

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ИССЛЕДОВАНИЙ И РАЗРАБОТКИ
ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ ИМ. М.П. ЧУМАКОВА РАН»
(ИНСТИТУТ ПОЛИОМИЕЛИТА)

На правах рукописи

Гордейчук Илья Владимирович

**Экспериментальная модель для оценки специфической активности
противовирусных вакцин на основе лабораторных приматов вида *Callithrix jacchus***

1.5.10. Вирусология

Диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН Ишмухаметов Айдар Айратович

Москва — 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	7
ГЛАВА 1. ОПТИМИЗАЦИЯ УСЛОВИЙ ДЛИТЕЛЬНОГО СОДЕРЖАНИЯ, РАЗВЕДЕНИЯ И МОНИТОРИНГА СОСТОЯНИЯ ЗДОРОВЬЯ ОБЫКНОВЕННЫХ ИГРУНОК В ВИРУСОЛОГИЧЕСКОЙ ЛАБОРАТОРИИ.....	18
1.1 Обзор литературы	18
1.2 Методы.....	21
1.2.1 Этические требования	21
1.2.2 Содержание и разведение обыкновенных игрунок в лабораторных условиях ..	22
1.2.3 Рацион питания	24
1.2.4 Процедура выхаживания детенышей.....	25
1.2.5 Условия проведения экспериментальных манипуляций	27
1.2.6 Оценка состояния здоровья животных в ходе эксперимента.....	28
1.2.7 Методики оценки гематологических и биохимических параметров крови.....	30
1.2.7.1 Методика подсчета лейкоцитов в камере Горяева.....	31
1.2.7.2 Методика подсчета эритроцитов в камере Горяева	31
1.2.7.3 Подсчет лейкоцитарной формулы	32
1.2.7.4 Биохимический анализ крови.....	32
1.2.8 Гистологическое описание поствакцинальных изменений в лимфоидных органах	33
1.2.9 Статистический анализ.....	34
1.3 Результаты	35
1.3.1 Разведение обыкновенных игрунок в лабораторных условиях	35
1.3.2 Определение оптимального возраста включения обыкновенных игрунок в эксперименты	37
1.3.3 Определение референсных значений гематологического и биохимического анализа крови	38
1.3.4 Исследование поствакцинальных изменений в структуре лимфоидных органов обыкновенных игрунок	41
1.4 Обсуждение	44
1.5 Заключение главы	48

ГЛАВА 2. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК ОЦЕНКИ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ПОСТВАКЦИНАЛЬНОГО Т-КЛЕТОЧНОГО И ЛОКАЛЬНОГО МУКОЗАЛЬНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ОБЫКНОВЕННЫХ ИГРУНОК	49
2.1 Обзор литературы	49
2.2 Методы.....	51
2.2.1 Лабораторные животные	51
2.2.2 Иммуноферментный анализ	52
2.2.3 Проточная цитофлуориметрия	53
2.2.4 Лимфопролиферативный тест	55
2.2.5 Статистический анализ	57
2.3 Результаты	57
2.3.1 Подбор клонов антител для детекции иммуноглобулинов класса А в образцах сыворотки крови, полученных от обыкновенных игрунок	57
2.3.2 Разработка методики оценки антиген-специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа у обыкновенных игрунок.....	58
2.4 Обсуждение	64
2.5 Заключение главы	67
ГЛАВА 3. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОБЫКНОВЕННЫХ ИГРУНОК В ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ БЕЗОПАСНОСТИ И СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ПРОФИЛАКТИЧЕСКИХ ВАКЦИН ПРОТИВ COVID-19	68
3.1 Обзор литературы	68
3.1.1 Характеристика возбудителя COVID-19.....	68
3.1.2 Применение лабораторных животных в доклинических исследованиях специфической активности вакцин против COVID-19.....	70
3.1.2.1 Оценка протективной активности кандидатных вакцин на лабораторных животных.....	71
3.1.2.2 Применение обыкновенных игрунок в доклинических исследованиях профилактических вакцин против заболеваний, вызываемых коронавирусами ...	73
3.2 Оценка безопасности и специфической активности инактивированной коронавирусной вакцины КовиВак на обыкновенных игрунках.....	76
3.2.1 Методы.....	76

3.2.1.1	Лабораторные животные и оценка общего состояния их здоровья	76
3.2.1.2	Иммунизация животных инактивированной цельновирионной очищенной сорбированной вакциной против COVID-19	76
3.2.1.3	Оценка гематологических и биохимических показателей крови в экспериментальной и контрольной группе.....	77
3.2.1.4	Определение уровня вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови	78
3.2.1.5	Статистический анализ	79
3.2.2	Результаты	80
3.2.2.1	Сравнительная оценка общего состояния здоровья, массы тела, температуры тела, биохимических и гематологических показателей крови животных в экспериментальных группах	80
3.2.2.2	Результаты оценки уровня вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 у обыкновенных игрунок, получивших вакцину КовиВак	88
3.2.3	Обсуждение	91
3.3	Изучение долгосрочного созревания иммунного ответа на внутримышечное и интраназальное введение аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 на обыкновенных игрунках	94
3.3.1	Методы.....	94
3.3.1.1	Лабораторные животные и оценка общего состояния их здоровья в ходе эксперимента.....	94
3.3.1.2	Иммунизация обыкновенных игрунок аденовирусной векторной вакциной против COVID-19 и получение образцов биоматериала.....	95
3.3.1.3	Исследование гематологических и биохимических показателей крови.....	96
3.3.1.4	Исследование напряженности специфического поствакцинального Т-клеточного иммунитета.....	96
3.3.1.5	Исследование уровня и аффинности специфических поствакцинальных антител в сыворотке крови и мазках из полости носа обыкновенных игрунок в иммуноферментном анализе	96
3.3.1.6	Исследование уровня вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови	98

3.3.1.7 Статистический анализ	99
3.3.2 Результаты	99
3.3.2.1 Сравнительная оценка общего состояния здоровья, массы тела, температуры тела, биохимических и гематологических показателей крови животных в экспериментальных группах	99
3.3.2.2 Результаты оценки уровня специфического Т-клеточного иммунного ответа на интраназальное и внутримышечное введение вакцины Спутник V.....	106
3.3.2.3 Результаты изучения динамики формирования специфического локального мукозального и центрального гуморального иммунного ответа на интраназальное и внутримышечное введение вакцины Спутник V обыкновенным игрункам	110
3.3.3 Обсуждение	119
3.4 Заключение главы	125
ГЛАВА 4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗЫВАЕМОЙ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА E, И ОЦЕНКА СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ КАНДИДАТНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА E НА ОБЫКНОВЕННЫХ ИГРУНКАХ.....	127
4.1 Обзор литературы	127
4.1.1 Характеристика возбудителя вирусного гепатита E	127
4.1.2 Потенциальные антигены для разработки вакцин против гепатита E	130
4.1.3 Кандидатные вакцины против гепатита E.....	132
4.1.4 Лабораторные <i>in vivo</i> модели инфекции, вызываемой вирусом гепатита E	133
4.2 Экспериментальное моделирование инфекции, вызываемой вирусом гепатита E, у обыкновенных игрунок	136
4.2.1 Методы.....	136
4.2.2 Результаты	138
4.3 Оценка специфической иммуногенности и протективной активности кандидатного вакцинного препарата против вирусного гепатита E.....	142
4.3.1 Методы.....	142
4.3.1.1 Дизайн консенсусной последовательности гена ORC2	142
4.3.1.2 Плазмиды.....	142
4.3.1.3 Используемые изоляты вируса гепатита E.....	143

4.3.1.4	Получение и очистка рекомбинантного белка	144
4.3.1.5	Анализ в SDS-ПААГ и вестерн-блоттинг	145
4.3.1.6	Просвечивающая электронная микроскопия.....	146
4.3.1.7	Лабораторные животные	146
4.3.1.8	Иммунизация, заражение и последующие процедуры	147
4.3.1.9	Выявление РНК ВГЕ	148
4.3.1.10	Определение анти-ВГЕ IgG в иммуноферментном анализе	149
4.3.1.11	Статистический анализ	149
4.3.2	Результаты	150
4.3.2.1	Консенсусная аминокислотная последовательность ОРС2 ВГЕ ГТЗ и дизайн иммуногена для кандидатного вакцинного препарата	150
4.3.2.2	Получение и очистка рекомбинантного бОРС2 р551	151
4.3.2.3	Оценка специфической иммуногенности и протективной активности р551 на модели обыкновенных игрунок	152
4.3.3	Обсуждение	158
4.4	Заключение главы	164
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	166
	ВЫВОДЫ.....	168
	ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	170
	ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	171
	БЛАГОДАРНОСТИ.....	172
	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	173
	СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	175

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Высокая скорость глобального распространения новых и возвращающихся вирусных патогенов требует наличия проверенных экспериментальных моделей и подготовленной инфраструктуры для проведения исследований эффективности и безопасности новых профилактических и терапевтических противовирусных препаратов в кратчайшие сроки.

В борьбе с пандемией коронавирусной инфекции 2019 года (COVID-19; 2020–2023 гг.) впервые были широко применены генетические и векторные вакцины, продемонстрировавшие высокую специфическую иммуногенность, а также возможность быстрого налаживания масштабного производства. Поскольку коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) преимущественно проникает в организм через эпителий верхних дыхательных путей, также был разработан ряд вакцин против COVID-19 с интраназальным введением, нацеленных на индукцию местного мукозального иммунитета во входных воротах инфекции.

Важнейшим отличием генетических и векторных вакцин от вакцин на основе инактивированных вирусов и рекомбинантных белков является синтез вакцинных антигенов в клетках вакцинируемых лиц, что обеспечивает адекватные посттрансляционные модификации синтезируемых белков, а также их презентацию в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) как II, так и I класса. Это обеспечивает эффективную активацию как гуморального, так и Т-клеточного адаптивного иммунного ответа, в то время как антигены, доставленные в форме рекомбинантного белка, обычно индуцируют преимущественно антительный ответ. Таким образом, исследования специфической активности вакцин нового поколения на доклиническом этапе требуют наличия хорошо охарактеризованных лабораторных моделей для адекватной оценки уровня активации всех звеньев поствакцинального адаптивного иммунитета, включая локальный мукозальный, системный гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ.

Для вирусных инфекционных заболеваний, поражающих людей, приматы являются наиболее адекватной моделью, позволяющей воспроизводить все этапы развития инфекции, включая путь заражения, места репродукции вируса, а также особенности развития заболевания и формирования всех звеньев иммунного ответа. В настоящее время лабораторное моделирование вирусных инфекций, а также завершающие этапы доклинических исследований терапевтических и профилактических противовирусных препаратов в основном проводятся на крупных приматах: зеленых мартышках, макаках-резусах и т. д. По причине их крупного размера и этологических особенностей, длительное содержание крупных приматов в лабораториях, оборудованных для работы с патогенами, связано с крайне высокими затратами. Кроме того, приматы, содержащиеся в открытых питомниках, перед использованием в лаборатории требуют длительной акклиматизации и обследования, исключающего наличие сопутствующих заболеваний, способных оказывать влияние на достоверность получаемых результатов.

Таким образом, разработка новых экспериментальных моделей для изучения патогенеза вирусных инфекций, а также исследования специфической активности противовирусных вакцин с применением видов приматов, подходящих для длительного содержания в лабораторных условиях, представляет собой актуальную цель.

Степень разработанности темы исследования

Обыкновенные игрунки (ОИ, *Callithrix jacchus*) — вид приматов Нового Света, обладающий высоким потенциалом применения в доклинических исследованиях специфической активности и безопасности вакцин и других иммунобиологических препаратов благодаря анатомической и физиологической близости к человеку, а также малым размерам (350–400 г), позволяющим постоянно содержать большое количество животных в контролируемых лабораторных условиях. При этом экспериментальная работа с ОИ технически значительно менее сложна, и, соответственно, представляет меньшую опасность для лабораторного персонала, чем работа с крупными приматами.

Вместе с тем, для широкого применения ОИ в доклинических исследованиях противовирусных вакцин требуется оценка их восприимчивости к возбудителям соответствующих заболеваний, оптимизация условий длительного содержания и разведения в лабораторных условиях, разработка методик инструментальной оценки состояния здоровья в ходе эксперимента, а также разработка методик оценки уровня активации специфического локального мукозального, системного гуморального и Т-клеточного адаптивного иммунитета, формируемого в ходе вирусных инфекций и в результате применения профилактических и терапевтических противовирусных препаратов.

Цель работы

Разработать и охарактеризовать экспериментальную модель для оценки специфической активности противовирусных вакцин на основе приматов вида обыкновенная игрунка (*Callithrix jacchus*), родившихся и постоянно содержащихся в лабораторных условиях.

Задачи

1. Установить референсные значения основных гематологических и биохимических показателей крови лабораторных обыкновенных игрунок, оцениваемых при проведении доклинических исследований противовирусных вакцин.
2. Провести гистологическую характеристику лимфоидных органов лабораторных обыкновенных игрунок в норме, а также в ходе формирования поствакцинального иммунного ответа.
3. Разработать методики комплексной оценки специфического поствакцинального локального мукозального, системного гуморального и Т-клеточного адаптивного иммунного ответа у обыкновенных игрунок.
4. Исследовать параметры специфической активности и безопасности инактивированной цельновирионной коронавирусной вакцины КовиВак, а также интраназальной и внутримышечной формы аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 Спутник V на лабораторных обыкновенных игрунках.

5. Исследовать долгосрочное созревание иммунитета, сформированного в результате внутримышечного или интраназального введения лабораторным обыкновенным игрункам аденовирусной векторной вакцины против COVID-19.
6. Оценить восприимчивость обыкновенных игрунок к заражению вирусом гепатита E генотипов 1 и 3.
7. Провести оценку протективной активности кандидатного вакцинного препарата на основе рекомбинантного капсидного белка вируса гепатита E в эксперименте с заражением лабораторных обыкновенных игрунок вирусом гепатита E.

Научная новизна работы

1. Впервые в эксперименте на лабораторных ОИ протяженностью более двух лет описано долгосрочное созревание аффинности и кросс-вариантной вируснейтрализующей активности специфических поствакцинальных антител, индуцированных в результате внутримышечного введения аденовирусной векторной вакцины против COVID-19.
2. Впервые проведена оценка влияния пути введения аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 на эффективность созревания аффинности специфических поствакцинальных антител у лабораторных ОИ.
3. Впервые в эксперименте с детекцией репликативной формы вирусного генома проведено исследование локализации репликации генома вируса гепатита E в организме ОИ.
4. Впервые проведена оценка восприимчивости ОИ к генотипу 3 вируса гепатита E.
5. Впервые с использованием лабораторных ОИ проведена оценка протективной активности кандидатного вакцинного препарата против вирусного гепатита E при экспериментальном заражении вирусом гепатита E генотипов 1 и 3.
6. Впервые с использованием проточной цитофлуориметрии проведен анализ возрастных изменений субпопуляционного состава и степени созревания лимфоцитов периферической крови ОИ.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты работы расширяют представления о физиологии иммунной системы ОИ, в частности о закономерностях формирования локального мукозального, системного гуморального и Т-клеточного противовирусного иммунитета, а также дополняют представления о долгосрочном созревании поствакцинального адаптивного иммунного ответа у приматов. Кроме того, в ходе работы решен ряд практических задач: стандартизованы условия длительного содержания и мониторинга состояния здоровья ОИ в лабораторных условиях; установлены средний возраст самок ОИ на момент первых родов, средний интервал между родами, выживаемость детенышей и минимальный возраст включения животных в эксперименты, что в совокупности позволяет проводить долгосрочное планирование динамики нарастания численности колонии ОИ в зависимости от экспериментальных задач; установлены референсные значения основных гематологических и биохимических показателей крови лабораторных ОИ, оцениваемых при проведении доклинических исследований противовирусных вакцин; проведена гистологическая характеристика лимфоидных органов ОИ в норме и в ходе формирования постинфекционного и поствакцинального иммунного ответа, показавшая высокий уровень сходства иммунной системы ОИ с человеческой; подобран клон антител для детекции IgA в биоматериале, полученном от ОИ, а также клоны флуоресцентно меченных антител, необходимых для дифференциации субпопуляций лимфоцитов ОИ и оценки уровня их созревания и активации; разработаны методики комплексной оценки специфического поствакцинального локального мукозального, системного гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у ОИ, а также методики оценки протективной активности кандидатных вакцин против вирусного гепатита E на модели ОИ.

Таким образом, в ходе проведенных работ была проведена разработка и комплексная характеристика удобной и доступной лабораторной приматной модели для изучения специфической активности противовирусных вакцин.

Методология и методы исследования

Диссертационное исследование планировалось согласно анализу литературных данных, поставленной цели и сформулированным задачам. Объектом исследования

служили лабораторные приматы вида обыкновенная игрунка (*Callithrix jacchus*), используемые для лабораторного моделирования вирусных инфекций и в доклинических исследованиях специфической активности противовирусных вакцин. Была проведена многоплановая характеристика релевантных биологических свойств ОИ, включая характеристику их иммунной системы, после чего полученные данные были использованы в ходе проведения доклинических исследований специфической активности и безопасности трех кандидатных противовирусных вакцин: инактивированной и аденовирусной векторной вакцин против COVID-19 и рекомбинантного кандидатного вакцинного препарата против вирусного гепатита Е. По типу построения и дизайну проведенные исследования специфической активности и безопасности кандидатных вакцинных препаратов относились к проспективным рандомизированным. Общая продолжительность описываемых работ составила более 10 лет.

В ходе работы были использованы клинические методы (термометрия, измерение массы тела, гематологический и биохимический анализ крови, оценка общего состояния здоровья животных, получение биоматериала и т.д.), методы иммунологии (иммуноферментный анализ, проточная цитометрия, лимфопротлиферативный тест), вирусологические методы (выделение вируса из биологического материала, амплификация участков вирусного генома с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), оценка титра вируснейтрализующих антител в сыворотке крови животных на культуре клеток и т.д.), методы молекулярной биологии (молекулярное клонирование, получение и очистка рекомбинантного белка, геномное секвенирование) и статистический анализ данных.

Протоколы всех исследований с применением лабораторных животных были одобрены Этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная и охарактеризованная экспериментальная модель на основе обыкновенных игрунок, родившихся и постоянно содержащихся в лабораторных условиях, позволяет проводить комплексную оценку специфической активности кандидатных противовирусных вакцин.
2. С использованием разработанной модели на основе лабораторных обыкновенных игрунок получены подтверждения безопасности и специфической активности (индукция специфических вируснейтрализующих антител) инактивированной цельновиральной коронавирусной вакцины против COVID-19 КовиВак.
3. С использованием разработанной модели на основе лабораторных обыкновенных игрунок получены подтверждения безопасности и специфической активности (индукция специфических IgG, вируснейтрализующих антител, специфического Т-клеточного и локального мукозального иммунного ответа) интраназальной и внутримышечной формы аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 Спутник V.
4. Как интраназальное, так и внутримышечное введение аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 Спутник-V приводит к выработке у обыкновенных игрунок специфических поствакцинальных антител и последующему созреванию их аффинности. При этом внутримышечное введение вакцины приводит к непрерывному повышению авидности и кросс-вариантной вируснейтрализующей активности поствакцинальных антител в отношении возникающих вариантов SARS-CoV-2 в течение более двух лет.
5. Обыкновенные игрушки представляют собой адекватную лабораторную модель для оценки протективной активности кандидатных вакцин против вирусного гепатита E. Обыкновенные игрушки восприимчивы к генотипам 1 и 3 вируса гепатита E, при этом репродукция вируса происходит в печени и вызывает повышение уровня биохимических маркеров поражения печени, а в фекалиях животных выявляется вирусная РНК. На модели обыкновенных игрунок показана протективная активность кандидатного вакцинного препарата на основе рекомбинантного фрагмента капсидного белка вируса гепатита E в отношении гомологичного и гетерологичного генотипов вируса.

Личное участие автора в получении результатов

Автором лично проведены: анализ литературных источников, постановка цели и задач, планирование, подготовка протоколов экспериментов, манипуляции с лабораторными животными, экспериментальное заражение животных, сбор и обработка биоматериала, экспериментальная работа *in vitro* (выделение и культивирование субпопуляций клеток крови животных), получение и обработка данных инструментальных исследований (ПЦР, проточная цитометрия и т. д.), статистический анализ данных, подготовка отчетов и подготовка материалов к публикации. Ветеринарное обслуживание и уход за лабораторными приматами осуществлялись сотрудниками лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) под руководством автора. Текст диссертации написан автором лично.

Упомянутые в тексте диссертации гистологические исследования, иммуноферментный анализ, культивирование клеток ОИ и оценка уровня вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 проведены сотрудниками ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) и ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в соответствии с планами, разработанными автором, что отдельно указано в каждой главе в разделах, описывающих соответствующие методы.

Внедрение результатов исследования

Описанная в диссертации модель ОИ, родившихся и постоянно содержащихся в лабораторных условиях, а также разработанные методики оценки специфического поствакцинального адаптивного иммунного ответа активно использовалась в ходе доклинических исследований вакцин против COVID-19, разработанных в России, включая исследования безопасности и специфической активности инактивированной β -пропиолактоном цельновирионной вакцины КовиВак, разработанной в ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), а также аденовирусной векторной вакцины Спутник V, разработанной в ФГБУ «НИЦЭМ им.

Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Полученные данные вошли в состав регистрационных досье и в совокупности с данными, полученными на лабораторных грызунах и кроликах, позволили обосновать возможность перехода к I–II фазе клинических исследований упомянутых вакцин.

Материалы диссертации используются при проведении лекций и практических занятий с обучающимися на Кафедре организации и технологии производства иммунобиологических препаратов Института трансляционной медицины и биотехнологии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) в рамках трех курсов: «Основы работы с лабораторными животными», «Методы оценки эффективности и безопасности иммунобиологических препаратов» и «Введение в разработку иммунобиологических препаратов».

Степень достоверности и апробация полученных результатов

Достоверность полученных результатов обусловлена тщательным планированием, адекватной характеристикой животных перед включением в эксперименты, рандомизацией, использованием точных методик оценки уровня исследуемых параметров, наличием адекватных контрольных групп и применением адекватных методов статистического анализа.

Результаты исследований по теме диссертации доложены автором и обсуждены на российских и международных научно-практических конференциях, включая: секционный устный доклад «Применение лабораторных приматов вида *Callithrix jacchus* в оценке специфической активности биопрепаратов на доклиническом этапе» на XI Петербургском международном онкологическом форуме «Белые ночи 2025», прошедшем в 2025 г. в г. Санкт-Петербурге, Россия; секционный устный доклад «Применение приматов вида *Callithrix jacchus* для исследования долгосрочного созревания поствакцинального иммунного ответа» на Международной научной конференции GLP-PLANET VI, прошедшей в 2025 г. в г. Санкт-Петербурге, Россия; секционный устный доклад «Разработка кандидатного вакцинного препарата против вирусного гепатита E с кросс-генотипической протективностью» на XIV всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Вирусные гепатиты — достижения и новые перспективы», прошедшей в 2024 г. в

г. Москве, Россия; секционный устный доклад «Как сделать новую вакцину. От фундаментальной идеи к препарату» на секции «Генетика и нанобиотехнологии» 66-й Всероссийской научной конференции МФТИ, прошедшей в 2024 г. в г. Долгопрудном, Россия; пленарный устный доклад «Maturation of antibody affinity and cross-variant neutralization 2,5 years after intranasal or intramuscular immunization of nonhuman primates with vector-based COVID-19 vaccine Sputnik V» на международной конференции Virology Africa, прошедшей в 2024 г. в г. Стелленбош, ЮАР; секционный устный доклад «Модели для изучения эффективности и безопасности профилактических вакцин против COVID-19» на Международной научной конференции GLP-PLANET III, прошедшей в 2022 г. в г. Санкт-Петербурге, Россия; секционный устный доклад «Marmoset model for vaccine research, immune characteristics» на Международной конференции «Перспективные технологии в вакцинации и иммунотерапии 2020», прошедшей в 2020 г. онлайн; секционный устный доклад «Immunological Characteristics of Common Marmosets as a Primate Model for Preclinical Testing of Immunobiological Drugs» на Международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития. Науки о жизни», прошедшем в 2019 г. в г. Москве, Россия; стендовый доклад «Protectivity of the experimental recombinant vaccine against hepatitis E and two-year follow-up of the antibody response after immunization and viral challenge in nonhuman primates» на Ежегодном конгрессе Международного вакцинного общества, прошедшем в 2019 г. в г. Генте, Бельгия; стендовый доклад «Toolkit for monitoring of immunogen expression and adaptive cellular response in common marmosets following intradermal DNA immunization with electroporation» на Ежегодном конгрессе Международного вакцинного общества, прошедшем в 2018 г. в г. Атланте, США; секционный устный доклад «Опыт моделирования вирусных гепатитов на мармозетах обыкновенных (*Callithrix jacchus*)» на III международной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицинской приматологии», прошедшей в 2016 г. в г. Сочи, Россия и стендовый доклад «Steps towards the development of hepatitis E vaccine» на Международной конференции Mucosal Vaccines, Adjuvants and Delivery 2016, прошедшей в 2016 г. в г. Лозанне, Швейцария.

Апробация диссертации состоялась 3 декабря 2025 г. на заседании Научной экспертной комиссии ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (протокол №15 от 3 декабря 2025 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 6, 7 и 11 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертационного исследования опубликовано 17 печатных работ, индексируемых в международных базах Web of Science и Scopus, из них 13 — входящих в перечень рецензируемых научных изданий рекомендованных ВАК для публикаций основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, глава в монографии — 1.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 203 страницах машинописного текста и состоит из введения, 4-х логически завершенных глав, каждая из которых содержит отдельное введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты собственных исследований, обсуждение полученных результатов и заключение. Диссертация также содержит выводы, практические рекомендации, перспективы дальнейшей разработки темы, благодарности, список сокращений и условных обозначений и список литературы, включающий 21 отечественный и 239 зарубежных источников. Диссертационная работа иллюстрирована 19 таблицами и 28 рисунками.

ГЛАВА 1. Оптимизация условий длительного содержания, разведения и мониторинга состояния здоровья обыкновенных игрунок в вирусологической лаборатории

В данной главе описаны результаты работ, которые были направлены на решение ряда актуальных задач. Во-первых, за последние годы потребность в лабораторных приматах для биомедицинских исследований в России значительно выросла, что обусловило необходимость получения эмпирических данных о реально достижимой динамике роста численности колонии ОИ, содержащихся в лабораторных условиях, для планирования программы разведения в среднесрочной и долгосрочной перспективе. Во-вторых, поскольку одной из наиболее важных областей применения ОИ являются доклинические исследования специфической активности и безопасности иммунобиологических препаратов, актуальной задачей представлялось получение референсных значений основных гематологических и биохимических показателей крови лабораторных ОИ, оцениваемых при проведении доклинических исследований противовирусных вакцин, а также гистологическая характеристика лимфоидных органов ОИ в норме и в ходе формирования постинфекционного и поствакцинального иммунного ответа.

1.1 Обзор литературы

В настоящее время завершающие этапы доклинических исследований эффективности и безопасности противовирусных вакцин в основном проводятся на приматах Старого Света: макаках-резусах (*Macaca mulatta*), яванских макаках (*Macaca fascicularis*) и зеленых мартышках (*Chlorocebus sabaues*). Благодаря филогенетической близости к человеку, организм обезьян обладает значительным анатомическим и физиологическим сходством с человеческим, что обеспечивает их восприимчивость ко многим вирусам, вызывающим заболевания у людей. Кроме того, многие диагностические тест-системы и наборы реагентов, применяемые для работы с биоматериалом, полученным от людей, также подходят для работы с биоматериалом, полученным от обезьян, что дополнительно повышает трансляционный потенциал получаемых данных [1].

Наряду с описанными выше преимуществами, использование приматов Старого Света в биомедицинских исследованиях связано с рядом ограничений. Во-первых, постоянное содержание большого количества крупных приматов в экспериментальных лабораториях, оборудованных для работы с патогенными биологическими агентами (ПБА), связано с этическими ограничениями и крайне высокими затратами, а животные, содержащиеся в открытых питомниках, перед использованием в экспериментах нуждаются в длительной акклиматизации и обследовании, исключающем наличие сопутствующей патологии. Во-вторых, у человека геномная область, кодирующая гены главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I, включает одну копию генов человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA)-A, HLA-B и HLA-C на хромосому (гаплотип), тогда как у разных видов обезьян количество генов МНС класса I, присутствующих в гаплотипе, может существенно различаться. Так, у макак-резусов наблюдается большее число генов МНС класса I A и B, а эквивалент гена C отсутствует. Значительно более высокая, чем у людей, вариабельность генов МНС класса I в ряде случаев требует проведения генотипирования животных перед включением в эксперименты с исследованием поствакцинального адаптивного иммунного ответа или значительного увеличения численности экспериментальных групп, дополнительно повышая стоимость исследований [2].

Обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*, ОИ) — вид приматов Нового Света, применяемый во многих областях биомедицинских исследований, включая репродуктивную биологию, когнитивные исследования, изучение аутоиммунных заболеваний, онкологию, токсикологию и инфектологию [3]. ОИ как биологический вид обладают рядом преимуществ, обуславливающих их применимость в биомедицинских исследованиях (Рисунок 1, адаптировано из обзорной статьи, опубликованной диссертантом и соавт.). К таким характеристикам относятся филогенетическая близость к человеку, небольшая масса тела (300–500 г) и относительная простота содержания и разведения в лабораторных условиях [4]. В отличие от большинства других видов приматов, у ОИ наблюдается высокая частота рождения двух и более близнецов [5]. Это, в частности, позволило нам использовать близнецовый дизайн исследования в ходе испытаний протективной активности

кандидатного вакцинного препарата против вирусного гепатита E [6], описываемых в Главе 4, и тем самым повысить достоверность результатов сравнения исследуемых показателей в экспериментальных группах. Также уникальной особенностью представителей семейства Игрунковые (Callitrichidae; ОИ и тамарины) является способность производить полизиготных близнецов с гематопозитическим химеризмом, обусловленным формированием хорионной полости на ранних стадиях развития эмбрионов (30 сутки беременности) и установлением сосудистого анастомоза с последующим обменом стволовыми клетками между близнецами [7].



Рисунок 1 — Области применения обыкновенных игрунок в биомедицинских исследованиях (адаптировано из статьи Е. Баюровой и соавт. [8])

Важной видовой особенностью ОИ является минимальное разнообразие локусов МНС как I, так и II класса [9–11], что способствует получению высоко воспроизводимых результатов оценки показателей поствакцинального и постинфекционного адаптивного иммунного ответа. Кроме того, нами, а также другими научными группами было показано, что ряд коммерчески доступных моноклональных антител, используемых для дифференцировки субпопуляций человеческих иммунных клеток методом проточной цитометрии, перекрестно реагируют с ортологичными антигенами ОИ [12–15], что позволяет применять при работе с ОИ хорошо описанные иммунологические методики и реактивы, используемые при работе с биоматериалом, полученным от людей. Подробные

характеристики иммунной системы ОИ, а также результаты работ, направленных на разработку методик оценки специфического поствакцинального адаптивного иммунного ответа у ОИ, приведены в Главе 2.

ОИ восприимчивы ко многим вирусным, протозойным и бактериальным патогенам человека [16], включая вирус желтой лихорадки, вирус Эпштейна-Барр и другие герпесвирусы, вирус гепатита А, вирус Хунин, вирус кори [17], вирус Ласса [18], вирус Зика [19] и др. При этом работа с патогенами при использовании ОИ технически значительно менее сложна, и, соответственно, представляет меньшую опасность для персонала, чем работа с крупными приматами. Кроме того, наличие данных расшифровки генома ОИ позволяет использовать их в исследованиях генотерапевтических препаратов нового поколения, а также получать трансгенных животных [20].

В сочетании с приведенными в Главе 2 методиками оценки локального мукозального, системного гуморального и Т-клеточного адаптивного иммунного ответа, описанные выше характеристики делают ОИ оптимальной моделью для исследований безопасности и специфической активности противовирусных вакцин на завершающих этапах доклинических исследований. Тем не менее, широкое экспериментальное применение ОИ в данной области требовало решения ряда задач, включая разработку и стандартизацию условий их длительного лабораторного содержания, определение референсных значений биохимических и гематологических показателей крови, а также функциональную и морфологическую характеристику органов иммунной системы.

1.2 Методы

1.2.1 Этические требования

Протоколы всех описанных в диссертации экспериментов на приматах были одобрены Этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (протоколы №2 от 6.04.2015 г., №5 от 11.03.2016 г., № 110520-1 от 11.05.2020 г., № 140720-1 от 14.07.2020 г. и № 141021-2 от 14.10.2021 г.).

1.2.2 Содержание и разведение обыкновенных игрунок в лабораторных условиях

Первой из задач, требовавших решения в ходе создания самовоспроизводящейся колонии приматов для вирусологических и токсикологических исследований, было проектирование помещений для длительного лабораторного содержания ОИ в соответствии как с этологическими потребностями вида, так и с регуляторными требованиями в области работы с ПБА.

Автор выражает благодарность сотрудникам ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита): д.м.н. Ю.К. Новодержкиной, С.Е. Соцковой и С.Ю. Лютой, принимавшим непосредственное участие в работе по проектированию лабораторных помещений, результаты которой были опубликованы в журнале Медицинская вирусология [21] в соавторстве с диссертантом.

Лаборатория моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян (Лаборатория) ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) оборудована для работы с возбудителями инфекционных заболеваний человека и животных и генно-инженерно-модифицированными организмами III и IV групп патогенности в соответствии с требованиями СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Животные содержались в Лаборатории в соответствии с требованиями к условиям содержания лабораторных приматов: ГОСТ 33218-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными», Рекомендацией Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. №33 «О Руководстве по работе с лабораторными (экспериментальными) животными при проведении доклинических (неклинических) исследований» и Директивой Европейского парламента и Совета Европейского Союза 2010/63/ЕС от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Помещения Лаборатории включали зону разведения и экспериментальную зону с разделенными потоками перемещения персонала и материалов. Система автоматической вентиляции и кондиционирования круглогодично обеспечивала температуру воздуха от +24 °С до +30 °С, влажность на уровне 50–60% и содержала два независимых контура, исключающих возможность смешивания воздушных

потоков и попадания инфекционных агентов из экспериментальной зоны в зону разведения. Воздух, поступавший как в зону разведения, так и в экспериментальную зону, очищался трехступенчатой системой фильтрации, включавшей два набора фильтров грубой очистки с коэффициентами эффективности 90% и 95% и фильтры высокой очистки (HEPA), расположенные непосредственно в выводах вентиляции. В помещениях для содержания ОИ обеспечивался ежечасный десятикратный воздухообмен.

Комнаты зоны разведения были оснащены окнами для естественной инсоляции, а также лампами дневного света с круглогодичным ежедневным включением в 7:00 и отключением в 17:00.

В зоне разведения ОИ содержались семейными группами в малошумных вольерах (Triol, Россия) размером 810×470×1760 мм (Д×Г×В) с вертикальными эмалированными прутьями, расположенными на расстоянии 8 мм, обеспечивавшими естественных хват при перемещении животных. Спальные домики размерами 300×200×200 мм (Д×Г×В) располагались в каждом вольере в количестве двух штук. Каждый спальный домик имел два входных отверстия диаметром 150 мм, обеспечивавших возможность перемещения взрослых ОИ с детенышами на спине. Наличие двух входных отверстий было обусловлено необходимостью свободного выхода животного из спального домика в случае агрессивного поведения со стороны других ОИ, содержащихся в том же вольере.

Дополнительный локальный обогрев животных осуществлялся установленными на расстоянии 1 м напротив каждого вольера лампами инфракрасного света (ЭРА, Россия) мощностью 250 Вт, включавшимися ежедневно на 1 час.

Повышение разнообразия поведенческой активности животных в вольерах при длительном лабораторном содержании обеспечивалось ветеринарным врачом в соответствии с циклической схемой изменения расположения компонентов обогащения среды внутри вольеров. Элементы обогащения среды обитания были направлены на повышение разнообразия поведения и путей перемещения (звонки, зеркала, ветви, подвесы, качели-гамаки и перекладины) и усложнение доступа к пище (кормушки с отверстиями, располагаемые в различных зонах вольера). К однообразному расположению элементов обогащения среды приматы привыкают и

теряют интерес в течение 3–5 суток, что впоследствии может приводить к стереотипиям и повышению уровня агрессии внутри группы.

Семейные группы ОИ включали пару взрослых животных с двумя поколениями их потомства: новорожденными детенышами, требовавшими грудного вскармливания и переноса, и детьми из предыдущего помета, участвовавшими в переносе детенышей вне периодов кормления. Таким образом, общая численность животных на один вольер в условиях разведения могла достигать шести–семи. В возрасте 10–13 месяцев взрослые детеныши отсаживались в отдельные вольеры для неполовозрелых животных. Новые семейные пары составлялись из ОИ в возрасте не менее 18 месяцев с последующим наблюдением с целью оценки индивидуальной совместимости животных в паре. Возможными признаками несовместимости в паре могли быть затруднение доступа одного из животных к пище или спальным домикам и общая агрессивность. В случае отсутствия беременности у самки в течение года пара разделялась с последующим подбором новых партнеров.

1.2.3 Рацион питания

Длительное содержание ОИ в условиях экспериментальной лаборатории требовало тщательного планирования рациона питания для поддержания роста, развития и здоровья животных. Одним из важнейших факторов при разработке рациона ОИ являлась крайне высокая потребность вида в витамине D. Ранее было показано, что ОИ не усваивают D₂ (эргокальциферол) [22], поэтому в их рацион необходимо включать D₃ (холекальциферол). Следствием дефицита витамина D у ОИ может являться нарушение метаболизма кальция, приводящее к нарушению роста и формирования костей. В неволе недостаток витамина D₃ может быть связан как с недостатком воздействия света ультрафиолетового спектра в условиях лабораторного содержания, так и с индивидуальными особенностями усвоения питательных веществ в кишечнике [23].

Энергетическая ценность рациона, использовавшегося в Лаборатории, составляла 140 ккал в сутки на взрослое животное массой 350–450 г, при этом 18–24% составлял белок, получаемый из отварного куриного мяса, яиц, гречневой каши, овсяной каши и творожной запеканки. Рацион ежедневно дополняли 360 МЕ витамина D₃ на одно

животное, глюконатом кальция и витаминным комплексом. Раздачу кормов производили дважды в день.

Разборные автоклавируемые капельные поилки объемом 100 мл с питьевой водой, соответствовавшей ГОСТ Р 51232-98, закрепляли на стенках верхнего уровня каждого вольера. Смену воды производили ежедневно. Очистку поддонов вольеров от остатков пищи производили ежедневно до утренней раздачи кормов и после полудня по мере загрязнения. Биологические отходы, получаемые в экспериментальной зоне, обеззараживали автоклавированием.

1.2.4 Процедура выхаживания детенышей

Большинство родов у ОИ происходило ночью, при этом поведение детеныша сразу после родов имело решающее значение для его выживания. Здоровые детеныши сразу же перемещались вверх по телу самки, зацепляясь за шерсть. Обнаружение новорожденных детенышей на полу клетки, как правило, свидетельствовало о полном отказе самки от ухода. В случае отказа самки от здорового детеныша, он мог быть передан на вскармливание другой самке, у которой роды произошли в предшествующие три недели. Процедура обычно заключалась в перемещении детеныша в домик приемной самки с предварительной маркировкой ее мочой и в большинстве случаев проходила успешно.

Для полноценного искусственного вскармливания в случае отказа самки от ухода или слабости новорожденного детеныши отлучались от группы уже через несколько часов после рождения и помещались в инкубатор с покрытой искусственным мехом грелкой температурой 37 °С. В качестве дополнительного источника обогрева использовалась инфракрасная лампа, выставленная на достаточном расстоянии, чтобы не вызывать перегрева и обезвоживания детенышей (Рисунок 2А). Наибольшее влияние на неонатальную выживаемость оказывал режим кормления и нормальная дефекация в первые трое суток.

Молоко ОИ схоже по составу с молоком других приматов, содержит около 14% сухого вещества и имеет энергетическую ценность 0,76 ккал/г [24]. Хотя молоко ОИ содержит больше белка, чем молоко других приматов (2,7% против 1,7%),

коммерческие молочные смеси, применяемые для людей, могут быть успешно использованы для вскармливания детенышей ОИ.



Рисунок 2 — Выхаживание и искусственное вскармливание новорожденных детенышей обыкновенных игрунок. Дополнительный обогрев шестидневных детенышей ИК лампой (А). Вскармливание 55-дневного детеныша молочной смесью (Б)

Первое кормление новорожденных детенышей производилось из шприца 10% раствором глюкозы в объеме 0,05–0,1 мл. Для исключения возможности аспирации жидкости необходимо было удерживать детеныша в вертикальном положении при кормлении. Второе и последующие кормления в первые сутки производили коммерческими молочными смесями для новорожденных (NAN-1, Nestle, Швейцария) с интервалом в два часа. Каждую порцию смеси готовили непосредственно перед кормлением. Начиная со второй недели детенышам дважды в неделю в молочную смесь добавляли по 1 капле масляного раствора D3 (1000 Ед. в неделю). Увеличение объема употребляемой смеси за одно кормление производили по мере прироста массы тела и аппетита. Сигналом насыщения детеныша служило отворачивание головы в сторону. Каждое кормление заканчивалось проведением массажа в направлении от груди к нижним отделам живота с использованием ватного тампона, смоченного теплой водой. Смоченные в теплой воде тампоны также использовали для обработки рта, гениталий и ануса. Эти меры были необходимы для поддержания гигиены кожных покровов, стимуляции регионального кровообращения, мочеиспускания и дефекации. На 5–6 сутки жизни в качестве дополнения к смеси в рацион вводили жидкую

молочную кашу из перемолотой овсяной крупы. Норму потребления каши ежедневно корректировали и увеличивали по мере набора массы тела детенышем. Со второй недели кормление проводили через миниатюрную силиконовую соску с микроотверстиями (Рисунок 2Б). С третьей недели в рацион вводили куриный желток, пюре банана, яблока и груши. На 55–56 сутки жизни детенышей перемещали во взрослые вольеры и переводили на общий рацион питания.

1.2.5 Условия проведения экспериментальных манипуляций

Все манипуляции с ОИ проводили ветеринарные врачи либо научные сотрудники, прошедшие специализированное обучение работе с лабораторными приматами.

Экспериментальные процедуры с животными проводили в боксе микробиологической безопасности 2 класса типа А в исполнении *vis-a-vis* (LAMSYSTEMS, Россия), установленном в операционной, оборудованной для проведения всех видов процедур от получения биоматериала и введения экспериментальных препаратов до хирургических вмешательств и *in vivo* визуализации биолюминесценции от репортерных молекул.

В ходе проведения экспериментальных манипуляций анестезию обеспечивали путем подачи животному через полнолицевую маску потока воздушно-газовой смеси, содержащей 4% изофлурана для индукции и 2% для поддержания наркоза с использованием прибора 410AP Anesthesia Unit (Univentor, Мальта). Мониторинг артериального давления, оксигенации, электрокардиограммы и частоты сердечных сокращений во время анестезии производили с помощью монитора МЛ-750 VET (Микролюкс, Россия). Кроме того, мониторинг сердечного ритма проводился ветеринарным врачом с использованием цифрового стетоскопа Littmann 3200 (3M, США) в режиме усиления звуков в диапазоне 20–1000 Гц с акцентом на низком частотном диапазоне 20–200 Гц с 24-кратным усилением звука и фильтрацией посторонних шумов. Наиболее четкое прослушивание было установлено в области проекции митрального клапана в левом пятом межреберье.

Идентификацию животных в экспериментах проводили с использованием подкожных радиочипов стандарта ISO 11784 и 1178 (LifeChip, Destron Fearing, США) в капсулах из биосовместимого стекла с антимиграционным покрытием. Капсула,

введенная подкожно в область холки с соблюдением мер антисептики, имела пассивный транспондер, хранивший и передававший на сканер микрочипов уникальный 15-значный номер. Микрочип являлся энергетически пассивным устройством без источника питания, что обеспечивало возможность его использования в течение всей жизни животного.

Определение массы тела ОИ проводили с помощью электронных весов Pioneer PA4102 (Ohaus, США). Определение температуры тела животных проводили не чаще двух раз в неделю ректально на постоянной глубине 2 см с помощью электронного термометра DT-622 (A&D Company, Япония).

Все экспериментальные манипуляции с приматами проводили в операционной при исключении визуального и аудиального контакта животного, находившегося в эксперименте, с другими животными.

1.2.6 Оценка состояния здоровья животных в ходе эксперимента

Оценку общего состояния здоровья ОИ ежедневно проводили ветеринарные врачи Лаборатории, ее результаты фиксировали в Карте наблюдения за животными (Таблица 1). Параметры, оцениваемые в ходе осмотра, а также значимость таких изменений в баллах были оптимизированы для ОИ в соответствии с этологическими характеристиками данного вида приматов.

Таблица 1 — Карта наблюдения за животными

Группы показателей	Состояние животного	Баллы тяжести	Результат наблюдения (проставить балл)
Расположение в вольере	Норма	0	
	Прячется в верхних углах вольера	1	
	Не выходит из домика	3	
Двигательная активность, темперамент	Норма	0	
	Повышенная активность	1	
	Повышенная агрессивность	1	
	Пониженная активность	1	
	Атаксия, неврологические симптомы (тремор, изменение положения головы, стереотипичные движения)	5	
	Нежелание двигаться, опора на клетку, сложность в доступе к воде и пище, судороги	10	

	Положение на дне клетки/домика с минимальной реакцией на раздражители, кома	15	
Поза	Норма	0	
	Опора не на все конечности	5	
	Сидит, поджав хвост	2	
	Травмы конечностей (в зависимости от выраженности)	1–10	
Потребление пищи и воды	Норма (1–2 мл воды в сутки, полный рацион)	0	
	Умеренно сниженное потребление (не потребляет корм между кормлениями)	1	
	Среднее снижение потребления пищи (потребляет менее половины рациона в сутки)	3	
	Полная потеря аппетита	5	
	Умеренное снижение потребления воды (менее 1 мл/сутки)	1	
	Полный отказ от воды	10	
	Умеренное повышение потребления воды (более 2 мл/сутки)	1	
	Выраженное повышение потребления воды	4	
Дефекация и мочеиспускание	Норма	0	
	Уменьшение объема фекалий, сухость фекалий, диарея, обесцвеченные фекалии, уменьшение объема мочи и ее обесцвечивание	3	
	Отсутствие фекалий	8	
	Анурия, кровь в фекалиях или моче	10	
Кожа и шерсть	Норма	0	
	Растрепанная шерсть, выпадение шерсти, неухоженный внешний вид	3	
	Сыпь, покраснение, желтушность, петехии, абсцессы, язвы	8	
Нос, рот, глаза, голова	Норма	0	
	Назальные выделения, слюнотечение, слезотечение, покраснение глаз, воспаление ушей	3	
	Потеря зубов, незначительные раны ротовой полости, вправленный вывих нижней челюсти	3	
	Избыточное слюноотделение, слюноотделение со следами крови	2	
Дыхание	Норма	0	
	Учащенное или замедленное дыхание	3	
	Кашель, чихание	8	
	Одышка; свистящее, хрипящее дыхание	8	
	Неритмичное затрудненное дыхание с открытым ртом, цианоз, кашель с кровью	10	
Другие изменения	Описание: _____	1–15	

В Карту наблюдения за животными вносили результаты по совокупности не менее трех наблюдений в сутки. Первое наблюдение проводили в интервале с 7.00 до 9.00, до уборки вольера и кормления животных, второе наблюдение — с 11.00 до 12.00 и третье — с 15.00 до 16.00. Во время первого и второго наблюдения оценивали

расположение ОИ в вольере, поведение, двигательную активность и позу, проводили наружный осмотр животного. Поверхности вольера осматривали на наличие следов крови или патологических выделений, оценивали консистенцию, цвет и количество свежего кала и мочи. В ходе третьего наблюдения продолжали наблюдение за поведением, возможными травмами и выделениями, оценивали количество съеденного рациона и выпитой воды. Повторно оценивали консистенцию свежего кала и цвет мочи, а также их количество. По каждому из оцениваемых показателей фиксировали норму, соответствовавшую 0 баллов, или патологические отклонения, оцениваемые в пределах 1 до 15 баллов. Баллы по всем показателям для каждого животного суммировали.

В соответствии с Рекомендацией коллегии Евразийской экономической комиссии №33 от 14 ноября 2023 г. «в экспериментах с лабораторными животными устанавливается конечная гуманная точка — самый ранний индикатор в исследовании, указывающий на сильную боль, дистресс, страдания или приближающуюся гибель животного. По достижении конечной гуманной точки следует принять меры по прекращению воздействия, минимализации или уменьшению воздействия на субъект в исследовании (за счет эвтаназии животного, прекращения болезненной процедуры или проведения лечения для облегчения боли и (или) дистресса)». Конечную гуманную точку для большинства исследований устанавливали на уровне 15 баллов. В случае достижения данного значения для предотвращения страданий животного была бы проведена эвтаназия путем введения трехкратной дозы золетила (Virbac, Франция) и рометара (Bioveta, Чехия) с последующим подтверждением смерти путем обескровливания.

1.2.7 Методики оценки гематологических и биохимических параметров крови

Взятие образцов цельной крови у ОИ для гематологического и биохимического анализа проводили путем пункции бедренной вены с использованием трехкомпонентных шприцев (SFM, Германия) объемом 2,5 мл с иглами 27G. Максимальный единовременно получаемый объем крови у ОИ массой 400 г составляет 4 мл, что соответствует 10% объема циркулирующей крови, после чего для

предотвращения формирования анемии животному необходим период восстановления продолжительностью две недели.

Для проведения гематологического анализа полученные образцы цельной крови немедленно переносили в специализированные пробирки с Na-ЭДТА (Cerebrum, КНР) и перемешивали 6 раз переворачиванием. Для биохимического анализа кровь переносили в пробирки с активатором свертывания (Cerebrum, КНР), перемешивали и выдерживали в течение 30 мин при комнатной температуре, после чего сыворотку отделяли центрифугированием при 600 g в течение 10 мин.

1.2.7.1 Методика подсчета лейкоцитов в камере Горяева

Хорошо перемешанный на лабораторном шейкере образец исследуемой крови объемом 20 мкл вносили в 1,5 мл центрифужную пробирку с коническим дном (Ахуген, США) с 380 мкл 5% раствора уксусной кислоты и 20 мкл раствора красителя метиленовый синий 0,5% (Самарамедпром, Россия). Пробу тщательно перемешивали на лабораторном шейкере в течение 1 минуты и исследовали непосредственно после перемешивания. Предварительно подготовленную камеру Горяева (МиниМед, Россия) с притертым покровным стеклом заполняли разведенной кровью и выдерживали 1 минуту для прекращения движения клеток. При малом увеличении (окуляр $\times 10$, объектив $\times 8$) производили подсчет лейкоцитов в 100 больших квадратах камеры. Расчет числа лейкоцитов осуществляли исходя из разведения крови (20) и числа больших квадратов (100), по формуле $X = (a \times 250 \times 20) / 100$, где X — число лейкоцитов в 1 мкл крови; а — число лейкоцитов, посчитанных в 100 больших квадратах камеры Горяева.

1.2.7.2 Методика подсчета эритроцитов в камере Горяева

Хорошо перемешанный на лабораторном шейкере образец исследуемой крови объемом 20 мкл вносили в пробирку объемом 5 мл (Ахуген, США) с 3980 мкл 0,9% раствора NaCl. Пробу тщательно перемешивали на лабораторном шейкере в течение 1 минуты и исследовали непосредственно после перемешивания. Предварительно подготовленную камеру Горяева с притертым покровным стеклом заполняли разведенной кровью и выдерживали 1 минуту для прекращения движения клеток. При

малом увеличении (окуляр $\times 10$, объектив $\times 8$) производили подсчет эритроцитов в 5 больших квадратах, разделенных на 16 малых (т.е. в 80 малых квадратах камеры). Подсчет клеток производили в квадратах, расположенных по диагонали камеры. Расчет числа эритроцитов осуществляли исходя из разведения крови (200) и числа малых квадратов (80) по формуле $X = (a \times 4000 \times 200) / 80$, где X — число эритроцитов в 1 мкл крови; a — число эритроцитов, посчитанных в 80 малых квадратах камеры Горяева.

1.2.7.3 Подсчет лейкоцитарной формулы

Лейкоцитарную формулу подсчитывали в сухих фиксированных и окрашенных мазках крови. В качестве фиксирующего агента использовали 0,2% раствор фиксатора-красителя эозин-метиленовый синий по Май-Грюнвальду, в качестве красителя использовали раствор азур-эозин по Романовскому (0,76 % раствор сухого азур-эозина по Романовскому). Подсчет производили по стандартной методике с использованием клавишного счетчика клеток.

1.2.7.4 Биохимический анализ крови

Биохимический анализ сыворотки крови животных проводили с использованием автоматизированного биохимического анализатора Cobas c 111 (Roche, Швейцария) с и соответствующих наборов жидких реагентов (Roche): аланин-аминотрансфераза (АЛТ; ALTL), аспартат-аминотрансфераза (АСТ; ASTL), щелочная фосфатаза (ALP2S), общий белок (TP2), альбумин (ALB2), триглицериды (TG), мочевины (UREAL), амилаза (AMYL2), креатинин (CREJ2), общий билирубин (BILT3), прямой билирубин (BILD2) и С-реактивный белок (CRPLX).

Калибровка производилась с помощью калибратора для автоматизированных систем (C.f.a.s., Roche), и калибратора белков для автоматизированных систем (C.f.a.s. Protein, Roche). Для ежедневного контроля анализов использовались универсальные контроли PreciControl ClinChem Multi 1 и PreciControl ClinChem Multi 2. Значения ниже минимального уровня детекции прибора принимали за 0.

1.2.8 Гистологическое описание поствакцинальных изменений в лимфоидных органах

С целью описания поствакцинальных изменений в лимфоидных органах ОИ в данной работе использовали семь животных (три самца и четыре самки) в возрасте 2–5 лет, родившихся в Лаборатории и участвовавших в доклинических исследованиях инактивированной цельновиральной очищенной сорбированной вакцины против COVID-19 КовиВак, результаты которых приведены в Главе 3.

За два дня до введения первой дозы вакцины животных рандомизировали с использованием электронных таблиц Excel (Microsoft, США) и рассаживали попарно в клетки. Дважды с интервалом 14 суток в бедренные мышцы правой и левой нижних конечностей животным из экспериментальной группы вводили по 250 мкл препарата вакцины в виде суспензии для внутримышечного введения (суммарный введенный объем — 500 мкл на животное). Животным контрольной группы в те же дни вводили препарат плацебо, содержащий адъювант, применяемый в вакцине КовиВак (гидроокись алюминия), тем же путем, в том же объеме.

Эвтаназию проводили путем передозировки наркоза (внутримышечное введение трехкратной дозы смеси препаратов Ксила (De Adelaar, Нидерланды) и Золетил (Virbac, Франция) под изофлурановой анестезией.

Лимфоидные органы (тимус, селезенка, мезентериальный лимфатический узел и паховый лимфатический узел, региональный к месту введения препарата) для гистологического исследования были зафиксированы сразу после некропсии путем погружения в 10% забуференный формалин (Биовитрум, Россия).

Зафиксированные в течение 48 часов и отмытые от формалина органы подвергали стандартной гистотехнической обработке [25,26], включавшей гистологическую вырезку (получение репрезентативных фрагментов органов необходимого размера) в соответствии с руководствами по доклиническим исследованиям [27] и помещение образцов в маркированные гистологические кассеты. Вырезанные и маркированные образцы органов в кассетах подвергались автоматизированной гистологической проводке, включавшей последовательную дегидратацию в повышающихся концентрациях этанола и в ксилоле, заливку в парафиновую среду «Histomix» (Биовитрум, Россия) на заливочной станции Leica EG1150H (Leica, Германия) с

формированием маркированных парафиновых блоков и микротомии этих блоков с образцами на ротационном микротоме Leica RM 2245 (Leica, Германия) с получением парафиновых срезов толщиной 3 мкм. Срезы лимфоидных органов монтировали на предметных стеклах, высушивали, депарафинировали, гидратировали, окрашивали квасцовым гематоксилином и водно-спиртовым эозином (Биовитрум, Россия) и заключали под покровные стекла в среду BioMount (Bio-Optica, Италия) для получения постоянных гистологических препаратов. Все гистологические препараты проходили контроль качества на наличие артефактов [28] под микроскопом и отправлялись на гистологическое исследование, морфологический анализ и микрофотографирование специалистом-патоморфологом. С одного блока получали 1–4 репрезентативных среза надлежащего качества.

Готовые срезы анализировали под световым микроскопом Zeiss Axio Observer A1 (Carl Zeiss, Германия). Репрезентативные микрофотографии получали с помощью камеры высокого разрешения Digital Microscopy Camera AxioCam 305 в программном обеспечении Zeiss Zen 2 lite blue edition (Carl Zeiss). Обработку микрофотографий и составление панелей проводили с использованием программного обеспечения AxioVision v.3.0 (Carl Zeiss) и GIMP (S. Kimball, P. Mattis, США).

Автор выражает благодарность руководителю лаборатории гистологических исследований Института синтетической биологии и геной инженерии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России и научному сотруднику лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) к.б.н. О.С. Ганчаровой за обработку и описание гистологических препаратов.

1.2.9 Статистический анализ

Возраст самок на момент родов, выживаемость потомства в неонатальном периоде, а также интервалы между родами представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения (СО). Статистическую значимость различий параметров гематологического и биохимического анализа крови оценивали с использованием критерия Манна-Уитни в программе Prism 9 (9.3.0) (GraphPad, США). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

1.3 Результаты

1.3.1 Разведение обыкновенных игрунок в лабораторных условиях

С целью долгосрочного планирования экспериментальных работ с применением ОИ необходимо было исследовать динамику нарастания численности колонии в условиях лабораторного содержания. Для этого была проведена оценка среднего возраста самок на момент первых родов, среднего интервала между родами, а также среднего количества выживших детенышей на одни роды.

Ретроспективное исследование проводили на основании данных наблюдения за 23 родившимися в Лаборатории самками ОИ, у которых с 2015 по 2023 гг. в общей сложности произошло 69 родов. Результаты оценки среднего возраста самок на момент первых родов, а также среднего интервала между родами представлены на Рисунке 3.

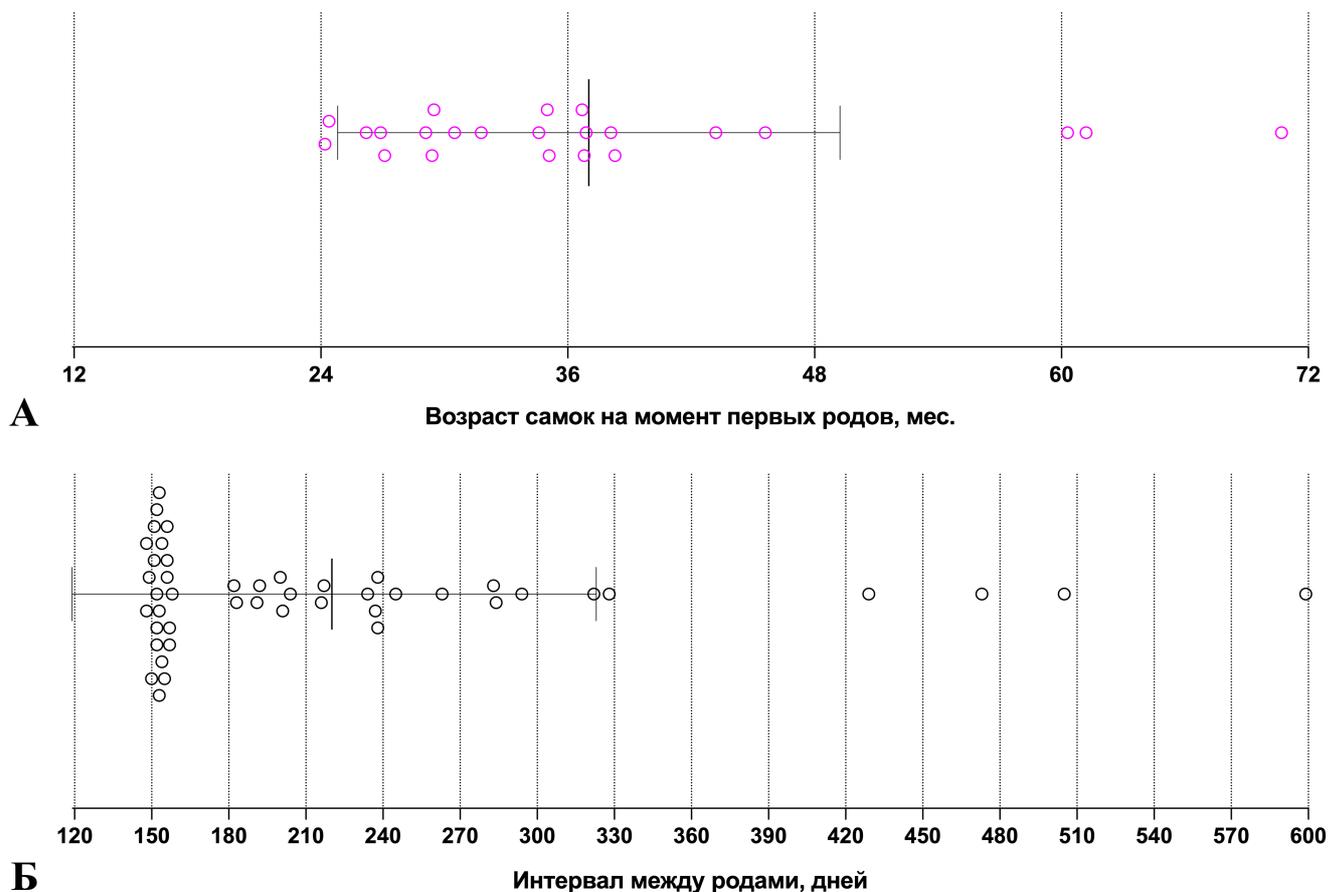


Рисунок 3 — Результаты наблюдения за родами у самок обыкновенных игрунок в условиях лабораторного содержания. Розовыми окружностями обозначен возраст самок ($n = 23$) на момент первых родов (А). Черными окружностями обозначены

интервалы между родами ($n = 46$) (Б). Вертикальными сплошными линиями обозначены среднее и стандартное отклонение

Средний возраст самок на момент первых родов составил 37 (СО 12,2) месяцев, минимальный — 24,2 месяца (Рисунок 3А). Полученные результаты соответствуют ранее опубликованным данным о том, что половое созревания у самок ОИ наступает в возрасте полутора лет, а средний возраст первого зачатия составляет 2,5 года [4].

Средний интервал между родами составил 220,1 (СО 102,9) суток, при этом в 21 из 46 случаев роды наступали через 148–158 суток после предыдущих (Рисунок 3Б). Поскольку продолжительность беременности у ОИ составляет в среднем 143–144 суток [4], наиболее часто наблюдаемый интервал между родами в 148–158 суток свидетельствовал о том, что новое зачатие происходило в течение одной-двух недель после родов.

В общей сложности за исследуемый период одни роды произошли у 7 из 23 самок, двое — у 4, трое — у 8, четверо родов — у 2, восемь родов — у 1 и 14 родов у 1 (Рисунок 4).

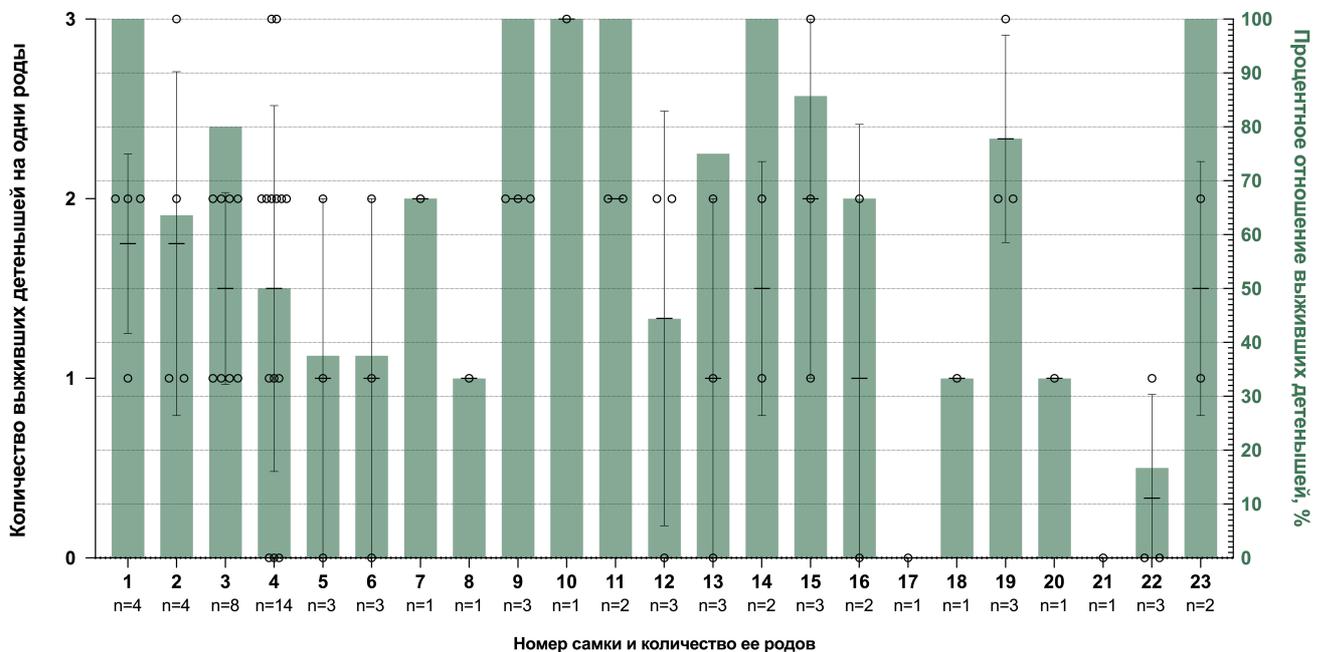


Рисунок 4 — Количество и процентное отношение выживших детенышей на одни роды у самок обыкновенных игрунок в условиях лабораторного содержания. Черными окружностями обозначены роды ($N = 69$), на левой оси Y отображено количество выживших детенышей на одни роды. Зелеными столбцами обозначено процентное отношение (правая ось Y) выживших детенышей к общему количеству детенышей,

родившихся у данной самки за весь период наблюдения. На оси X отображены порядковые номера самок и общее количество родов у каждой самки. Вертикальными линиями обозначены среднее количество выживших детенышей и стандартное отклонение

Выжившими считали всех детенышей, прошедших неонатальный период, так как смертность после 28 суток жизни полностью отсутствовала. Основной причиной смерти детенышей были нарушения работы желудочно-кишечного тракта в первые трое суток после родов. Детенышей, погибших в неонатальном периоде, учитывали как мертворожденных. Таким образом, среднее количество выживших детенышей на одни роды в ходе периода наблюдения составило 1,45 (95% ДИ 1,24–1,66), при этом значительно различаясь между отдельными самками.

За период наблюдения наиболее частым результатом родов ($N = 69$) у самок ОИ в условиях лабораторного содержания было рождение двух детенышей (31/69). Один живой детеныш родился в 20/69 случаев, трое — в 6/69. В 12 случаях роды закончились появлением от 1 до 5 мертворожденных детенышей или их гибелью в течение первых трех суток.

Значимые изменения плодовитости у самок отсутствовали как минимум до восьмых-девятых родов, однако данный вывод требует дополнительного подтверждения, так как за период наблюдения только у двух самок из 23 произошло более четырех родов.

1.3.2 Определение оптимального возраста включения обыкновенных игрунок в эксперименты

Для определения оптимального возраста включения ОИ в эксперименты по изучению специфической активности иммунобиологических препаратов, была проведена оценка динамики набора массы тела животными, родившимися в Лаборатории.

В апреле 2023 года в течение недели было проведено взвешивание 69 содержащихся в Лаборатории животных (37 самцов и 32 самки в возрасте от 2,6 мес. до 9,6 лет). Результаты приведены на Рисунке 5.

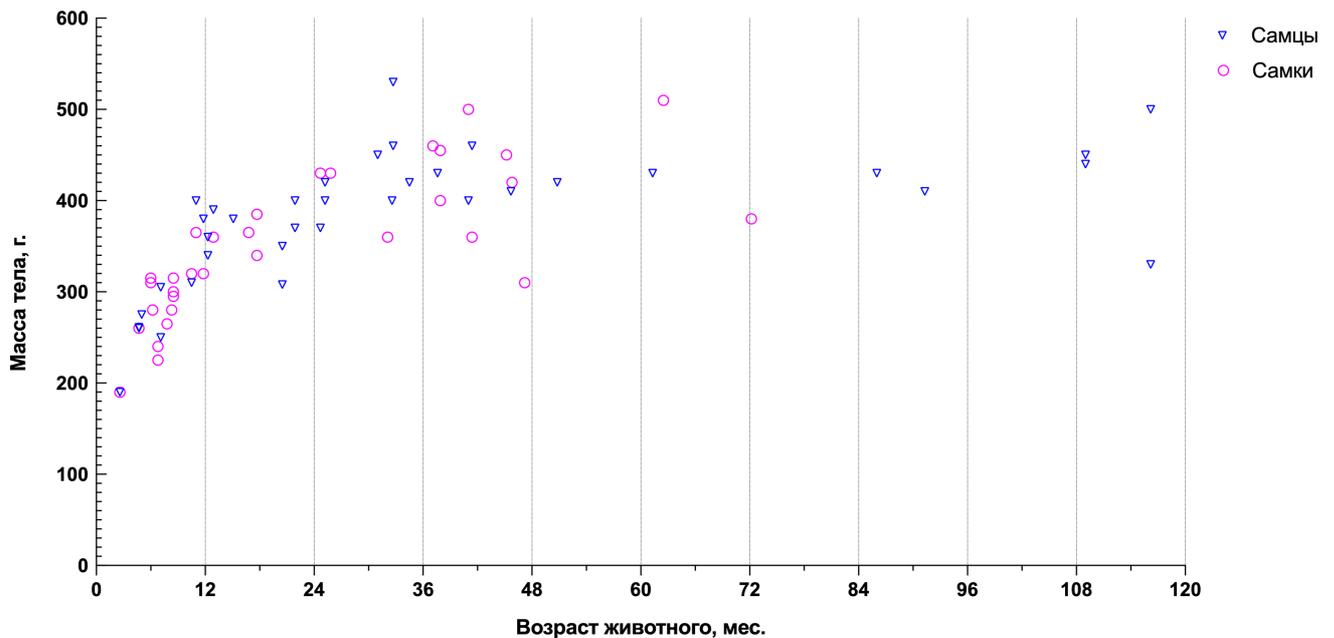


Рисунок 5 — Масса тела и возраст обыкновенных игрунок, содержащихся в Лаборатории. Общее количество животных — 69; самцов 37, самок 32

В результате эксперимента было установлено, что наиболее быстро масса тела ОИ нарастала в течение первых полутора лет жизни. К 18–20 мес. масса тела животных в среднем достигала 400 г и оставалась на том же уровне у всех исследованных животных в возрасте до 9,6 лет. Значимых различий между массой тела самцов и самок выявлено не было (критерий Манна-Уитни, $p = 0,08$).

1.3.3 Определение референсных значений гематологического и биохимического анализа крови

Изучение специфической активности противовирусных вакцин с применением ОИ, содержащихся в лабораторных условиях, требовало определения референсных значений показателей гематологического и биохимического анализа крови, т.к. опубликованные референсные показатели зачастую были получены на основании исследования биоматериала, взятого у небольшого количества животных, содержащихся в открытых вольерах в питомниках и зоопарках.

С целью определения референсных значений показателей гематологического анализа у ОИ, содержащихся в Лаборатории, с мая 2020 по декабрь 2021 гг. в общей сложности были взяты образцы крови 38 ОИ (26 самцов и 12 самок) в возрасте 2–5 лет. Результаты приведены на Рисунке 6.

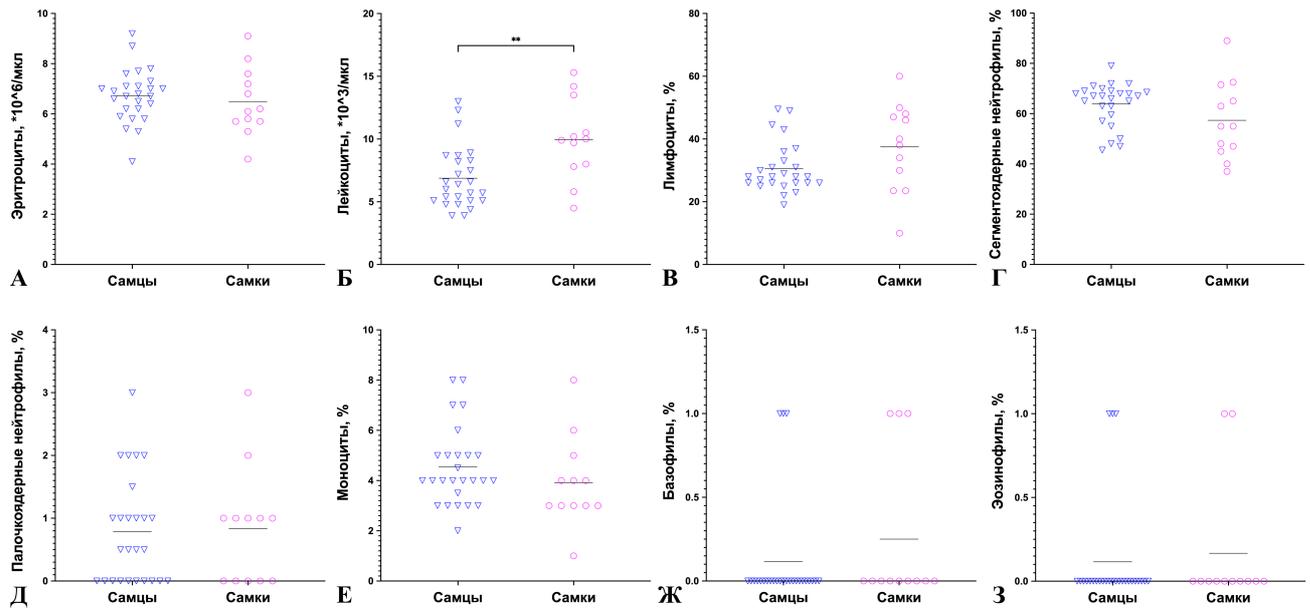


Рисунок 6 — Количество эритроцитов (А) и лейкоцитов (Б), а также доля лимфоцитов (В), сегментоядерных нейтрофилов (Г), палочкоядерных нейтрофилов (Д), моноцитов (Е), базофилов (Ж) и эозинофилов (З) в лейкоцитарной формуле крови обыкновенных игрунок ($N = 38$), содержащихся в Лаборатории. Горизонтальными линиями показаны средние значения. Статистическую значимость различий исследуемых параметров между самцами и самками оценивали с использованием критерия Манна-Уитни. ** — Статистически значимые различия ($p < 0,05$)

Среднее количество эритроцитов в крови ОИ, содержащихся в Лаборатории, составило 6,6 (4,1–9,2) млн клеток/мкл; лейкоцитов — 7,8 (3,9–15,3) тыс. клеток/мкл. В лейкоцитарной формуле средняя доля лимфоцитов составила 32,8 (10–60)%, сегментоядерных нейтрофилов — 61,8 (37–89)%, палочкоядерных нейтрофилов — 0,8 (0–3)%, моноцитов — 4,3 (1–8)%, базофилов — 0,2 (0–1)%, эозинофилов — 0,1 (0–1)%. У самок в крови в среднем наблюдалось большее количество лейкоцитов (критерий Манна-Уитни, $p = 0,0047$), чем у самцов. Статистически значимых различий в значениях других параметров крови между самцами и самками выявлено не было.

С целью определения референсных значений показателей биохимического анализа крови у ОИ, содержащихся в Лаборатории, оценивали уровень креатинина у 20 животных (10 самцов и 10 самок), триглицеридов — у 12 животных (5 самцов и 7 самок), амилазы — у 8 животных (5 самцов и 3 самок), С-реактивного белка — у 26 животных (21 самец и 5 самок), остальные параметры оценивали у 38 животных (26 самцов и 12 самок). Результаты приведены на Рисунке 7.

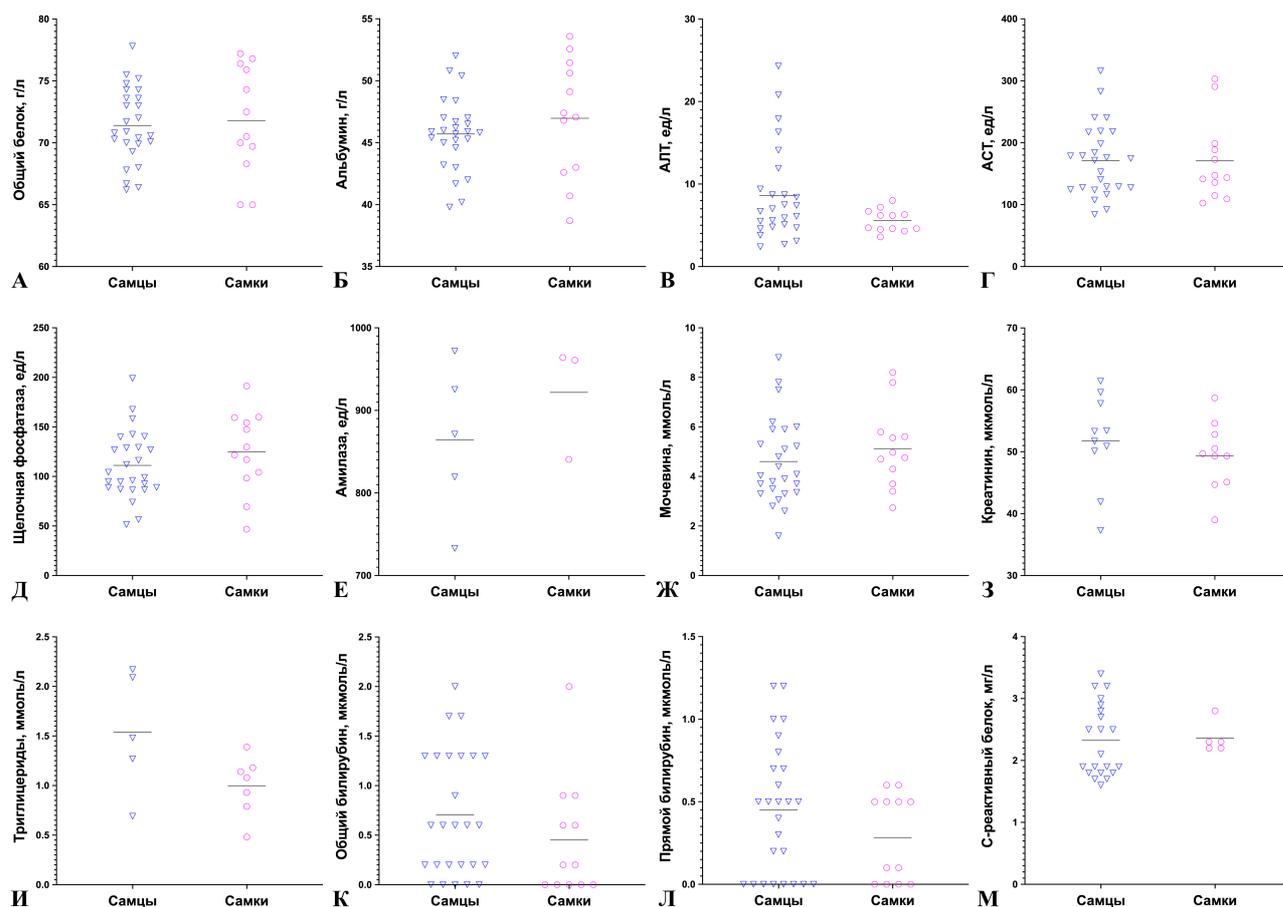


Рисунок 7 — Результаты биохимического анализа крови ОИ, содержащихся в Лаборатории. Представлены уровни общего белка (А), альбумина (Б), аланинаминотрансферазы [АЛТ] (В), аспаратаминотрансферазы [АСТ] (Г), щелочной фосфатазы (Д), амилазы (Е), мочевины (Ж), креатинина (З), триглицеридов (И), общего билирубина (К), прямого билирубина (Л) и С-реактивного белка (М). Уровни креатинина определяли у 20 животных, триглицериды — у 12, амилазу — у 8, С-реактивный белок — у 26; остальные показатели — у 38. Горизонтальными линиями показано среднее значение. Статистическую значимость различий исследуемых параметров между самцами и самками оценивали с использованием критерия Манна-Уитни

Среднее содержание общего белка в сыворотке крови ОИ, содержащихся в Лаборатории, составило 71,3 (65–77,8) г/л; альбумина — 44,8 (38,7–53,58) г/л; активности АЛТ — 8,0 (2,4–24,3) ед./л; АСТ — 182,8 (84,3–316,1) ед./л; щелочной фосфатазы — 106,5 (46,7–199) ед./л; амилазы — 885,7 (732,9–964) ед./л; содержание мочевины — 4,8 (1,6–8,8) ммоль/л; креатинина — 51 (37,3–61,4) мкмоль/л; триглицеридов — 1,22 (0,48–2,17) ммоль/л; общего билирубина — 0,8 (0–2) мкмоль/л; прямого билирубина — 0,4 (0–1,2) мкмоль/л; С-реактивного белка — 2,3 (1,6–3,4)

мг/л. Статистически значимых различий в биохимических параметрах крови у самцов и самок выявлено не было (критерий Манна-Уитни, $p > 0,05$ для всех показателей).

Таким образом, на основании исследования материала, полученного от 38 здоровых взрослых животных, родившихся и постоянно содержавшихся в Лаборатории, были установлены референсные показатели гематологического и биохимического анализа крови, которые могут быть использованы в ходе исследований безопасности иммунобиологических препаратов на модели ОИ.

1.3.4 Исследование поствакцинальных изменений в структуре лимфоидных органов обыкновенных игрунок

В ходе доклинических исследований инактивированной очищенной цельновирионной сорбированной вакцины против COVID-19 КовиВак было проведено гистологическое исследование лимфоидных органов у четырех вакцинированных (один самец и три самки) и трех контрольных (два самца и одна самка) ОИ в возрасте 2–5 лет. Охарактеризована морфологическая структура лимфоидных органов у животных, получивших препарат плацебо, а также описаны изменения микроструктуры тимуса, селезенки и лимфатических узлов, наблюдавшиеся в ходе формирования специфического поствакцинального иммунного ответа.

Морфология лимфоидных органов контрольных животных. Тимус (Рисунок 8А) был сохранен у всех животных. Морфологически легко различались более светлое мозговое и более темное корковое вещество органа. Акцидентальная (стрессовая) инволюция коркового вещества тимуса отсутствовала или была выражена минимально, как и липоматоз коркового вещества. Гистологически строение органа соответствовало описанной в литературе видовой норме [29], в том числе присутствовали тельца Гассалья мозгового вещества.

В селезенке (Рисунок 8В) контрольных приматов было выявлено правильное строение белой и красной пульпы: атрофические и дистрофические изменения отсутствовали, патологическое расширение зон белой пульпы не наблюдалось, красная пульпа была умеренно полнокровна. Макрофаги селезенки контрольных животных не демонстрировали вакуолизации или видимого накопления компонентов

адьюванта (геля гидроокиси алюминия) либо иных веществ. Морфологические признаки миелоидной метаплазии красной пульпы у всех исследованных животных отсутствовали.

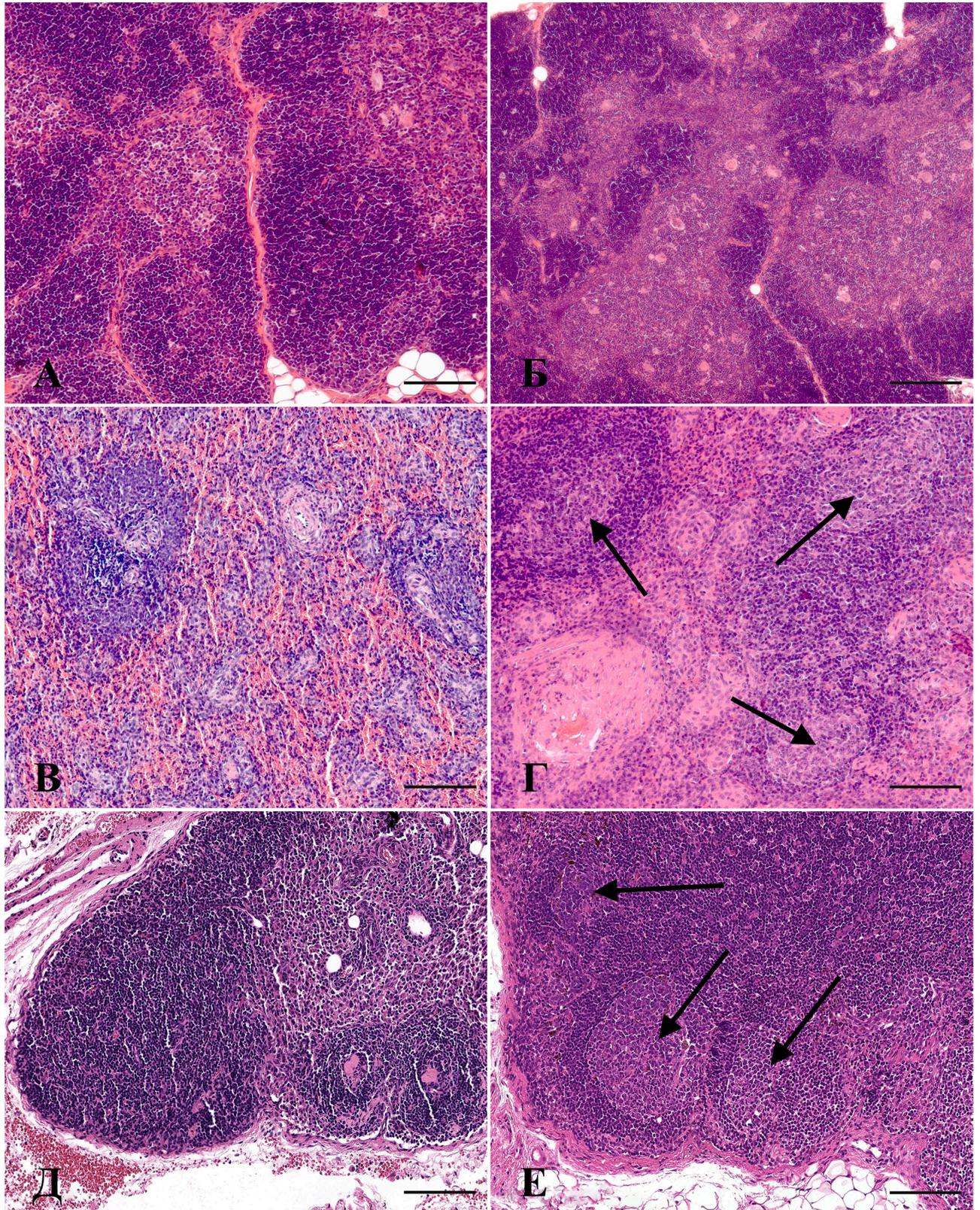


Рисунок 8 — Лимфоидные органы ОИ, получивших цельновирионную инактивированную вакцину КовиВак (Б, Г, Е), в сравнении с контрольными

животными, получившими плацебо (А, В, Д): тимус (А, Б), селезенка (В, Г), регионарный (паховый) лимфатический узел (Д, Е). Стрелки указывают на герминативные центры в корковом плато лимфатического узла и в мантийной зоне белой пульпы селезенки — области Т-зависимого В-иммуногенеза. Гематоксилин и эозин, увеличение: $\times 100$. Масштабная линейка 200 мкм

У контрольных животных паховый лимфатический узел, регионарный к месту введения плацебо (Рисунок 8Д), был построен правильно, состоял из коркового плато, паракортикальной зоны с медуллярными тяжами и системы синусов. У всех исследованных животных лимфатический узел не имел патологических изменений, соответствуя морфологически видовой норме.

Мезентериальный лимфатический узел (не показано) как у вакцинированных, так и у контрольных животных не имел особенностей и патологических изменений и демонстрировал морфологические проявления иммуногенеза: ярко выраженные герминативные (светлые) центры в корковом плато и минимально выраженный гистиоцитоз краевого синуса, что является нормальным отражением функции органа, получающего постоянную антигенную стимуляцию из кишечника.

Морфология лимфоидных органов вакцинированных животных. Тимус вакцинированных животных (Рисунок 8Б) морфологически не отличался от тимуса животных, получавших препарат плацебо. Тимус является первичным лимфоидным органом, в котором при антиген-опосредованном В-иммуногенезе не возникают морфофункциональные изменения.

В некоторых образцах селезенки, взятых от вакцинированных ОИ (Рисунок 8Г), обнаружено формирование герминативных (светлых) центров в мантийной зоне белой пульпы. Эта картина морфологически отражает Т-зависимый В-иммуногенез, что соответствует формированию поствакцинального ответа. В остальном строение селезенки было таким же, как у контрольных животных. В макрофагах маргинальной зоны и красной пульпы селезенки вакцинированных животных отсутствовали вакуолизация или видимое накопление компонентов вакцины, геля гидроокиси алюминия либо иных веществ.

У вакцинированных приматов паховый лимфатический узел, регионарный к месту введения вакцины (Рисунок 8Е), имел правильное строение, состоял из коркового

плато, паракортикальной зоны с медуллярными тяжами и системы синусов. В нем наблюдались выраженные в разной степени морфофункциональные проявления иммуногенеза: возникновение герминативных (светлых) центров в корковом плато (так называемая В-зависимая зона лимфатического узла), а также минимальный гистиоцитоз краевого синуса, что соответствует формированию поствакцинального ответа и морфологически сходно с событиями в лимфатических узлах человека при антигенном воздействии.

1.4 Обсуждение

Обыкновенная игрунка — вид обезьян-эндемиков, обитающих в тропической зоне атлантического побережья северо-восточной Бразилии. В дикой природе ОИ живут семьями, состоящими из устойчивой пары животных и их многочисленного потомства [30]. В группах наблюдается доминирование одной самки с подавлением репродуктивной активности окружающих самок, особенно матерей над дочерьми [4]. Приплод ОИ состоит из 1–3 детенышей, которые уже на третий месяц жизни становятся самостоятельными [31]. ОИ ведут дневной образ жизни и обитают в густых верхних и средних ярусах крон лиственных деревьев, спасаясь от змей и хищных птиц. Рацион питания ОИ в естественной среде обитания состоит из насекомых, древесного экссудата (камеди) как основного источника энергии, а также птичьих яиц и сезонных фруктов [31].

Этологические особенности вида были учтены в ходе разработки методик лабораторного содержания ОИ: периодичность включения освещения в помещениях для разведения животных соответствовала продолжительности светового дня в регионах их обитания, состав семейных групп соответствовал наблюдаемому в дикой природе, а высокие вольеры позволяли животным перемещаться в верхние отделы, т.е. реализовывать поведенческий каскад, связанный с поиском укрытия при приближении опасности. Используемый в Лаборатории рацион обеспечивал потребности ОИ в белках, жирах, углеводах и витаминах, при этом по энергетической ценности и белку он несколько превышал рационы, опубликованные зарубежными авторами [31,32].

В результате наблюдения за 69 родами, произошедшими у самок ОИ, родившихся в Лаборатории с 2015 по 2023 гг., был определен средний возраст самок на момент первых родов, средний интервал между родами, выживаемость детенышей и кинетика нарастания массы тела животных с возрастом, что в совокупности позволяет управлять численностью колонии в зависимости от экспериментальных задач. Согласно полученным данным, в среднем одна самка приносит около 2,4 детенышей в год (с учетом того, что в среднем на одни роды приходятся 1,45 выживших детенышей, а средний интервал между родами составляет 220,1 суток), при этом ускорение динамики нарастания численности колонии ОИ при лабораторном содержании может достигаться как за счет составления максимального количества пар, так и путем отбора наиболее плодовитых самок. Были установлены средний возраст самок на момент первых родов, средний интервал между родами, выживаемость детенышей и минимальный возраст включения животных в эксперименты, что в совокупности позволяет проводить долгосрочное планирование динамики нарастания численности колонии в зависимости от экспериментальных задач.

Заключение о минимальном возрасте включения животных в эксперименты было основано на двух факторах. Во-первых, на основании результатов оценки возраста самок на момент первых родов был установлен возраст половозрелости ОИ, составивший 19–20 месяцев, что соответствует ранее опубликованным данным [4]. Во-вторых, была единовременно оценена масса тела 69 животных, родившихся в Лаборатории.

Оценка массы тела является важнейшим фактором при подборе животных для экспериментов, т.к. у ОИ, как и у большинства других лабораторных животных, исходя из массы тела рассчитывается возможный объем единовременно забираемой крови. Животные без осложнений переносят взятие из бедренной вены до 10% объема циркулирующей крови (1% массы тела) с последующим восстановительным периодом продолжительностью 14 суток. В ходе работ, описанных в данной главе было установлено, что оптимальный возраст включения животных в эксперимент совпадает с описанным ранее Tardif и соавт. возрастом наступления половозрелости [4]. Единовременное взвешивание животных разного возраста позволило минимизировать

влияние сезонных изменений массы тела ОИ, таких как длительность светового дня, температура воздуха, изменения источника фруктов для приготовления кормов и т.д.

Исследования специфической активности противовирусных вакцин с применением ОИ, родившихся и выращенных в лабораторных условиях, требовали определения референсных значений показателей гематологического и биохимического анализа крови. На момент проведения экспериментов, описанных в данной главе (2020–2021 гг.), были опубликованы результаты единичных исследований, описывавших референсные показатели гематологического и биохимического анализа крови лабораторных ОИ [33]. Более того, в дальнейшем Kramer и соавт. в обширном исследовании было показано, что параметры гематологического и биохимического анализа крови здоровых ОИ могут значительно различаться в различных питомниках даже при единообразии условий содержания и используемых аналитических методик [34].

Анализ образцов, взятых от 38 здоровых самцов и самок ОИ в возрасте 2–5 лет, позволил определить уровни основных гематологических и биохимических показателей крови. Статистически значимые различия между самцами и самками наблюдались только для количества лейкоцитов (критерий Манна-Уитни, $p = 0,0047$).

Исследования безопасности и специфической активности вакцин на доклиническом этапе требуют проведения гистологической характеристики изменений в лимфоидных органах, происходящих в результате вакцинации. В ходе работ, описанных в данной главе, была проведена гистологическая характеристика лимфоидных органов ОИ в норме, а также после введения инактивированной цельновирионной сорбированной вакцины против COVID-19.

На гистологическом исследовании в мозговом веществе тимуса ОИ наблюдались тельца Гассалья — скопления концентрически расположенных эозинофильно окрашенных терминально дифференцированных эпителиальных клеток, что делает тимус ОИ морфологически сходным с тимусом человека. Известно, что у грызунов, наиболее часто используемых в доклинических и экспериментальных исследованиях лекарственных препаратов, в том числе вакцин, строение тимуса отличается от такового у человека в особенности в области мозгового вещества. У мышей и крыс в мозговом веществе тимуса тельца Гассалья отсутствуют [35]. Таким образом, строение

тимуса контрольных ОИ соответствовало видовой норме, при этом морфологически тимус ОИ проявлял большее сходство с тимусом человека, чем тимус грызунов.

Другим важным гистологическим наблюдением, отмеченным в ходе проведенной работы, являлось отсутствие у исследованных ОИ миелоидной метаплазии красной пульпы селезенки. Миелоидной метаплазией называют состояние, при котором морфологические признаки кроветворной ткани возникают вне костного мозга, например, в печени или селезенке. Следует заметить, что у человека возникновение таких изменений в селезенке отражает наличие патологического процесса, в то время как у мышей умеренный уровень миелоидной метаплазии — норма [36,37]. У ОИ спектр фоновых патологических изменений селезенки более близок к человеку, при этом наличие миелоидной метаплазии квалифицируется как фоновое патологическое состояние [38], возникает как компенсаторный процесс и сигнализирует о наличии патологических изменений, как правило, кровотечений, к которым склонны ОИ [39]. Изменения в селезенке ОИ в таком случае проще квалифицировать в ходе доклинических исследований иммунобиологических препаратов, нежели результаты, получаемые при работе с селезенками мышевидных грызунов.

Кроме перечисленных лимфоидных органов, в ходе работы были проанализированы третичные лимфоидные узелки слизистых оболочек, в том числе Пейеровы бляшки кишечника и лимфоидная ткань, ассоциированная с бронхами (bronchus-associated lymphoid tissue, BALT). Морфология данных органов соответствовала видовой норме и была сходна с аналогичными третичными лимфоидными органами человека, что подтверждало данные литературы [40].

Таким образом, были охарактеризованы изменения, наблюдавшиеся в лимфоидных органах ОИ в результате вакцинации с использованием инактивированной цельновирионной вакцины против COVID-19. Получены свидетельства высокой степени сходства структуры лимфоидных органов ОИ с человеческими в норме, а также в ходе формирования поствакцинального иммунного ответа.

Полученные данные позволяют утверждать, что ОИ, выращенные в изолированных лабораторных условиях, исключаящую фоновую инфекционную патологию, являются адекватной лабораторной моделью, позволяющей с высоким

уровнем достоверности характеризовать профиль безопасности и специфической активности противовирусных вакцин в ходе доклинических исследований.

1.5 Заключение главы

В ходе работ, описанных в данной главе, были разработаны подходы к длительному лабораторному содержанию и разведению ОИ, установлены референсные значения основных гематологических и биохимических показателей крови, оцениваемых в ходе доклинических исследований иммунобиологических препаратов, а также проведено гистологическое описание структуры лимфоидных органов в норме и в ходе формирования поствакцинального иммунного ответа.

Благодаря ряду биологических особенностей вида, а также наличию отработанных методик содержания, разведения и экспериментальной работы, ОИ, содержащиеся в Лаборатории, активно использовались в биомедицинских исследованиях, включая доклинические исследования инактивированной [41,42] и аденовирусной векторной [43] вакцин против COVID-19, аденовирусной векторной вакцины против ближневосточного респираторного синдрома [44,45], а также кандидатной рекомбинантной вакцины против гепатита E [6].

Описанные в данной главе результаты опубликованы в журнале *Acta Naturae* [46], а также представлены на ряде международных и российских научных конференций.

ГЛАВА 2. Разработка методик оценки специфического поствакцинального Т-клеточного и локального мукозального иммунного ответа у обыкновенных игрунок

2.1 Обзор литературы

Пандемия COVID-19 продемонстрировала острую необходимость в новых технологиях и инфраструктуре, позволяющих в кратчайшие сроки разрабатывать вакцинные препараты против новых и возвращающихся вирусных заболеваний. Впервые были широко применены генетические [47,48] и векторные [49] вакцины, продемонстрировавшие высокую иммуногенность, хорошую переносимость, а также возможность быстрого налаживания широкомасштабного производства. Поскольку SARS-CoV-2 преимущественно проникает в организм через эпителий верхних дыхательных путей, также был разработан ряд вакцин против COVID-19 с интраназальным введением, нацеленных на индукцию местного мукозального иммунитета во входных воротах инфекции [50].

Важнейшим отличием генетических и векторных вакцин от вакцин на основе инактивированных вирусов и рекомбинантных белков является продукция вакцинных антигенов [51] внутри клеток вакцинируемых лиц, обеспечивающая осуществление адекватных посттрансляционных модификаций. Подобно живым или аттенуированным вирусам, такие вакцины обеспечивают антиген-презентацию в контексте молекул МНС как II, так и I класса, обеспечивая выработку антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (CD — кластер дифференцировки; поверхностные антигены), т.е. эффективную активацию как гуморального, так и Т-клеточного адаптивного иммунного ответа, в то время как антигены, доставленные в форме рекомбинантного белка, обычно индуцируют преимущественно антительный ответ [52]. Таким образом, исследования безопасности и специфической активности вакцин нового поколения на доклиническом этапе требуют наличия хорошо охарактеризованных лабораторных животных для адекватной оценки уровня активации всех звеньев поствакцинального адаптивного иммунитета, включая как системный гуморальный, так и Т-клеточный иммунный ответ.

Органы иммунной системы ОИ морфологически схожи с человеческими (см. п. 1.3.4), однако также имеется ряд значимых видовых отличий. Анализ аминокислотных последовательностей 30 генов, связанных с иммунной системой, проведенный Kohu и соавт., показал, что уровень идентичности человеческих генов с их ортологами у ОИ в среднем составляет 86%. При этом последовательности белков человека и ОИ одинаково отличаются от последовательностей ортологичных белков мыши, а уровень идентичности последовательностей человеческих белков с белками мыши составил в среднем 60% [53]. Гены Т-клеточного рецептора человека в области связывания с антигеном (CDR3-FR4) и соответствующие гены ОИ имеют более 90% гомологии [54]. В геноме ОИ были идентифицированы последовательности генов, ортологичных каждому из пяти классов иммуноглобулинов человека [55]. Тем не менее, иммуноглобулины ОИ имеют и ряд видовых особенностей. Так, в последовательности IgD отсутствует экзон CH2 [55], а IgG ОИ, по видимому, представлены одним изотипом [56].

ОИ представляют собой исключение из общего правила стабильности локусов МНС класса I у приматов [57,58] и не имеют локусов, гомологичных генам человеческих лейкоцитарных антигенов (HLA)-A и HLA-C человека. В то же время ОИ имеют гены, гомологичные человеческим HLA-B, HLA-F и HLA-G [59], при этом МНС-G (*Caja-G*) ОИ гетерогенны и способны к презентации антигенов [60]. Локусы МНС класса I ОИ обладают ограниченной изменчивостью при относительно высокой частоте смены поколений, что приводит к низкому уровню или полному отсутствию различий иммунного ответа на инфекционные и опухолевые антигены между отдельными представителями вида [61]. Изменчивость локусов МНС класса II ОИ также весьма ограничена, при этом они функционально схожи с ортологичными генами МНС класса II (HLA-DR и HLA-DQ) человека [9]. Таким образом, в целом молекулярные структуры антигенраспознающих молекул ОИ близки к человеческим [59].

ОИ восприимчивы к вирусным заболеваниям, поражающим людей [62–64], в частности к инфекциям, вызванным онкогенными вирусами [65–68]. Ранние работы, выявившие повышенную восприимчивость ОИ к онкогенным вирусам, нашли подтверждение в экспериментах по их заражению лимфотропными герпесвирусами с

последующим спонтанным формированием опухолевых новообразований [69–71]. Сходные спонтанные новообразования наблюдаются у людей при лимфоме Беркитта и назофарингеальной карциноме, что делает ОИ ценной моделью для тестирования соответствующих противовирусных и иммунотерапевтических препаратов, включая профилактические и терапевтические вакцины. Несмотря на аутбредную природу экспериментальных групп, исследования специфической иммуногенности вакцин на ОИ позволяют получать воспроизводимые результаты по причине низкого уровня гетерогенности иммунного ответа у отдельных животных.

Характеристика специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа, а также исследования безопасности иммунобиологических препаратов требуют наличия методик достоверной дифференциации субпопуляций мононуклеаров периферической крови (МПК) лабораторных животных и оценки статуса их активации. Основным используемым для этого методом является проточная цитометрия с окрашиванием МПК моноклональными антителами к CD антигенам и внутриклеточным цитокинам. Несмотря на высокий уровень гомологии маркерных молекул клеток между человеком и обезьянами, было показано, что ряд клонов коммерчески доступных антител против CD антигенов человека не связывается с ортологичными антигенами ОИ [12–14].

В результате работ, описанных в данной главе, был осуществлен подбор клонов флуоресцентно меченных антител, необходимых для дифференциации субпопуляций лимфоцитов ОИ, а также отработана методика оценки специфического поствакцинального Т-клеточного ответа в лимфопролиферативном тесте. Кроме того, были подобраны клоны антител для детекции IgA в биоматериале, полученном от ОИ.

2.2 Методы

2.2.1 Лабораторные животные

Работы по подбору клонов антител для дифференциации субпопуляций МПК ОИ были проведены с использованием образцов цельной крови, полученных от животных, родившихся и постоянно содержащихся в Лаборатории. Детальные условия содержания ОИ, режим кормления, условия проведения экспериментальных

манипуляций, методики идентификации и определения массы и температуры тела, а также методика оценки общего состояния животных в ходе эксперимента описаны в Главе 1. Итоговая численность ОИ, используемых в работе — 8 особей (3 самца и 5 самок) в возрасте от 23 до 48 месяцев массой 360–400 г. Идентификаторы (ID) животных в таблицах соответствуют четырем последним цифрам кода подкожного радиочипа.

Разработка методики оценки специфического поствакцинального Т-клеточного ответа на ОИ, а также подбор клонов антител для детекции IgA ОИ проводились с использованием биоматериала, полученного в ходе исследований специфической активности вакцины Спутник V, разработанной в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Состав вакцины и препарата плацебо, способ вакцинации животных и последующее наблюдение подробно описаны в Главе 3.

Протокол исследования был одобрен этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (выписка из протокола заседания №141021-2 от 14 октября 2021 г.). Ухудшений в состоянии здоровья животных в течение двух недель после получения образцов цельной крови не наблюдалось.

2.2.2 Иммуноферментный анализ

Клоны антител к эпитопам альфа-цепи IgA человека 3B7, 1B12, 10G11, 2E5, 2B5, 1N9 и 3B4 были предоставлены руководителем лаборатории гибридной технологии ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России д.б.н., проф. М.П. Самойлович.

Работы по выбору клонов антител, распознающих IgA ОИ, были проведены совместно с сотрудниками ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России к.б.н. А.Ш. Джаруллаевой и к.б.н. А.И. Тухватулиным.

Рекомбинантный белок, соответствующий рецептор-связывающему домену (RBD) S-белка SARS-CoV-2 (B.1.1.1., ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России; 100 нг/лунка) сорбировали на 96-луночные планшеты для иммуноферментного анализа (ИФА) с высокой сорбционной емкостью (Costar, США) в карбонатно-бикарбонатном буфере (ПанЭко, Россия; pH 9,6) и инкубировали при +4 °С в течение ночи. На следующий день планшеты трижды промывали фосфатно-

солевым буфером (Sigma Aldrich, США), содержащим 0,05% Tween 20 (TPBS, Пущинские лаборатории, Россия) блокировали фосфатно-солевым буфером с добавлением 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (Диаэм, Россия), инкубировали 1 ч на термошейкере (Biosan, Латвия) при 37 °С с перемешиванием (300 об./мин) и снова промывали 3 раза TPBS.

Для подбора клонов антител, распознающих IgA ОИ, использовали сыворотки крови шести животных: двух ОИ, получивших вакцину Спутник V внутримышечно (ID 0701 и 0729); двух ОИ, получивших вакцину Спутник V интраназально (ID 2584 и 3018) и двух ОИ, получивших препарат плацебо (ID 0728 и 0727) внутримышечно и интраназально.

В 96-луночных планшетах без покрытия готовили серийные разведения исследуемых сывороток ОИ в диапазоне 1:50–1:6400 в буфере для разведения образцов (S012, Хема, Россия), переносили в ИФА-планшеты в объеме по 100 мкл и инкубировали 1 ч на термошейкере при 37 °С с перемешиванием (300 об./мин). Планшет промывали 5 раз TPBS, после чего в каждую лунку добавляли по 100 мкл описанных выше клонов антител к Fc-фрагменту IgA, конъюгированных с пероксидазой хрена, в буфере для разведения образцов и инкубировали 1 час на термошейкере (Biosan, Латвия) при 37 °С с перемешиванием (300 об./мин). Для определения наиболее оптимального разведения клонов антител к IgA в иммуноферментном анализе, они наносились на планшет в разведении, рекомендованном производителем, а также в концентрации вдвое выше и вдвое ниже.

Планшеты промывали 5 раз TPBS. Детекцию проводили с использованием готового водного раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (100 мкл на лунку) (Иммунотех, Россия). Реакцию останавливали через 15 мин 1М H₂SO₄ (50 мкл на лунку). Оптическую плотность измеряли на спектрофотометре (Multiskan FC, Thermo Fisher, США) при длине волны 450 нм. Титр антител определяли как максимальное разведение сыворотки, при котором значение оптической плотности превышало среднее значение в лунках с контрольными образцами в два раза.

2.2.3 Проточная цитофлуориметрия

Образцы цельной венозной крови объемом 2 мл (<6% объема циркулирующей крови животного) были получены от восьми ОИ путем пункции бедренной вены с использованием трехкомпонентных шприцев объемом 2,5 мл с иглами 25G (SFM, Германия), в которые предварительно набирали 25 МЕ натрий-гепарина (Белмедпрепараты, Минск, Республика Беларусь) на 1 мл цельной крови.

Взятие крови у ОИ проводили в отдельном помещении с исключением визуального и аудиального контакта с другими особями. Процедуры не вызывали значительного дистресса у животных, поскольку ловля и взятие крови являются рутинными процедурами при ветеринарном мониторинге ОИ, содержащихся в лабораторных условиях.

Аликвоты цельной крови объемом 50 мкл инкубировали в течение 30 минут при температуре 22 °С с клонами флуоресцентно меченых антител (Таблица 2).

Таблица 2 — Перечень использованных в работе клонов антител к поверхностным антигенам мононуклеаров периферической крови обыкновенных игрунок

№	Антиген	Видовая специфичность	Клон антител	Флуорохром	Кат. номер	Производитель
1.	CD45	антитела мыши; к антигену ОИ	6C9	PE	250204	BioLegend
2.	CD3	антитела мыши; к антигену человека	SP34-2	Alexa Fluor 700	557917	BD biosciences
3.	CD20	антитела мыши; к антигену человека	H299	FITC	6602381	Beckman Coulter
4.	CD4	антитела мыши; к антигену человека	L200	PerCP-Cy5.5	552838	BD biosciences
5.	CD8	антитела мыши; к антигену ОИ	6F10	PE	250304	BioLegend
6.	CD69	антитела мыши; к антигену человека	L78	APC	654663	BD biosciences
7.	CD62L	антитела мыши; к антигену человека	SK11	Brilliant Violet 421	743207	BD biosciences
8.	CD45RO	антитела мыши; к антигену человека	UCHL1	PE-Cy7	304230	BioLegend
9.	CD107a	антитела мыши; к антигену человека	H4A3	Brilliant Violet 421	562623	BD biosciences

10.	CD27	антитела мыши; к антигену человека	M-T271	APC	356409	BioLegend
-----	------	---------------------------------------	--------	-----	--------	-----------

FITC — флуоресцеинизотиоцианат; PE — фикоэритрин; PerCP — перидинин-хлорофилл протеин; Cy — цианин; APC — аллофикоцианин.

После инкубации с указанными антителами образцы обрабатывали 1 мл буфера для лизиса эритроцитов (BioLegend, кат. 420301) в течение 15 минут при комнатной температуре и однократно отмывали путем центрифугирования в 1 мл фосфатно-солевого буфера (Sigma Aldrich, США) на скорости 2000 g в течение 3 мин. Образцы анализировали на проточном цитометре BD FACSAria III (BD) в течение 30 минут после окрашивания. Гейтинг проводили с помощью программного обеспечения FACSDiva (BD). Для контроля неспецифического связывания антител использовали отрицательный контроль флуоресценции минус один — окрашивание всеми другими антителами, за исключением тестируемого.

2.2.4 Лимфопротлиферативный тест

На 11 сутки после введения второго компонента вакцины Спутник V МПК ОИ выделяли из цельной крови с использованием среды для выделения лимфоцитов LSM (lymphocyte separation media, MP biomedical, США). Полученную клеточную суспензию в 1 мл фосфатно-солевого буфера в стерильных условиях ламинарного бокса переносили в 15 мл пробирку (Corning, США) и отбирали аликвоту неокрашенных клеток для дальнейшей калибровки цитометра. Окрашивание клеток флуоресцентным красителем CFSE (сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина, 5 mM раствор в диметилсульфоксиде, Invitrogen, США) проводили в соответствии с протоколом производителя. С соблюдением правил стерильной работы пипеткой с переменным объемом 1–10 мкл на внутреннюю поверхность крышки пробирки, содержащей клеточную суспензию, добавляли 5 мкл раствора красителя CFSE. После повторения данной процедуры с каждым окрашиваемым образцом, все пробирки быстро переворачивали и перемешивали клетки на вортексе в течение 20 секунд. Образцы инкубировали 5 минут при комнатной температуре в темноте. По истечении времени инкубации каждую пробирку открывали и добавляли по 1 мл фетальной бычьей сыворотки (ФБС; HyClone, США), инактивированной нагреванием, для

инактивации несвязанного красителя. Далее в пробирки вносили по 10 мл фосфатно-солевого буфера (Sigma Aldrich, США), центрифугировали при 500 g в течение 10 мин, отбирали надосадочную жидкость и добавляли 2 мл полной среды для культивирования клеток (RPMI-1640 с 10% термоинактивированной ФБС, 0.292 мг/мл L-глутамина, 50 ед./мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина).

Для проведения антигенной стимуляции клетки высевали в двух повторах в 96-луночные планшеты из расчета 200 тыс. клеток на лунку и стимулировали 5 мкг/мл S-белка SARS-CoV-2 (S1+S2 эктодомен, YP_009724390.1, Sino biological, КНР). В качестве положительного контроля использовали конканавалин А в концентрации 8 мкг/мл (ПанЭко). В качестве отрицательного контроля — полную среду RPMI-1640. Суммарный объем среды в каждой лунке составлял 216 мкл. Клетки инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при температуре 37 °С. Через 96 ч собирали клетки и бесклеточную надосадочную жидкость. Клетки из лунок с повторностями объединяли и окрашивали антителами: анти-CD3-APC-Cy7 (BD; клон SP34-2, кат. номер 557757), анти-CD4-PE-Cy7 (BD, клон L200, кат. номер 560644) и анти-CD8-PE (BioLegend, клон 6F10, кат. номер 250304) в объеме 50 мкл в течение 30 мин. при +4 °С. Затем образцы окрашивали 4',6-диамидино-2-фенилиндолом (DAPI, 1 мкг/мл) для исключения мертвых клеток и проводили цитофлуориметрический анализ на приборе CytOfex (Beckman Coulter, США) в течение 30 минут после окрашивания. Гейтинг популяций клеток проводили с помощью программного обеспечения CytExpert (Beckman Coulter, США), включая последовательно: выделение популяции лимфоцитов по показателям прямого и бокового светорассеивания, выделение одиночных клеток на основании показателей прямого светорассеивания по высоте и по площади, выделение живых клеток по отсутствию окрашивания DAPI, выделение CD3⁺ популяции и разделение последней на популяцию CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺. Количество анализируемых событий устанавливали как 50 тыс. в гейте CD3⁺ клеток. Уровень антиген-специфической пролиферации CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-лимфоцитов рассчитывали для каждого животного как разность доли пролиферирующих (CFSE dim, затухание сигнала CFSE) клеток в лунках, куда добавляли S-белок SARS-CoV-2, и лунках, куда его не добавляли.

1B12 1:500						1B12 1:1000						1B12 1:2000					
<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
10G11 1:500						10G11 1:1000						10G11 1:2000					
<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
2E5 1:500						2E5 1:1000						2E5 1:2000					
<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
2B5 1:2000						2B5 1:4000						2B5 1:8000					
<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50	<1:50
1H9 1:2500						1H9 1:5000						1H9 1:10000					
1:50	1:200	1:400	1:100	<1:50	<1:50	1:50	1:100	1:200	1:100	<1:50	<1:50	<1:50	1:100	1:100	1:100	<1:50	<1:50
3B4 1:20000						3B4 1:40000						3B4 1:80000					
1:100	1:100	1:400	1:200	<1:50	<1:50	1:50	1:200	1:800	1:200	<1:50	<1:50	1:100	1:100	1:400	1:200	<1:50	<1:50

В/М — внутримышечное введение вакцины; И/Н — интраназальное введение вакцины. Жирным шрифтом выделены образцы, в которых наблюдалось связывание исследуемого клона с IgA ОИ в иммуноферментном анализе.

На основании данных иммуноферментного анализа для дальнейшего изучения специфического локального мукозального поствакцинального иммунного ответа у ОИ был выбран клон 3B4 в разведении 1:40000.

2.3.2 Разработка методики оценки антиген-специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа у обыкновенных игрунок

К моменту начала исследования различными научными группами было проанализировано недостаточное количество коммерчески доступных моноклональных антител для цитометрического анализа клеток ОИ [12–14]. На первом этапе разработки методики оценки специфического адаптивного поствакцинального и постинфекционного клеточного ответа у ОИ был проведен подбор клонов флуоресцентно меченных моноклональных антител, связывающихся с

поверхностными антигенами субпопуляций МПК ОИ, а также определено соотношение субпопуляций лимфоцитов и уровня их активации у здоровых интактных самок и самцов ОИ. В частности, было установлено процентное соотношение основных субпопуляций Т- и В-лимфоцитов ($CD45^+$, $CD45^+CD3^-CD20^+$, $CD45^+CD3^+CD20^-$, $CD3^+CD4^+CD8^-$, $CD3^+CD4^-CD8^+$), а также доля клеток, имеющих маркеры созревания и активации ($CD27$, $CD62L$, $CD69$, $CD45RO$, $CD107a$). Стратегия дифференциации клеточных субпопуляций и анализ результатов окрашивания представлены на Рисунке 9 и Рисунке 10 на примере образца крови, полученного от одного животного (ID 4540).

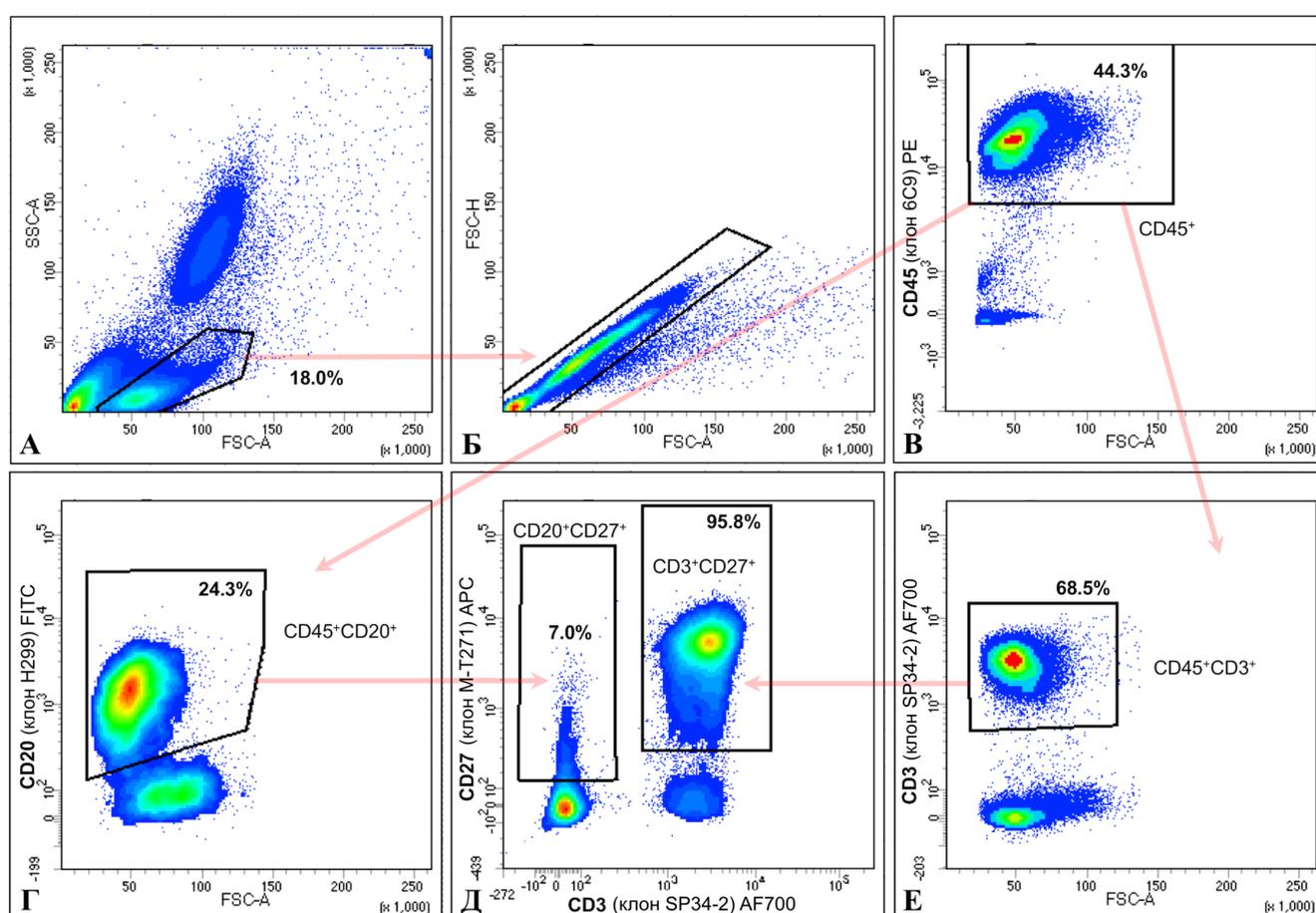


Рисунок 9 — Дифференциация субпопуляций мононуклеаров периферической крови интактных ОИ (ID 4540). Графики прямого и бокового светорассеивания FSC-A/SSC-A (A) и исключения неодинокных клеток (B) были использованы для выделения популяции $CD45^+$ лейкоцитов (B). Доли окрашенных $CD45^+CD20^+$ (Г) и $CD45^+CD3^+$ (E) клеток представлены в соответствующих полях относительно популяции $CD45^+$. Доли окрашенных клеток $CD3^+CD27^+$ и $CD20^+CD27^+$ (Д) представлены в соответствующих полях относительно популяций $CD3^+$ и $CD20^+$ клеток, соответственно. В каждом тесте были проанализированы 150 000 событий

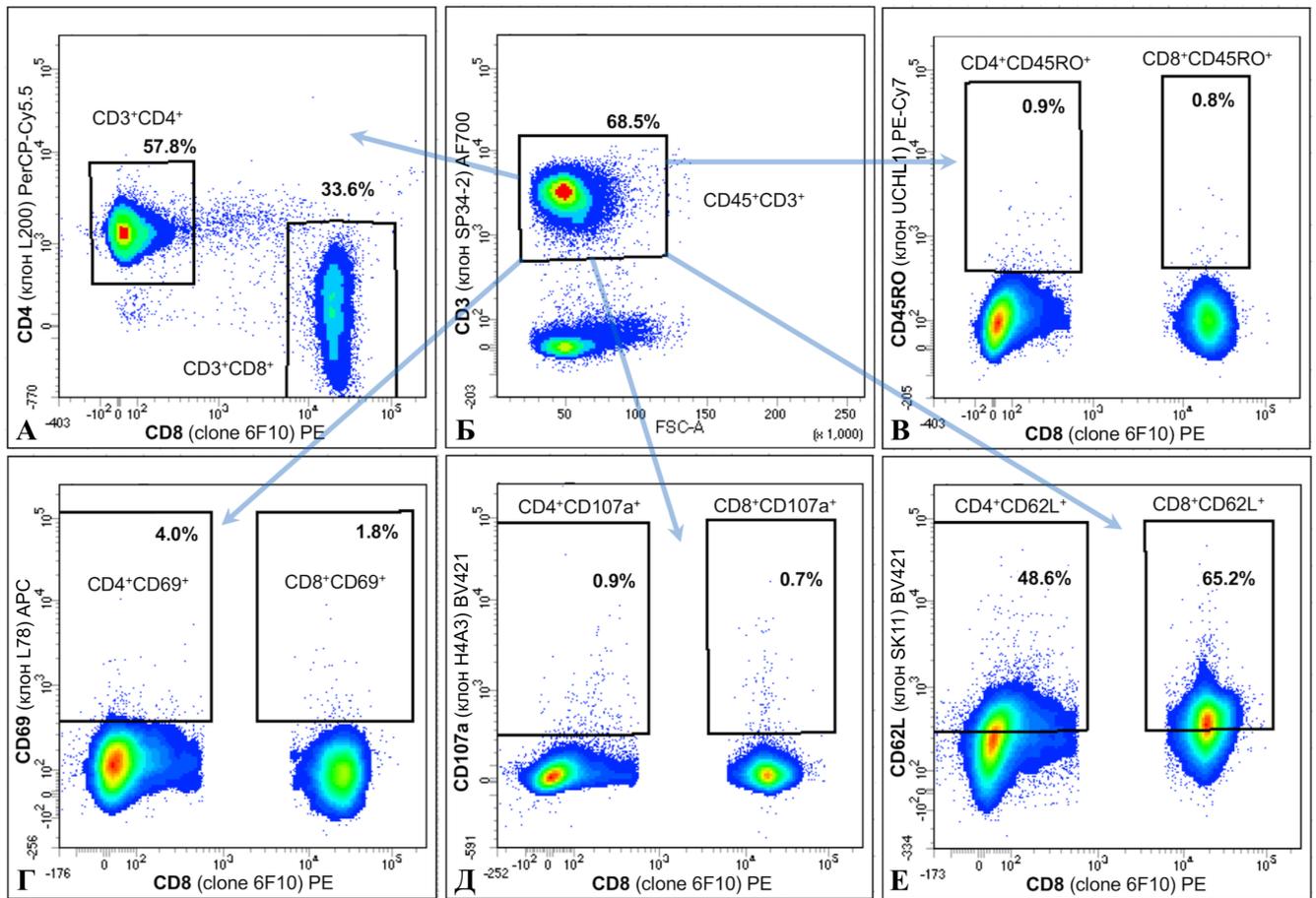


Рисунок 10 — Результаты окрашивания субпопуляций Т-лимфоцитов интактных ОИ антителами к маркерам созревания и активации. Доли окрашенных $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ (А) клеток представлены в соответствующих полях относительно популяции $CD45^+CD3^+$ (Б) клеток. Доли окрашенных $CD45RO^+$ (В), $CD69^+$ (Г), $CD107a^+$ (Д), и $CD62L^+$ (Е) клеток представлены в соответствующих полях относительно популяций $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ клеток. В каждом тесте были проанализированы 150 000 событий

Соотношение субпопуляций МПК, окрашиваемых антиген-специфическими антителами, у интактных ОИ представлены в Таблице 4. $CD45^+$ лейкоциты составляли $54,3 \pm 11,8\%$ от общего количества клеток после лизиса эритроцитов. $CD45^+$ популяция содержала $22,7 \pm 5,5\%$ В-клеток ($CD45^+CD3^-CD20^+$) и $67,6 \pm 6,3\%$ Т-клеток ($CD45^+CD3^+CD20^-$). Среди $CD3^+$ клеток $55,7 \pm 5,5\%$ составляли Т-хелперы ($CD3^+CD4^+CD8^-$) и $34,3 \pm 3,7\%$ — цитотоксические Т-лимфоциты ($CD3^+CD4^-CD8^+$). Соотношения популяций В- и Т-клеток ОИ, включая субпопуляции $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов, соответствовали ранее опубликованным данным для интактных ОИ [13,72], а также показателям, характерным для здоровых людей [73,74].

Таблица 4 — Соотношение субпопуляций мононуклеаров периферической крови интактных обыкновенных игрунок

Исследуемые параметры	ID животного, параметр, %										Итого, М±σ, %
	Самки					Самцы					
	2996	2998	0519	3016	2997	М±σ,	2994	4540	4520	М±σ,	
Возраст, месяцы	29	29	23	48	25	30,8±10,0	30,0	25,0	25,0	26,7±2,9	29,3±8,0
*CD45 ⁺	67,5	64,5	62,3	43,5	43,2	56,2±11,9	42,1	44,3	66,6	51,0±13,6	54,3±11,8
CD45 ⁺ CD3 ⁻ CD20 ⁺	28,7	32,4	17,7	17,5	20,4	23,3±6,8	22,3	24,3	18,4	21,7±3,0	22,7±5,5
CD45 ⁺ CD20 ⁺ CD27 ⁺	8,3	11,8	5,9	17	7,9	10,2±4,4	8,9	7,0	4,7	6,9±2,1	8,9±3,9
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD20 ⁻	62,4	57,6	69,6	74,7	64,4	65,7±6,6	66,5	68,5	76,9	70,6±5,5	67,6±6,3
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD27 ⁺	93,9	93,2	96,2	98,4	93,2	95,0±2,3	91,8	95,8	94,6	94,1±2,1	94,6±2,1
CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD8 ⁺	39,2	32,7	34,4	40	32,9	35,8±3,5	33,2	33,6	28,5	31,8±2,8	34,3±3,7
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD62L ⁺	72,7	81,2	89,3	86,7	51,8	76,3±15,1	76,4	65,2	72,0	71,2±5,6	74,4±12,1
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD69 ⁺	0,9	1,1	1,6	1,9	0,3	1,2±0,6	1,2	1,8	1,0	1,3±0,4	1,2±0,5
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD45RO ⁺	2	2,4	1,8	1,8	0,8	1,8±0,6	2,0	0,8	0,7	1,2±0,7	1,8±0,7
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD107a ⁺	0,9	0,5	0,8	0,5	0	0,5±0,4	0,2	0,7	0,2	0,4±0,3	0,5±0,3
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁻	49,9	57,7	51,2	49,7	57,8	53,3±4,1	55,5	57,8	66,1	59,8±5,6	55,7±5,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ⁺	47,3	56	73,8	66	43	57,2±12,8	49,1	48,6	47,8	48,5±0,7	54,0±10,7
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD69 ⁺	1,1	2,3	3,8	4,2	1,7	2,6±1,3	2,0	4,0	2,7	2,9±1,0	2,7±1,2
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD45RO ⁺	2	1,7	2,3	2,4	1,1	1,9±0,5**	1,3	0,9	1,0	1,1±0,2**	1,6±0,6
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD107a ⁺	1,2	0,6	1,5	0,9	0,2	0,9±0,5	0,2	0,9	0,4	0,5±0,4	0,7±0,5

* — среди популяции лимфоцитов, дифференцированных на основе графика FSC-A/SSC-A при исключении неодионых клеток; ** — статистически значимые различия ($p < 0,05$).

Маркеры активации и созревания лимфоцитов у интактных ОИ определялись на поверхности следующих пропорций клеток из описанных выше субпопуляций: CD62L (L-селектин; сигнал хоуминга лимфоцитов, расщепляется при активации клеток): на 54,0±10,7% CD3⁺CD4⁺ клеток и на 74,4±12,1% CD3⁺CD8⁺ клеток; CD69 (ранний маркер Т-клеточной активации): на 2,7±1,2% CD3⁺CD4⁺ клеток и 1,2±0,5% CD3⁺CD8⁺ клеток; CD45RO (активированные Т-клетки памяти): на 1,6±0,6% CD3⁺CD4⁺ клеток и 1,8±0,7% CD3⁺CD8⁺ клеток; CD107a (активированные Т-клетки): на 0,7±0,5% CD3⁺CD4⁺ клеток и 0,5±0,3% CD3⁺CD8⁺ клеток; CD27 (TNFRSF7, представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей-7; В-клетки памяти, зрелые Т-клетки): на 94,6±2,1% Т-клеток (CD20⁻CD3⁺). Значения находились

в пределах, описанных в исследовании распределения субпопуляций иммунных клеток интактных ОИ, проведенном Neumann и соавт. [14].

В ходе работ, описываемых в данном разделе, была обнаружена более низкая в сравнении с опубликованными данными [14] доля популяции В-клеток памяти $CD45^+CD20^+CD27^+$ ($8,9 \pm 3,9\%$), что свидетельствует о низком уровне активации В-клеток ОИ. Причиной наблюдаемых различий может быть более молодой средний возраст ($29,3 \pm 8,0$ месяцев, Таблица 4) животных, использованных в нашей работе, а также тот факт, что они родились и выросли в лабораторных условиях, позволяющих значительно снизить частоту фоновой инфекционной патологии.

Доли $CD62L$ -позитивных субпопуляций $CD4^+$ и $CD8^+$ лимфоцитов, наблюдавшиеся в данном исследовании, были ниже, чем соответствующие показатели, описанные в работе Yoshida и соавт. [75], что свидетельствовало об активации Т-клеток. Следует отметить, что доля активированных $CD20^+CD27^+$ В-клеток коррелировала с долей неактивных $CD3^+CD4^+CD62^+$ Т-хелперов, но не коррелировала с долей цитотоксических $CD3^+CD8^+CD62^+$ Т-лимфоцитов ($r = 0,902$; $p = 0,006$; тест ранговой корреляции Спирмена). Других признаков системной иммунной активации выявлено не было.

Соотношение субпопуляций лимфоцитов, а также уровни активации Т- и В-клеток у интактных самцов и самок ОИ не различались. Единственное статистически значимое различие было выявлено в доле $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ клеток ($1,9 \pm 0,5\%$ у самок против $1,1 \pm 0,2$ у самцов; $t = 2,5658$, $df = 6$, $p = 0,0426$; t-тест). Наблюдаемые доли $CD3^+CD4^+CD45RO^+$ клеток у самцов и самок находились в рамках значений, описанных ранее для интактных животных [13].

Возраст ОИ, использованных в исследовании, был неоднородным, при этом одно животное было значительно старше других (№3016, Таблица 4). В этой связи была проанализирована взаимосвязь между возрастом животных и оцениваемыми иммунными параметрами. Доля В-клеток памяти $CD45^+CD20^+CD27^+$ достоверно коррелировала с возрастом животных ($n = 8$, $r = 0,923$, $p = 0,0011$; тест ранговой корреляции Спирмена), что подтверждает высказанное выше предположение о том, что относительно низкая доля В-клеток памяти связана с молодым возрастом животных. Более того, достоверная корреляция наблюдалась и при исключении из

анализа данных животного №3016 ($n = 7$, $r = 0,798$; $p = 0,03$). Другие иммунологические параметры иммунного статуса ОИ не зависели от возраста животных ($p > 0,05$).

Подобранные клоны флуоресцентных антител далее были использованы для оценки специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа у ОИ в лимфопролиферативном тесте с антигенной рестимуляцией МПК. На 11 сутки после введения первого компонента вакцины Спутник V МПК ОИ выделяли из цельной крови, окрашивали CFSE и стимулировали S-белком SARS-CoV-2. В качестве положительного контроля использовали конканавалин А, в качестве отрицательного контроля — полную среду RPMI-1640. Через 96 ч клетки собирали и окрашивали подобранными клонами антител к маркерам CD3, CD4 и CD8. Уровень антиген-специфической лимфопролиферации оценивали методом проточной цитометрии.

На Рисунке 11 представлен пример результата оценки напряженности специфического поствакцинального Т-клеточного иммунитета у ОИ через 7 суток после введения второй дозы аденовирусной векторной вакцины Спутник V. С использованием подобранных клонов антител удалось провести дифференциацию целевых субпопуляций Т-лимфоцитов ОИ и долю клеток, пролиферирующих в ответ на специфическую антигенную стимуляцию. Важно отметить низкий уровень фоновой лимфопролиферации не стимулированных лимфоцитов в контрольном образце, подтверждающий низкий уровень активации иммунного ответа у ОИ, содержащихся в лабораторных условиях. Результаты оценки специфического поствакцинального Т-клеточного ответа на внутримышечное и интраназальное введение ОИ вакцины Спутник V подробно описаны в Главе 3.

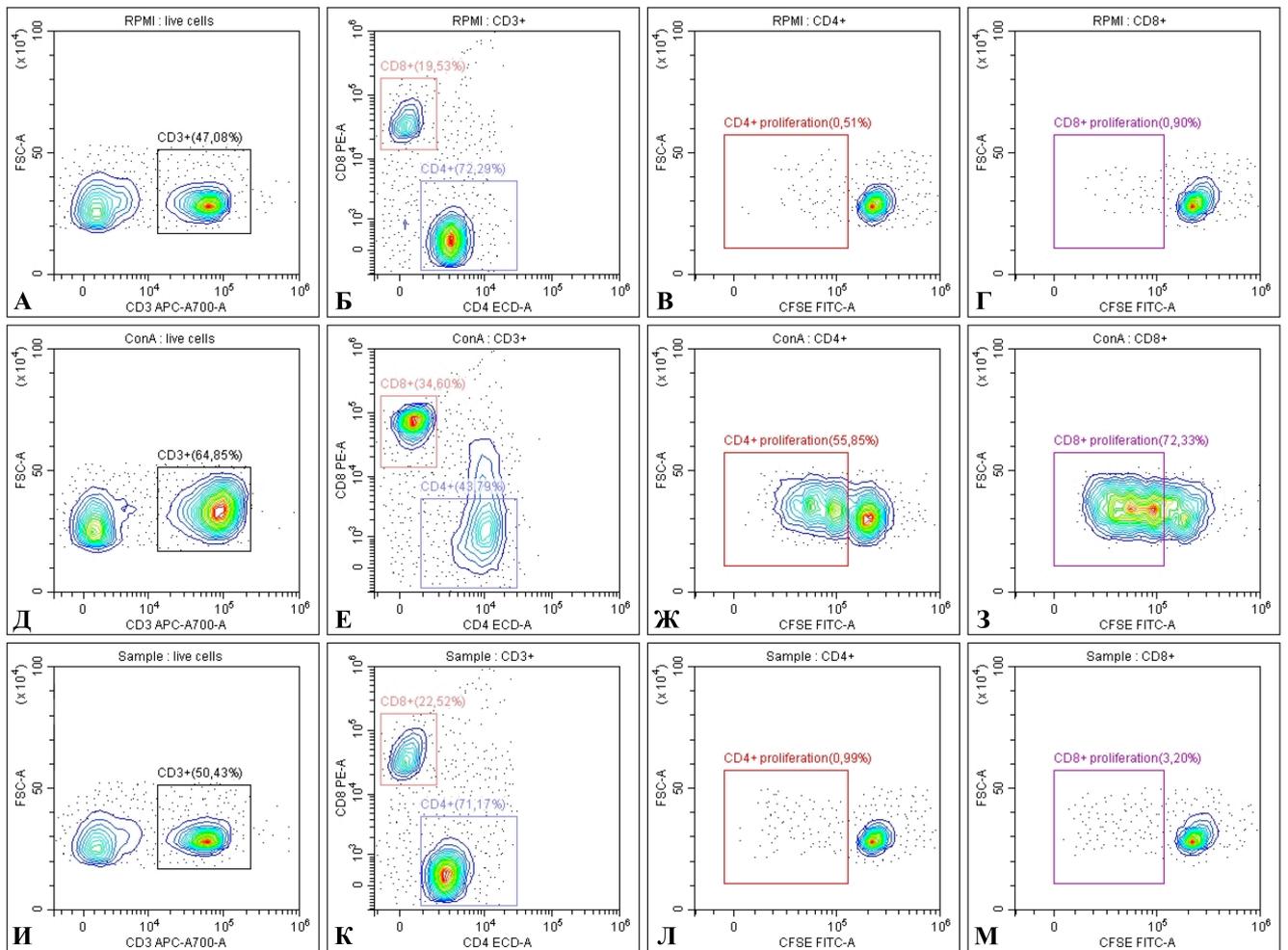


Рисунок 11 — Оценка напряженности специфического поствакцинального Т-клеточного иммунитета у обыкновенных игрунок в лимфопролиферативном тесте. Определение доли Т-хелперных ($CD3^+CD4^+$) и Т-киллерных ($CD3^+CD8^+$) клеток, пролиферирующих в ответ на стимуляцию S-белком у животного, получившего аденовирусную векторную вакцину Спутник V. Представлено выделение популяции $CD3^+$ клеток, разделение ее на популяции $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ и оценка уровня лимфопролиферации в этих популяциях для (А–Г) нестимулированных клеток, (Д–З) клеток, стимулированных конканавалином А и (И–М) клеток, стимулированных S-белком SARS-CoV-2

2.4 Обсуждение

На первом этапе работ, описанных в данной главе, была проведена оценка способности панели клонов антител к альфа-цепи IgA человека связываться с IgA ОИ. Выбранный клон 3В4, показавший наилучшие характеристики связывания с IgA ОИ, представляет собой моноклональное антитело мыши, распознающее эпитоп альфа-цепи IgA человека, присутствующий на альфа-1 и на альфа-2 тяжелых цепях. Антитело распознает эпитоп на мономерном IgA, а также на полимерном IgA в составе

комплекса с секреторным компонентом. Клон 3В4 не связывается с IgG, IgM, с каппа- или лямбда- легкими цепями [76]. В дальнейшем мы использовали клон 3В4 для доклинической оценки уровня специфического поствакцинального локального мукозального иммунного ответа при внутримышечном и интраназальном введении ОИ вакцины Спутник V [43,77].

Дальнейшие работы, описанные в данной главе, были направлены на подбор панели клонов антител для дифференциации субпопуляций МПК ОИ и их использование для разработки методики оценки специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа у ОИ. Важно отметить, что из подобранных моноклональных антител только антитела к антигенам CD45 и CD8 были специально получены для работы с биоматериалом, полученным от ОИ. Остальные клоны антител были специфичны к человеческим антигенам, но обладали кросс-реактивностью к ортологичным антигенам ОИ.

Был установлен субпопуляционный состав МПК у интактных ОИ различного пола и возраста, показавший более низкую в сравнении с опубликованными данными [14] долю субпопуляции CD45⁺CD20⁺CD27⁺ клеток (В-клетки памяти). Поскольку возраст животных в исследовании, описываемом в данной главе, был младше, чем в исследовании Neumann и соавт. [14], было выдвинуто предположение о связи доли субпопуляции В-клеток памяти с возрастом ОИ, в дальнейшем подтвержденное результатами корреляционного анализа между возрастом животных и долей субпопуляции CD45⁺CD20⁺CD27⁺ клеток в их крови ($r = 0,923$, $p = 0,0011$; тест ранговой корреляции Спирмена).

Поскольку других статистически значимых различий субпопуляционного состава и статуса активации лимфоцитов у животных разного возраста в ходе исследования, описанного в данной главе, обнаружено не было, было выдвинуто предположение о возможности использования ОИ в возрасте старше двух лет в исследованиях Т-клеточного иммунного ответа в составе смешанных возрастных групп. Тем не менее, в дальнейшем представляется необходимым подтверждение данного предположения в экспериментах на более обширной выборке.

Доля субпопуляций CD62L-позитивных CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, установленная в данной работе, была ниже значений, представленных Yoshida и соавт. [75]. L-селектин

(CD62L) обеспечивает вход Т-клеток в лимфатические узлы. Уровень L-селектина также снижается у Т-клеток, мигрирующих внутри лимфатических узлов, тогда как при нахождении клеток вне лимфоидных органов уровень экспрессии CD62L остается неизменным [78]. Уровень L-селектина на поверхности Т-клеток снижается в ходе их активации до 10% от исходного значения в течение нескольких минут [79]. Таким образом, снижение доли CD62L⁺ Т-клеток означает возможную недавнюю или еще продолжающуюся Т-клеточную активацию. Интересно, что доля CD27⁺ В-клеток ОИ коррелировала с долей CD62L⁺CD4⁺ Т-клеток ($p < 0,01$), т.е. В-клеточная активация ассоциировалась с отсутствием активации CD4⁺ Т-клеток. В более ранних работах была описана взаимосвязь между уровнем поверхностных маркеров активации В-клеток памяти CD27 и CD21 у макак [80]. Рецептор комплемента II типа CD21 представлен на большинстве зрелых В-клеток. Ранее было показано, что снижение уровня маркера CD21⁺ на В-клетках происходило одновременно с расщеплением CD62L незрелыми лимфоцитами и клетками памяти, что приводило к их миграции к месту инфицирования. При этом оба процесса регулируются одной и той же группой протеаз [81]. Эти данные позволяют предположить механизм CD21-опосредованной взаимосвязи между уровнем маркеров активации: CD27 для В-клеток памяти и CD62L для Т-клеток. Корреляция между уровнем продукции CD27 В-клетками, свидетельствующим об активации В-клеток, и уровнем деградации CD62L, свидетельствующем об активации CD4⁺ клеток, может отражать одновременную регуляцию дифференциации этих субпопуляций иммунных клеток у ОИ.

Подобранные клоны флуоресцентных антител далее были использованы нами для оценки специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа на внутримышечное и интраназальное введение ОИ вакцины Спутник V [43]. Благодаря низкому уровню гетерогенности иммунного ответа между отдельными животными, а также изолированным условиям лабораторного содержания с исключением инфекционной опасности, результаты, получаемые в ходе иммунологических исследований с использованием ОИ, характеризуются высокой сходимостью и низким уровнем фонового шума, что повышает силу статистических тестов.

2.5 Заключение главы

В результате работ, описанных в данной главе, был подобран клон антител для детекции IgA в биоматериале, полученном от ОИ, а также клоны флуоресцентно меченных антител, необходимых для дифференциации субпопуляций лимфоцитов и оценки уровня их созревания и активации. Подобранные клоны антител далее были использованы в методике оценки специфического поствакцинального локального мукозального и Т-клеточного адаптивного ответа у ОИ.

Подобранная панель антител позволила установить доли специфических клеточных популяций МПК у интактных ОИ и определить их функциональный статус, что в дальнейшем может быть использовано в экспериментах по оценке эффективности новых иммунобиологических препаратов, включая вакцины против вирусных и онкологических заболеваний. Возможность проведения доклинических исследований локального мукозального и Т-клеточного иммунного ответа на введение иммунобиологических препаратов на лабораторных приматах значительно повышает трансляционный потенциал получаемых результатов.

Описанные в данной главе результаты опубликованы в журнале *Acta Naturae* [15] и *Emerging Microbes and Infections* [43], а также представлены на ряде международных и российских научных конференций, включая доклад «Toolkit for monitoring of immunogen expression and adaptive cellular response in common marmosets following intradermal DNA immunization with electroporation» (Набор методик для оценки экспрессии иммуногенов и адаптивного клеточного ответа у обыкновенных игрунок после внутрикожной ДНК-иммунизации и электропорации) на международной конференции Международного вакцинного общества (ISV), прошедшей 28–30 октября 2018 г. в г. Атланта, США.

ГЛАВА 3. Использование обыкновенных игрунок в доклинических исследованиях безопасности и специфической активности профилактических вакцин против COVID-19

Пандемия коронавирусной инфекции 2019 года (COVID-19), вызванная коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2), по состоянию на июль 2025 г. унесла более 7 млн жизней по всему миру [82]. Для профилактики COVID-19 были разработаны препараты на основе всех существующих вакцинных платформ, включая генетические [47,48], векторные [49,83], субъединичные [84,85] и инактивированные [86–89] вакцины. Высокая скорость развития пандемии потребовала проведения исследований специфической активности и безопасности кандидатных вакцинных препаратов в кратчайшие сроки, что обусловило необходимость наличия охарактеризованных лабораторных животных различных видов и подготовленной инфраструктуры для работы с патогенами.

В данной главе приведены результаты применения лабораторных ОИ в доклинических исследованиях безопасности и специфической активности инактивированной β -пропиолактоном цельновирионной вакцины КовиВак, разработанной в ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), а также результаты долгосрочной оценки иммунного ответа на интраназальное и внутримышечное введение ОИ аденовирусной векторной вакцины Спутник V, разработанной ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

3.1 Обзор литературы

3.1.1 Характеристика возбудителя COVID-19

SARS-CoV-2 относится к подроду *Sarbecovirus* рода *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae* [90]. Вирионы SARS-CoV-2 представляют собой покрытые липидной мембраной частицы сферической или эллипсоидной формы со средней длиной порядка 97 нм в максимальном измерении, на поверхности которых расположены характерные шиповидные структуры тримеров поверхностного гликопротеина (S) длиной около 26 нм (Рисунок 12). В составе поверхностной мембраны вириона также содержатся белок

оболочки (E) и мембранный белок (M). Внутри вирусных частиц расположены плотно упакованные рибонуклеиновые комплексы, состоящие из белка нуклеокапсиды (N) и вирусной геномной (+) РНК длиной около 30 тыс. оснований [91].

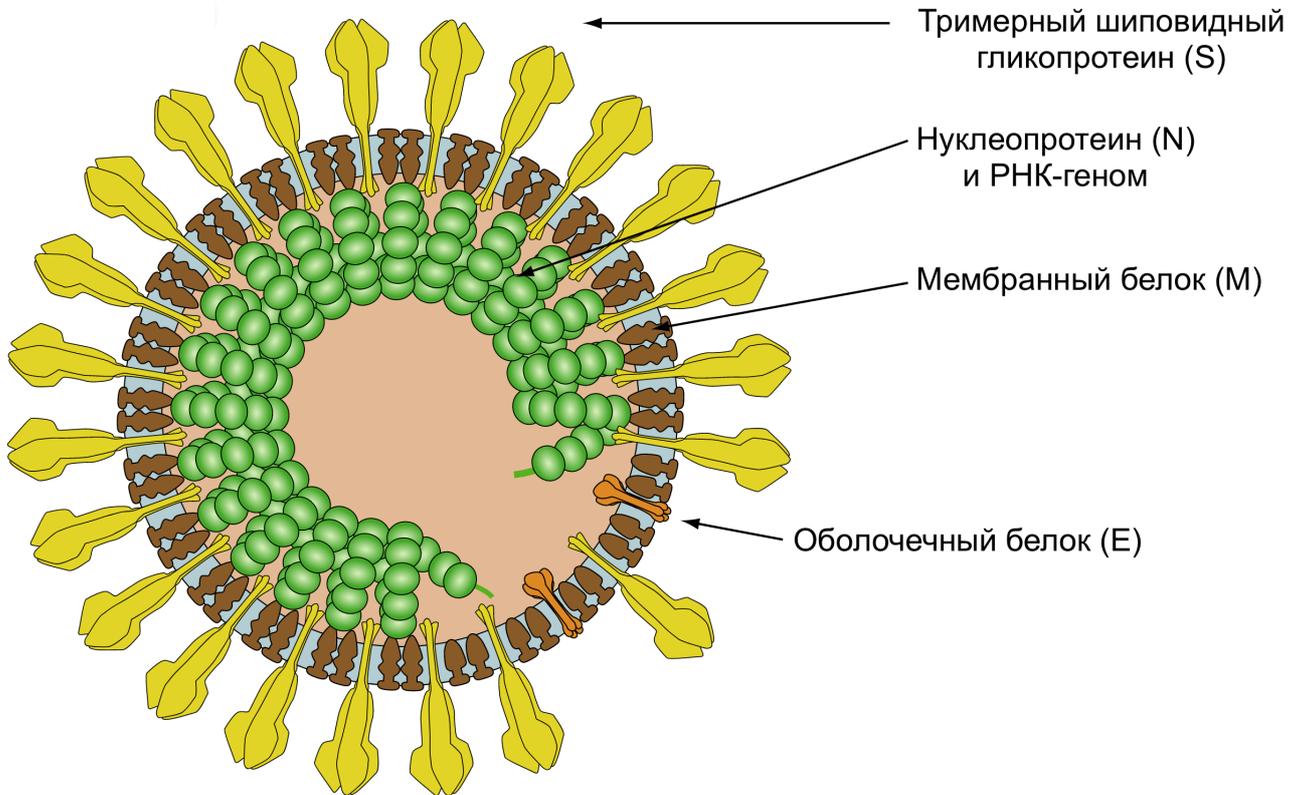


Рисунок 12 — Структура частиц SARS-CoV-2 [ViralZone, Швейцарский институт биоинформатики, Швейцария]

Поскольку N-белок не представлен на поверхности вирионов SARS-CoV-2, антитела к N-белку не обладают вируснейтрализующей активностью, однако они способствуют элиминации инфицированных клеток по механизму антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности [92]. Широко применяемые генетические и векторные вакцины против COVID-19 содержат геномные последовательности S-белка SARS-CoV-2 и не индуцируют выработку антител к N-белку [47–49,83]. Выявление специфических антител к N-белку в сыворотке крови людей и лабораторных животных наблюдается в результате перенесенной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, применения инактивированных вакцин [41,86–89], а также применения специализированных вакцин на основе N-белка [93–95].

На поверхности клетки SARS-CoV-2 может связываться с рядом молекул, включая гистаминовый рецептор H1 [96], однако в качестве основного рецептора для

проникновения в клетку вирус использует ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [97], с которым связывается вирусный поверхностный гликопротеин S. Белок S представляет собой обширно гликозилированный трансмембранный белок слияния класса I, представленный на поверхности вирусных частиц в виде тримера и содержащий субъединицы S1 и S2, а также трансмембранный домен [98]. Субъединица S1 содержит рецептор-связывающий домен (RBD), который взаимодействует с ACE2, после чего происходит протеолитическое разрезание белка S клеточными протеазами с высвобождением субъединицы S2 и ее последующими конформационными изменениями, обеспечивающими слияние мембран и проникновение вирусных нуклеокапсидов в клетку [97]. Таким образом, гликопротеин S и, в особенности, RBD, расположенный на поверхности субъединицы S1, являются основными мишенями вируснейтрализующих антител [99]. Было показано, что уровень анти-RBD IgG в сыворотке крови коррелирует с уровнем иммунной защиты людей от COVID-19 [100]. Кроме того, наличие Т-клеточного иммунного ответа, специфичного к S-белку SARS-CoV-2, обеспечивает защиту от тяжелого течения COVID-19 [101].

3.1.2 Применение лабораторных животных в доклинических исследованиях специфической активности вакцин против COVID-19

Согласно Федеральному закону от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», доклинические исследования лекарственных средств проводятся путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств их безопасности, качества и эффективности. При этом регистрационное досье препаратов должно включать отчеты о фармакодинамических, фармакокинетических и токсикологических исследованиях.

Для вакцин проведение фармакокинетических исследований как правило не требуется, так как фокус доклинической оценки смещен на изучение иммуногенности и токсикологического профиля (WHO Technical Report Series, No. 927, 2005). Токсикологические исследования вакцин проводятся на грызунах и кроликах с применением методик, изложенных в документах ICH (International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use), Решениях

Совета Евразийской экономической комиссии и локальных ГОСТах, а также методик, описанных в Части второй Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты) [102].

Специфическую активность вакцин чаще всего изучают в опытах с иммунизацией лабораторных грызунов с последующим определением титра антител к соответствующему возбудителю в серологических или иммунохимических реакциях, а также в опытах по оценке протективной активности на релевантных моделях, обеспечивающей устойчивость вакцинированных животных к специфическому инфекционному агенту. В тех случаях, когда при формировании в результате вакцинации невосприимчивости к инфекционному агенту клеточные механизмы играют существенную роль, должны быть изучены показатели клеточного иммунного ответа [102].

Учитывая, что SARS-CoV-2 преимущественно проникает в организм через эпителий верхних дыхательных путей, интраназальные вакцины против COVID-19, специально нацеленные на входные ворота инфекции и направленные на индукцию местного мукозального иммунитета, могут превосходить вакцины с внутримышечным введением в способности предотвращать как вирус-ассоциированный патогенез, так и передачу инфекции. Таким образом, существует необходимость в лабораторных животных, позволяющих производить достоверную оценку не только системного поствакцинального гуморального и Т-клеточного, но также локального мукозального иммунного ответа.

3.1.2.1 Оценка протективной активности кандидатных вакцин на лабораторных животных

Наиболее часто в качестве лабораторных тест-систем для оценки протективной активности кандидатных вакцинных препаратов против COVID-19 в опытах с экспериментальным заражением используются восприимчивые к SARS-CoV-2 виды: гуманизированные линейные мыши (*Mus musculus*), сирийские хомяки (*Mesocricetus auratus*), хорьки (*Mustelaputorius furo*) и лабораторные приматы [103].

Основными преимуществами сирийских хомяков в качестве экспериментальной тест-системы для оценки протективной активности вакцин против COVID-19

являются их естественная восприимчивость к SARS-CoV-2 и невысокая стоимость. После интраназального заражения у сирийских хомяков формируется выраженная вирусная пневмония, как правило не приводящая к гибели животных и заканчивающаяся клиническим выздоровлением. Учитываемыми параметрами в экспериментальных и контрольных группах в опытах по оценке протективной активности кандидатных вакцинных препаратов на сирийских хомяках являются масса тела животных, уровни вирусной нагрузки в тканях легких и смывах с дыхательных путей, а также оцениваемая в баллах степень выраженности пневмонии при гистологическом исследовании легких в конечной точке [41,85]. Поскольку упомянутые параметры подвержены значительной изменчивости в зависимости от условий эксперимента, для проведения достоверной статистической оценки различий требуется повышение численности животных в экспериментальных группах. Кроме того, существует ограниченное количество валидированных методик и специализированных реагентов для работы с биоматериалом, полученным от сирийских хомяков, что значительно ограничивает их применение в качестве экспериментальной модели для детального изучения специфического поствакцинального иммунного ответа.

Мыши линии C57BL/6, генетически модифицированные с целью экспрессии фрагмента человеческого гена, кодирующего ACE2 (экзон 6, интрон 6, экзон 7 и поли(A)) под промотором цитокератина 18 (K18-hACE2), исходно были разработаны для моделирования инфекции, вызываемой коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), вызвавшим вспышку заболеваемости в китайской провинции Гуандун в 2003 г. [104]. Полученная линия K18-hACE2 широко используется для моделирования инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, а также испытаний противовирусных препаратов и кандидатных вакцин. У интраназально зараженных животных наблюдается инфекция дыхательных путей [105], однако патогенез COVID-19 у K18-hACE2 мышей имеет значительные отличия от наблюдаемого у людей. Так, после экспериментального заражения гибель животных наблюдается в среднем на 7 сутки в результате поражения мозга [106]. Причиной указанных отличий может являться то, что хотя ген цитокератина 18 преимущественно экспрессируется в эпителиальных клетках, была также показана его

экспрессия в нейронах в коре и стволе головного мозга [107]. В настоящее время продолжается разработка новых моделей COVID-19 на основе мышей, более точно воспроизводящих патогенез, наблюдаемый у человека [108].

Лабораторные тест-системы на основе упомянутых видов животных успешно применяются в разработке терапевтических и профилактических препаратов против COVID-19, однако ограниченный срок жизни лабораторных грызунов и значительные отличия их иммунной системы от человеческой не позволяют проводить долгосрочные исследования специфического поствакцинального гуморального и Т-клеточного иммунного ответа с высоким трансляционным потенциалом [109].

3.1.2.2 Применение обыкновенных грызунов в доклинических исследованиях профилактических вакцин против заболеваний, вызываемых коронавирусами

На ранних стадиях развития пандемии COVID-19 ОИ воспринимались как перспективная приматная модель для доклинических исследований протективной активности разрабатываемых кандидатных профилактических вакцин и противовирусных лекарственных препаратов ввиду ряда причин. Во-первых, наличие колонии охарактеризованных ОИ, родившихся и постоянно содержащихся в помещениях, приспособленных для работы с ПБА, описанной в Главе 1, позволяет набирать необходимое количество животных в экспериментальные группы в кратчайшие сроки без необходимости дополнительной длительной акклиматизации. Во-вторых, наличие отработанных методик оценки специфического поствакцинального системного гуморального, а также локального мукозального и Т-клеточного иммунного ответа у ОИ, описанных в Главе 2, позволяет проводить детальную оценку специфической активности кандидатных вакцинных препаратов.

ОИ успешно использовались несколькими научными группами для изучения инфекций, вызываемых двумя вирусами из рода *Betacoronavirus*: SARS-CoV и коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV), вызвавшими вспышки тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС) и ближневосточного респираторного синдрома (БВРС) в 2002 и 2012 гг., соответственно. Заражение как SARS-CoV, так и MERS-CoV вызывает у ОИ формирование пневмонии и внелегочных поражений, сходных с таковыми у человека

[110,111], что, в частности, позволило использовать ОИ в доклинических исследованиях комбинированных схем лечения БВРС [112].

Под руководством автора в ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) на лабораторных ОИ было проведено изучение безопасности и специфической активности комбинированной векторной вакцины БВРС-ГамВак-Комби, разработанной сотрудниками ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России на основе рекомбинантных аденовирусов человека 26 и 5 серотипов, экспрессирующих гликопротеин вируса MERS-CoV (изолят EMC/2012). Было показано, введение ОИ двух компонентов вакцины БВРС-ГамВак-Комби с интервалом 21 день в дозе 10^{11} вирусных частиц на животное не вызывало значимых изменений уровня показателей общего состояния здоровья и биохимического анализа крови и приводило к выработке вируснейтрализующих антител, СГТ которых составил 1:160, 1:403, 1:3225 и 1:3225 через 7 дней, 24 дня, 3 месяца и 6 месяцев, соответственно [45]. Через 12 месяцев после вакцинации в сыворотке крови ОИ сохранялись высокие титры вируснейтрализующих антител (1:2560–1:5120) [44]. Также сотрудниками ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России было установлено, что вакцина БВРС-ГамВак-Комби обеспечивала 100% защиту от летальной инфекции MERS-CoV на модели трансгенных мышей [45].

В качестве основного рецептора для входа в клетку MERS-CoV использует дипептидилпептидазу-4 (DPP4) [113], тогда как SARS-CoV использует ACE2 — тот же рецептор, что и SARS-CoV-2 [114]. Поэтому на ранних этапах развития пандемии предполагалось, что ОИ окажутся восприимчивы к SARS-CoV-2. Тем не менее, интратрахеальное введение ОИ до 10^6 TCID вируса SARS-CoV-2 вариантов Ухань (B.1.1, D614G) и дельта (B.1.617.2), проведенное автором, не привело к формированию пневмонии у животных. Более того, в течение трех суток после экспериментального заражения по данным исследования методом ПЦР с детекцией в реальном времени вирусная нагрузка в смывах с верхних дыхательных путей ОИ снижалась до не детектируемого уровня (неопубликованные данные). Схожие результаты были получены и другими группами исследователей [115,116].

Видовая восприимчивость животных к SARS-CoV-2 определяется последовательностью ортологов ACE2 [117,118] в участках их связывания с RBD

белка S SARS-CoV-2. Последовательность ортолога ACE2 ОИ содержит четыре замены в участках связывания с RBD относительно человеческого ACE2: Y41H, Q42E, M82T и G354Q. Согласно результатам, полученным *in vitro* путем экспрессии гена ACE2 ОИ и его модификаций в культуре клеток A549, нативная последовательность ACE2 ОИ не поддерживает возможность проникновения вируса в клетки, тогда как внесение в нее двух «гуманизирующих» замен (H41Y, E42Q) обеспечивает восприимчивость клеток к заражению [117].

Таким образом, естественная невосприимчивость ОИ к SARS-CoV-2 исключила возможность их использования в испытаниях протективной активности кандидатных вакцин. В то же время, данная видовая особенность ОИ позволила провести достоверную оценку специфического поствакцинального иммунного ответа на введение двух разработанных в России вакцин против COVID-19 с гарантированным исключением влияния потенциального незарегистрированного заражения от лабораторного персонала в условиях постоянной вирусной циркуляции в ходе пандемии, а также провести долгосрочные исследования стабильности и созревания поствакцинального иммунного ответа на введение упомянутых вакцин.

3.2 Оценка безопасности и специфической активности инактивированной коронавиральной вакцины КовиВак на обыкновенных игрунках

В данном разделе описано применение лабораторных ОИ в доклинических исследованиях безопасности и специфической активности инактивированной β -пропиолактоном цельновирионной очищенной сорбированной коронавиральной вакцины КовиВак производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

3.2.1 Методы

3.2.1.1 Лабораторные животные и оценка общего состояния их здоровья

Исследование проведено на ОИ, родившихся и постоянно содержащихся в Лаборатории. Итоговая численность животных, использованных в работе — 10 особей (5 самцов и 5 самок) в возрасте 2–5 лет: 7 (3 самца и 4 самки) в группе, получившей вакцину КовиВак, и 3 (2 самца и 1 самка) в контрольной группе.

Детальные условия содержания ОИ, режим кормления, условия проведения экспериментальных манипуляций, методики идентификации и определения массы и температуры тела, а также методика оценки общего состояния животных в ходе эксперимента описаны в Главе 1. ID животных в таблицах соответствуют четырем последним цифрам кода подкожного радиочипа.

Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (№140720-1 от 14 июля 2020 г.). В ходе эксперимента ни одно животное не достигло гуманной конечной точки.

3.2.1.2 Иммунизация животных инактивированной цельновирионной очищенной сорбированной вакциной против COVID-19

Выделение вакцинного штамма и разработка технологии производства вакцины проводились сотрудниками Управления разработки и внедрения инновационных и полупромышленных технологий под руководством к.б.н. А.Н. Пиняевой, а также сотрудниками лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с

референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) под руководством д.б.н. Л.И. Козловской.

Вакцинный штамм SARS-CoV-2 AYDAR-1 (GISAID EPI_ISL_428851) был выделен из мазка из носоглотки пациента с COVID-19 [41]. Процесс производства вакцины КовиВак включал накопление вирусной суспензии в клетках Vero (Biologicals, ВОЗ, Швейцария) на микроносителях, инактивацию β -пропиолактоном (1:1000–1:2000 (об./об.)) при 4 °С в течение 24–48 ч, ультрафильтрацию, диафильтрацию, хроматографическую очистку, стерилизующую фильтрацию и добавление геля гидроокиси алюминия в качестве адъюванта [41].

За два дня до введения первой дозы вакцины животные были рандомизированы методом случайных чисел и рассажены попарно в клетки. Непосредственно перед введением первой дозы вакцины, а также через 14 дней были получены образцы крови животных для оценки биохимических и гематологических показателей и определения титра специфических вируснейтрализующих антител против вируса SARS-CoV-2, после чего инсулиновым шприцем с иглой 30G (BD, США) в бедренные мышцы правой и левой нижних конечностей животным из экспериментальной группы вводили по 250 мкл препарата инактивированной цельновирioнной очищенной сорбированной вакцины КовиВак в виде суспензии для внутримышечного введения (суммарный введенный объем — 500 мкл на животное), при этом одно животное получило вакцину в дозе 3 мкг по S-белку, и 6 животных получили вакцину в дозе 6 мкг по S-белку. Животным из контрольной группы в те же дни вводили препарат плацебо, содержащий используемый в вакцине адъювант (гидроокись алюминия), тем же путем в том же объеме.

3.2.1.3 Оценка гематологических и биохимических показателей крови в экспериментальной и контрольной группе

Взятие образцов крови для оценки гематологических и биохимических показателей крови в группе ОИ, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе проводили непосредственно перед введением первой дозы вакцины, а также через 7, 14, 21 и 28 суток в соответствии с методиками, описанными в Главе 1.

3.2.1.4 Определение уровня вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови

Определение уровня специфических вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 в сыворотке крови в группе ОИ, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе проводили непосредственно перед введением первой дозы вакцины, а также через 7, 14, 21, 28, 35 и 49 суток в реакции нейтрализации.

Порядок проведения реакции нейтрализации

Постановку реакции нейтрализации проводили сотрудники лаборатории полиомиелита и других энтеровирусных инфекций с референс-центром ВОЗ по надзору за полиомиелитом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) под руководством д.б.н. Л.И. Козловской в соответствии с правилами работы с ПБА II группы патогенности.

Для проведения реакции нейтрализации использовали штамм ПИК35 SARS-CoV-2 (GISAID ID EPI_ISL_428851), выделенный из назофарингального мазка больного COVID-19 и прошедший четыре последовательных пассажа в культуре клеток Vero [41]. Штамм вызывал цитопатический эффект (ЦПЭ) на культуре клеток.

Клетки Vero наносили на 96-луночные плоскодонные планшеты в среде Игла MEM (Eagle's minimal essential medium) с двойным набором аминокислот и витаминов с добавлением антибиотиков (пенициллин, стрептомицин) и 5% фетальной бычьей сыворотки. На 3–4 сутки по достижении полного монослоя клетки использовали для проведения реакции нейтрализации.

В круглодонных 96-луночных планшетах готовили серии из восьми 2-кратных разведений сыворотки на среде Игла MEM, модифицированной по Дульбекко (DMEM, ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН (Институт полиомиелита)). К разведениям сыворотки добавляли равный объём вируссодержащей жидкости (конечная доза 100 ТЦД₅₀ на лунку) для получения серии разведений сыворотки начиная с 1:8. Смеси сыворотки и вируса инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, после чего добавляли к монослою клеток Vero на 96-луночных плоскодонных планшетах в 2 повторностях. Клетки инкубировали при 37 °С и 5% CO₂ в течение пяти суток.

В каждом эксперименте проводили титрование отрицательного (фосфатно-солевой буфер) и положительного (стандартная сыворотка реконвалесцента) контроля и раститровку дозы вируса.

На 5-е сутки после заражения учитывали признаки ЦПЭ визуально с помощью светового микроскопа.

Титр сыворотки рассчитывали согласно формуле Кербера:

$\lg \text{ титра} = L - d(S - 0,5)$, где:

L — \lg наименьшего разведения в опыте;

d — разница между \lg последовательных разведений;

S — сумма пропорций положительных тест-единиц, т.е. культур с ЦПЭ в каждом разведении.

Каждую сыворотку исследовали в реакции нейтрализации индивидуально. Средний геометрический титр (СГТ) рассчитывали на основании усреднения результатов по всем животным из одной группы на 1 точку наблюдения.

3.2.1.5 Статистический анализ

Статистическую оценку достоверности различий исследуемых параметров общего состояния здоровья, температуры тела, массы тела, биохимических и гематологических показателей крови животных, проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA) с поправкой Geisser-Greenhouse. Множественные сравнения проводили с помощью теста Šidák. Статистическую оценку достоверности различий исследуемых параметров титра вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в экспериментальной и контрольной группе проводили с использованием теста Манна-Уитни. Расчеты проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9 (v. 9.3.1, GraphPad, США). Различия считали достоверными при $P < 0,05$.

3.2.2 Результаты

3.2.2.1 Сравнительная оценка общего состояния здоровья, массы тела, температуры тела, биохимических и гематологических показателей крови животных в экспериментальных группах

В исследовании в общей сложности использовали 10 ОИ. Животным из экспериментальной группы (3 самца и 4 самки) внутримышечно вводили препарат инактивированной цельновирионной очищенной сорбированной вакцины КовиВак дважды с интервалом 14 суток, при этом одно животное (самец) получило вакцину в дозе 3 мкг по S-белку и 6 животных получили вакцину в дозе 6 мкг по S-белку. Животным из контрольной группы (2 самца и 1 самка) в те же дни вводили препарат плацебо, содержащий вакцинный адъювант, тем же путем в том же объеме.

Оценку общего состояния здоровья всех животных проводили в баллах в соответствии с Таблицей 1 ежедневно со дня, предшествующего дню введения первой дозы вакцины. Результаты сравнительной оценки общего состояния здоровья животных в экспериментальной и контрольной группе приведены в Таблице 5.

В целом на фоне ежедневного наблюдения, а также повышенной частоты ловли для взвешивания и термометрии, у всех животных в экспериментальной и контрольной группе наблюдали слабо выраженное снижение суточного уровня потребления воды и пищи в течение первых двух недель эксперимента.

У одного животного из экспериментальной группы (2997, самка) на следующий день после первого введения вакцины наблюдалось кровотечение из дистальной фаланги правой верхней конечности в результате травмы когтя в процессе ловли для измерения температуры, и, соответственно, изменение позы, что соответствовало 2 баллам по Таблице 1. Уровень видимых повреждений и сопутствующий отек значительно уменьшились в течение недели и полностью исчезли к 16 суткам после введения первой дозы вакцины, что указано в Таблице 5. Незначительная травматизация фаланг животных при ежедневной ловле для взвешивания и термометрии является относительно распространенным явлением и не связано с введением исследуемого препарата.

Таблица 5 — Результаты сравнительной оценки общего состояния здоровья в группе ОИ, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе

Дни после введения первой дозы вакцины	Общее состояние, баллы										P
	ID животного, пол										
	Животные, получившие вакцину КовиВак							Контрольная группа			
	Доза целевого антигена на одно животное										
	3 мкг	6 мкг									
	2960, самец	4540, самец	2997, самка	0725, самка	2474, самка	0714, самка	2472, самец	0002, самка	2471, самец	2473, самец	
-1	1	0	0	1	2	5	0	1	2	1	>0,9999
0	0	0	0	1	1	5	0	1	1	0	>0,9999
1	2	1	2	0	0	6	1	1	0	1	0,9998
2	1	0	2	1	1	5	1	1	1	2	>0,9999
3	1	1	4	1	1	6	1	1	1	1	0,9981
4	0	0	3	0	0	4	0	0	0	1	>0,9999
5	1	1	2	1	1	3	1	1	1	1	0,9987
6	2	1	2	0	1	3	1	0	1	1	0,9965
7	0	1	2	1	1	3	1	1	1	1	>0,9999
8	0	1	2	1	1	3	1	1	1	1	>0,9999
9	1	1	3	0	1	3	3	0	1	1	0,9691
10	2	1	2	1	1	3	1	1	1	1	0,9617
11	2	1	2	1	1	3	1	1	1	1	0,9617
12	1	0	1	0	1	3	2	0	1	1	>0,9999
13	0	1	2	1	1	3	1	1	1	1	>0,9999
14	0	1	2	0	0	3	1	1	1	1	>0,9999
15	0	0	1	0	0	2	1	1	1	1	0,9987
16	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	0,9966
17	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	>0,9999
18	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	>0,9999
19	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	>0,9999
20	0	1	1	0	0	2	1	1	1	1	>0,9999
21	0	1	1	0	0	2	1	1	1	1	>0,9999
22	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	>0,9999
23	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	>0,9999
24	0	0	0	0	0	2	1	1	1	1	0,9617
25	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	>0,9999
26	0	1	1	1	1	2	1	1	1	1	>0,9999
27	1	1	1	0	0	2	1	1	1	1	>0,9999

У одного животного из экспериментальной группы (0714, самка) за день до введения первой дозы вакцины наблюдался отек дистальных фаланг правой верхней конечности в результате их защемления прутьями клетки, и, соответственно, изменение позы, что суммарно соответствовало 5 баллам по Таблице 1. Отек значительно уменьшился в течение недели и практически полностью исчез к окончанию периода наблюдения (28 сутки), что указано в Таблице 5.

После введения второй дозы вакцины (14 сутки после введения первой дозы) никаких изменений в общем состоянии животных выявлено не было.

Согласно результатам двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA), единственным фактором, достоверно влиявшим на измеряемые параметры, были индивидуальные особенности животных. Статистически значимые различия общего состояния здоровья между ОИ, получившими вакцину КовиВак, и животными в контрольной группе отсутствовали на протяжении всего периода наблюдения.

Измерение массы тела животных проводили за день до введения первой дозы вакцины, непосредственно перед введением первой дозы, а также на 2, 4, 7, 11, 14, 18, 21, 25 и 28-е сутки. Результаты сравнительной оценки массы тела животных в экспериментальной и контрольной группе приведены в Таблице 6.

Таблица 6 — Результаты сравнительной оценки массы тела в группе ОИ, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе

Дни после введения первой дозы вакцины	Масса тела, г										P
	ID животного, пол										
	Животные, получившие вакцину КовиВак							Контрольная группа			
	Доза целевого антигена на одно животное										
	3 мкг		6 мкг								
	2960, самец	4540, самец	2997, самка	0725, самка	2474, самка	0714, самка	2472, самец	0002, самка	2471, самец	2473, самец	
-1	400	440	450	340	440	380	355	410	320	335	0,9515
0	410	440	460	360	430	390	350	405	330	340	0,8716

2	390	410	435	370	410	380	340	400	310	330	0,9523
4	385	405	425	350	415	385	330	410	315	320	0,9927
7	390	415	430	350	405	400	350	400	340	340	0,9616
11	390	425	430	355	410	410	355	405	330	340	0,9521
14	390	400	440	360	425	400	370	420	340	350	0,9956
18	370	415	430	360	415	420	360	400	335	335	0,9189
21	390	430	440	360	420	410	370	400	330	340	0,8391
25	360	410	430	360	390	405	355	395	320	320	0,9406
28	400	420	450	350	420	415	360	400	340	350	0,8555

Значимые различия массы тела между ОИ, получившими вакцину КовиВак, и животными в контрольной группе отсутствовали на протяжении всего периода наблюдения.

Измерение ректальной температуры животных проводили за день до введения первой дозы, непосредственно перед введением первой дозы, а также через 2, 4, 7, 9, 11, 14, 16, 18, 21, 23, 25 и 28 дней. Результаты сравнительной оценки температуры тела животных в экспериментальной и контрольной группе приведены в Таблице 7.

Таблица 7 — Результаты сравнительной оценки температуры тела в группе ОИ, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе

Дни после введения первой дозы вакцины	Температура тела, °С										Р
	ID животного, пол										
	Животные, получившие вакцину КовиВак						Контрольная группа				
	Доза целевого антигена на одно животное										
	3 мкг		6 мкг								
	2960, самец	4540, самец	2997, самка	0725, самка	2474, самка	0714, самка	2472, самец	0002, самка	2471, самец	2473, самец	
-1	40,1	39,5	40,1	40	40,7	40	40,6	39,6	40,7	41	>0,9999
0	40,2	39,4	40	40,7	40,1	40,2	40,4	40,4	40,4	40,2	0,9905
2	39,5	39,5	39,5	40,1	40,3	40	40,2	39,7	40,3	40	>0,9999
4	39,7	39,3	39,6	39,8	40	39,8	40,5	40,1	40,1	40,5	0,6458
7	40	40,1	39,8	39,9	39,8	40,1	40,5	40,7	40,3	40,2	0,8171

9	39,4	39,3	39,7	40,4	40,4	39,7	40,6	39,8	40,7	40,7	0,9859
11	40,3	39,5	39,9	40,4	39,8	39,4	40,3	40,3	40,2	40,4	0,5960
14	39,6	39,9	39,9	40,1	40,3	40	40,6	40,3	39,5	40,4	>0,9999
16	39,8	39,7	40,1	40,4	40,2	39,5	40,7	40,3	40,4	40,6	0,6486
18	40	39	39,8	40,6	39,5	39,5	40,1	39,8	40	39,8	>0,9999
21	39,8	39,8	40	40,5	39,6	39,4	40,1	40,1	40,4	40,2	0,6034
23	39,7	39,2	40,1	40	39,8	39,2	40	40,1	40	40,3	0,4081
25	40	39,1	40	40,3	39,9	39,2	40,1	40,2	40,2	40,1	0,6965
28	40,1	38,9	40,1	40,5	40,2	39,5	40,5	40,1	39,5	40,1	>0,9999

Статистический анализ показал, что наблюдаемые различия показателей ректальной температуры достоверно зависели только от индивидуальных особенностей животных. Значимые различия между температурой тела ОИ, получивших вакцину КовиВак, и животными в контрольной группе отсутствовали на протяжении всего периода наблюдения.

Результаты сравнительной оценки уровня биохимических и гематологических показателей в крови животных, получивших вакцину КовиВак, и контрольной группе приведены в Таблице 8.

Таблица 8 — Результаты сравнительной оценки уровня биохимических и гематологических показателей крови в группе ОИ, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе

Дни после введения первой дозы вакцины	ID животного, пол										P
	Животные, получившие вакцину КовиВак							Контрольная группа			
	Доза целевого антигена на одно животное										
	3 мкг	6 мкг						0002, самка	2471, самец	2473, самец	
2960, самец	4540, самец	2997, самка	0725, самка	2474, самка	0714, самка	2472, самец					
Аланинаминотрансфераза, ед./л [референсный интервал: 0,79–45,33 [33]]											
0	5,1	8,4	4,5	13,2	20,7	3,6	8,7	6,2	20,8	7	0,9979
7	4,8	4	3,3	3,6	3,3	3,8	6,4	6,8	9,9	5,2	0,534
14	5,2	4,6	2,5	5,2	8,6	2,3	8,4	2,6	4,3	2,7	0,402
21	4	4,4	3,4	2,8	2,6	3,8	5,4	4,2	5,4	4,5	0,4702
28	3,9	3,3	2,8	3,8	3,4	2,3	4	3,5	4,6	4,5	0,4667
Аспартатаминотрансфераза, ед./л [референсный интервал: 51,24–316,12 [33]]											
0	92,1	178,6	102,5	919,7*	2478,5*	188,6	171,7	290,6	240,9	116,7	0,8413
7	131,2	102,2	86,1	118,2	167,9	87,3	172	106,1	164,5	111	>0,9999

14	84,5	101,9	75,3	107,6	143,8	81,7	161,4	87,2	110,4	95,7	0,9652
21	78,8	89,8	75,8	91,8	105,7	87,2	141,6	92,1	111,5	86,6	>0.9999
28	76,2	82,7	71,2	103,4	104	81,1	120,4	80,8	112	96,2	0,9964
Щелочная фосфатаза, ед./л [референсный интервал: 44,00–426,25 [33]]											
0	104,2	92,7	104,1	231,6	109,3	159,9	96	147,4	139,8	99	>0.9999
7	152,3	108,2	109	185,2	90,5	100,4	89,7	165,8	145,7	106	0,9321
14	140,3	100,4	128,3	177,8	76,1	82,2	104,6	121,1	120,1	109,8	>0.9999
21	128,6	82,8	103	156,2	64,6	76,8	85,6	96,9	87,5	87,3	0,9674
28	105,4	102,4	97,8	171,5	72,8	75,6	99,4	91	111,4	100,5	>0.9999
Общий белок, г/л [референсный интервал: 4,1–74,8 [33]]											
0	69,3	72	70,5	63,8	70,8	65	70,8	65	66,4	74,3	>0.9999
7	69	70,2	73,2	62,2	67,8	62,7	70,8	62	67,9	68,1	0,9591
14	63,2	68,7	70,9	69,4	69,1	69,5	69,5	58,7	70	69	0,9781
21	65,6	72,9	73,5	65,4	69,9	71,4	70,1	57,9	73,1	73	0,9991
28	64,9	71,1	69,8	64,8	67,6	69,2	67,6	63,5	73,4	69,6	0,9994
Альбумин, г/л [референсный интервал: 10,77–57,88 [33]]											
0	45,37	47,04	40,69	41,99	50,45	38,74	46,5	42,56	43,18	48,41	>0.9999
7	43,79	45,79	42,09	43,22	47,04	36,72	44,89	40,66	41,08	41,59	0,4997
14	37,8	45,13	40,24	45,84	47,84	37,18	44,32	37,77	43,97	41,34	0,9779
21	40,24	43,36	42,28	44,65	47,72	39,7	42,88	37,11	45,51	41,98	0,9927
28	41,06	44,14	42,77	46,02	48,85	38,26	42,33	43,02	49,02	45,06	0,8731
Мочевина, ммоль/л [референсный интервал: 3,37–18,67 [33]]											
0	3,69	4,37	3,7	4,03	5,08	4,7	3,87	8,22	3,75	3,29	0,9933
7	5,28	4,53	2,94	4,19	3,87	4,47	5,64	5,42	3,43	3,47	0,9976
14	2,72	4,88	3,25	4,36	4,33	4,22	4,23	5,25	3,4	2,83	>0.9999
21	5,11	3,66	3,34	4,93	4,62	3,58	4,64	7,45	4,07	3,34	0,9944
28	2,52	3,55	3,23	5,51	3,19	3,13	4,84	8,02	2,62	3,62	0,9894
Креатинин, ммоль/л [референсный интервал: 38,94–62,38 [119]]											
0	50,1	37,3	50,5	57	42,8	45,1	51,7	58,7	61,4	53,3	0,1213
7	51,6	39	47,6	48	41,7	40	48	48,5	50,7	47,4	0,4368
14	47,8	44,4	45,8	49,7	40,5	34,5	48,3	51,2	41	43,5	0,9999
21	53	43,5	46,6	44,8	37,2	35,5	53,2	52,1	47,4	51	0,4433
28	50,6	32,5	46,5	55,3	37,2	25,7	45,8	49,4	41,5	36,1	>0.9999
Амилаза, ед./л [референсный интервал: 617,4–1243,2 [33]]											
0	819,3	732,9	964	839,8	864,9	960,8	971,8	840,6	871,1	925,3	>0.9999
7	687	732,2	890,4	744,2	904,7	766,5	952	762,7	969,4	907,4	0,922
14	700,5	788,9	925,6	788	909,2	857,6	1023,1	726,4	946,7	839,6	0,9998
21	734,4	777,1	972,3	752,1	923,2	912,3	1025,6	687,9	979,8	959,5	>0.9999
28	757,1	793,1	935,4	742,9	919,2	917,3	1022,1	789,6	968,2	984,3	0,9873
Общий билирубин, мкмоль/л [референсный интервал: 0,03–4,24 [33]]											
0	0,6	0	2	0	1,3	0,6	0	0,2	1,3	1,3	0,9841
7	1,3	0	0,2	0,2	1,3	0,2	0,6	0,2	0,2	0,9	0,9988
14	0,6	1,3	0,2	0,2	1,3	0,9	0,9	1,3	0	0,6	0,9992
21	0,6	0	0,9	0	0,6	0,2	0	1,3	0	0,6	0,9719
28	0	0,6	1,3	0,9	0	0,9	1,3	1,3	0,6	0,2	>0.9999
Прямой билирубин, мкмоль/л [референсный интервал: 0,0–1,3 [119]]											
0	0,2	0	0,5	0	0,4	0,6	0	0	0	0,4	0,9796
7	0	0	0,6	0	0	0	0,1	0	0,2	0,2	0,9993
14	0,7	0,2	0,1	0,3	0,4	0	0	0	0	0,1	0,3195

21	0,4	0	0	0,2	0,4	0	0	0	0	0,1	0,6832
28	0,5	0,3	0,5	0,2	0,4	0	0,5	0,4	0,2	0,7	0,9916
С-реактивный белок, мг/л [референсный интервал: 0,0–3,99 [119]]											
0	1,88	2,52	2,18	1,92	3,45	2,26	1,88	2,32	1,84	1,9	0,851
7	2,9	1,98	1,68	2,02	1,92	2,14	1,94	2,18	1,86	2,38	0,9996
14	2,16	2,06	1,6	2,04	2,16	2,06	1,88	1,74	2,02	3,48	0,9744
21	2,3	2,54	1,96	2,18	2,14	1,9	2,97	1,78	2,24	3,15	0,9998
28	2,06	2,26	1,7	1,86	1,88	1,68	1,96	1,66	2,04	2	>0.9999
Эритроциты, клеток $\times 10^{12}/л$ [референсный интервал: 3,47–7,88 [33]]											
0	5,28	4,07	5,81	5,45	5,59	4,18	5,88	5,66	5,81	5,38	0,9403
7	6,83	6,04	6,79	5,94	7,44	3,65	5,14	4,9	4,4	6,09	0,5049
14	3,95	5,19	5,14	5,79	5,59	4,65	5,64	5,64	5,3	5,64	0,9621
21	6,04	5,53	5,19	5,14	5,99	3,85	5,69	3,9	5,34	4,85	0,7512
28	4,9	6,59	4,7	5,89	5	4,9	5,04	5	4,55	5,79	0,999
Лейкоциты, клеток $\times 10^9/л$ [референсный интервал: 2,72–10,85 [33]]											
0	8,85	8,7	9,9	6,25	9	15,3*	6,4	7,95	4,4	8,2	0,3189
7	4,95	5,26	6,19	5,88	5,36	4,41	4,33	8,04	4,33	7,27	0,8299
14	5,57	4,33	4,8	9,28	9,13	5,41	8,35	6,65	4,18	5,88	0,9118
21	9,13	7,73	9,75	9,9	7,58	5,26	7,43	6,03	5,41	8,35	0,7528
28	7,12	8,77	7,89	9,59	8,97	8,82	9,28	6,03	6,03	9,44	0,776
Палочкоядерные нейтрофилы, % [референсный интервал: 0,0–4,0 [33]]											
0	0,5	1,5	1	1	1	0	0,5	1	0,5	0,5	0,9993
7	0,5	1	0,5	0,5	1	1	1	0,5	0	1	0,9594
14	2	1	1	1	1	1,5	1,5	2	0,5	2	0,9884
21	0	0	0,5	2	1	0,5	1,5	0,5	0	1,5	0,9993
28	1,5	1,5	1,5	0	0	1	0,5	0	1	1	0,9932
Сегментоядерные нейтрофилы, % [референсный интервал: 28,25–78,05 [33]]											
0	45,5	50	72,5	45	63	89*	59,5	71	65	68,5	0,8686
7	73	70	75,5	57	62	77	68	78	67	46,5	0,9721
14	49	58	52	52	68,5	60	65	74	63,5	46,5	0,9945
21	73,5	62	51	59	45,5	59,5	71,5	83	73,5	48	0,8453
28	48	55	61	60,5	55	61	64	71	65	43	0,9997
Базофилы, % [референсный интервал: 0,0–5,0 [120]]											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>0.9999
7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>0.9999
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>0.9999
21	0	0	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0,7706
28	1	0	0	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0,1242
Эозинофилы, % [референсный интервал: 0,0–13,75 [33]]											
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>0.9999
7	0	0,5	0,5	0	0	0	0	0	0	0	0,1603
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>0.9999
21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>0.9999
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	>0.9999
Моноциты, % [референсный интервал: 2,0–17,05 [33]]											
0	4,5	4	3	6	3,5	1	4	4	3,5	3	0,9993
7	4,5	4,5	3	4	5,5	6	3	2,5	3	3,5	0,2806
14	6,5	4,5	4	5	7	5	5,5	5,5	5	5,5	>0.9999
21	2,5	2	4,5	4,5	3,5	3	5	3	2,5	4,5	0,9988

28	4	4,5	3,5	3	5	4,5	4,5	3,5	3,5	3,5	0,9022
Лимфоциты, % [референсный интервал: 14,0–62,70 [33]]											
0	49,5	44,5	23,5	48	32,5	10	36	23,5	26	28	0,718
7	22	24	20,5	38,5	31,5	16	28	19	30	49	0,8854
14	42,5	36,5	42,5	42	23,5	33,5	28	18	31	46	0,9901
21	24	36	44	34	49,5	37	22	13,5	24	46	0,8525
28	45,5	39	34	36,5	39,5	33	31	25,5	30,5	52,5	>0.9999

* — уровень исследуемых показателей находится за пределами референсных значений.

В образцах сыворотки крови, полученных от двух ОИ (0725 и 2474) непосредственно перед введением первой дозы вакцины, наблюдалось повышение уровня АСТ. Предполагаемой причиной повышения уровня АСТ у данных животных был повышенный уровень двигательной активности в процессе ловли в первой точке экспериментального наблюдения после рандомизации и распределения по вольерам. В условиях более длительной адаптации к высокой частоте ловли в последующих временных точках у данных животных повышения уровня АСТ выявлено не было. Ранее было показано, что у людей уровень АСТ может повышаться на период длительностью до нескольких дней при интенсивной мышечной активности [121]. Статистический анализ показал, что наблюдаемые различия уровня АСТ достоверно зависели только от индивидуальных особенностей животных. Значимые различия уровня АСТ в группе ОИ, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе отсутствовали в течение всего периода наблюдения.

У одного животного, получившего вакцину КовиВак (0714, самка), у которого за день до введения первой дозы вакцины наблюдался отек дистальных фаланг правой верхней конечности в результате их защемления прутьями клетки, в образце сыворотки крови, взятом непосредственно перед введением первой дозы, наблюдалось повышение количества лейкоцитов в крови до $15,3 \times 10^9$ клеток на литр крови, что свидетельствовало о воспалительном процессе, вызванном травмой, не связанной с введением вакцины. Уровень лейкоцитов в крови данного животного в остальных точках наблюдения (после введения вакцины) находился в пределах референсных значений для данного вида.

Также у животного 0714 в образце сыворотки крови, полученном непосредственно перед введением первой дозы вакцины, наблюдалось повышение доли

сегментоядерных нейтрофилов в лейкоцитарной формуле в крови до 89%, что свидетельствовало о воспалительном процессе, вызванном травмой, не связанной с введением вакцины. Доля сегментоядерных нейтрофилов в лейкоцитарной формуле в крови данного животного в остальных точках наблюдения (после введения вакцины) находилась в пределах референсных значений. Значимых различий в количестве лейкоцитов в крови и доле сегментоядерных нейтрофилов в лейкоцитарной формуле у ОИ, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе в ходе периода наблюдения выявлено не было.

У трех животных, получивших вакцину КовиВак, наблюдалось повышение доли базофилов в лейкоцитарной формуле до 0,5–1%. По различным данным у взрослых ОИ доля базофилов в лейкоцитарной формуле может как находиться на уровне 0% [119], так и достигать 5% [120]. По нашим собственным данным повышение уровня базофилов до 1% может наблюдаться у клинически здоровых взрослых ОИ (Рисунок 6, [46]). Для сравнения, у взрослых здоровых людей доля базофилов в лейкоцитарной формуле также достигает 1% [122]. Статистически значимых различий доли сегментоядерных нейтрофилов в лейкоцитарной формуле в крови ОИ, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе в ходе периода наблюдения выявлено не было.

Статистически значимых различий уровня АЛТ, щелочной фосфатазы, общего белка, альбумина, мочевины, креатинина, амилазы, общего билирубина, прямого билирубина, С-реактивного белка, количества эритроцитов, а также доли палочкоядерных нейтрофилов, базофилов, эозинофилов, моноцитов и лимфоцитов лейкоцитарной формуле в крови ОИ, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе выявлено не было.

Таким образом, было установлено отсутствие достоверных отличий оцениваемых параметров безопасности в группе ОИ, которым двукратно вводили вакцину КовиВак, от контрольной группы.

3.2.2.2 Результаты оценки уровня вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 у обыкновенных игрунок, получивших вакцину КовиВак

Результаты сравнительной оценки уровня специфических поствакцинальных вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 у животных в экспериментальной и контрольной группе приведены в Таблице 9.

Таблица 9 — Результаты сравнительной оценки уровня поствакцинальных вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в группе ОИ, получивших вакцину КовиВак

Дни после введения первой дозы вакцины	Титры нейтрализации вируса SARS-CoV-2 (штамм ПИК35) сыворотками крови животных, получивших вакцину КовиВак, и в контрольной группе										P
	ID животного, пол										
	Животные, получившие вакцину КовиВак							Контрольная группа			
	Доза целевого антигена на одно животное										
	3 мкг		6 мкг								
	2960, самец	4540, самец	2997, самка	0725, самка	2474, самка	0714, самка	2472, самец	0002, самка	2471, самец	2473, самец	
0	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8	>0,9999
7	<1:8	<1:8	<1:8	1:8	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8	<1:8	>0,9999
14	1:8	1:16	1:16	1:23	1:32	<1:8	1:16	<1:8	<1:8	<1:8	0,0583
21	1:23	1:128	1:64	1:64	1:64	1:45	1:91	<1:8	<1:8	<1:8	0,0083*
28	1:45	1:181	1:91	1:91	1:128	1:91	1:128	<1:8	<1:8	<1:8	0,0167*
35	1:32	1:91	1:91	1:64	1:45	1:45	1:64	<1:8	<1:8	<1:8	0,0083*
49	1:64	1:91	1:64	1:128	1:91	1:64	1:91	<1:8	<1:8	<1:8	0,0083*

* — статистически достоверное различие между группами (Манн — Уитни, $p < 0,05$).

У одного животного, получившего вакцину КовиВак в дозе 6 мкг, к 7 суткам после введения первой дозы вакцины наблюдалось появление поствакцинальных вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 в титре 1:8.

У шести из семи животных, получивших вакцину КовиВак, к 14 суткам после введения первой дозы вакцины наблюдалась выработка поствакцинальных вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в титрах от 1:8 до 1:32. Единственным животным, у которого не выявлялись вируснейтрализующие антитела к SARS-CoV-2

после первого введения вакцины КовиВак, было животное 0714, у которого за день до введения первой дозы вакцины наблюдался отек дистальных фаланг правой верхней конечности в результате их защемления прутьями клетки, а в образце, полученном непосредственно перед введением первой дозы вакцины, наблюдалось повышение количества лейкоцитов в крови, что свидетельствовало о воспалительном процессе, вызванном травмой. На основании данного наблюдения можно выдвинуть предположение о негативном влиянии локального воспаления на эффективность формирования поствакцинального иммунного ответа, однако достоверность данного предположения требует дополнительного экспериментального подтверждения.

У всех семи животных, получивших вакцину КовиВак, к 21 суткам после введения первой дозы вакцины (7 суток после введения второй дозы) наблюдалось появление поствакцинальных вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 ($P=0,0083$, статистически достоверное отличие от контрольной группы) в титрах от 1:23 до 1:128. У животного, получившего вакцину КовиВак в дозе 3 мкг, титр вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 к 21 суткам после введения первой дозы вакцины (7 суток после введения второй дозы) составил 1:23; у животных, получивших вакцину в дозе 6 мкг, титр вируснейтрализующих антител составил от 1:45 до 1:128 (СГТ=1:72).

На 28, 35 и 49 сутки после введения первой дозы вакцины у животного, получившего вакцину КовиВак в дозе 3 мкг, титр вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 составил 1:45, 1:32 и 1:64, соответственно; у животных, получивших вакцину в дозе 6 мкг, СГТ вируснейтрализующих антител составил 1:114, 1:64 и 1:86, соответственно.

Таким образом, способность вакцины КовиВак индуцировать выработку специфических вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 была подтверждена на лабораторных приматах.

3.2.3 Обсуждение

Многие зарегистрированные вакцины против COVID-19 демонстрируют высокий уровень специфической иммуногенности и значительно снижают частоту тяжелого течения заболевания, однако было показано, что уровень поствакцинальных антител со временем снижается [123,124]. Необходимость внедрения ежегодной и даже еще более частой бустерной вакцинации в неблагоприятных эпидемиологических условиях в ряде стран, включая Россию, обусловила крайне высокие требования к профилю безопасности используемых вакцин.

Инактивированные вакцины, технология производства которых включает наработку вирусной суспензии в культурах клеток с последующей инактивацией и очисткой, широко используются во всем мире и характеризуются высоким уровнем безопасности [87,125]. Несмотря на в целом более низкие уровни поствакцинальных вируснейтрализующих антител (нАТ) в сравнении с векторными и мРНК-вакцинами, применение инактивированных вакцин приводит к достоверному снижению заболеваемости COVID-19 у вакцинированных лиц [126]. Таким образом, инактивированные вакцины против COVID-19 оптимальны для плановой долгосрочной вакцинации, требующей периодического введения бустерных доз.

Острая глобальная нехватка профилактических вакцин, наблюдавшаяся в начале пандемии, вызванной вирусом SARS-CoV-2, а также успешные клинические исследования нескольких инактивированных препаратов [87,125] обусловили перспективность разработки отечественной инактивированной вакцины против COVID-19. Ранее в ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) с использованием биореакторной технологии культивирования клеток Vero были успешно разработаны инактивированные вакцины против клещевого энцефалита [127] и полиомиелита [128], а также проведен анализ вариантов SARS-CoV-2, циркулировавших в России на ранних этапах развития пандемии [129]. Таким образом, в ходе разработки отечественной инактивированной β -пропиолактоном цельновирионной вакцины КовиВак был использован значительный научно-технологический задел.

На первом этапе доклинических исследований вакцины КовиВак на лабораторных грызунах нами было показано отсутствие признаков острой, хронической,

репродуктивной, эмбрио- и фетотоксичности, тератогенных свойств в антенатальном и постнатальном периоде, а также аллергизирующих свойств. Кроме того, протективная активность вакцины КовиВак была подтверждена в экспериментах с заражением сирийских хомяков [41].

С целью оценки безопасности и специфической активности вакцины КовиВак на лабораторных приматах, ее двукратно с интервалом 14 суток вводили семи ОИ (3 самца и 4 самки). Трех ОИ из контрольной группы (2 самца и 1 самка) в те же сроки вводили препарат плацебо. Далее для каждого животного в обеих группах исследования проводили: ежедневную оценку общего состояния здоровья в баллах; измерение массы тела и ректальной температуры трижды в неделю; биохимический и гематологический анализ крови непосредственно перед введением первой дозы вакцины, а также через 7, 14, 21 и 28 суток; а также оценку титра специфических вируснейтрализующих антител непосредственно перед введением первой дозы вакцины, а также через 7, 14, 21, 28, 35 и 49 суток.

В результате работы установлено, что у животных, получивших препарат инактивированной цельновирионной очищенной сорбированной коронавирусной вакцины КовиВак, в сравнении с контрольной группой отсутствовали статистически достоверные отличия общего состояния здоровья, массы тела, ректальной температуры, а также биохимических и гематологических показателей крови.

У всех семи животных, получивших вакцину КовиВак как в дозе 3 мкг ($n=1$), так и в дозе 6 мкг ($n=6$), к 21 суткам после введения первой дозы (7 суток после введения второй дозы) наблюдалась выработка поствакцинальных вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в титрах от 1:23 до 1:128. На 28, 35 и 49 сутки после введения первой дозы вакцины у животного, получившего вакцину КовиВак в дозе 3 мкг, титр вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 составил 1:45, 1:32 и 1:64, соответственно; у животных, получивших вакцину в дозе 6 мкг, СГТ вируснейтрализующих антител составил 1:114, 1:64 и 1:86, соответственно.

На основании описанных выше данных, полученных на лабораторных приматах, был сделан вывод о безопасности вакцины КовиВак, а также о ее способности индуцировать выработку специфических вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2, что в совокупности с данными, полученными на лабораторных грызунах и

кроликах, позволило обосновать возможность перехода к I–II фазе клинических исследований.

В ходе клинических исследований нами было показано, что вакцина КовиВак обладала хорошей переносимостью и безопасностью. У лиц, которые были серонегативны при скрининге, как в возрастной группе 18–60 лет, так и в группе старше 60 лет, после полного курса вакцинации более чем в 85% случаев в сыворотке крови выявлялись вируснейтрализующие антитела (СГТ 1:20 и 1:31, соответственно) [42]. Таким образом, специфическая активность вакцины КовиВак, установленная с использованием ОИ, в дальнейшем была подтверждена в клинических исследованиях.

3.3 Изучение долгосрочного созревания иммунного ответа на внутримышечное и интраназальное введение аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 на обыкновенных игрунках

В данном разделе описано применение лабораторных ОИ в доклинических исследованиях безопасности и специфической активности аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 Спутник V, разработанной ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, а также представлены результаты изучения долгосрочного созревания иммунного ответа на интраназальное и внутримышечное введение вакцины Спутник V.

3.3.1 Методы

3.3.1.1 Лабораторные животные и оценка общего состояния их здоровья в ходе эксперимента

Исследование было проведено на ОИ в возрасте 2–6 лет, родившихся и постоянно содержавшихся в Лаборатории. За шесть дней до начала исследования у животных проводили взятие крови с целью оценки соответствия критериям включения. Критериями включения ОИ в исследование были: нормальные гематологические и биохимические показатели крови; отсутствие антител к аденовирусам типов 5 и 26; отсутствие вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2. В общей сложности в исследование были включены 12 животных (5 самцов и 7 самок).

Детальные условия содержания ОИ, режим кормления, условия проведения экспериментальных манипуляций, методики идентификации и определения массы и температуры тела, а также методика оценки общего состояния животных в ходе эксперимента описаны в Главе 1. ID животных в таблицах соответствуют четырем последним цифрам кода подкожного радиочипа.

Протокол исследования одобрен этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) №141021-2 от 14 октября 2021 г.

3.3.1.2. Иммунизация обыкновенных игрунок аденовирусной векторной вакциной против COVID-19 и получение образцов биоматериала

12 животных (5 самцов и 7 самок) были рандомизированы методом случайных чисел и распределены на три группы (по 4 животных на группу). Животным из первой группы внутримышечно вводили 1/5 человеческой дозы (2×10^{10} вирусных частиц) первого (на основе рекомбинантного аденовируса типа 26) и второго (на основе рекомбинантного аденовируса типа 5) компонентов вакцины Спутник V [49] в бедренную мышцу правой нижней конечности в объеме 100 мкл (Рисунок 13). Второй группе интраназально с помощью автоматической пипетки вводили по 50 мкл первого и второго компонента вакцины Спутник V в каждый носовой ход (2×10^{10} вирусных частиц суммарно на одно животное). Интервал между введением первого и второго компонента вакцины составил 24 дня в обеих группах. В те же дни животным из контрольной группы вводили препарат плацебо (стерильный изотонический физиологический раствор) как интраназально, так и внутримышечно в тех же объемах.

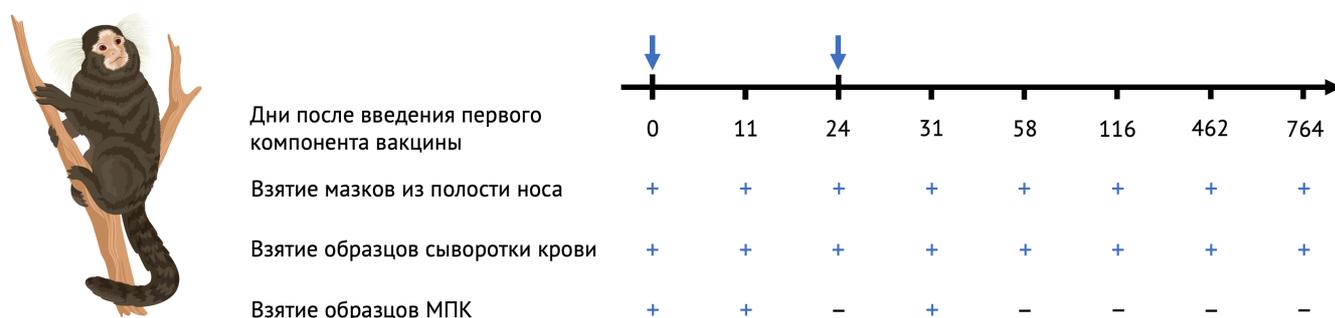


Рисунок 13 — Схема эксперимента. Синими стрелками обозначены дни введения первого и второго компонента вакцины Спутник V. МПК — мононуклеары периферической крови. Плюсами обозначены дни взятия соответствующих образцов

Образцы крови ОИ для оценки биохимических и гематологических показателей, а также изучения напряженности специфического поствакцинального гуморального и Т-клеточного иммунного ответа были получены без использования анестезии путем пункции бедренной вены с использованием трехкомпонентных шприцев (SFM, Германия) объемом 2,5 мл с иглами 27G. Суммарный единовременно получаемый объем крови не превышал 3 мл (<8% объема циркулирующей крови).

Мазки из полости носа получали с помощью медицинских урогенитальных зондов типа А («Полимерные изделия», Россия) и помещали в 0,1 мл фосфатно-солевого

буфера (Sigma-Aldrich), содержащего коктейль ингибиторов протеиназ (Sigma-Aldrich) и 0,1% азида натрия.

Взятие образцов крови и смывов с полости носа мазков у животных проводили в отдельном помещении с исключением визуального и аудиального контакта с другими животными. Процедуры не вызывали значительного дистресса у животных, поскольку ловля и забор крови являются рутинными процедурами при ветеринарном мониторинге ОИ, содержащихся в лабораторных условиях.

3.3.1.3 Исследование гематологических и биохимических показателей крови

Взятие образцов крови для оценки гематологических и биохимических показателей крови животных, получивших аденовирусную векторную вакцину против COVID-19 Спутник V внутримышечно и интраназально, а также в контрольной группе проводили непосредственно перед введением первого компонента вакцины, а также через 11, 24 и 31 день в соответствии с методиками, описанными в Главе 1.

3.3.1.4 Исследование напряженности специфического поствакцинального Т-клеточного иммунитета

Уровень специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа оценивался в лимфопротеративном тесте в соответствии с методикой, изложенной в п. 2.2.3.

Анализ уровня цитокинов в образцах бесклеточной среды, собранной после инкубации клеток со стимулами, проводили с использованием набора Non-Human Primate Th 14-Plex ProcartaPlex Panel (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкциями производителя.

3.3.1.5 Исследование уровня и аффинности специфических поствакцинальных антител в сыворотке крови и мазках из полости носа обыкновенных игрунок в иммуноферментном анализе

Работы по оценке avidности поствакцинальных специфических антител были проведены совместно с сотрудниками Лаборатории микоплазм и Л-форм бактерий

ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России под руководством к.б.н. А.И. Тухватулина.

Для определения уровня IgG к RBD SARS-CoV-2 в сыворотке крови ОИ использовали предварительно покрытые RBD штамма Wuhan-Hu-1 (B.1.1.1) 96-луночные планшеты из набора для ИФА, зарегистрированного для клинического применения в России (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, РЗН 2020/10393 2020-05-18). Для определения уровня IgG к S-белку (S1+S2 эктодомен) SARS-CoV-2 использовали растворы для покрытия 96-луночных планшетов (Sino Biological, КНР) на основе вариантов B.1.1.1 (Wuhan-Hu-1), B.1.617.2 (дельта) и B.1.1.539.5 (омикрон BA.5) в количестве 100 нг на лунку. Для детекции IgG ОИ использовали очищенные кроличьи антитела к IgG обезьян, конъюгированные с пероксидазой хрена (A2054, Sigma Aldrich, США; разведение 1:20 000). Для детекции IgA ОИ использовали моноклональные антитела, распознающие альфа-1 и альфа-2-тяжёлые цепи IgA, представленные как в мономерной, так и в полимерной форме (клон 3В4 любезно предоставлен д.б.н., проф. М.П. Самойлович, ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России, разведение 1:40 000). Работы по подбору данного клона описаны в Главе 2. Детекция сигнала проводилась путем добавления в лунку раствора тетраметилбензидина (Иммунотех, Россия). Колориметрический сигнал измеряли с использованием 450 нм фильтра на планшетном спектрофотометрическом ридере Multiscan FC (Thermo Fisher, США) после добавления стоп-раствора (1М H₂SO₄; 50 мкл на лунку).

Для оценки avidности антител использовали описанные выше 96-луночные планшеты для ИФА с предварительно нанесенным RBD или S-белком. Сыворотки крови ОИ вносили в две лунки планшета и инкубировали в течение 60 мин. при 37 °С. Затем на 10 мин. в одну из двух лунок добавляли денатурирующий раствор (фосфатно-солевой буфер с добавлением 8М мочевины), а в другую — контрольный фосфатно-солевой буфер, после чего планшеты промывали 5 раз раствором фосфатно-солевого буфера с 0,05% Твин 20 (ПанЭко, Россия). Остальные этапы ИФА проводили в соответствии с методикой, описанной выше. Индекс avidности (ИА, %) для каждого образца сыворотки крови рассчитывался как отношение оптической плотности в

лунке, содержащей денатурирующий раствор, к оптической плотности в лунке, содержащей контрольный буфер, при том же разведении сыворотки [130].

Для мониторинга уровня антител класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 в сыворотке крови животных с целью исключения случаев незарегистрированного заражения от персонала в условиях пандемии использовали набор для иммуноферментного анализа, зарегистрированный для клинического применения (Вектор-Бест, Россия) с заменой антивидовых детекторных антител на моноклональные антитела, распознающие IgG ОИ (A2054, Sigma Aldrich, США; разведение 1:20 000). Остальные этапы проведения ИФА соответствовали методике, описанной выше.

3.3.1.6 Исследование уровня вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке крови

Работы по оценке поствакцинального системного гуморального иммунного ответа у ОИ были проведены совместно с сотрудниками лаборатории Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России под руководством к.б.н. И.В. Должиковой в соответствии с правилами работы с ПБА II группы патогенности.

Для определения уровня вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 использовали вирусы вариантов В.1.1.1 (PMVL-1, штамм Wuhan-Hu-1, GISAID EPI_ISL_421275), В.1.617.2 (дельта) и В.1.1.529.5 (омикрон), выделенные из мазков носоглотки пациентов с COVID-19 в Москве и задепонированные в Государственную коллекцию вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Клетки Vero E6 (ATCC CRL-1586) культивировали в среде ДМЕМ (HyClone, США) с добавлением 2% фетальной бычьей сыворотки (ФБС; Capricorn Scientific, Германия), инактивированной нагреванием, L-глутамин (4 мМ) и раствора пенициллина/стрептомицина (100 МЕ/мл, 100 мг/мл; ПанЭко, Россия). Образцы сыворотки крови ОИ инактивировали путем инкубации при температуре 56 °С в течение 30 минут, после чего проводили серийные двукратные разведения в полной среде ДМЕМ с добавлением 2% ФБС, инактивированной нагреванием. Затем образцы смешивали в соотношении 1:1 с вирусной суспензией, содержащей 100 TCID₅₀ соответствующего варианта SARS-CoV-2 в общем объеме 100 мкл и инкубировали

при температуре 37 °С в течение 1 часа. Полученную смесь добавляли к монослою клеток Vero E6 и инкубировали в течение 96 часов. ЦПЭ вируса в клетках оценивали визуально. Титр нейтрализации определяли как наибольшее разведение сыворотки, при котором ЦПЭ не наблюдался в двух из трёх лунок.

3.3.1.7 Статистический анализ

Статистическую оценку достоверности различий исследуемых параметров общего состояния здоровья, температуры тела, массы тела, биохимических и гематологических показателей крови животных, проводили с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA) с поправкой Geisser-Greenhouse. Сравнение проводили с контрольной группой. При множественных сравнениях использовали поправку Šidák. Статистическую оценку достоверности различий исследуемых параметров титра вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 в экспериментальных и контрольной группе проводили с использованием теста Манна-Уитни. Дополнительные тесты, с помощью которых проводилось сравнение параметров иммунного ответа, указаны в подписях к рисункам. Расчеты проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 9 (v. 9.3.1, GraphPad, США). Различия считались достоверными при $P < 0,05$.

3.3.2 Результаты

3.3.2.1 Сравнительная оценка общего состояния здоровья, массы тела, температуры тела, биохимических и гематологических показателей крови животных в экспериментальных группах

В исследование в общей сложности были включены 12 ОИ (5 самцов и 7 самок), соответствовавших критериям включения (нормальные гематологические и биохимические показатели крови; отсутствие антител к аденовирусам типов 5 и 26; отсутствие нейтрализующих антител SARS-CoV-2). Животные из первой группы (n=3) получили внутримышечную инъекцию 1/5 человеческой дозы первого и второго компонента вакцины Спутник V (2×10^{10} вирусных частиц в 100 мкл) с интервалом 24 дня. Животные из второй группы (n=3) получили идентичную дозу первого и второго

компонента вакцины Спутник V интраназально (по 50 мкл в каждый носовой ход, 2×10^{10} вирусных частиц суммарно на одно животное). Животным из третьей группы ($n=3$) вводили препарат плацебо и внутримышечно (100 мкл), и интраназально (по 50 мкл в каждый носовой ход) в те же дни. В течение исследования у животных проводили оценку общего состояния здоровья, массы тела и ректальной температуры. Кроме того, были получены образцы крови для проведения гематологического и биохимического анализа, а также оценки специфического гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на внутримышечное и интраназальное введение вакцины Спутник V.

Оценку общего состояния здоровья всех животных проводили в баллах в соответствии с Таблицей 1 ежедневно со дня, предшествующего дню введения первого компонента вакцины. Результаты сравнительной оценки общего состояния здоровья животных в экспериментальных группах с контрольной группой приведены в Таблице 10.

Таблица 10 — Общая оценка состояния здоровья животных в группах, получавших аденовирусную векторную вакцину против COVID-19 внутримышечно и интраназально, а также в контрольной группе

Дни	Общее состояние, баллов													
	ID животного, пол													
	Плацебо				Внутримышечное введение					Интраназальное введение				
	0728 M	2585 F	0727 F	0708 M	0722 M	0729 F	0701 F	0703 F	P*	3018 M	0704 F	0724 M	2584 F	P*
-1	0	0	0	0	1	0	0	0	ns	0	1	0	0	ns
0	1	0	1	1	1	1	0	1	ns	0	1	0	0	ns
1	1	0	0	0	1	1	0	1	ns	0	1	0	0	ns
2	1	1	0	0	1	0	0	1	ns	0	1	1	1	ns
3	0	0	0	0	0	0	1	0	ns	0	0	0	0	n/a
4	0	0	0	0	0	0	1	0	ns	0	0	0	0	n/a
5	1	0	0	0	1	0	1	1	ns	0	1	0	0	ns
6	1	0	0	1	1	0	0	1	ns	0	1	0	0	ns
7	0	0	0	0	0	1	0	0	ns	0	0	0	0	n/a
8	1	0	0	0	1	0	0	1	ns	0	1	0	0	ns
9	0	0	0	0	0	1	1	0	ns	0	0	0	0	n/a

10	1	0	0	0	0	0	0	1	ns	0	0	0	0	ns
11	1	0	0	1	1	1	1	1	ns	0	1	0	1	ns
12	0	0	0	0	1	0	0	0	ns	0	1	0	0	ns
13	0	0	0	0	1	0	0	0	ns	0	1	0	0	ns
14	0	0	0	0	0	0	1	0	ns	0	0	0	0	ns
15	1	0	0	0	0	0	1	1	ns	0	0	0	0	ns
16	1	0	0	0	0	0	0	1	ns	0	0	0	0	ns
17	0	0	0	0	0	1	0	0	ns	0	0	0	0	n/a
18	0	0	0	0	0	0	1	0	ns	0	0	0	0	n/a
19	1	0	0	0	1	0	0	1	ns	0	1	0	0	ns
20	1	0	0	1	1	0	0	1	ns	0	1	0	0	ns
21	1	0	0	0	0	0	1	1	ns	0	0	0	0	ns
22	0	0	0	0	0	0	1	0	ns	0	0	0	0	n/a
23	1	0	0	0	0	0	0	1	ns	0	0	0	0	ns
24	0	0	0	0	1	1	1	0	ns	0	1	0	0	ns
25	0	1	0	0	1	0	1	0	ns	0	1	1	1	ns
26	0	0	0	0	0	1	1	0	ns	0	0	0	0	n/a
27	2	0	0	0	1	0	1	2	ns	0	1	0	0	ns
28	1	0	0	0	0	0	1	1	ns	0	0	0	0	ns
29	0	0	0	0	0	1	1	0	ns	0	0	0	0	n/a
30	0	0	0	0	0	1	1	0	ns	0	0	0	0	n/a
31	1	0	1	0	1	2	1	0	ns	0	2	0	0	ns
32	1	0	0	0	1	0	1	1	ns	0	1	0	0	ns
33	1	1	1	0	1	0	1	1	ns	0	1	1	1	ns
34	0	1	0	0	1	1	1	0	ns	1	1	1	1	ns
35	0	1	0	1	1	1	1	0	ns	1	1	1	1	ns

* — ns — нет статистически значимых отличий от контрольной группы ($P > 0,05$); n/a — статистический анализ неприменим из-за нулевых значений.

Статистически значимые отличия общего состояния здоровья животных в экспериментальных группах от контрольной группы отсутствовали в течение всего периода исследования.

Массу тела животных определяли непосредственно перед введением первого компонента вакцины, а также на 3-й, 7-й, 11-й, 15-й, 17-й, 24-й, 28-й, 31-й и 35-й день после введения первого компонента вакцины с помощью электронных весов. Температуру тела животных определяли в те же дни, что и массу тела, ректально на постоянной глубине 2 см, используя электронный термометр. Результаты сравнительной оценки массы тела и температуры тела животных в экспериментальных группах с контрольной группой приведены в Таблице 11 и Таблице 12, соответственно.

Таблица 11 — Масса тела животных в группах, получавших аденовирусную векторную вакцину против COVID-19 внутримышечно и интраназально, а также в контрольной группе

Дни	Масса тела, г													
	ID животного, пол													
	Плацебо				Внутримышечное введение					Интраназальное введение				
	0728 M	2585 F	0727 F	0708 M	0722 M	0729 F	0701 F	0703 F	P*	3018 M	0704 F	0724 M	2584 F	P*
0	420	400	400	490	390	370	380	480	ns	400	490	350	420	ns
3	420	380	370	460	380	380	380	470	ns	390	480	370	405	ns
7	420	390	360	450	390	370	370	470	ns	390	470	370	400	ns
11	420	400	380	460	400	380	390	500	ns	410	480	380	420	ns
15	420	380	370	450	395	380	370	480	ns	410	490	370	400	ns
17	420	380	360	440	380	380	385	470	ns	405	495	380	405	ns
24	400	360	370	460	380	380	370	490	ns	420	500	380	400	ns
28	420	365	370	450	360	370	365	490	ns	415	480	370	400	ns
31	420	395	400	470	380	380	380	500	ns	430	490	370	420	ns
35	410	380	380	470	370	385	370	500	ns	410	500	370	400	ns

* — ns — нет статистически значимых отличий от контрольной группы ($P > 0,05$);
n/a — статистический анализ неприменим из-за нулевых значений.

Таблица 12 — Температура тела животных в группах, получавших аденовирусную векторную вакцину против COVID-19 внутримышечно и интраназально, а также в контрольной группе

Дни	Температура тела, °C													
	ID животного, пол													
	Плацебо				Внутримышечное введение					Интраназальное введение				
	0728 M	2585 F	0727 F	0708 M	0722 M	0729 F	0701 F	0703 F	P*	3018 M	0704 F	0724 M	2584 F	P*
0	40,8	40,6	40,7	39,7	40,4	40,4	39,8	40,8	ns	39,4	39,9	40,4	40,6	ns
3	39,9	40,8	40	39,8	39,8	39,8	39,8	40,5	ns	39,8	40,3	40,3	40,6	ns
7	40,2	40,8	40,5	40	40,6	40,2	40,1	40,4	ns	39,8	40,8	41	40,5	ns
11	40,5	40,3	40,5	39,5	40,3	40,2	40,1	40,6	ns	39,6	40,6	40,5	40,5	ns
15	39,8	40,8	40,5	40	40,4	40	39,7	40,3	ns	40	40,5	40,5	41	ns
17	40,1	40,6	40,3	39,6	40,2	39,6	39,9	39,8	ns	39,5	40,2	41	40,5	ns
24	40,5	40,5	40,7	40	39,9	40	39,8	40,4	ns	39,9	39,5	40,4	40,7	ns
28	40,5	40,8	40,3	40,2	39,6	39,8	39,8	39,6	0,013	39,2	40,3	40	41	ns
31	40,7	39,9	40,3	39,5	40,1	40,2	40,1	40,4	ns	39,4	40,3	40,8	40,3	ns
35	40,3	40,8	40	40	40,1	39,5	40,1	39,7	ns	39,6	40	40,8	41	ns

* — ns — нет статистически значимых отличий от контрольной группы ($P > 0,05$);
n/a — статистический анализ неприменим из-за нулевых значений.

Взятие образцов крови для оценки гематологических и биохимических показателей крови животных проводили непосредственно перед введением первого компонента вакцины Спутник V, а также через 11, 24 и 31 сутки. Результаты сравнительной оценки исследуемых показателей в экспериментальных группах с контрольной группой приведены в Таблице 13.

Таблица 13 — Биохимические и гематологические показатели крови животных в группах, получавших аденовирусную векторную вакцину против COVID-19 внутримышечно и интраназально, а также в контрольной группе

Дни	Параметры													
	ID животного, пол													
	Плацебо				Внутримышечное введение					Интраназальное введение				
	0728 М	2585 F	0727 F	0708 М	0722 М	0729 F	0701 F	0703 F	P*	3018 М	0704 F	0724 М	2584 F	P*
Аланинаминотрансфераза, ед./л [референсный интервал: 0,79–45,33]														
0	14,1	4,3	6,3	4,8	3,8	7,2	4,6	6,2	ns	8,7	6,7	6,7	8	ns
11	6,6	12,3	11,6	4,2	4,6	7,3	27	9,3	ns	4,5	9,5	56,6	7,8	ns
24	6,8	3,6	23,6	6,4	3,3	4,4	3,4	3,7	ns	3,5	4,6	5,6	7	ns
31	5,5	5,7	6,7	2,7	3,2	3,2	3,3	3	ns	2,3	6,1	5,1	12,8	ns
Аспартатаминотрансфераза, ед./л [референсный интервал: 51,24–316,12]														
0	198,3	114,6	172,9	140,6	107,3	143,6	109,2	135,8	ns	184,2	147,3	152,8	141,5	ns
11	131,9	141,7	140	102,9	100,9	133	233,1	127,7	ns	101	131,6	260,2	146,7	ns
24	133,3	115	141,8	147,6	128,9	127,9	107,9	127,2	ns	104,1	119,6	127,6	129,9	ns
31	139,5	130,8	132,4	108,3	114,6	89,8	107,8	97,4	ns	93,5	103,9	109,2	126,2	ns
Щелочная фосфатаза, ед./л [референсный интервал: 44,00–426,25]														
0	158,3	159,4	154,2	89	112,1	98,3	121,6	129,7	ns	88,9	117	199	191,3	ns
11	120	115	121,7	85,7	107	90,2	125	127,4	ns	115	111,4	161,7	159,3	ns
24	125,4	140,2	113,6	108,1	134,4	105,6	122,8	131,5	ns	153,6	117,1	190,5	160,8	ns
31	127,8	137,8	137,7	96,5	131,3	97,2	104,8	126,6	ns	155,7	106,6	173,7	163,9	ns
Общий белок, г/л [референсный интервал: 41,1–74,8]														
0	70,4	69,7	76,4	73	70,9	70	68,3	72,5	ns	66,7	77,2	74,3	74,3	ns
11	72,1	70,5	71,8	73,6	70,9	68,7	76,6	73,4	ns	69,6	71	71,3	70,3	ns
24	74,5	70,2	72,9	76,3	73,9	75,3	73,6	73,2	ns	74	75,2	78,6	74,6	ns
31	72,2	69,2	77,5	78,3	72,9	66,9	68,9	75,2	ns	77,3	71	71,8	74,4	ns

Альбумин, г/л [референсный интервал: 10,77–57,88]														
0	50,8	50,62	51,46	45,81	48,48	47,06	43	49,12	ns	41,68	53,58	52,02	52,56	ns
11	48,68	45,51	47,02	44,58	45,75	42,29	45,03	47,82	ns	40,42	46,47	46,28	46,86	ns
24	51,75	49,26	49,59	46,96	49,23	49,87	45,65	49,12	ns	44,95	50,15	51,52	49,9	ns
31	49,75	47,4	50,86	46,57	45,8	43,76	42	49,9	ns	48,05	48,78	48,45	50,91	ns
Мочевина, ммоль/л [референсный интервал: 3,37–18,67]														
0	4,04	4,76	2,74	4,09	3,06	5,79	5,61	4,97	ns	5,22	7,79	3,36	5,56	ns
11	3,17	5,93	4,83	6,46	3,62	4,28	7,59	5,31	ns	3,98	5,45	3,93	7,14	ns
24	3,02	4,36	2,67	4,45	3,27	4,38	5,09	4,24	ns	2,21	6,23	3,35	6,56	ns
31	3,9	6,7	2,88	4,89	3,95	3,8	3,67	2,47	ns	2,96	4,54	1,98	4,42	ns
Триглицериды, ммоль/л [референсный интервал: 0,56–2,63]														
0	1,27	0,79	0,93	2,09	0,69	1,14	0,48	1,18	ns	2,17	1,39	1,48	1,08	ns
11	1,4	1,14	1,02	2,61	0,72	1,22	0,98	2,12	ns	2,98	2,25	1,85	1,54	ns
24	1,25	0,76	1,52	2,99	0,85	1,29	0,72	2,13	ns	1,36	3,89	1,47	3,18	ns
31	1,59	0,74	1,24	2,59	1,43	0,57	0,64	1,47	ns	1,08	2,26	1,16	0,8	ns
Креатинин, ммоль/л [референсный интервал: 38,94–62,38]														
0	57,8	49,7	49,3	41,9	50,9	52,8	39	44,7	ns	53,4	49,3	59,6	54,6	ns
11	46,3	51,8	56,5	38,6	51,1	49,9	45,2	48	ns	51	45,8	66,6	49,2	ns
24	45,8	57,3	48	45,2	54,4	49	44,6	39,2	ns	39,5	40,2	55,1	55,5	ns
31	53,3	49,9	49	37,6	54,1	47,3	39,1	45,2	ns	36,8	41,8	57,4	56,9	ns
Общий билирубин, мкмоль/л [референсный интервал: 0,03–4,24]														
0	0,2	0,9	0	0	0,6	0	0	0	ns	1,3	0	0,6	0,2	ns
11	0	0	0	0	1,3	0	0	0	ns	0	0	0	0	ns
24	0,2	0,2	0,2	0	0	0	0,6	0	ns	0	0	0,2	0,2	ns
31	0	0	0	0	0	0,2	0	0	n/a	0,2	0,2	0	0	ns
Прямой билирубин, мкмоль/л [референсный интервал: 0,0–1,3]														
0	0,5	0,6	0	0	0,2	0	0	0,1	ns	1	0,5	0,3	0,5	ns
11	0,1	0	0,1	0,1	0,4	0	0,1	0,1	ns	0,5	0,2	0,4	0,1	ns
24	0,1	0	0,1	0,5	0,5	0	0	0,3	ns	0	0	0	0,1	ns
31	0	0	0	0,4	0,4	0	0	0	ns	0,4	0,7	0	0,1	ns
Эритроциты, клеток*10¹²/л [референсный интервал: 3,47–7,88]														
0	7,67	6,83	7,25	7,82	9,19	5,25	5,67	8,24	ns	5,83	9,14	8,66	7,61	ns
11	7,67	5,72	5,62	6,14	5,04	5,09	3,68	7,88	ns	7,35	6,83	7,77	5,51	ns
24	7,77	6,72	7	7,07	9,94	8,33	5,39	8,68	ns	6,16	9,31	7,14	7,77	ns
31	9,03	7,56	7,84	9,17	8,12	7,07	4,34	8,19	ns	7	10,78	7,28	6,3	ns
Лейкоциты, клеток*10⁹/л [референсный интервал: 2,72–10,85]														
0	8,66	13,52	9,98	12,99	12,34	10,5	9,71	10,24	ns	11,16	5,78	8,27	14,18	ns
11	6,69	6,83	8,53	8,01	10,89	9,71	6,56	7,35	ns	13,91	9,32	4,99	6,96	ns
24	8,79	6,43	6,56	8,53	8,4	13,39	5,78	6,56	ns	11,29	4,99	8,01	13,26	ns
31	7,35	8,14	5,12	8,93	8,79	9,06	6,96	9,19	ns	9,71	5,91	6,43	7,74	ns
Палочкоядерные нейтрофилы, % [референсный интервал: 0,0–4,0]														

0	0	0	0	2	1	3	2	1	ns	3	1	0	1	ns
11	2	0	1	2	2	1	0	1	ns	2	1	0	0	ns
24	0	0	0	5	2	1	0	0	ns	2	1	0	0	ns
31	3	0	1	1	1	0	2	1	ns	1	1	1	0	ns
Сегментоядерные нейтрофилы, % [референсный интервал: 28,25–78,05]														
0	47	55	37	48	55	40	47	45	ns	67	48	67	55	ns
11	59	38	44	66	65	52	56	33	ns	46	44	71	82	ns
24	64	59	35	59	73	66	54	25	ns	44	50	71	75	ns
31	60	60	47	64	39	43	43	34	0,018	37	38	64	66	ns
Базофилы, % [референсный интервал: 0,0–5,0]														
0	1	1	0	0	1	0	1	0	ns	0	1	1	0	ns
11	0	0	0	0	0	1	0	0	ns	0	1	0	0	ns
24	1	1	0	0	3	1	1	0	ns	3	0	1	1	ns
31	0	0	0	1	2	7	0	1	ns	3	0	0	0	ns
Эозинофилы, % [референсный интервал: 0,0–13,75]														
0	0	0	0	0	0	1	1	0	ns	0	0	0	0	n/a
11	0	0	0	0	0	0	0	0	n/a	0	0	0	0	n/a
24	0	0	0	0	0	0	0	0	n/a	0	0	0	0	n/a
31	0	0	0	0	1	0	0	0	ns	0	0	0	0	n/a
Моноциты, % [референсный интервал: 2,0–17,05]														
0	3	4	3	7	6	8	3	4	ns	4	3	3	6	ns
11	4	3	2	5	1	3	2	3	ns	3	5	2	3	ns
24	2	2	2	2	1	2	3	4	ns	5	2	3	2	ns
31	3	3	5	4	4	4	2	4	ns	3	4	2	2	ns
Лимфоциты, % [референсный интервал: 14,0–62,70]														
0	49	40	60	43	37	48	46	50	ns	26	47	29	38	ns
11	35	59	53	27	32	43	42	63	ns	49	49	27	15	ns
24	33	38	63	34	21	30	42	71	ns	46	47	25	22	ns
31	34	37	47	30	53	46	53	60	0,029	56	57	33	32	ns

* — ns — нет статистически значимых отличий от контрольной группы ($P > 0,05$); n/a — статистический анализ неприменим из-за нулевых значений.

На протяжении исследования только в двух случаях наблюдалось статистически достоверное отличие в уровне оцениваемых показателей безопасности вакцины между экспериментальными группами и контрольной группой (Таблицы 11–13). На 28-й день после введения первого компонента вакцины наблюдалось статистически значимое ($p = 0,013$) снижение температуры тела у животных, получивших вакцину Спутник V внутримышечно (в среднем на $0,8\text{ }^{\circ}\text{C}$), по сравнению с контрольной группой. Кроме того, на 31-й день после введения первого компонента вакцины (7 дней после введения

второго компонента) в группе животных, получивших вакцину Спутник V внутримышечно, наблюдалось увеличение доли лимфоцитов в лейкоцитарной формуле ($P = 0,029$) с компенсаторным статистически значимым снижением доли сегментоядерных нейтрофилов ($P = 0,018$) по сравнению с контрольной группой. В обоих случаях значения параметров находились в рамках референсных значений для приматов данного вида. Указанные наблюдения могут свидетельствовать о развитии поствакцинального иммунного ответа и соответствовали побочным эффектам вакцинации, наблюдавшимся у людей в клинических исследованиях вакцины Спутник V [131,132]. Другие статистически значимые отличия в общем состоянии здоровья, массе тела, температуре тела, гематологических и биохимических показателях крови животных в экспериментальных группах от контрольной группы отсутствовали на протяжении всего периода наблюдения. Таким образом, приматы в целом хорошо переносят как внутримышечное, так и интраназальное введение вакцины Спутник V.

3.3.2.2 Результаты оценки уровня специфического Т-клеточного иммунного ответа на интраназальное и внутримышечное введение вакцины Спутник V

Для оценки напряженности поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа образцы цельной крови животных, получивших вакцину Спутник V (два компонента с интервалом 24 суток) внутримышечно ($n=4$) и интраназально ($n=4$), а также в контрольной группе ($n=4$) были получены непосредственно перед введением первого компонента вакцины, а также через 11 суток и через 31 сутки (7 суток после введения второго компонента вакцины, Рисунок 13). Уровень специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа оценивался в лимфопролиферативном тесте после антигенной стимуляции мононуклеаров периферической крови (МПК).

Стимуляцию МПК проводили S-белком SARS-CoV-2 (S1+S2 эктодомен). В качестве положительного и отрицательного контроля в лимфопролиферативном тесте использовали конканавалин А и полную среду, использовавшуюся при культивации клеток, соответственно. Уровень специфической пролиферации $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов выражали как долю клеток, которые делились один раз и

более в ответ на антигенную стимуляцию. Анализ уровня цитокинов, секретируемых иммунными клетками, проводили в образцах бесклеточной среды, собранной после инкубации клеток с антигеном. Результаты оценки уровня специфического Т-клеточного иммунного ответа на интраназальное и внутримышечное введение вакцины Спутник V представлены на Рисунке 14.

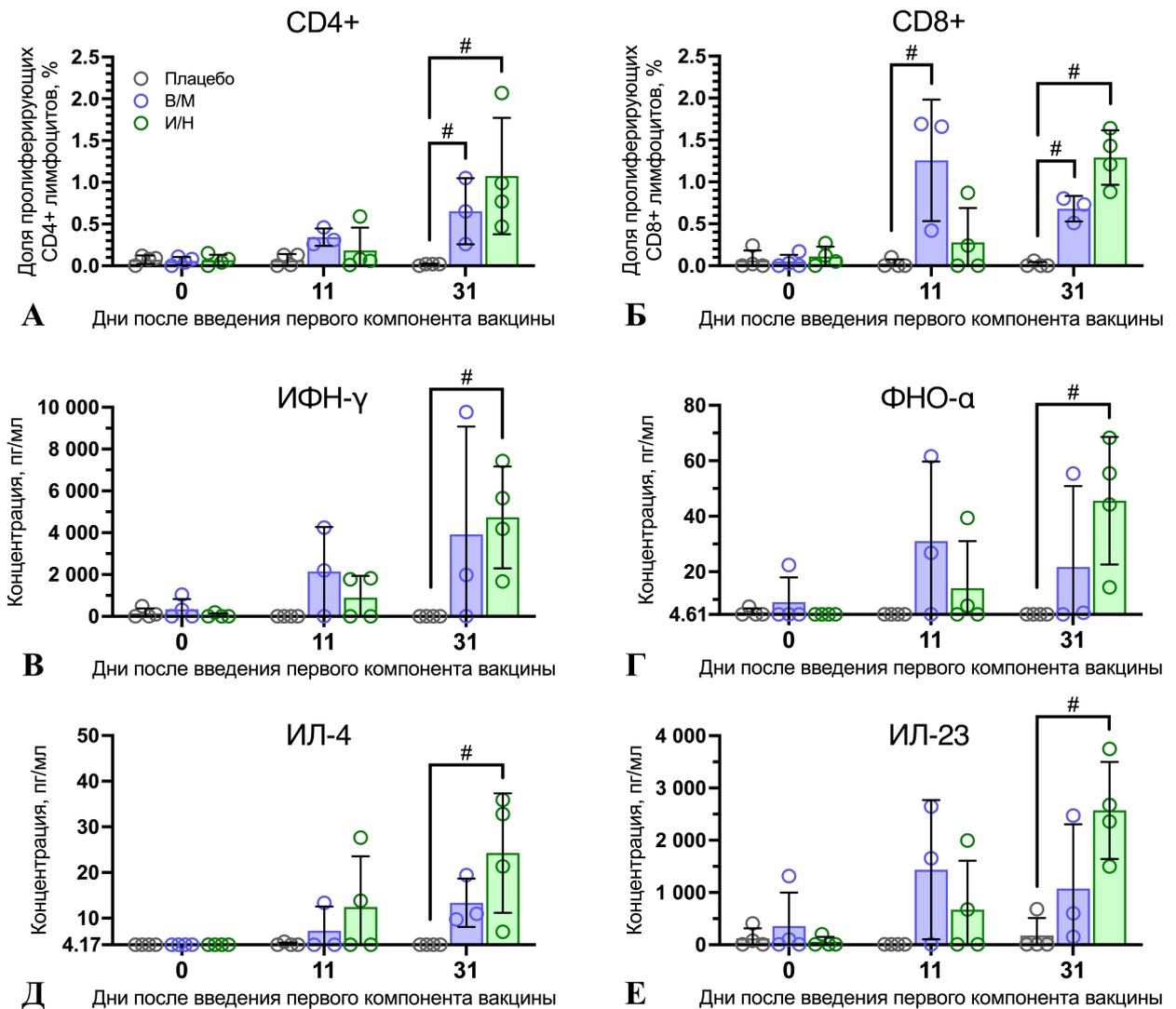


Рисунок 14 — Уровень антиген-специфической пролиферации $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ Т-клеток, а также уровень продукции ИФН- γ , ФНО- α , ИЛ-4 и ИЛ-23 после антигенной рестимуляции МПК обыкновенных игрунок, получивших вакцину Спутник V (два компонента с интервалом 24 суток) внутримышечно (В/М, n=3) или интраназально (И/Н, n=4), а также в контрольной группе (Плацебо, n=4). Уровень антиген-специфической пролиферации (А) $CD3^+CD4^+$ и (Б) $CD3^+CD8^+$ Т-лимфоцитов у животных в экспериментальных группах после стимуляции S-белком SARS-CoV-2. Уровень продукции (В) интерферона гамма (ИФН- γ), (Г) фактора некроза опухолей альфа (ФНО- α), (Д) интерлейкина 4 (ИЛ-4) и (Е) интерлейкина 23 (ИЛ-23) МПК

животных в экспериментальных группах после стимуляции S-белком SARS-CoV-2. Окружностями показаны значения для каждого отдельного животного, столбцами — средние значения для каждой группы, вертикальными линиями — стандартные отклонения. Оценку статистической значимости различий между экспериментальными группами проводили с помощью теста Манна-Уитни (# — $p < 0,05$). Минимальное значение на оси Y соответствует пределу детекции метода

Одно животное, получившее вакцину Спутник V внутримышечно (0701, самка), было исключено из анализа напряженности поствакцинального Т-клеточного ответа по причине формирования сгустков в полученных образцах цельной крови и, соответственно, низкого выхода МПК, недостаточного для проведения лимфопролиферативного теста. Повышенная свертываемость образцов крови, получаемых от ОИ, является широко распространенным явлением и описана исследователями, проводившими цитометрический анализ крови ОИ [133]. Внутримышечное и интраназальное введение вакцины Спутник V вызывало пролиферацию антиген-специфических CD4⁺ (0,65% и 1,08%, соответственно) и CD8⁺ (0,68% и 1,29%, соответственно) Т-клеток в периферической крови ОИ к 31-м суткам после введения первого компонента вакцины (7 суток после введения второго компонента, Рисунок 14А).

После интраназального введения вакцины в циркулирующей крови животных наблюдалось появление большей доли антиген-специфических Т-клеток по сравнению с внутримышечным введением, однако наблюдаемые различия не были статистически значимы. Функциональная активность антиген-специфических клеток характеризовалась на основании анализа уровня секреции ряда цитокинов. У животных, получивших вакцину интраназально, наблюдался статистически значимо более высокий уровень специфической продукции Th1 (ИФН- γ , ФНО- α), Th2 (ИЛ-4) и Th17 (ИЛ-23) цитокинов после антигенной стимуляции МПК в сравнении с контрольной группой (Рисунок 14Б).

Концентрации цитокинов, важных для характеристики специфического поствакцинального Т- и В-опосредованного иммунитета, но незначительно повышавшихся после антигенной стимуляции МПК животных в экспериментальных группах, представлены на Рисунке 15.

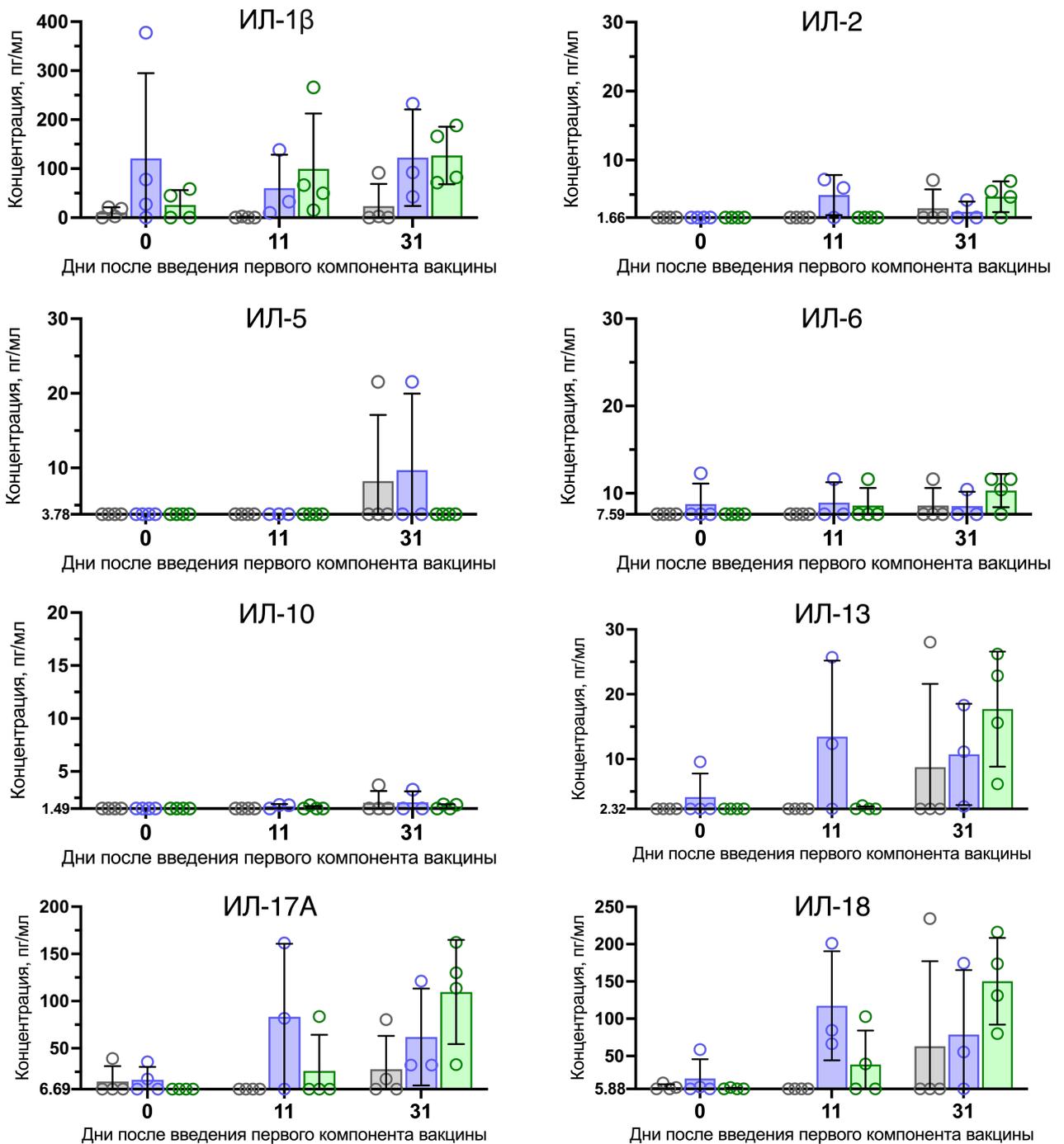


Рисунок 15 — Уровень продукции цитокинов после рестимуляции S-белком SARS-CoV-2 МПК ОИ, получивших вакцину Спутник V (два компонента с интервалом 24 суток) внутримышечно (фиолетовые окружности, n=3) или интраназально (зеленые окружности, n=4), а также в контрольной группе (серые окружности, n=4). В заголовке каждой панели указаны цитокины, уровень которых измеряли в культуральной среде. Окружностями показаны значения для каждого отдельного животного, столбцами — средние значения для каждой группы, вертикальными линиями — стандартные отклонения. Оценку статистической значимости различий между экспериментальными группами проводили с помощью теста Манна-Уитни (таковые отсутствовали). Минимальное значение на оси Y соответствует пределу детекции метода

Таким образом, как внутримышечный, так и интраназальный путь введения вакцины Спутник V приводили к формированию выраженного специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа у ОИ с вовлечением $CD3^+CD4^+$ и $CD3^+CD8^+$ клеток, однако статистически значимое в сравнении с контрольной группой специфическое повышение уровня продукции Th1, Th2 и Th17 цитокинов после антигенной стимуляции МПК наблюдалось только у животных, получивших вакцину интраназально.

3.3.2.3 Результаты изучения динамики формирования специфического локального мукозального и центрального гуморального иммунного ответа на интраназальное и внутримышечное введение вакцины Спутник V обыкновенным игрункам

Ввиду значительных различий в анатомии верхних дыхательных путей, а также эффективности презентации антигенов со слизистых оболочек носовой полости между людьми и грызунами [134,135], лабораторные приматы представляются наиболее адекватной лабораторной моделью для сравнения уровня иммунного ответа, индуцируемого при внутримышечном и интраназальном введении вакцин.

В ходе сравнительного анализа показателей напряженности поствакцинального локального мукозального гуморального иммунного ответа было установлено, что только интраназальный путь введения вакцины Спутник V приводил к выработке детектируемого уровня анти-RBD IgA на слизистых оболочках полости носа ОИ. СГТ анти-RBD IgA в группе животных, получивших вакцину Спутник V интраназально, достиг максимума на 58-й день после введения первого компонента вакцины (СГТ = 35) и затем опустился ниже предела детекции метода к 462-му дню (Рисунок 16А), что подтвердило предположение о том, что локальный IgA-ответ, вызванный вакцинацией, имеет ограниченную продолжительность [136]. Как и уровень IgA в мазках из носовой полости, уровень анти-RBD IgA в сыворотке крови ОИ после интраназального введения вакцины кратковременно повысился, достигнув максимума на 116-й день после введения первого компонента вакцины (СГТ = 141), после чего к 764-му дню снизился до значений, статистически неотличимых от значений, наблюдавшихся до вакцинации (Рисунок 16Б). Интраназальное введение вакцины не

привело к формированию статистически значимого повышения уровня анти-RBD IgG в смывах с полости носа ОИ (Рисунок 16В).

Внутримышечное введение вакцины Спутник V не привело к выработке детектируемых уровней анти-RBD IgA в мазках из полости носа (Рисунок 16А), однако титры анти-RBD IgA в сыворотке крови животных (Рисунок 16Б), а также титры специфических IgG в мазках из полости носа (Рисунок 16В) постоянно повышались с течением времени и достигли пиков на 764-й (СГТ 566) и 462-й (СГТ 119) день, соответственно. Чтобы учесть возможную вариабельность в процедуре забора образцов, также оценивали общий уровень IgG в мазках из носа на 7, 116 и 764-й дни после введения первого компонента вакцины. Нормализация детектируемого уровня анти-RBD IgG на общую концентрацию IgG в полученных мазках, выраженную в мкг/мл, подтвердила результаты, описанные выше.

Оценку напряженности системного гуморального поствакцинального иммунного ответа на первом этапе проводили путем измерения титра анти-RBD IgG в сыворотке крови ОИ, т.к. ранее была показана их корреляция с уровнем иммунной защиты от COVID-19 у людей [100]. Долгосрочный сравнительный анализ специфического системного гуморального иммунного ответа на внутримышечное и интраназальное введение ОИ вакцины Спутник V показал ряд значительных различий между исследуемыми группами (Рисунок 17).

Во-первых, титры анти-RBD IgG были в целом выше во всех точках наблюдения в группе ОИ, получивших вакцину внутримышечно (Рисунок 17А). При этом статистически значимые различия между группами наблюдались с 116-го дня после введения первого компонента вакцины (СГТ 30444 против 673) и сохранялись до 764-го дня (СГТ 25600 против 336).

Во-вторых, пик анти-RBD IgG наблюдался на 58-й день (СГТ 2263) после интраназального введения вакцины, тогда как внутримышечное введение приводило к отсроченному и пролонгированному максимуму уровня специфических IgG (СГТ 30444 как на 116-й, так и на 462-й день).

В-третьих, в наиболее поздней точке наблюдения (день 764 после введения первого компонента вакцины) в группе ОИ, получивших вакцину интраназально, наблюдалось значительное снижение уровня антител (СГТ 336, различия с

контрольной группой статистически незначимы), тогда как в группе ОИ, получившей вакцину внутримышечно, наблюдалось лишь незначительное снижение уровня анти-RBD IgG (СГТ 30 444 и 25600 на 462-й и 764-й день, соответственно).

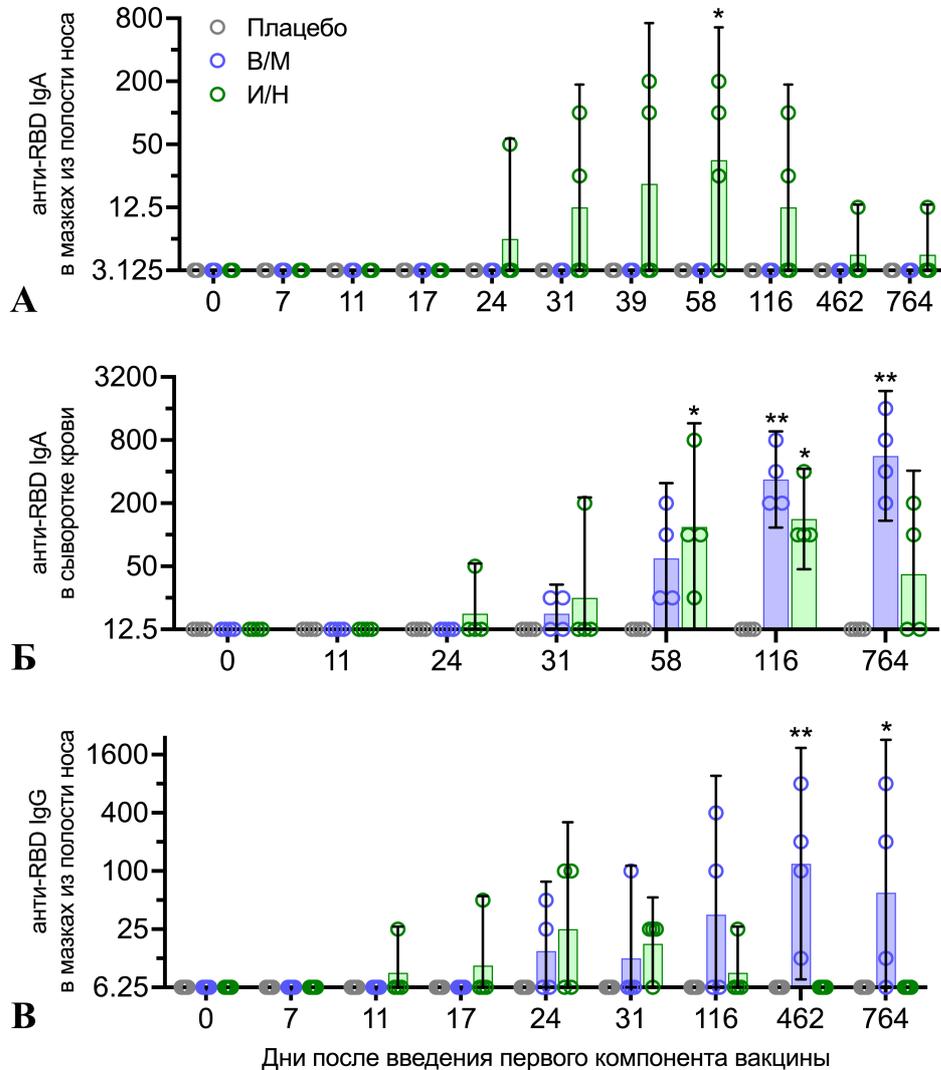


Рисунок 16 — Долгосрочный специфический локальный гуморальный иммунный ответ у ОИ, получивших вакцину Спутник V (два компонента с интервалом 24 суток) внутримышечно (В/М, n=4) или интраназально (И/Н, n=4), а также в контрольной группе (Плацебо, n=4). Уровень IgA, специфичных к RBD S-белка SARS-CoV-2, оценивали в мазках из полости носа (А), а также в сыворотке крови (Б). Уровень анти-RBD IgG также измеряли в мазках из полости носа (В). Окружностями показаны значения для каждого отдельного животного. Столбцами и вертикальными линиями показаны СГТ для каждой группы и 95% ДИ, соответственно. Статистически значимые отличия от показателей, полученных до введения вакцины (день 0) обозначены звездочками (* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$; непараметрический парный тест Фридмана, множественные сравнения проведены с использованием теста Данна). Минимальное значение на оси Y соответствует пределу детекции метода

Авидность антител является одним из важных параметров, указывающих на их созревание. Ранее было показано, что у людей сила связывания антигена с антителами увеличивается со временем как после инфекции, вызванной SARS-CoV-2, так и после вакцинации [137–140]. В ходе данной работы оценивали долгосрочные изменения авидности поствакцинальных антител, сформированных в результате внутримышечного и интраназального введения ОИ вакцины Спутник V (Рисунок 17Б).

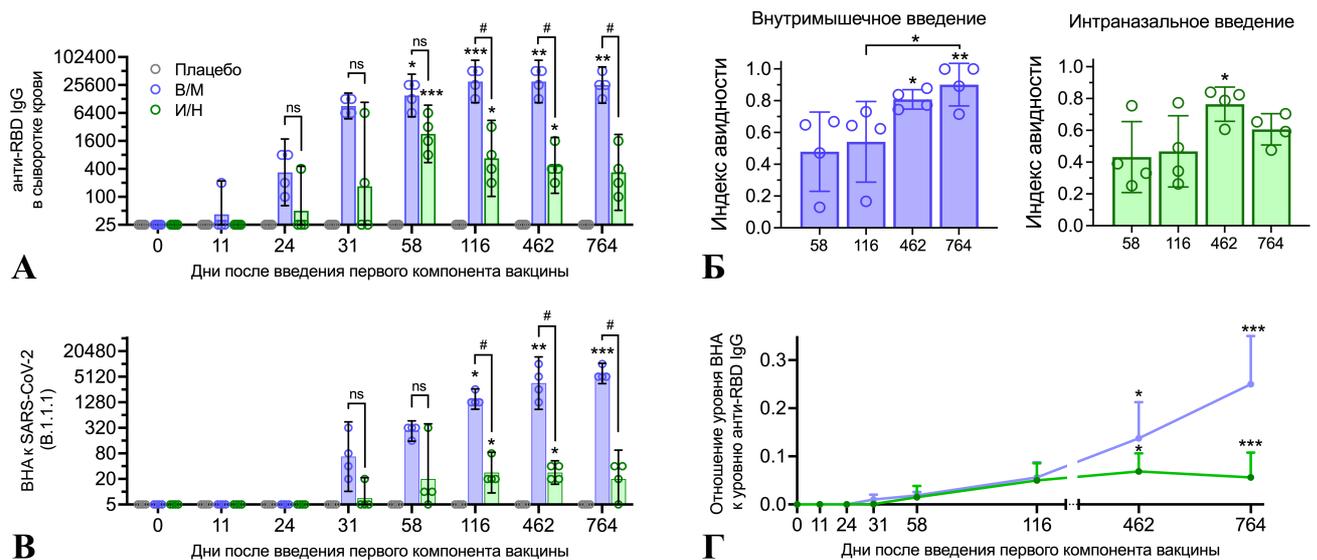


Рисунок 17 — Долгосрочный специфический системный гуморальный иммунный ответ у ОИ, получивших вакцину Спутник V (два компонента с интервалом 24 суток) внутримышечно (В/М, n=4) или интраназально (И/Н, n=4), а также в контрольной группе (Плацебо, n=4). Уровень (А) и индекс авидности (Б) IgG, специфичных к RBD S-белка SARS-CoV-2 в сыворотке крови ОИ; уровень вируснейтрализующих антител (ВНА) к SARS-CoV-2 (вариант B.1.1.1.) (В) в сыворотке крови ОИ (В) и отношение уровня ВНА к уровню анти-RBD IgG (Г). Окружностями показаны значения для каждого отдельного животного. Столбцами показаны СГТ (А,В) либо среднее (Б). Вертикальными линиями показаны 95% ДИ (А,В), либо стандартное отклонение (Б,Г). Статистически значимые отличия от показателей, полученных до введения вакцины (день 0), обозначены звездочками (* — $p < 0,05$, ** — $p < 0,01$, *** — $p < 0,001$; непараметрический парный тест Фридмана, множественные попарные сравнения проведены с использованием теста Данна). Точки наблюдения, в которых наблюдались статистически достоверные различия между группами животных, получивших вакцину внутримышечно и интраназально, обозначены решетками (# — $p < 0,05$, ns — статистически незначимые различия; двухфакторный дисперсионный анализ с апостериорным тестом Тьюки). Минимальное значение на оси Y соответствует пределу детекции метода

ИА анти-RBD IgG в сыворотках крови в группе приматов, получивших вакцину внутримышечно, повышался в течение всего периода наблюдения и достиг среднего значения 0,90 к 764-му дню после введения первого компонента вакцины (Рисунок 17Б). Примечательно, что в наиболее поздней точке наблюдения при исследовании образцов сыворотки крови двух из четырех животных уровни оптической плотности в лунках с интактными образцами и образцами, обработанными 8М мочевиной, были одинаковыми (ИА = 1), что свидетельствовало о крайне высокой аффинности специфических поствакцинальных антител. Интраназальное введение вакцины также привело к повышению ИА со временем, однако на 462-й день средний ИА в данной группе был ниже, чем в группе животных, получивших вакцину внутримышечно (ИА 0,76 против 0,81, соответственно), а затем снизился до 0,61 к 764-му дню.

Вируснейтрализующие антитела (ВНА) играют важную роль в иммунной защите против SARS-CoV-2, при этом уровень ВНА в крови коррелирует с уровнем защиты от COVID-19 [141]. На первом этапе данной работы была проведена оценка динамики изменения уровня ВНА к SARS-CoV-2 варианта B.1.1.1 (D614G), родственного штамму Wuhan-Hu-1, использованному при разработке вакцины Спутник V. Интраназальное введение вакцины привело к выработке относительно низкого уровня ВНА у ОИ (Рисунок 17В) — статистически значимое повышение уровня ВНА наблюдалось только на 116-й и на 462-й день после введения первого компонента вакцины (СГТ 28 в обоих случаях). Внутримышечное введение вакцины привело к выработке значительно более высоких уровней ВНА — статистически значимые отличия как от контрольной группы, так и от группы, получившей вакцину интраназально, наблюдались начиная с 116-го дня (СГТ 1522), при этом уровень ВНА продолжал нарастать на протяжении всего периода наблюдения до 764-го дня (СГТ 6089).

Для более подробного описания различий динамики изменения уровней анти-RBD IgG и ВНА, наблюдавшаяся у ОИ, получивших вакцину интраназально и внутримышечно, был проведен расчет индекса нейтрализующей активности сыворотки (соотношение ВНА/анти-RBD IgG), который считается одним из параметров, изменяющихся при созревании гуморального ответа и влияющих на эффективность иммунной защиты от COVID-19 [142,143]. В обеих группах животных,

получивших вакцину, наблюдалось повышение соотношения ВНА/IgG с течением времени (Рисунок 17Г). В группе ОИ, получивших вакцину внутримышечно, наблюдалось постоянное повышение соотношения ВНА/IgG вплоть до показателя 0,25 в наиболее отдаленной точке наблюдения (764-й день). Индекс нейтрализующей активности сыворотки в группе ОИ, получивших вакцину интраназально, достиг максимума на 462-й день (среднее значение в группе — 0,07) с последующим снижением до 0,06 на 764-й день, что все еще статистически значимо отличалось ($p < 0,01$) от уровня данного показателя в ранней точке наблюдения (11-й день).

Далее в группах ОИ, получивших вакцину Спутник V внутримышечно и интраназально, был проведен корреляционный анализ между параметрами гуморального иммунитета: уровнями специфических IgG и ВНА, индексом avidности специфических анти-RBD IgG и индексом нейтрализующей активности сыворотки. Анализ провели с использованием образцов сыворотки крови, полученных на 58-й, 116-й, 462-й и 764-й дни после введения первого компонента вакцины.

У ОИ в группах, получивших вакцину внутримышечно и интраназально, формировались различные паттерны корреляции в парах исследуемых параметров: титра анти-RBD IgG и титра ВНА (Рисунок 18А); титра ВНА и индекса avidности анти-RBD IgG (Рисунок 18Б); индекса нейтрализующей активности сыворотки и индекса avidности анти-RBD IgG (Рисунок 18В); а также титра и индекса avidности анти-RBD IgG (Рисунок 18Г). В группе ОИ, получивших вакцину внутримышечно, наблюдались статистически значимые показатели корреляции во всех указанных парах параметров, что согласуется с опубликованными данными, полученными с использованием сыворотки крови людей [144–146]. Напротив, в группе ОИ, получивших вакцину интраназально, корреляция не наблюдалась ни в одной паре параметров. Важно отметить, что значения всех коррелирующих параметров повышались попарно с течением времени только в группе животных, получивших вакцину внутримышечно. Полученные результаты подчеркивают различия в процессе созревания иммунного ответа, формируемого в результате внутримышечной и интраназальной вакцинации.

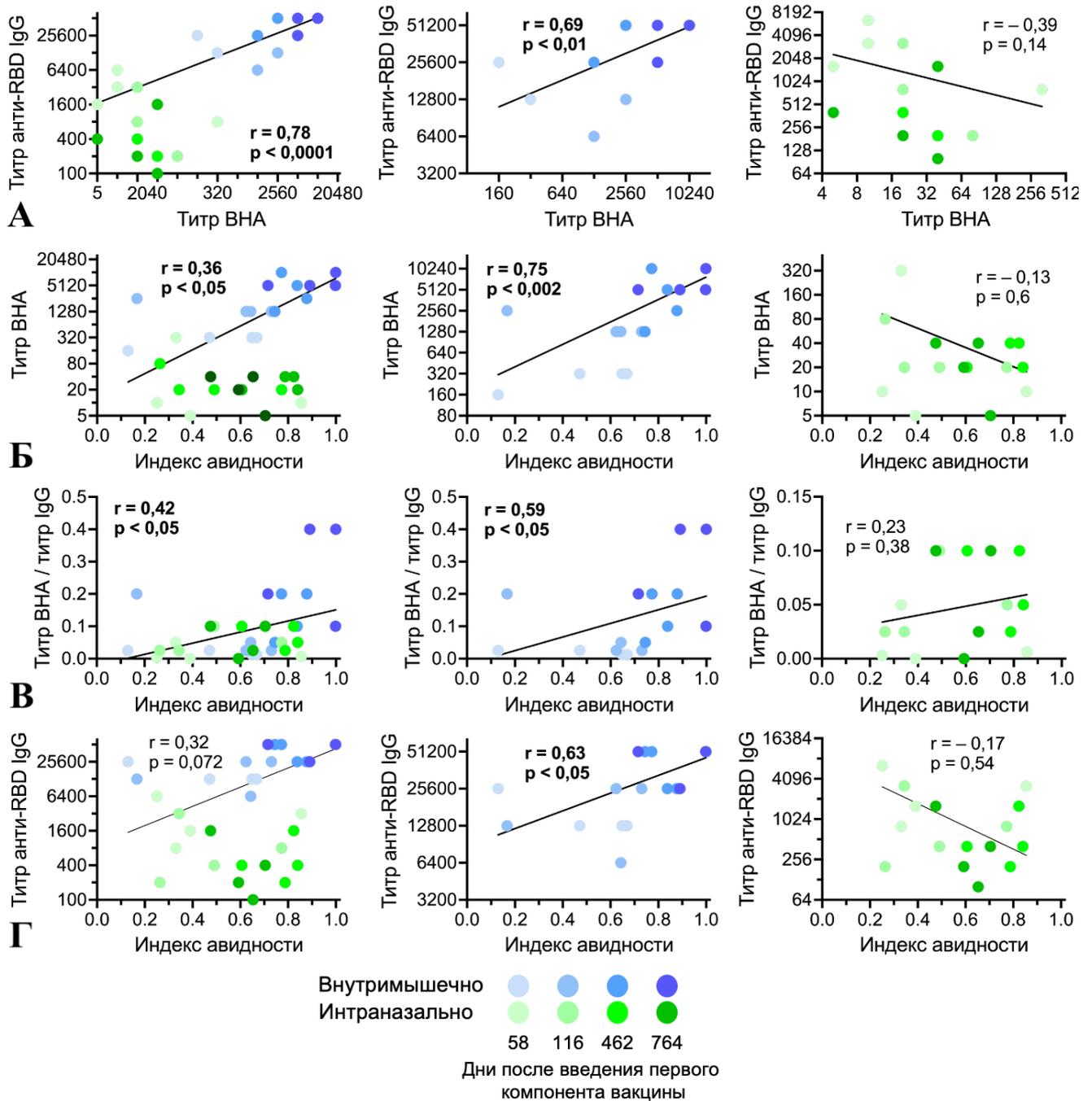


Рисунок 18 — Характеристика созревания специфического системного гуморального иммунного ответа у обыкновенных игрунок, получивших вакцину Спутник V (два компонента с интервалом 24 суток) внутримышечно (В/М, n=4) или интраназально (И/Н, n=4), а также в контрольной группе (Плацебо, n=4). Анализ корреляции в парах параметров гуморального иммунитета, проведенный с использованием образцов сыворотки крови, полученных на 58-й, 116-й, 462-й и 764-й дни после введения первого компонента вакцины, проводился суммарно для обеих групп (левый столбец), отдельно для группы животных, получивших вакцину внутримышечно (центральный столбец) и отдельно для группы животных, получивших вакцину интраназально (правый столбец). Графики корреляции между титрами анти-RBD IgG и титрами ВНА против инфекционного SARS-CoV-2 (вариант В.1.1.1.) (А). Графики корреляции между титрами вируснейтрализующих антител (ВНА) и индексами avidности анти-

RBD IgG (Б). Графики корреляции между индексом нейтрализующей активности сыворотки (титр ВНА / титр анти-RBD IgG) и индексом avidности анти-RBD IgG (В). Графики корреляции между титрами анти-RBD IgG и индексом avidности анти-RBD IgG (Г). Интенсивность цвета соответствует различным срокам после введения вакцины (указано в легенде). Показаны линия регрессии, непараметрические значения r и p Спирмена (значимые уровни корреляции выделены жирным шрифтом). Минимальное значение на оси Y соответствует пределу детекции для количественных показателей

Далее была проведена оценка способности вакцины Спутник V, введенной внутримышечно и интраназально, индуцировать формирование кросс-реактивных вируснейтрализующих антител к новым вариантам SARS-CoV-2. На первом этапе в сыворотках крови животных из всех экспериментальных групп методом иммуноферментного анализа было проведено определение титров антиген-связывающих антител к S-белку варианта B.1.1.1 (штамм Wuhan-Hu-1), гомологичного штамму, использованному при разработке вакцины Спутник V, а также гетерологичных вариантов B.1.617.2 (дельта) и B.1.1.529.5 (омикрон BA.5). С использованием образцов сыворотки крови ОИ, полученных на 116-й и 764-й дни после введения первого компонента вакцины, было установлено, что титры IgG, специфичных к S-белку штамма Wuhan-Hu-1, у животных, получивших вакцину внутримышечно, были стабильны на протяжении длительного времени (СГТ 36204 на 116-й и 764-й дни). В группе животных, получивших вакцину интраназально, наблюдалось статистически недостоверное снижение уровня анти-S IgG (СГТ 951 против 566 на 116-й и 764-й дни, соответственно). На 116-й день у животных, получивших вакцину как внутримышечно, так и интраназально, в сравнении с титром IgG, специфичных к S-белку гомологичного варианта B.1.1.1. (СГТ 36204 и 951, соответственно), титр IgG, специфичных к S-белку гетерологичного варианта SARS-CoV-2 дельта (B.1.617.2; СГТ 30444 и 672, соответственно), статистически достоверно не отличался, тогда как титр IgG к S-белку гетерологичного варианта SARS-CoV-2 омикрон (B.1.1.529.5; СГТ 15221 и 400, соответственно) был статистически достоверно ниже ($p < 0.05$) (Рисунок 19А). На 764-й день у животных, получивших вакцину внутримышечно, титры IgG к S-белкам гомологичного (B.1.1.1) и гетерологичных (B.1.617.2 и B.1.1.529.5) вариантов SARS-CoV-2 сравнивались (все СГТ

36204). Статистически значимые различия между титрами IgG к S-белкам трех исследованных вариантов у животных, получивших вакцину интраназально, на 764-й день отсутствовали (СГТ 566, 400 и 283 для вариантов В.1.1.1, В.1.617.2 и В.1.1.529.5, соответственно) (Рисунок 19Б).

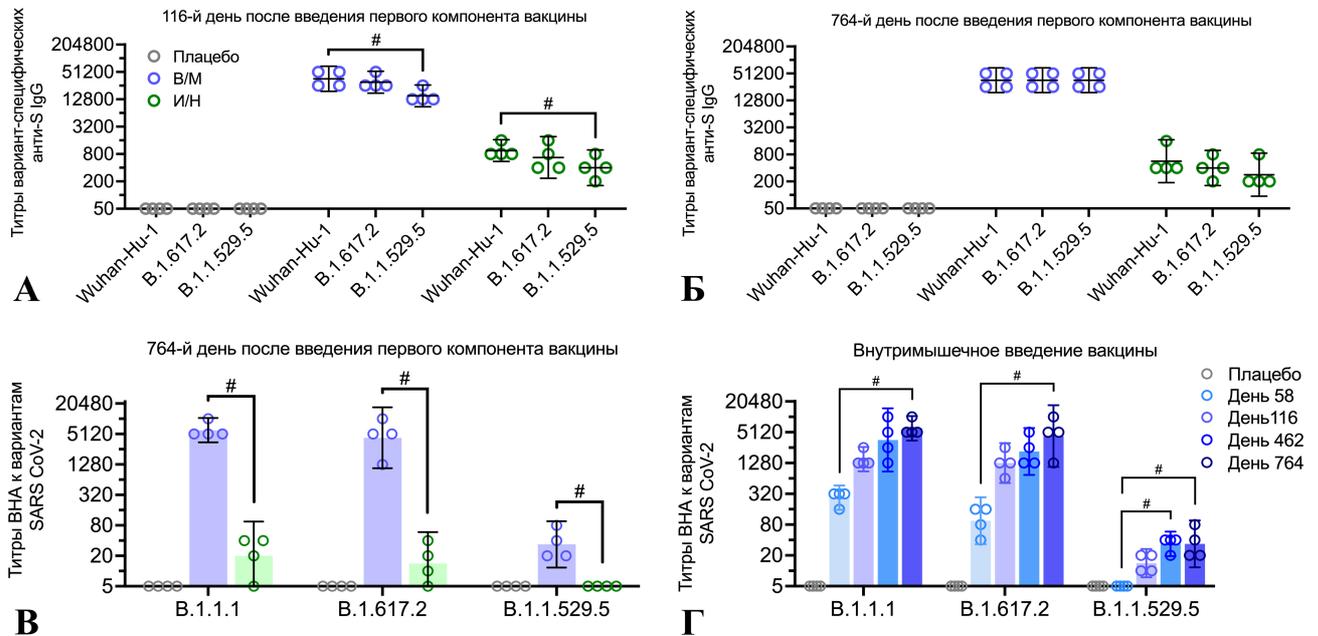


Рисунок 19 — Долгосрочная оценка кросс-вариантной реактивности IgG, специфических к S-белку SARS-CoV-2, и вируснейтрализующих антител (ВНА) у ОИ, получивших вакцину Спутник V (два компонента с интервалом 24 суток) внутримышечно (В/М, n=4) или интраназально (И/Н, n=4), а также в контрольной группе (Плацебо, n=4). Титры специфических IgG к S-белкам SARS-CoV-2 вариантов В.1.1.1 (штамм Wuhan-Hu-1), В.1.617.2 (дельта) и В.1.1.529.5 (омикрон ВА.5) на 116-й (А) и 764-й (Б) дни после введения первого компонента вакцины. Горизонтальными линиями показаны СГТ и 95% ДИ. Статистическая оценка достоверности различий между титрами IgG к вариантам SARS-CoV-2 проводилась с помощью теста Краскела-Уоллиса, множественные попарные сравнения проведены с использованием теста Данна. Титры ВНА к SARS-CoV-2 вариантов В.1.1.1, В.1.617.2 и В.1.1.529.5 на 764-й день у животных, получивших вакцину внутримышечно и интраназально (В). Титры ВНА к SARS-CoV-2 вариантов В.1.1.1, В.1.617.2 и В.1.1.529.5 у животных, получивших вакцину внутримышечно, на 58-й, 116-й, 462-й и 764-й день (Г). Статистическую оценку достоверности различий между титрами ВНА на 58-й день с последующими точками наблюдения, а также между группами животных, получивших вакцину внутримышечно и интраназально, проводили с помощью U-критерия Манна — Уитни. Столбцами и вертикальными линиями показаны СГТ и 95% ДИ, соответственно. Окружностями показаны значения для каждого отдельного

животного. Минимальное значение на оси Y соответствует пределу детекции. Статистически достоверные различия между группами показаны решетками.

Оценка кросс-вариантной реактивности ВНА в конце периода наблюдения (764-й день) показала, что по сравнению с интраназальным введением вакцины внутримышечная вакцинация привела к выработке значительно более высоких (более чем в 100 раз) титров ВНА как против гомологичного варианта SARS-CoV-2 B.1.1.1, так и против гетерологичных вариантов B.1.617.2 и B.1.1.529.5 (Рисунок 19В). На 764-й день в сыворотке крови всех животных, получивших вакцину внутримышечно, были обнаружены ВНА (СГТ 34) к гетерологичному варианту B.1.1.529.5 (омикрон ВА.5), который не циркулировал на момент вакцинации ОИ, тогда как в группе животных, получивших вакцину интраназально, ВНА к варианту B.1.1.529.5 отсутствовали.

Поскольку только внутримышечная вакцинация привела к формированию ВНА ко всем протестированным вариантам SARS-CoV-2 в конце периода наблюдения, далее была проведена оценка динамики выработки кросс-нейтрализующих антител у животных, получивших вакцину внутримышечно, с 58-го по 764-й день после введения первого компонента вакцины (Рисунок 19Г). Проведенный анализ показал, что с течением времени непрерывно повышались титры ВНА не только против гомологичного штамма B.1.1.1 (с СГТ 269 на 58-й день до СГТ 6089 на 764-й день), но и против гетерологичных штаммов B.1.617.2 (с СГТ 95 на 58-й день до СГТ 4305 на 764-й день) и B.1.1.529.5 (с неопределяемых уровней на 58-й день до СГТ 34 на 764-й день)

3.3.3 Обсуждение

Быстрое распространение SARS-CoV-2 и последующее появление множества кандидатных вакцин против COVID-19, основанных на разных платформах и вводимых разными путями и в разных дозах, поставили перед иммунологами множество вопросов, среди которых один из наименее изученных — длительность поствакцинального иммунитета.

Было показано, что ряд параметров гуморального иммунитета, таких как титры IgG против RBD и S-белка, титры ВНА и аффинность/авидность антител, являются суррогатными маркерами защиты от COVID-19 [141,144,145,147–151]. Более того,

значения некоторых из этих параметров, такие как avidность антител, титр ВНА и кросс-нейтрализующая активность антител против SARS-CoV-2, могут повышаться с течением времени после вакцинации или инфицирования в результате созревания аффинности антител [152]. В этом контексте оценка долгосрочной иммуногенности вакцин против COVID-19 крайне востребована как для разработки новых кандидатных вакцинных препаратов, так и для планирования кампаний вакцинации, направленных на долгосрочную защиту населения. В то же время, такие исследования весьма редки ввиду значительных трудозатрат, большой длительности и высокой стоимости. Постоянная циркуляция новых вариантов SARS-CoV-2 в популяции людей, а также продолжающаяся массовая вакцинация и ревакцинация дополнительно усложняют долгосрочное исследование поствакцинального иммунного ответа в человеческой популяции [153].

Для адекватной оценки специфической иммуногенности и безопасности мукозальных вакцин требовалась лабораторная животная модель с высоким трансляционным потенциалом, позволяющая оценить уровень активации мукозального, гуморального и Т-клеточного ответа, а также методики, позволяющие провести такую оценку. Для оценки долгосрочного специфического поствакцинального иммунного ответа с надежным исключением влияния незарегистрированных случаев инфицирования SARS-CoV-2 на исследуемые параметры, в данной работе использовали колонию ОИ, описанную в Главе 1. Ранее в данной главе были описаны факторы, определяющие невосприимчивость ОИ к заражению SARS-CoV-2, однако изучение созревания поствакцинального гуморального иммунного ответа в условиях продолжавшейся пандемии требовало дополнительного подтверждения отсутствия влияния незарегистрированных случаев инфицирования животных от персонала при ежедневном уходе и ветеринарном обслуживании. В течение всего периода наблюдения животных содержали в изолированных условиях в виварии, оборудованном для работы с ПБА, при этом персонал вивария использовал средства индивидуальной защиты, включая защиту органов дыхания. Также у всех животных в течение всего периода наблюдения периодически проводили исследование уровня антител класса IgG к N-белку SARS-CoV-2 в сыворотке крови. Исследование проводили с использованием набора для

иммуноферментного анализа, зарегистрированного для клинического применения (Вектор-Бест, Россия), с заменой антивидовых детекторных антител на моноклональные антитела, распознающие IgG ОИ (Sigma-Aldrich, США), подобранные в ходе работ, описанных в Главе 2. Случаев заражения ОИ SARS-CoV-2 в ходе всего периода наблюдения выявлено не было.

При изучении поствакцинального иммунного ответа с использованием лабораторных животных необходимо учитывать релевантность модели и трансляционный потенциал получаемых данных. В ходе работы, описанной в данном разделе, было показано, что внутримышечное введение ОИ вакцины Спутник V привело к выработке специфических антител и последующему непрерывному повышению их авидности и кросс-нейтрализующей активности в отношении гетерологичных вариантов SARS-CoV-2 с течением времени, что согласуется с результатами ряда опубликованных долгосрочных клинических исследований [137,138,154]. В то же время, у мышей, которых широко используют для первичной оценки специфической иммуногенности и протективной активности кандидатных вакцинных препаратов, динамика изменения авидности поствакцинальных антител заметно отличается от таковой у приматов (включая человека). В опубликованной нами статье было показано, что у мышей титры IgG к RBD после внутримышечного введения вакцины Спутник V оставались стабильными в период с 77-го по 134-й день, при этом индекс авидности анти-RBD IgG достигал пика в период с 35-го по 49-й день, а затем заметно снижался к 91-му дню [77]. Наблюдаемые видоспецифические различия могут быть вызваны, помимо прочего, более короткой продолжительностью жизни мышей, кратной разницей в скорости биохимических процессов [155] и значительной разницей в количестве В-клеток [156].

Одним из отличительных наблюдений, сделанных в ходе работы, описываемой в данном разделе, является долгосрочное сохранение высоких уровней анти-RBD IgG в сыворотке крови ОИ после внутримышечной (но не интраназальной) вакцинации, в то время как у людей поствакцинальные IgG, как правило, демонстрируют тенденцию к снижению с течением времени [157]. Ранее в ряде работ было показано, что, в то время как общие уровни антигенсвязывающих антител снижаются со временем за счет фракции с низкой авидностью, уровень антител с высокой авидностью более стабилен

[142,158,159]. Таким образом, относительно высокий наблюдавшийся нами индекс avidности анти-RBD IgG в сыворотках ОИ после вакцинации, а также его достоверная корреляция с титрами анти-RBD IgG (Рисунок 18Г), может объяснить стабильность анти-RBD IgG у животных, получивших вакцину внутримышечно. Исходно высокий индекс avidности анти-RBD IgG, наблюдаемый после внутримышечной вакцинации ОИ, может быть связан с относительно высокой использованной дозой вакцины. Нами было показано, что доза вакцины влияет на динамику изменения ИА анти-RBD IgG у мышей. Большая доза (10^9 вирусных частиц) приводила к выработке анти-RBD IgG с более высоким ИА по сравнению с меньшей дозой (10^8 вирусных частиц) [77]. Полученные данные свидетельствуют о том, что поствакцинальное созревание гуморального иммунного ответа зависит не только от количества доз вакцины [144,146], но и от дозы вакцинного антигена. Тем не менее, необходимы дополнительные детальные исследования для определения механизмов, лежащих в основе взаимосвязи между дозой антигена и динамикой созревания поствакцинального гуморального иммунного ответа.

Нами впервые продемонстрировано, что интраназальное введение аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 также индуцирует созревание avidности сывороточных антител. У ОИ, получивших вакцину Спутник V интраназально, в целом наблюдалось менее выраженное и относительно кратковременное повышение нейтрализующей активности сыворотки и увеличение ИА анти-RBD IgG по сравнению с группой животных, вакцинированных внутримышечно. Из-за низких титров сывороточных ВНА, оценить динамику изменения кросс-нейтрализующей активности сыворотки крови животных, получивших вакцину интраназально, в отношении вариантов SARS-CoV-2 оказалось невозможным. При этом у животных из данной группы титры анти-S IgG против всех трёх протестированных вариантов SARS-CoV-2 — B.1.1.1 (Wuhan-Hu-1), B.1.617.2 (дельта) и B.1.1.529.5 (омикрон BA.5) — снизились между 116-м и 764-м днями после введения первого компонента вакцины, в отличие от группы животных, получивших вакцину внутримышечно. Интраназальное введение вакцин вызывает в целом более низкий системный гуморальный иммунный ответ у людей по сравнению с внутримышечным введением [160], что может быть связано с естественной иммунной толерантностью слизистой

оболочки, а также с различиями в биораспределении вакцины при использовании различных путей введения. Лимфоидная ткань, ассоциированная с носоглоткой, представляет собой третичный лимфоидный орган и является основным местом презентации антигена при интраназальной вакцинации, в то время как внутримышечная вакцинация преимущественно нацелена на вторичные лимфоидные органы, такие как селезенка и лимфатические узлы [161,162]. Поскольку третичные лимфоидные органы не равны вторичным по своим функциям, размеру и сложности, можно предположить, что наблюдаемое небольшое и ограниченное по времени повышение индекса авидности IgG у ОИ, получивших вакцину интраназально, может быть связано с функциональными ограничениями в процессах созревания антител в герминальных центрах В-клеток в третичных лимфоидных органах [163,164]. Для доказательства этой гипотезы необходимы исследования механизмов созревания поствакцинального гуморального иммунного ответа, которые позволят выяснить причины нестабильности мукозального и системного иммунного ответа при интраназальной вакцинации.

Ранее Almendro-Vázquez и соавт. было показано, что наличие Т-клеточного иммунного ответа, специфичного к S-белку SARS-CoV-2, обеспечивает защиту от тяжелого течения COVID-19 [101]. Благодаря наличию отработанных методик оценки специфического Т-клеточного иммунитета у ОИ, описанных в Главе 2, нами в ходе изложенной в данной главе работы было показано, что как внутримышечный, так и интраназальный путь введения вакцины Спутник V приводили к формированию выраженного специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа у ОИ с вовлечением CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток, однако статистически значимое в сравнении с контрольной группой специфическое повышение уровня продукции Th1, Th2 и Th17 цитокинов после антигенной стимуляции МПК наблюдалось только у животных, получивших вакцину интраназально.

При долгосрочном изучении поствакцинального иммунного ответа выбор релевантных лабораторных моделей становится еще более важным [165]. Учитывая значительные различия в морфологии и физиологии верхних дыхательных путей между грызунами и приматами, включая четырехкратную разницу в соотношении площади слизистых покровов полости носа к объему тела, видоспецифические

особенности мышей могут значительно снижать их релевантность при оценке специфической иммуногенности вакцин, применяемых интраназально [134]. Так, нами показано, что при интраназальном и внутримышечном введении мышам вакцины Спутник V наблюдались схожие уровни поствакцинальных IgG [43]. Аналогично, интраназальное и внутримышечное введение хомякам вакцины на основе аденовируса шимпанзе (ChAdOx1, nCoV-19, AstraZeneca) приводило к выработке схожих уровней анти-S IgG в сыворотке крови. При этом результаты I фазы клинических исследований продемонстрировали значительную разницу в титрах анти-S IgG в сыворотке крови людей, получивших вакцину ChAdOx1 интраназально и внутримышечно [160,166]. В ходе работ, описанных в данном разделе, показано, что у ОИ титры IgG, специфичных как к RBD, так и к S-белку SARS-CoV-2, после интраназальной вакцинации были ниже, чем после внутримышечной. Таким образом, необходимость применения лабораторных приматов для подтверждения результатов оценки иммуногенности интраназально вводимых вакцин, полученных с использованием грызунов, представляется установленным фактом, подтвержденным как литературными источниками [167], так и результатами экспериментов, описанных в данном разделе.

Среди нечеловекообразных приматов выбор ОИ для долгосрочных исследований поствакцинального иммунного ответа может быть обусловлен несколькими общими факторами, включая их небольшой размер, относительно небольшую стоимость и относительную простоту содержания в лабораторных условиях. Показанная нами и другими научными группами схожесть анатомии и физиологии иммунной системы ОИ и человека [46,72] обуславливает широкую применимость ОИ в биомедицинских исследованиях, включая доклинические испытания безопасности и специфической активности противовирусных вакцин [41,59,168]. Однако, как и для любой другой экспериментальной модели, при планировании экспериментов необходимо учитывать видоспецифические особенности [156].

Важным ограничением описанной в данном разделе работы является то, что механизм наблюдаемого созревания аффинности антител и расширения их кросс-нейтрализующей активности в отношении гомологичных и гетерологичных вариантов SARS-CoV-2 остался неуточненным. Ранее было показано, что для созревания

аффинности антител необходим антиген, способный персистировать в герминальных центрах в течение длительного времени [168]. Например, вирусные белки и нуклеиновые кислоты могут сохраняться в кишечнике реконвалесцентов, перенесших COVID-19, в течение месяцев, обеспечивая источник антигена для герминальных центров [169]. В данном исследовании источник антигена для герминальных центров остается неизвестным.

Известно, что димерная форма IgA, присутствующая на поверхности слизистых оболочек, проявляет более высокую avidность и нейтрализующую активность по сравнению с мономерной формой, которая преимущественно обнаруживается в сыворотке крови [170,171]. Из-за ограниченной доступности антител к различным изотипам антител ОИ, еще одним ограничением данного исследования была невозможность отдельно измерить титры различных форм IgA. В этом исследовании мы использовали антитела, распознающие обе формы антигенспецифического IgA, любезно предоставленные д.б.н., проф. М.П. Самойлович.

Таким образом, в ходе работы, описанной в данном разделе, впервые были получены доказательства того, что внутримышечное и интраназальное введение аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 индуцирует выработку у лабораторных приматов специфических антител с последующим созреванием их аффинности. Также установлено, что внутримышечная вакцинация ОИ приводит к формированию устойчивого системного гуморального иммунитета с постоянным повышением показателей созревания антител (avidности и кросс-нейтрализующей активности в отношении гомологичных и гетерологичных вариантов SARS-CoV-2) на протяжении более двух лет. Наряду с общим снижением патогенности современных вариантов SARS-CoV-2, свидетельства созревания поствакцинального гуморального иммунного ответа позволяют лучше понять механизмы формирования популяционного иммунитета против пандемических заболеваний и будут полезны при планировании кампаний по широкой вакцинации населения.

3.4 Заключение главы

Описанная в Главе 1 колония ОИ, родившихся и постоянно содержащихся в лабораторных условиях, активно использовалась в ходе доклинических исследований вакцин против COVID-19, разработанных в России.

В первом разделе данной главы описано применение ОИ в доклинических исследованиях инактивированной β -пропиолактоном цельновирионной очищенной сорбированной коронавирусной вакцины КовиВак производства ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). На основании данных, полученных с использованием ОИ, был сделан вывод о безопасности вакцины КовиВак, а также о ее способности индуцировать выработку специфических вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2, что в совокупности с данными, полученными на лабораторных грызунах и кроликах, позволило обосновать возможность перехода к I–II фазе клинических исследований.

Во втором разделе данной главы описано применение лабораторных ОИ в исследованиях безопасности и специфической активности интраназальной и внутримышечной формы аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 Спутник V, разработанной ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, а также представлены результаты изучения долгосрочного созревания поствакцинального иммунного ответа.

Описанные в данной главе результаты опубликованы в журналах *Emerging microbes and infections* [41,43] и *Frontiers in Immunology* [77], а также представлены автором в виде устных докладов на ряде российских и международных научных конференций, включая пленарный доклад на международной конференции *Virology Africa*, прошедшей 15–18 апреля 2024 г. в г. Стелленбош, Южно-Африканская Республика.

ГЛАВА 4. Экспериментальное моделирование инфекции, вызываемой вирусом гепатита E, и оценка специфической активности кандидатной рекомбинантной вакцины против вирусного гепатита E на обыкновенных игрушках

Изучение многих аспектов ВГЕ-инфекции и разработка вакцинных и терапевтических препаратов против вирусного гепатита E требуют поиска адекватных лабораторных животных моделей, восприимчивых ко всем значимым генотипам вируса и воспроизводящих основные этапы развития инфекции у человека (репродукция вируса, преимущественно поражаемые органы, длительность заболевания и т.д.).

В данной главе представлены результаты разработки экспериментальной модели для оценки специфической активности терапевтических препаратов и кандидатных вакцин против вирусного гепатита E на основе ОИ, а также описаны результаты испытаний кандидатной рекомбинантной вакцины против вирусного гепатита E с использованием разработанной модели.

4.1 Обзор литературы

4.1.1 Характеристика возбудителя вирусного гепатита E

Вирус гепатита E (ВГЕ) является наиболее частой причиной острого гепатита во многих регионах мира, вызывая более 20 млн инфекций и более 40 тыс. смертей ежегодно [172]. ВГЕ генотипов (ГТ) 1 и 2 циркулирует только в человеческой популяции и вызывает вспышки острой инфекции с водным путем передачи. ГТ3 и ГТ4 ВГЕ в основном передаются человеку алиментарным путем от диких и сельскохозяйственных животных, преимущественно свиней, в промышленно развитых странах [173], где в последние годы происходит увеличение количества автохтонных случаев инфицирования ВГЕ [174].

За последнее десятилетие появились новые данные, свидетельствующие о циркуляции ВГЕ в странах с умеренным климатом, в том числе в России, где случаи гепатита E ранее не регистрировались [175], а также о передаче ВГЕ от животных

человеку и циркуляции ВГЕ у многих видов домашних животных, включая цыплят и свиней [176].

ВГЕ относится к роду *Orthohepevirus A* семейства *Hepeviridae* и имеет не менее восьми ГТ, пять из которых (ВГЕ1–4 и ВГЕ7) способны вызывать инфекцию у людей [177,178].

Вирионы ВГЕ, обнаруживаемые в желчи и фекалиях, имеют диаметр 32–34 нм (Рисунок 20) и не имеют оболочки, тогда как в крови они могут циркулировать в липидной капсуле (квазиоболочке) [179].

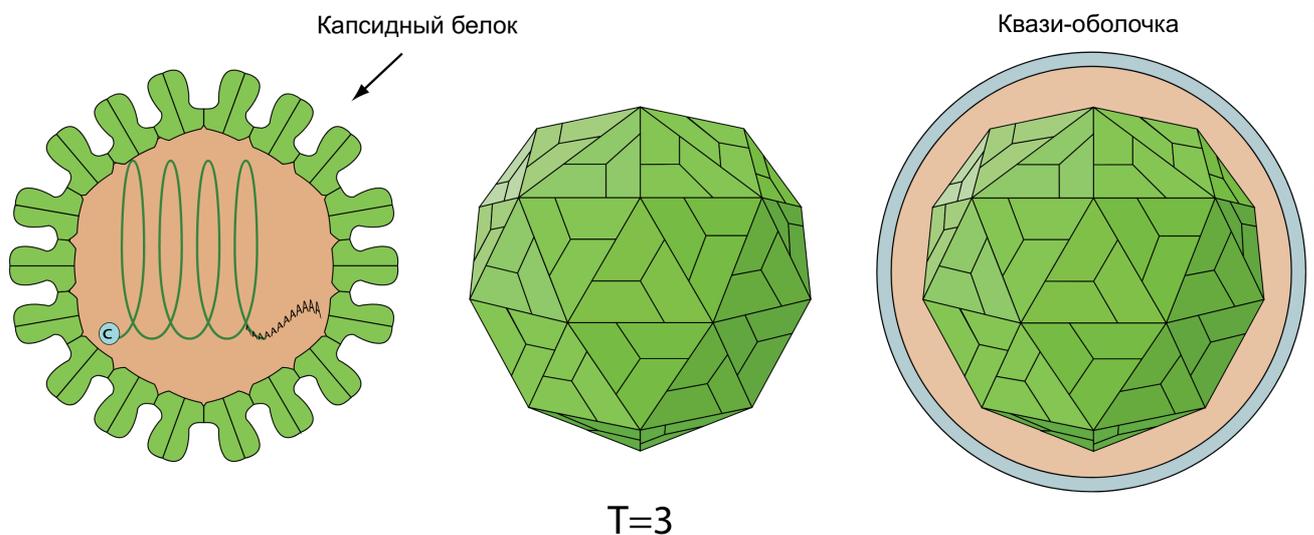


Рисунок 20 — Структура частиц вируса гепатита Е [ViralZone, Швейцарский институт биоинформатики, Швейцария]

Геном ВГЕ представлен одноцепочечной плюс-РНК длиной 7,2 тыс. оснований (Рисунок 21) [180]. Открытая рамка считывания (ОРС) 1 ВГЕ кодирует неструктурные белки, которые участвуют в репликации вирусного генома, ОРС2 кодирует капсидный белок, а ОРС3 — регуляторный фосфопротеин, который модулирует противовирусный иммунный ответ [181–184]. Также была идентифицирована дополнительная рамка считывания ОРС4 в составе ОРС1 ВГЕ ГТ1. ОРС4 кодирует один белок с молекулярной массой 20 кДа, который ускоряет репродукцию ВГЕ ГТ1 *in vitro* и, возможно, способствует негативным исходам гепатита Е у пациентов [185].

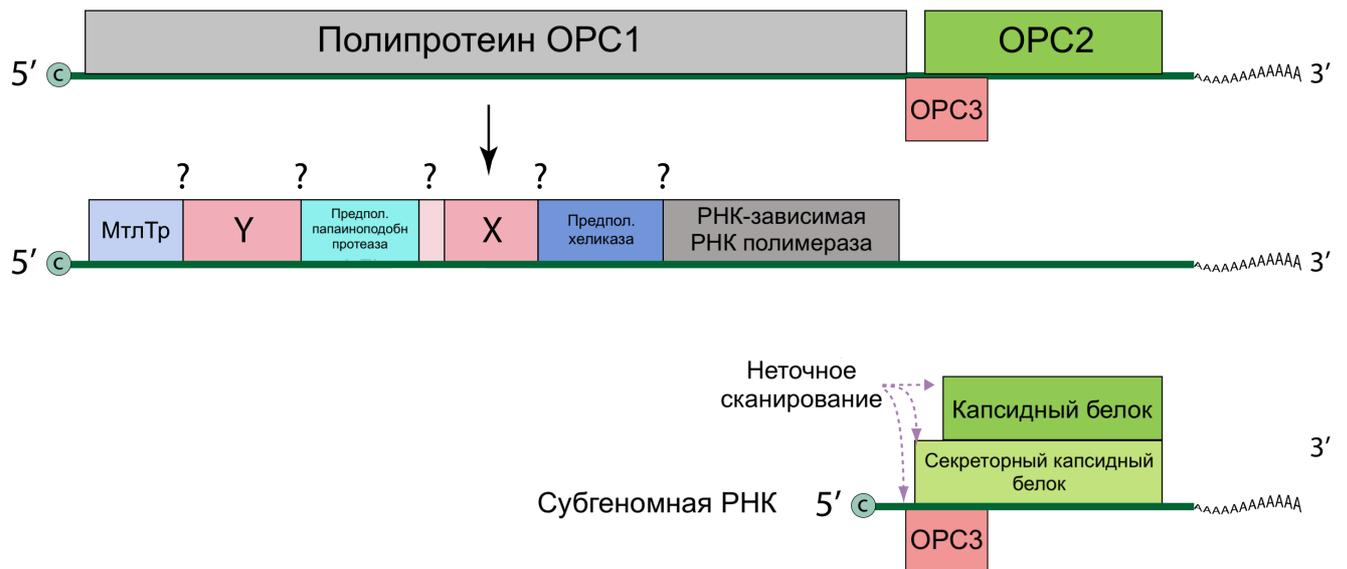


Рисунок 21 — Организация генома вируса гепатита E [ViralZone, Швейцарский институт биоинформатики, Швейцария]. МтлТр — метилтрансфераза; ОРС — открытая рамка считывания

ОРС2 кодирует капсидный белок массой 72 кДа, состоящий из 660 аминокислотных (ак) остатков с гидрофобным участком от 14 до 34 ак на N-конце, который функционирует как сигнальная последовательность, регулирующая секрецию ОРС2 [186]. Белок ОРС2 (БОРС2) существует в различных формах: капсидная форма ОРС2 (ОРС2^С), компонент инфекционных частиц, и секретируемая ОРС2 (ОРС2^С), которая присутствует в гликозилированной и укороченной формах [187,188]. Формы белка ОРС2^С являются наиболее распространенными антигенами, обнаруживаемыми в крови инфицированных пациентов, и представляют собой основную мишень для иммунного ответа против ВГЕ, выступая в качестве антигенов-приманок, при этом антитела, связавшиеся с секретируемыми формами ОРС2, не участвуют в нейтрализации инфекционных вирионов [189]. Белок ОРС2^С транслируется начиная с высококонсервативного внутреннего кодона AUG, расположенного через 15 кодонов после стартового кодона AUG, с которого начинается трансляция белка ОРС2^С. Продукт ОРС2^С лишен сигнальной последовательности и не секретируется. При экспрессии *in vitro* капсидный белок самособирается в вирусоподобные частицы (ВПЧ), которые при сборке упаковывают вирусную РНК [190]. При этом ОРС2^С участвует в связывании клеточного рецептора, интернализации вируса и высвобождении генома в цитоплазму [191].

4.1.2 Потенциальные антигены для разработки вакцин против гепатита E

ОРС2^C содержит три функциональных домена: S (ак 118–313), P1 (ак 314–453) и P2 (ак 454–606), также называемый E2s [192]. 54 С-концевых ак остатка бОРС2 предположительно изменяют конформацию белка, экспонируя дополнительные эпитопы, связывающие антитела [193]. Взаимодействие доменов E2s инициирует гомодимеризацию бОРС2 в капсомеры, которые затем собираются в вирусную частицу. Вирусная инфекция инициируется взаимодействием гомодимера E2s с клетками хозяина [192,194,195]. Рекомбинантные белки бОРС2 также могут формировать ВПЧ. Укороченная с N- и С-конца версия бОРС2, содержащая ак 14–608 (p595), образует икосаэдрические ВПЧ с числом триангуляции (Т), равным 3 (n=180), напоминающие нативные вирионы; p495, представляющий собой ак 112–606 бОРС2, образует вирионоподобные икосаэдрические ВПЧ с Т=1 (n=60) [189]. Как уже было сказано выше, E2s (ак 459–606) образует плотные гомодимеры, при этом удлинение E2s на 66 ак на N-конце (ак 394–606) дополнительно стабилизирует E2s, позволяя ему образовывать гексамеры в растворе [196]. E2s, дополненный 26 ак до p239 (ак 368–606), может самособирается в ВПЧ диаметром 20–30 нм [197]. Даже короткий p179 (ак 439–617) самособирается в ВПЧ размером около 20 нм [198]. Формирование ВПЧ также было описано для большого количества производных бОРС2, укороченных на N-конце: ак 439–617, 394–606, 368–606, 112–606 [197–199] (Рисунок 22).

ОРС2^C обладает высокой иммуногенностью и, в отличие от ОРС2^S, индуцирует формирование ВНА при экспериментальной вакцинации лабораторных животных [200]. Эпитопы ВНА локализованы на С-конце белка по ак 458–607 в пределах E2s и лучше всего представлены в контексте гомодимеров и ВПЧ [200]. Используя моноклональные антитела мыши к капсидному белку ВГЕ, Zhang и соавт. показали, что основные эпитопы вируснейтрализующих антител образованы несколькими последовательностями ак между положениями 470 и 606, ко-локализуемыми при мультимеризации [201], в то время как синтетические пептиды, полученные из бОРС2, и рекомбинантные полипептиды длиной менее 100 ак не индуцируют выработку ВНА [202], подтверждая, что эпитопы нейтрализации ВГЕ являются конформационными, а не линейными.



Рисунок 22 — Производные капсидного белка вируса гепатита E, способные формировать вирусоподобные частицы. p595, формирующий частицы, сходные с нативными вирионами (адаптировано из статьи Yamashita и соавт. [195]); E2s, формирующий стабильные иммуногенные гомодимеры [194]; три белка, используемых в кандидатных вакцинных препаратах, дошедших до клинических исследований: p179 [198], p239 [197] и p495 [199]; и p551, полученный нами [6]

Высокая иммуногенность ВПЧ, образованных укороченными на N-конце версиями БОРС2, сохраняющими ак 470–606, зависит от их способности к полимеризации [197–199]. Иммуногенность ВПЧ, состоящих из ак 368–606 БОРС2, у мышей оказалась в 240 раз выше, чем иммуногенность димерного E2s [197]. Более того, ВПЧ, образованные ак 368–606 БОРС2, также индуцировали мощный Т-клеточный ответ, отсутствующий у животных, иммунизированных E2s, несмотря на тот факт, что последовательность Т-клеточного эпитопа была общей для этих двух иммуногенов [203]. Более высокая иммуногенность ВПЧ по сравнению не только с мономерными, но и с димерными структурами объяснялась преимуществами одновременной презентации на поверхности частиц нескольких вирусоподобных эпитопов по сравнению с ограниченным числом эпитопов, представленных иммуногенами, не формировавшими ВПЧ [198]. Такая презентация индуцирует как В-клеточный ответ, так и Т-клеточный ответ Th1-типа и не требует добавления адьюванта [203], что подтверждает более ранние выводы, сделанные для ВПЧ, образованных нуклеокапсидным белком вируса гепатита В [204]. В целом это делает

формирование ВПЧ критическим этапом, определяющим иммуногенность производных БОРС 2 ВГЕ и их способность индуцировать выработку ВНА.

Антитела, вырабатываемые против рекомбинантных белков, содержащих ак 452–617 БОРС2, проявляют нейтрализующую активность в отношении различных генотипов ВГЕ, что указывает на то, что эпитоп(ы) перекрестно-нейтрализующих антител находятся в пределах консервативной С-концевой части БОРС2^С [202]. Это позволяет предположить, что вакцины на основе БОРС2 одного генотипа ВГЕ будут эффективны для предотвращения заражения другими генотипами [205,206].

4.1.3 Кандидатные вакцины против гепатита Е

Хотя было описано более четырнадцати кандидатных вакцин против гепатита Е [207], только три из них прошли клинические исследования. р495 (ак 112–608 БОРС2 ГТ1 ВГЕ), рекомбинантный белок массой 56 кДа, формирующий ВПЧ при экспрессии в клетках насекомых, показал хорошую безопасность и эффективность в ходе II фазы клинических исследований в Непале [208]. Кандидатная ВПЧ-содержащая вакцина р179 (ак 439–617 БОРС2 ВГЕ ГТ4), полученная в бактериальной системе экспрессии, была разработана и изучена в I фазе клинических исследований в Китае [198]. Эта кандидатная вакцина показала безопасность и хорошую переносимость, и ее клинические исследования продолжаются в исследованиях II фазы [198].

Единственная коммерчески доступная в настоящее время вакцина против гепатита Е основана на рекомбинантном белке, представляющем собой последовательность ак 368–606 БОРС2 ВГЕ ГТ1, экспрессированную в *E. coli* (HEV-239, Necolin®, Xiamen Inovax Biotech, Китай). HEV 239 лицензирована и доступна в Китае и Пакистане [209] и на настоящий момент не прошла преквалификацию ВОЗ для использования в эндемичных регионах и для купирования вспышек [210]. Иммуногенность вакцины HEV-239 оценивали в серии исследований I, II и III фазы [211,212], в ходе которых она показала длительную (не менее 4,5 лет) защиту от гепатита Е в человеческой популяции с циркулирующим ВГЕ ГТ4 [213]. Длительность детекции поствакцинальных антител была аналогична длительности детекции постинфекционных антител [214]. Информация об эффективности HEV-239 против гепатита Е, вызванного генотипами, отличными от ГТ4, скудна. В III фазе

исследований HEV-239 представлены данные о защите от гепатита E, вызванного ГТ1, что было ожидаемо, поскольку HEV-239 получена на основе БОРС2 ВГЕ ГТ1 [212]. Анализ с моноклональными антителами показал, что у пациентов, получивших вакцину HEV-239, вырабатывались перекрестно нейтрализующие антитела против ВГЕ [210]. Тем не менее, экспериментальные доказательства эффективности HEV-239 против ГТ2 и ГТ3 ВГЕ отсутствуют. Кроме того, была неоднократно показана возможность формирования генотип-специфичных вируснейтрализующих моноклональных антител, а также значительные вариации реактивности антител, вырабатываемых после вакцинации белками, полученными на основе последовательностей различных генотипов ВГЕ человека и животных [215–217].

Отсутствие доступных вакцин против ВГЕ наряду с недостатком данных о способности вакцин защищать от гетерологических генотипов ВГЕ определяют необходимость дальнейших усилий по разработке эффективных универсальных профилактических вакцин против ГЕ.

4.1.4 Лабораторные *in vivo* модели инфекции, вызываемой вирусом гепатита E

Разработка новых вакцин против гепатита E требует наличия адекватных лабораторных животных моделей, позволяющих воспроизводить заражение всеми генотипами вируса, способными вызывать инфекцию у людей. При экспериментальном воспроизведении инфекции предпочтительно соответствие основных этапов развития инфекции у используемого вида животных (путь заражения, органы, в которых происходит репродукция вируса, патогенез, длительность заболевания и т.д.) таковым у человека.

Основными лабораторными животными, используемыми для экспериментального воспроизведения ВГЕ-инфекции в настоящее время, являются яванские макаки (*Macaca fascicularis*) и макаки-резусы (*Macaca mulatta*) [218,219]. Впервые данные о возможности передачи ВГЕ от инфицированного добровольца яванским макакам путем внутривенной инокуляции вирусосодержащего фекального экстракта, были представлены первооткрывателем ВГЕ д.м.н., проф., академиком РАМН М.С. Балаяном в 1983 г. [220]. С тех пор было многократно подтверждено, что как яванские макаки, так и макаки-резусы являются надежными моделями для оценки

эффективности кандидатных вакцин против гепатита E [202,221]. Макаки-резусы также восприимчивы к ГТ1 и ГТ4 ВГЕ [222].

Однако, несмотря на ряд несомненных преимуществ, обе упомянутые модели также имеют определенные недостатки: ВГЕ не циркулирует у яванских макак и макак-резусов в естественной среде обитания, а клинические проявления гепатита E у этих животных ограничены. Также модель макак не воспроизводит хронический гепатит E, наблюдаемый у людей с ослабленным иммунитетом, инфицированных ГТ3 ВГЕ [221]. Кроме того, работа с макаками отличается трудоемкостью и высокой стоимостью, а также часто осложняется наличием у животных сопутствующей патологии, связанной с большой продолжительностью жизни и практической невозможностью содержания крупных колоний в изолированных условиях работы с патогенами [223].

Инфицирование ГТ3 и ГТ4 ВГЕ эффективно воспроизводится на свиньях [224] и кроликах [225], однако невосприимчивость данных видов к наиболее патогенным для человека ГТ1 и ГТ2 является серьезным недостатком [226].

ВГЕ-инфекция была успешно воспроизведена в Институте полиомиелита в 1990-х гг. на усатых тамаринах (*Saguinus mystax*) — мелких приматах из семейства Игрунковые [218,227,228], однако этот вид приматов более не разрешен к использованию в биомедицинских исследованиях.

ОИ имеют ряд преимуществ перед макаками и тамаринами в качестве экспериментальных животных, включая небольшой размер (300–500 г), более низкую стоимость, относительную простоту содержания и разведения в неволе, быструю смену поколений и возможность использовать доступные реагенты, предназначенные для работы с биоматериалом, полученным от человека [13–15,229]. В отличие от большинства других видов приматов, у ОИ часто наблюдается рождение двух или более близнецов [5], что позволяет планировать эксперименты с близнецовым дизайном, значительно повышая сходимость результатов.

Полученные ранее В.Ф. Полещук и соавт. экспериментальные данные по заражению ОИ вирусным материалом, выделенным из фекалий больного в ходе вспышки гепатита E на территории Кыргызской Республики в 1980-х годах, показали, что биохимический профиль инфекции у этих приматов соответствовал картине

острого гепатита E. Первое повышение активности АЛТ и АСТ было зафиксировано на 2-й и 3-й неделях после экспериментального заражения, а второе, более выраженное повышение наблюдалось на 5–7-й неделе. Пиковая активность трансаминаз как минимум в 2 раза превышала верхнюю границу референсного интервала. Экскреция ВГЕ с калом впервые регистрировалась на 7–14-е сутки после заражения и сохранялась в течение 8 нед. РНК ВГЕ в сыворотке не выявлялась на протяжении всего периода наблюдения [230].

Сравнительный анализ показал схожесть течения ВГЕ-инфекции у разных видов обезьян. У ОИ, как и ранее у тамаринов и яванских макаков, инфекция проявлялась повышением активности АЛТ, АСТ и других ферментов, традиционно используемых в качестве маркеров поражения печени при вирусных гепатитах. При этом было показано, что у ОИ ВГЕ-инфекция протекала более тяжело, чем у тамаринов, что проявлялось более высоким уровнем печеночных ферментов в острой фазе. У всех трех видов обезьян наблюдалось более чем двукратное повышение уровня печеночных ферментов в сыворотке крови по сравнению с исходными значениями [227,228,230].

Таким образом, ввиду высокого потенциала применения ОИ для исследований кандидатных вакцинных препаратов против вирусного гепатита E, оценка возможности экспериментального воспроизведения вирусного гепатита E, вызванного различными ГТ ВГЕ, на модели ОИ, представлялась важной научно-практической задачей, однако для подтверждения адекватности модели требовалось детально охарактеризовать инфекционный процесс у ОИ, включая выявление сайтов репродукции вируса.

4.2 Экспериментальное моделирование инфекции, вызываемой вирусом гепатита E, у обыкновенных игрунок

Целью работ, описанных в данном разделе, было экспериментальное воспроизведение ВГЕ-инфекции у ОИ с описанием основных вирусологических и биохимических характеристик гепатита E у данного вида животных, включая сайты репликации вирусного генома.

4.2.1 Методы

Локализацию репликации генома ВГЕ на ранней и поздней стадиях инфекции изучали на двух ОИ (самец и самка), родившихся и постоянно содержавшихся в Лаборатории. Детальные условия содержания ОИ, режим кормления, условия проведения экспериментальных манипуляций, методики идентификации и определения массы и температуры тела, а также методика оценки общего состояния животных в ходе эксперимента описаны в Главе 1. ID животных в таблицах соответствуют четырем последним цифрам кода подкожного радиочипа. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (протокол №2 от 6.04.2015 г.).

Изолят ВГЕ, использованный для экспериментального заражения, был выделен от больного во время вспышки гепатита E на территории Кыргызской Республики 1980-х годах [230]. Животных заражали одновременно внутривенно (0,7 мл) и перорально (0,3 мл) стерилизованным фильтрацией 10% фекальным экстрактом, содержащим ВГЕ ГТ1. Образцы крови в объеме 1 мл получали еженедельно в объеме 2 мл шприцем (SFM, Германия) с иглой 27 G из бедренной вены, образцы кала — ежедневно утром перед очисткой поддона клетки.

Наличие РНК ВГЕ в фекалиях определяли методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ). Образцы сыворотки использовали для выявления антител классов IgM и IgG к ВГЕ (анти-ВГЕ), РНК ВГЕ и для измерения уровня биохимических маркеров функции печени (АСТ, АЛТ и лактатдегидрогеназы [ЛДГ]).

Сывороточные анти-ВГЕ классов IgM и IgG определяли с помощью готовых тест-систем для иммуноферментного анализа (Диагностические системы, Нижний

Новгород) ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M и ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G, соответственно, согласно инструкции производителя.

РНК ВГЕ выделяли из образцов осветленных экстрактов фекалий, сывороток и тканей с использованием наборов, предназначенных для выделения нуклеиновых кислот из клинических образцов (набор для выделения ДНК/РНК из сыворотки/плазмы крови, Литех, Россия) согласно инструкции производителя. Полученные образцы РНК исследовали методом ОТ-ПЦР с набором праймеров, разработанных Meng и соавт. [231] и модифицированных д.б.н., проф. К.К. Кюрегяном (Таблица 14). Для выявления плюс-цепей РНК ВГЕ проводили ОТ с внешним обратным праймером; минус-цепь РНК ВГЕ выявляли с помощью внешнего прямого праймера. Полученная после ОТ кДНК (5 мкл) служила матрицей в 1 раунде ПЦР с парой внешних праймеров. Продукт 1-го раунда ПЦР (1 мкл) служил матрицей для 2-го раунда ПЦР. Обе реакции проводили в смеси (25 мкл) следующего состава: 10 мМ Трис-НСl (рН 8,3), 2 мМ MgCl₂, 0,25 мМ каждого дНТФ, 0,1 мкМ каждого праймера и 5 ед. полимеразы Taq. Оба раунда ПЦР проводили по следующему протоколу: денатурация в течение 30 с при 94°C; отжиг праймера 30 сек при 45°C; элонгация 1 мин при 72°C, 35 циклов; и окончательная элонгация в течение 7 мин при 72°C. Учет результата второго раунда ПЦР проводили методом электрофореза 10 мкл продуктов в 2% агарозном геле с этидий бромидом. Длина ампликона, полученного во втором раунде ПЦР, составила 350 п.н.

Таблица 14 — Последовательность праймеров для детекции РНК ВГЕ

Последовательность	Длина, нуклеотидов	Раунд ПЦР	Направление	Расположение в геноме ВГЕ*
5'-ATGCMCAGTACCGGGTTG-3'	18	первый	прямой	5691–5708
5'-ATCCTGCTGAGCATTCTC-3'	18	первый	обратный	6400–6417
5'-TGUTYTGCATACATGGCT-3'	18	второй	прямой	5977–5993
5'-GACGAAATYAATTCTGTGTC-3'	18	второй	обратный	6302–6319

* — нумерация в соответствии с последовательностью генома ВГЕ штамма Бирма (GenBank M73218).

Одно животное было подвергнуто эвтаназии через 1 неделю после заражения, а второе — через 6 недель. В ходе аутопсии были получены образцы эпителия тонкой, подвздошной и толстой кишки, брыжеечных лимфатических узлов, селезенки и печени (правой и левой долей), желчного пузыря и желчи. Все образцы тканей, сыворотки и кала были протестированы на наличие плюс- и минус-цепей РНК ВГЕ.

Наличие частиц ВГЕ оценивали с помощью электронной микроскопии во всех образцах тканей. Электронная микроскопия была проведена д.м.н., проф. И.А. Морозовым в ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита). Образцы тканей фиксировали в 4% (масса/объем) растворе параформальдегида (CDH, Индия) на растворе Хенкса (рН 7,3; ПанЭко, Россия), постфиксировали в 1% растворе тетраоксида осмия (AppliChem, Германия) на растворе Хенкса (ПанЭко), и, после обезвоживания в ацетоне восходящей концентрации, заключали в смесь эпоксидных смол Эпон-Аралдит (Serva, Германия). Ультратонкие срезы тканей получали с помощью ультрамикротомы LKB 8810A (LKB Bromma, Швеция), и, после контрастирования уранилацетатом и цитратом свинца (EMS, США), изучали в электронном микроскопе JEM-100C (Jeol, Япония).

4.2.2 Результаты

В ходе описываемого в данном разделе эксперимента были подтверждены результаты ранее проведенной в Лаборатории работы по воспроизведению ВГЕ-инфекции у ОИ [230]: экскреция ВГЕ с фекалиями впервые была выявлена на 7–14 день после заражения у обоих животных и сопровождалась повышением уровня биохимических маркеров поражения печени в крови. У животного, наблюдавшегося в течение более длительного периода, выявлено второе повышение уровня АСТ, АЛТ и ЛДГ на 6 неделе после заражения (Рисунок 23). Кривая, отражающая изменение уровня ЛДГ в ходе инфекции, практически полностью повторяла кривую изменения уровня АЛТ, являющейся основным маркером поражения печени при вирусных гепатитах, что позволяет предположить, что определение уровня ЛДГ может служить дополнительным тестом для диагностики острого гепатита у ОИ после экспериментального заражения.

Анти-ВГЕ (IgM и IgG) после заражения были обнаружены у обоих животных.

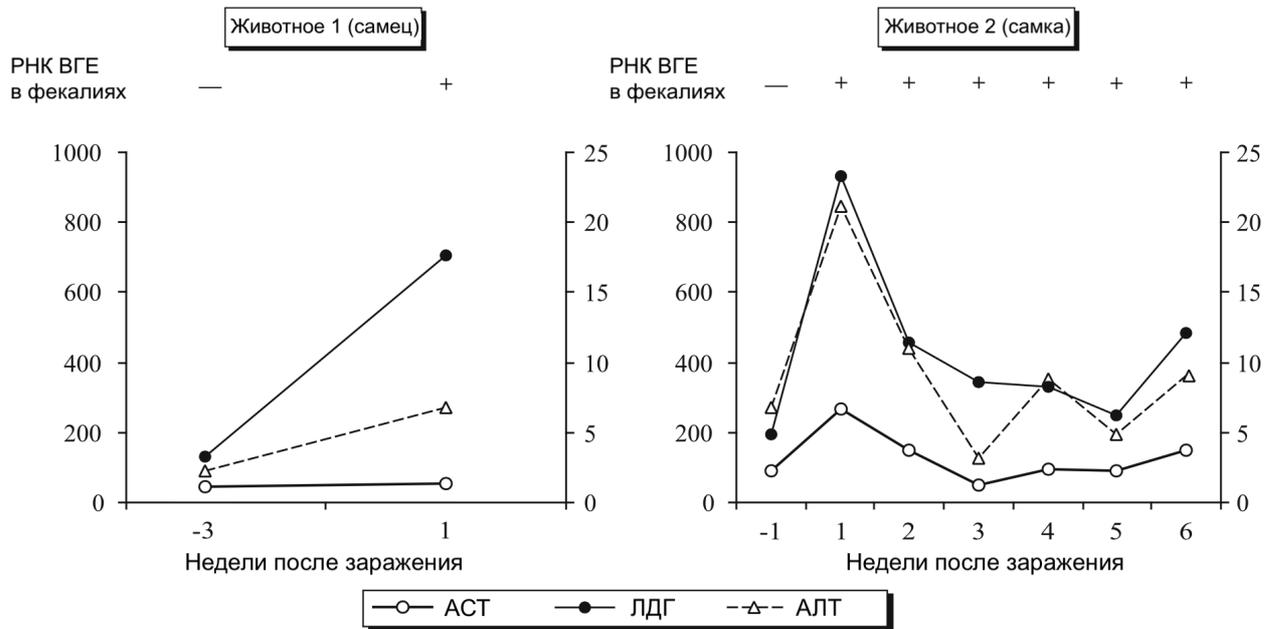


Рисунок 23 — Характеристики инфекции, вызываемой вирусом гепатита E генотипа 1, у обыкновенных игрунок. Ордината слева — уровень лактатдегидрогеназы (ЛДГ, Ед./л), уровень аспаратаминотрансферазы (АСТ, ед./л); ордината справа — уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ, ед./л)

Основной задачей данного эксперимента было выявление сайтов репликации генома ВГЕ на ранних и поздних стадиях инфекции у ОИ. В большинстве сообщений об экспериментальном инфицировании животных ВГЕ было установлено, что печень является основным органом, в котором происходит репродукция ВГЕ [232,233], однако в связи с опубликованными сообщениями о возможности репродукции ВГЕ в эпителии тонкой кишки при экспериментальном заражении свиней, было принято решение о поиске внепеченочных сайтов репродукции ВГЕ у ОИ [234].

В данном исследовании плюс-цепь РНК ВГЕ ГТ1 была обнаружена в ткани печени и желчного пузыря, а также в желчи и фекалиях экспериментально инфицированных ОИ, тогда как минус-цепь РНК ВГЕ, указывающая на репликацию генома ВГЕ, была обнаружена только в печени (Таблица 15).

Результаты выявления плюс-цепи и минус-цепи РНК ВГЕ совпали для ранней (через неделю после заражения, на следующий день после обнаружения РНК ВГЕ в фекалиях) и поздней фазы инфекции (через 6 недель после выделения вирусной РНК с фекалиями). Интересно, что в данном эксперименте РНК ВГЕ обнаруживалась в фекалиях обоих животных через 1–2 дня после заражения, после чего исчезала и

повторно обнаруживалась только через 1 неделю после заражения. Этот факт, по-видимому, связан с прохождением инокулята вируса через кишечник, так как 30% материала при заражении вводили перорально.

Таблица 15 — Выявление плюс-цепи и минус-цепи РНК ВГЕ в образцах тканей обыкновенных игрунок, полученных после экспериментального заражения вирусом гепатита Е генотипа 1

Источник образца	1 неделя после экспериментального заражения		6 недель после экспериментального заражения	
	Плюс-цепь РНК ВГЕ	Минус-цепь РНК ВГЕ	Плюс-цепь РНК ВГЕ	Минус-цепь РНК ВГЕ
Тощая кишка (эпителий)	–	–	–	–
Подвздошная кишка (эпителий)	–	–	–	–
Подвздошная кишка (Пейерова бляшка)	–	–	–	–
Ободочная кишка (эпителий)	–	–	–	–
Брыжеечные лимфатические узлы	–	–	–	–
Селезенка	–	–	–	–
Печень (правая доля)	+	+	+	+
Печень (левая доля)	+	+	+	+
Желчный пузырь (стенка)	+	–	+	–
Желчь	+	–	+	–
Фекалии	+	–	+	–

Вирусные частицы ВГЕ были обнаружены с помощью электронной микроскопии только в гепатоцитах (Рисунок 24), что свидетельствует о том, что репродукция ВГЕ происходила только в печеночной ткани как в начале инфекции, так и на поздних ее стадиях. Экстраполяция результатов данного эксперимента на естественное течение гепатита Е имеет одно ограничение: значительная часть вируса вводилась парентерально, то есть вирус мог попасть в печень непосредственно с кровью, минуя кишечник. Тем не менее, выделение ВГЕ с фекалиями на 1–2-й день после заражения подтвердило прохождение вируса через кишечник.

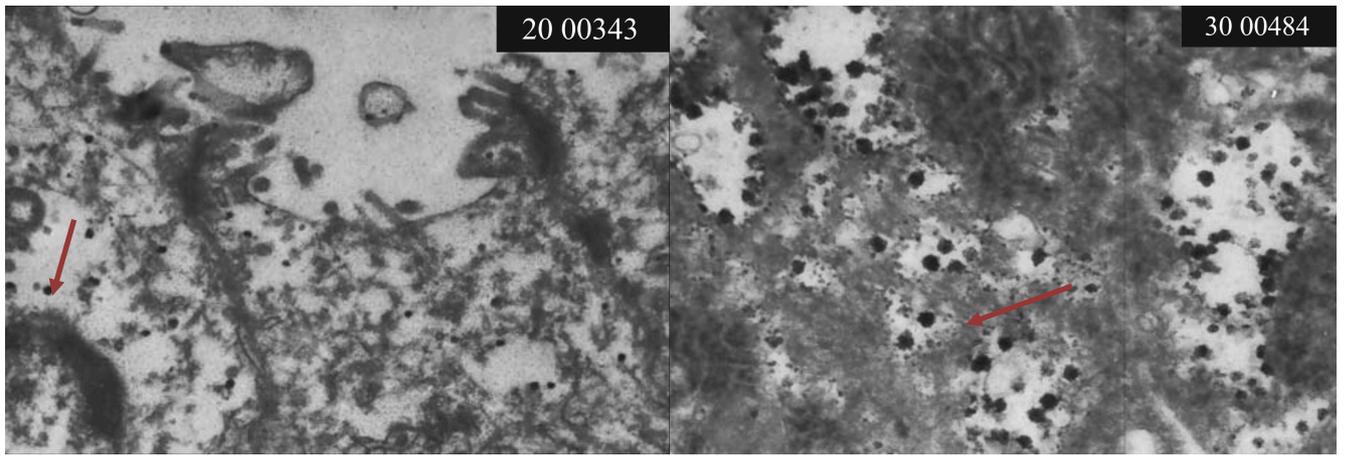


Рисунок 24 — Вирусные частицы ВГЕ (стрелка) в гепатоцитах экспериментально зараженных обыкновенных игрунок. Увеличение 20 тыс. (слева) и 30 тыс. (справа)

Полученные в данном разделе результаты свидетельствуют о том, что печень является преобладающим сайтом репродукции ВГЕ при экспериментальном заражении ОИ, в то время как предполагаемая репродукция в тканях кишечника не подтвердилась. Факт того, что эти данные получены на приматной модели, позволяет предположить, что репродукция ВГЕ у людей также происходит только в ткани печени.

Кроме того, полученные данные позволили подтвердить, что ОИ являются адекватной лабораторной моделью для экспериментального воспроизведения ВГЕ-инфекции, что позволило перейти к исследованиям кандидатного вакцинного препарата против вирусного гепатита Е, описанным в следующем разделе.

4.3 Оценка специфической иммуногенности и протективной активности кандидатного вакцинного препарата против вирусного гепатита E

4.3.1 Методы

4.3.1.1 Дизайн консенсусной последовательности гена *ORC2*

Аминокислотные последовательности ВГЕ ГТЗ, выделенные в России от больных гепатитом E (GenBank: HM446470, JN204462–JN204467, JX912474–JX912477) и от ВГЕ-инфицированных домашних свиней (GenBank: HQ380052–HQ380131, HQ399130–HQ399185, KP144127–KP144144) были выравнены с использованием программного обеспечения MEGA 7.0.18. Консенсусная последовательность гена *ORC2* ВГЕ ГТЗ была получена с использованием программного обеспечения SeqMan Ultra (DNASTAR, Inc., Мэдисон, США).

4.3.1.2 Плазмиды

Дизайн гена бОРС2, а также работы по получению плазмиды были проведены в Лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) под руководством д.б.н., проф. К.К. Кюрегяна.

Синтетический ген длиной 1683 п.н., кодирующий ак 110–660 бОРС2 (далее обозначаемый p551), был сконструирован с использованием индекса адаптации кодонов [235]. Синтетический ген был дополнен N-концевым остатком метионина и 10 остатками гистидина (10xHis) и оптимизирован с использованием стратегии двухслойной оптимизации генов DAPCEL™ RC (редкие кодоны) для редизайна гена с учетом важности редких кодонов и общей кинетики трансляции белка, руководствуясь использованием синонимических кодонов для продукции белка и котрансляционной укладки белка в бактериальных клетках (Darcel Inc., Кливленд, Огайо, США; <https://darcel.com/technology>). Синтетический ген был произведен компанией GeneWiz Inc (Саут-Плейнфилд, Нью-Джерси, США). Последовательность, кодирующая *ORC2*, была клонирована в прокариотический экспрессионный вектор pET3a (Novagen, Мэдисон, США) с использованием рестриктаз BamHI и NdeI (New

England BioLab, США). Наличие ДНК-вставки, кодирующей бОРС2 с N-концевым 10xHis, в полученной плазмиде рЕТ3а-ORF2 было подтверждено рестрикционным анализом и прямым секвенированием. Плазмиду рЕТ3а-ORF2 получали в клетках *E. coli* DH5а, очищали с использованием набора колонок MiniPrep (Аxygen, США) по инструкции производителя и использовали при трансформации клеток *E. coli* BL21 (DE3) (Евроген, Россия) для получения бОРС2.

4.3.1.3 *Использованные изоляты вируса гепатита E*

ВГЕ ГТ1 был выделен из образцов фекалий человека, полученных в Кыргызской Республике в 1993 г. (GenBank MZ028013), а ВГЕ ГТ3 (GenBank MZ028015) — из образцов фекалий свиней, полученных на фермах в Белгородской области в 2016 г. [236]. 0,5 г образцов фекалий гомогенизировали в 10 мл фосфатно-солевого буфера. Гомогенизированные образцы центрифугировали при 5000 g в течение 30 мин, затем супернатанты переносили в стерильные пробирки и снова центрифугировали при 12000 g в течение 30 мин. Образцы экстрактов стерилизовали фильтрацией с использованием стерильного шприцевого фильтра с размером пор 0,22 мкм (Merck Millipore, Германия) и хранили в аликвотах по 1 мл при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ до проведения исследования на наличие РНК ВГЕ.

Генотип ВГЕ в образцах фекальных экстрактов подтверждали путем секвенирования фрагмента ОРС2 длиной 350 п.н., амплифицированного с использованием вырожденных вложенных праймеров, нацеленных на ОРС2 [231].

РНК ВГЕ в фекальных экстрактах определяли количественно с праймерами и зондом TaqMan, описанными Jothikumar и соавт. [237], и набором реагентов для ПЦР с детекцией в реальном времени (Синтол, Москва, Россия). Серийные 10-кратные разведения международного стандарта РНК ВГЕ (1-й Международный стандарт Всемирной организации здравоохранения для амплификационных методов детекции РНК ВГЕ вируса, код PEI 6329/10, Paul-Ehrlich-Institut, Ланген, Германия) с концентрацией от 10 до 10^5 МЕ/мл использовали для построения калибровочной кривой. РНК выделяли из образцов инокулята и разведений стандарта с использованием набора QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) и подвергали обратной транскрипции со случайными гексамерными праймерами с

использованием набора для синтеза первой цепи кДНК (Силекс, Россия). ПЦР с детекцией в реальном времени проводили на анализаторе TaqMan48 (Roche, Германия) при следующих условиях: 45 циклов денатурации при 95°C (10 с) и отжига при 55 °С (20 с). После количественного определения РНК фекальные экстракты, содержащие ВГЕ ГТ1 ГТ3, разводили стерильным фосфатно-солевым буфером до конечной концентрации 10⁵ МЕ/мл.

4.3.1.4 Получение и очистка рекомбинантного белка

Получение и очистку белка р551 проводила сотрудница Лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) к.б.н. А.С. Житкевич под руководством автора.

Клетки *E. coli* (DE3) (Евроген, Россия) трансформировали плазмидой рЕТ3а-ORF2 по стандартному протоколу [238]. Одну колонию инокулировали в среду LB (1% бакто-триптон, 0,5% бакто-дрожжевой экстракт, 1% NaCl) (Servicebio, КНР) с добавлением ампициллина (50 мкг/мл) и 10% (масса/объем) глюкозы и инкубировали при 37 °С при встряхивании со скоростью 180 об/мин в течение ночи. Затем клетки переносили в свежую среду LB с ампициллином (50 мкг/мл) и выращивали до 0,4–0,8 OD600. Экспрессию индуцировали добавлением 1 mM ИПТГ, после чего клетки инкубировали в течение 4 часов при 37 °С и встряхивании при 180 об/мин. В качестве отрицательного контроля использовали не индуцированную бактериальную суспензию. Бактериальные осадки последовательно ресуспендировали в лизисных буферах А (50 mM Трис-НСl, pH 8,0; 0,2 M NaCl, 2% Тритон X-100, 1 mM ЭДТА), Б (50 mM Трис-НСl, pH 8,0; 0,2 M NaCl, 2 M мочевины) и С (50 mM Tris-НСl pH 8,0; 0,5 M NaCl, 8 M мочевины). В каждом буфере клетки обрабатывали ультразвуком 10 раз по 5 сек. с импульсами длительностью 7 мс на льду с использованием ультразвукового гомогенизатора Soniprep 150 (MSE, Франция), а затем центрифугировали в течение 30 мин. при ускорении 15000 g и температуре 4 °С. После обработки буфером С, обработки ультразвуком и центрифугирования супернатант собирали и использовали для очистки белка с использованием 1 мл Ni-NTA агарозы (Jena Bioscience, Йена, Германия) на 1 л клеточной культуры. Смесь образца и агарозы осторожно

перемешивали при 4 °С в течение ночи на шейкере (Biosan, Латвия), чтобы обеспечить связывание белка в присутствии 5 мМ имидазола, блокируя неспецифическое связывание. Суспензию белок/Ni-NTA-агароза переносили на колонку и затем промывали 10 объемами промывочного буфера (20 мМ трис-НСl pH 8,0; 0,5 М NaCl; 20 мМ имидазола; 1 мМ β-меркаптоэтанола; 6 М мочевины, H₂O) и 10 объемами каждого из трех рефолдинговых буферов, содержащих уменьшающуюся концентрацию мочевины (20 мМ трис-НСl, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазола, 1 мМ β-меркаптоэтанола, pH 8,0, и 4 М, 2 М и 0 М мочевины, соответственно). После промывок целевой белок элюировали добавлением 5 объемов элюирующего буфера (20 мМ трис-НСl, 0,5 М NaCl, 300 мМ имидазола, 1 мМ 2-меркаптоэтанола, pH 8,0). Собирали фракции по 250–300 мкл. Перед использованием для очистки меченых гистидином белков ко всем буферам добавляли смесь ингибиторов протеаз (P8849, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США). Наличие рекомбинантного белка р551 во фракциях оценивали электрофорезом в 10% SDS-ПААГ с последующим окрашиванием геля Кумасси R-250. Белок, элюированный с Ni-NTA агарозы, подвергали диализу в диализном мешке 12 кДа против 2 л фосфатно-солевого буфера (42 мМ NaH₂PO₄, 14 мМ Na₂HPO₄, 0,5 М NaCl, pH 8,0) в течение ночи при 37°С и концентрировали в течение 30 минут на фильтре Amicon® Ultra-15 (UFC9100, Millipore, США). Полученный белок анализировали электрофорезом в 10% SDS-ПААГ и вестерн-блоттингом с использованием антител Anti-6X His tag® с пероксидазой хрена (GT359, ab184607, Abcam, Великобритания).

4.3.1.5 Анализ в SDS-ПААГ и вестерн-блоттинг

Образцы белка смешивали с 2X буфером Лэммли (0,0625 М трис-НСl pH 6,8; 2% SDS, 10% глицерин, 0,05% бромфеноловый синий, 1% β-меркаптоэтанол), инкубировали в течение 10 мин при 95 °С и разделяли электрофорезом в 10% SDS-ПААГ, а затем окрашивали Кумасси R-250 (1.12553, Sigma-Aldrich, США). Для вестерн-блоттинга белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond ECL (GERPN82D, США) с использованием камеры Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). Мембрану блокировали в течение ночи при 4 °С в фосфатно-солевом буфере с твином (80 мМ Na₂HPO₄, 20 мМ NaH₂PO₄, 100 мМ NaCl, 0,1% Tween-20), содержащем 5%

обезжиренного молока, и инкубировали с Анти-6X His.tag антителами [GT359], конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1:10000 в течение 1 часа при комнатной температуре при постоянном встряхивании. Мембрану проявляли с использованием хемилюминесцентного реагента ECL (RPN2232, Cytiva, США) и пленки CL-XPosure Films (34089, Thermo Fisher Scientific, США). Пленку сканировали и обрабатывали с использованием программного обеспечения ImageJ (Research Services Branch (NIH), США) и Photoshop 2017 (Adobe, США).

4.3.1.6 Просвечивающая электронная микроскопия

Концентрированные ВПЧ адсорбировали в течение 5 мин на медных сетках, покрытых углеродом/формваром (Formvar/Carbon 200 Mesh, углерод 3-4 нм). Затем сетки семь раз промывали 1 М ЭДТА с последующим окрашиванием 2% уранилацетатом в течение 2 мин, сушили на воздухе и исследовали в просвечивающем электронном микроскопе JEM-100C (Jeol, Япония). Размер полученных частиц определяли с помощью программного обеспечения BioVision 4.0 (West Medica, Австрия).

4.3.1.7 Лабораторные животные

В исследование были включены три пары близнецов ОИ, родившихся и постоянно содержавшихся в Лаборатории: 4 самца и 2 самки, в возрасте от 1,5 до 2,5 лет, массой 320–370 граммов. Близнецы были распределены в исследовательские группы в соответствии с близнецовым дизайном исследования. Детальные условия содержания ОИ, режим кормления, условия проведения экспериментальных манипуляций, методика идентификации животных, методика проведения биохимического анализа крови, а также методика оценки общего состояния животных в ходе эксперимента описаны в Главе 1. ID животных в таблицах соответствуют четырем последним цифрам кода подкожного радиочипа.

Для заражения ВГЕ и в течение следующих 9 недель животных помещали в индивидуальные клетки со спальными домиками. Поведенческое обогащение достигалось изменением расположения пищи в клетке и усложнением доступа к ней в соответствии с разработанной в лаборатории циклической схемой, а также

изменением расположения компонентов обогащения внутри клетки. Мочу и фекалии удаляли ежедневно путем замены поддонов. Животные получали воду и специально разработанный корм для ОИ *ad libitum*. Все манипуляции с ОИ проводили в отдельном помещении без звукового и визуального контакта с другими животными.

Все экспериментальные процедуры с животными проводились диссертантом лично. Все манипуляции на протяжении исследования не были болезненными и не требовали анестезии.

Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) (протокол №8 от 20.04.2016).

4.3.1.8 Иммунизация, заражение и последующие процедуры

Четырем животным из опытной группы внутримышечно вводили 20 мкг антигена р551, сорбированного на гидроокиси алюминия в качестве адъюванта (0,5 мг/мл; Химснаб-СПб, Россия) в стерильном фосфатно-солевом буфере в общем объеме 500 мкл. Полученный препарат вводили в переднюю поверхность бедра на 0, 3 и 7 неделе. Бустерную дозу того же препарата вводили через 19 недель после введения первой дозы. Контрольным животным вводили смесь фосфатно-солевого буфера с адъювантом в том же объеме в те же дни.

На 27-й неделе после введения первой дозы препарата всем ОИ внутривенно вводили 1 мл суспензии ВГЕ ГТ1 или ВГЕ ГТ3, содержащей 10^5 МЕ/мл РНК ВГЕ (Таблица 16).

Образцы крови животных получали из бедренной вены перед введением каждой дозы препарата и еженедельно в течение первых 9 недель после заражения. В сыворотке контролировали уровни АЛТ, АСТ, ЛДГ, общего билирубина, анти-ВГЕ IgG и РНК ВГЕ. Дополнительные образцы крови были получены на 151 неделе после введения первой дозы вакцины — в сыворотке определяли наличие анти-ВГЕ IgG.

Фекалии собирали ежедневно и оценивали на наличие РНК ВГЕ с 1-го по 56-й день после экспериментального заражения.

Таблица 16 — Обыкновенные игрушки, получившие белок p551 ВГЕ ГТ3 ОРС2 с адьювантом или только адьювант и зараженные ВГЕ гомологического ГТ3 или гетерологического ГТ1

ИН	ID	Пол	Иммунизация				Заражение, неделя 27
			№1, неделя 0	№2, неделя 3	№3, неделя 7	№4, неделя 19	
ОИ1 ^α	4519	самец	p551/ адьювант	p551/ адьювант	p551/ адьювант	p551/ адьювант	ВГЕ ГТ1
ОИ2 ^β	4537	самка	p551/ адьювант	p551/ адьювант	p551/ адьювант	p551/ адьювант	ВГЕ ГТ1
ОИ3 ^α	3018	самец	p551/ адьювант	p551/ адьювант	p551/ адьювант	p551/ адьювант	ВГЕ ГТ3
ОИ4 ^γ	4516	самка	p551/ адьювант	p551/ адьювант	p551/ адьювант	p551/ адьювант	ВГЕ ГТ3
ОИ5 ^β	3020	самец	адьювант	адьювант	адьювант	адьювант	ВГЕ ГТ1
ОИ6 ^γ	3019	самец	адьювант	адьювант	адьювант	адьювант	ВГЕ ГТ3

α, β, γ — животные, промаркированные одинаковой буквой — близнецы.

4.3.1.9 Выявление РНК ВГЕ

РНК выделяли из всех образцов фекалий и сыворотки ОИ с использованием наборов QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, Германия). Выделенную тотальную РНК анализировали на наличие РНК ВГЕ методом ОТ-ПЦР с вырожденными вложенными праймерами, нацеленными на область ОРС2 [231]. Обратную транскрипцию выполняли с использованием внешнего обратного праймера с использованием набора для синтеза первой цепи кДНК (Силекс, Россия). ПЦР проводили в соответствии с протоколом [231], используя x5 PCR Mastermix TaqMM+Mg (Силекс). Чувствительность ОТ-ПЦР составила 125 МЕ/мл [239].

Для определения генотипа ВГЕ амплифицированные фрагменты генома ВГЕ вырезали из агарозного геля и выделяли нуклеиновые кислоты с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Germany) в соответствии с протоколом производителя. Первичную последовательность нуклеотидов определяли на автоматическом секвенаторе 3130 Genetic Analyzer (ABI, США) с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit в соответствии с протоколом производителя. Полученные последовательности выравнивали с помощью MEGA

7.0.18 [240]. Генотип вируса определяли с помощью филогенетического анализа, выполненного для 300-нуклеотидных последовательностей участка ORC2 ВГЕ (соответствует нуклеотидным позициям 5996–6295, нумерация по штамму M73218) с эталонными последовательностями [241].

4.3.1.10 Определение анти-ВГЕ IgG в иммуноферментном анализе

Сыворотки, полученные на 0, 3, 7, 12, 19, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33 и 151 неделе после введения первой дозы кандидатного препарата, делили на аликвоты, хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ и тестировали на наличие анти-ВГЕ IgG в конце эксперимента одновременно с использованием набора ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G (E-151/1.1, Диагностические системы, Россия).

Сыворотки наносили на планшет в серийных двукратных разведениях в буфере для разведения сывороток из набора в диапазоне разведений от 1:10 до 1:10000. ИФА проводили в соответствии с протоколом производителя, за исключением использования видоспецифичных вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена (A2054, Sigma-Aldrich, США) в разведении 1:10000. Поскольку эталонный препарат ВОЗ для анти-ВГЕ (NIBSC 95/584) основан на человеческой сыворотке и не может использоваться в качестве калибратора из-за видоспецифического характера вторичных антител, уровни анти-ВГЕ IgG выражали в виде титров в ИФА. Оптическую плотность в лунках измеряли с помощью планшетного фотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм. Пороговое значение оптической плотности для положительных образцов было установлено на уровне 0,242 на основании протокола производителя.

4.3.1.11 Статистический анализ

Статистическая оценка значимости межгрупповых различий изучаемых показателей была выполнена в программном обеспечении GraphPad Prism 9 (версия 9.1.1) с помощью двухфакторного дисперсионного анализа (2-way ANOVA) для АСТ, ЛДГ и билирубина и модели смешанных эффектов для АЛТ по причине отсутствия двух точек данных. Различия считались значимыми при скорректированном значении $P < 0,05$.

4.3.2 Результаты

4.3.2.1 Консенсусная аминокислотная последовательность ОРС2 ВГЕ ГТ3 и дизайн иммуногена для кандидатного вакцинного препарата

Аминокислотные последовательности ОРС2 ВГЕ генотипа 3, выделенные на территории Российской Федерации (GenBank: NM446470, JN204462–JN204467, JX912474–JX912477, HQ380052–HQ380131, HQ399130–HQ399185, KP144127–KP144144) были выровнены, и была создана консенсусная последовательность, охватывающая положения аминокислот 284–615 белка ОРС2 ВГЕ [6]. Вирусная популяция была однородной, 88,2% аминокислотных позиций были консервативны. Часть позиций в рамках консенсуса (39/332; 11,8%) продемонстрировали вариабельность; 69% (27/39) из них были одиночными аминокислотными заменами, обнаруженными в геноме отдельных вирусных изолятов в аминокислотных позициях бОРС2 с 284 по 615. Сравнение консенсусной последовательности ОРС2 и эталонной последовательности ВГЕ ГТ3 с последовательностью ВГЕ ГТ1 (Бирма) выявило характерные замены в одиннадцати аминокислотных позициях (L284P, S324T, T354N, S357G, I364V, G490N(Asp), V492M, S497T, T517S, S527T, V571I; Рисунок 25). Все эти замены были сохранены в консенсусной последовательности бОРС2. N-концевые вариабельные 109 ак, содержащие лидерную последовательность и РНК-связывающий домен ОРС2, не нужные для образования ВПЧ, были удалены, и N-концевая область белка была заменена остатком метионина с добавлением 10xHis для дальнейшей очистки белка (Рисунок 25). Нуклеотидная последовательность с оптимизированной экспрессией, кодирующая полученный р551 (Рисунок 25), была депонирована в GenBank под номером MW799825. Соответствующий ген р551 был синтезирован и клонирован в экспрессионный вектор рЕТ3а для получения плазмиды рЕТ3а-ORF2.

	1		99
Species/Abbrv			
1. 1a_M73218_Burma	MRFRPILLLLLLMLFPLPAPPQPSERRRGRSSGGGFWGDRVDSQPFAPYIHPITNPFAPDVVAAAAGAPRVRQPARPLGSAWRDQAQRPAVASR		
2. 3a_AF082843_HEV-3	MRFRVAVLLLVLLFVLLPAPPAGQPSERRRGRSSGGGFWGDRVDSQPFALPYIHPITNPFAPDVVAAAAGAPRVRQPARPLGSAWRDQSQRPSTASR		
3. p551	M-----		
4. Russian_HEV_g3_consensus	-----		
	100		199
Species/Abbrv			
1. 1a_M73218_Burma	RRRPTTACAAPLTAVAPAHDTTPVVDVDSRGAILRRQYNLSTSLTSSVAITGNLVLYAAPLSPLLPLQDGTNTHIMATEASNYAYRVARAIRYRPLVP		
2. 3a_AF082843_HEV-3	RRSAPAACAAPLTAVPAPDTAPVVDVDSRGAILRRQYNLSTSLTSSVAAGTNLVLYAAPLSPLLPLQDGTNTHIMATEASNYAYRVRVRAIRYRPLVP		
3. p551	HHHHHHHHHLLTAVAPAPDTAPVVDVDSRGAILRRQYNLSTSLTSTIATGNLVLYAAPLSPLLPLQDGTNTHIMATEASNYAYRVRVRAIRYRPLVP		
4. Russian_HEV_g3_consensus	-----		
	200		299
Species/Abbrv			
1. 1a_M73218_Burma	NAVGGYAIISIFWQTTTTPTSVDMNSITSDVRLVQPIASSELVIPSERLHYRNQGRSVETSQVAEEAATSGLVMLCIHGSLVNSYTNTPYTGALGL		
2. 3a_AF082843_HEV-3	NAVGGYAIISIFWQTTTTPTSVDMNSITSDVRLVQPIASSELVIPSERLHYRNQGRSVETSQVAEEAATSGLVMLCIHGSPVNSYTNTPYTGALGL		
3. p551	NAVGGYAIISIFWQTTTTPTSVDMNSITSDVRLVQPIASSELVIPSERLHYRNQGRSVETSQVAEEAATSGLVMLCIHGSPVNSYTNTPYTGALGL		
4. Russian_HEV_g3_consensus	-----		
	300		399
Species/Abbrv			
1. 1a_M73218_Burma	LDFALELEFRNLTPGNTNTRVSRYSSTARHRLRRGADGTAELTTTAAFRFMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALTLFNLAADLLGGLPTELISAGGLFYSR		
2. 3a_AF082843_HEV-3	LDFALELEFRNLTPGNTNTRVSRYSSTARHRLRRGADGTAELTTTAAFRFMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALTLFNLAADLLGGLPTELISAGGLFYSR		
3. p551	LDFALELEFRNLTPGNTNTRVSRYSSTARHRLRRGADGTAELTTTAAFRFMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALTLFNLAADLLGGLPTELISAGGLFYSR		
4. Russian_HEV_g3_consensus	LDFALELEFRNLTPGNTNTRVSRYSSTARHRLRRGADGTAELTTTAAFRFMKDLHFTGTNGVGEVGRGIALTLFNLAADLLGGLPTELISAGGLFYSR		
	400		499
Species/Abbrv			
1. 1a_M73218_Burma	PVVSANGEPVTKLYTSVENAQDQKGIATPHIDLDGSRVVIQYDQHEQDRPTSPAPSRFFSVLRANDVLLSLTAAEYDQTTYGSSTNPMYVSDVIT		
2. 3a_AF082843_HEV-3	PVVSANGEPVTKLYTSVENAQDQKGIATPHIDLDGSRVVIQYDQHEQDRPTSPAPSRFFSVLRANDVLLSLTAAEYDQTTYGSSTNPMYVSDVIT		
3. p551	PVVSANGEPVTKLYTSVENAQDQKGIATPHIDLDGSRVVIQYDQHEQDRPTSPAPSRFFSVLRANDVLLSLTAAEYDQTTYGSSTNPMYVSDVIT		
4. Russian_HEV_g3_consensus	PVVSANGEPVTKLYTSVENAQDQKGIATPHIDLDGSRVVIQYDQHEQDRPTSPAPSRFFSVLRANDVLLSLTAAEYDQTTYGSSTNPMYVSDVIT		
	500		599
Species/Abbrv			
1. 1a_M73218_Burma	LVNVATGCAQAVARSLDWSKVL DGRPLTTIQQYSKTFYVLP LRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQILLENAAAGHRVAISTYITSLGAPVSAVAVG		
2. 3a_AF082843_HEV-3	LVNVATGCAQAVARSLDWSKVL DGRPLTTIQQYSKTFYVLP LRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQILLENAAAGHRVAISTYITSLGAPVSAVAVG		
3. p551	FVNVATGCAQAVARSLDWSKVL DGRPLTTIQQYSKTFYVLP LRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQILLENAAAGHRVAISTYITSLGAPVSAVAVG		
4. Russian_HEV_g3_consensus	FVNVATGCAQAVARSLDWSKVL DGRPLTTIQQYSKTFYVLP LRGKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQILLENAAAGHRVAISTYITSLGAPVSAVAVG		
	600		661
Species/Abbrv			
1. 1a_M73218_Burma	VLA PHSALALLEDTLVYPARAHTFD DFCPECRPLGLQGCAFOSTVAELQLR LKMKVKKTRES*		
2. 3a_AF082843_HEV-3	VLA PHSALAVLEDTLVYPARAHTFD DFCPECRPLGLQGCAFOSTVAELQLR LKMKVKKTRES*		
3. p551	VLA PHSALALLEDTLVYPARAHTFD DFCPECRNLGLQGCAFOSTVAELQLR LKMKVKKTRES*		
4. Russian_HEV_g3_consensus	VLA PHSALAALEDTLV-----		

Рисунок 25 — Выравнивание эталонных штаммов ВГЕ ГТ1 (Бирма) и ВГЕ ГТ3 (HEV-3), консенсусной аминокислотной последовательности OPC2 на основе российской последовательности ВГЕ ГТ3 (Russian_HEV_g3_consensus) и аминокислотной последовательности иммуногена, полученного в ходе данной работы (белок p551)

4.3.2.2 Получение и очистка рекомбинантного бОPC2 p551

Клетки *E. coli* BL21 (DE3) трансформировали плазмидой pET3a-ORF2. Синтез белка индуцировали изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозидом (ИПТГ), целевой белок получали и очищали с помощью Ni^{2+} -хелатной аффинной хроматографии с последующим рефолдингом с использованием линейного градиента мочевины 6–0 М. Фракции анализировали с помощью SDS-ПААГ с окрашиванием Кумасси R-250. Было обнаружено, что фракции элюции содержат белок с молекулярной массой ≈ 61 кДа, соответствующей ожидаемой молекулярной массе p551 (Рисунок 26А), который окрашивался антителами против His-Tag (Рисунок 26Б).

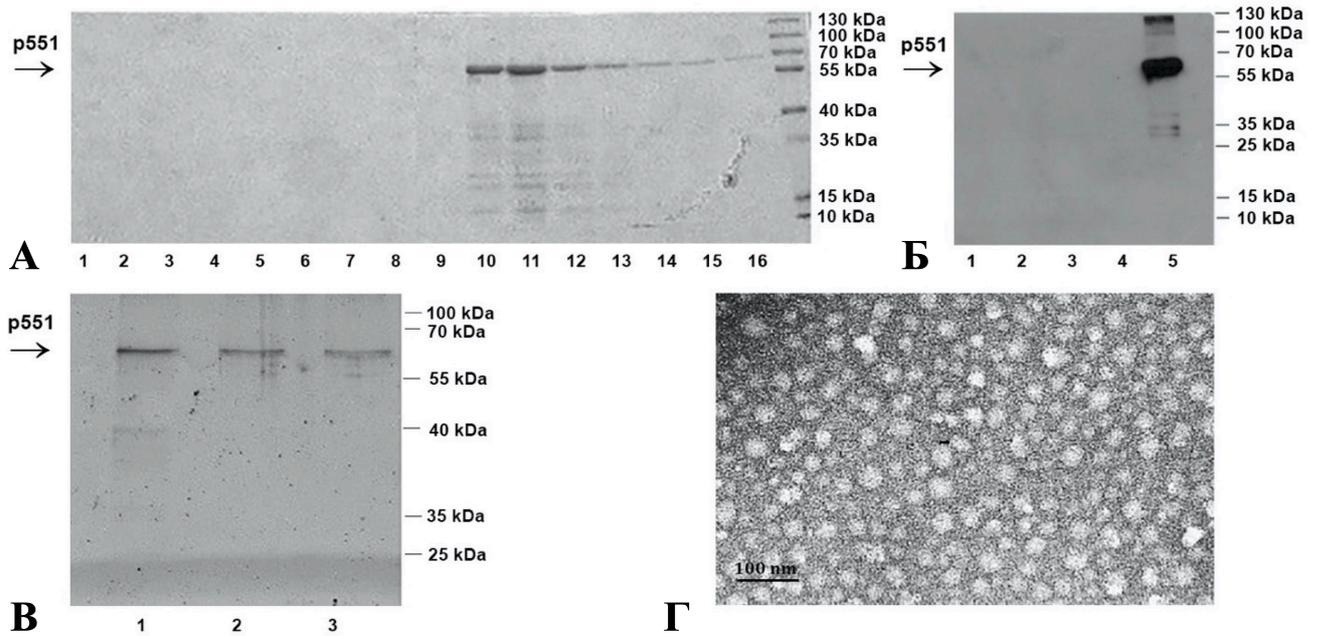


Рисунок 26 — Очистка и характеристика рекомбинантного белка, представляющего консенсусную аминокислотную последовательность позиций 110–660 БОРС2 ВГЕ ГТЗ с остатком метионина и His-Tag на N-конце (Met-(His)₁₀-aa110–660; p551). 10% SDS-ПААГ, окрашенный Кумасси R-250, с фракциями, полученными при очистке p551 с помощью хроматографической очистки на Ni-NTA-агарозе с элюированием в градиенте имидазола: объединенные фракции проскока (дорожка 1), связывания (2), промывки (3), буферы для рефолдинга (4–6), отдельные фракции элюции по 250 мкл (7–16) (А); Вестерн-блоттинг с антителом против His-Tag [GT359], конъюгированным с пероксидазой хрена. Объединенные фракции проскока (дорожка 1), связывания (2), промывки (3), буферы для рефолдинга (4) и объединенные фракции элюции 10–16 (5) (Б); 10% SDS-ПААГ, окрашенный Кумасси R-250, с аликвотами белка p551, хранившегося в течение 6 месяцев при –80 °С (дорожка 1), –20 °С (2) и +4 °С (3) (В); Просвечивающая электронная микрофотография ВПЧ, образованных очищенным белком p551, с окрашиванием уранилацетатом (масштаб: 100 нм, увеличение: x30000) (Г). Цифрами справа обозначено положение маркера молекулярной массы белка (Thermo Scientific, # 26617), а стрелкой слева — положение p551

При хранении белка p551 в фосфатно-солевом буфере при температуре до +4 °С в течение не менее 6 месяцев существенной деградации не наблюдалось (Рисунок 26В). Электронная микроскопия показала, что очищенный p551 после диализа против фосфатно-солевого буфера образовывал ВПЧ (Рисунок 26Г).

4.3.2.3 Оценка специфической иммуногенности и протективной активности p551 на модели обыкновенных игрунок

Иммуногенность и протективную активность ВПЧ, образованных р551, оценивали на ОИ. Для этого три пары близнецов ОИ (n=6) были распределены между группами в соответствии с близнецовым дизайном исследования (Таблица 16). Четыре ОИ получили по четыре инъекции р551 с гидроокисью алюминия в качестве адьюванта на 0, 3, 7 и 19 неделе. Два контрольных животных получили препарат плацебо (смесь фосфатно-солевого буфера с адьювантом) в том же объеме в те же дни (Таблица 16). На 27 неделе после введения первой дозы препарата (через 8 недель после последней иммунизации) животным внутривенно вводили ВГЕ ГТ1 или ГТ3 (10^5 МЕ РНК ВГЕ на животное; (Таблица 16).

У всех вакцинированных ОИ к 3-й неделе после введения первой дозы вакцины выработались специфические анти-ВГЕ IgG. СГТ поствакцинальных анти-ВГЕ IgG достигли пикового титра 1:1810 после второй иммунизации (Рисунок 27, Таблица 17). В сыворотках крови контрольных животных анти-ВГЕ IgG отсутствовали до экспериментального заражения (Рисунок 27, Таблица 17).

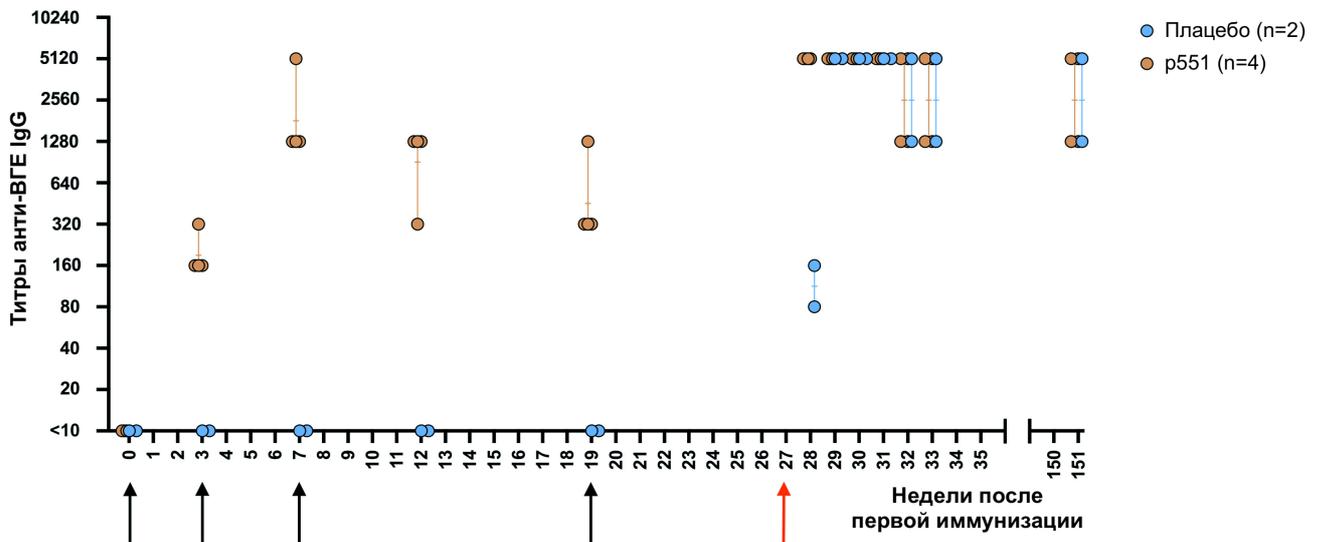


Рисунок 27 — Титры анти-ВГЕ IgG в ИФА в сыворотке ОИ, иммунизированных рекомбинантным белком р551 (n=4) или получивших плацебо (n=2), после иммунизации и заражения ВГЕ. Иммунизации, проведенные на 0, 3, 7 и 19 неделе, обозначены черными стрелками. Экспериментальное заражение обозначено красной стрелкой. Синие круги представляют уровни анти-ВГЕ IgG у животных, получивших плацебо (n=2). Оранжевые круги представляют уровни анти-ВГЕ IgG у животных, получивших р551 (n=4). Горизонтальные линии представляют СГТ

222	32	5	5120	1280	1280	5120	5120	1280
229	33	6	5120	1280	1280	5120	5120	1280
1058	151	124	5120	1280	1280	5120	5120	1280

α , β , γ — животные, промаркированные одинаковой буквой — близнецы. Разведение видоспецифического конъюгата — 1:10 000. ОП крит. = 0,242.

Образцы фекалий всех ОИ собирали ежедневно и анализировали на наличие РНК ВГЕ с помощью ОТ-ПЦР. В фекалиях ОИ 1–4, получивших р551, РНК ВГЕ в течение всего периода наблюдения не выявлялась (Таблица 18). У животных, получивших плацебо, РНК ВГЕ выявлялась в фекалиях на 2–6-й неделе (ОИ5, заражение ВГЕ ГТ1) и на 2–3 неделе после заражения (ОИ6, ВГЕ ГТ3) (Таблица 18). Секвенирование подтвердило, что геномные последовательности ВГЕ, выделенные из фекалий ОИ в контрольной группе, соответствовали вирусам, использованным при экспериментальном заражении (номера GenBank для последовательностей, выделенных из инокулята/фекалий после контрольного заражения: [ОИ5, ВГЕ ГТ1 — MZ028013/MZ028014], [ОИ6, ВГЕ ГТ3 — MZ028015/MZ028016]). В последовательности ORC2 ВГЕ ГТ1, выделенной из фекалий ОИ5 после заражения, наблюдались несколько нуклеотидных замен относительно последовательности ORC2 инокулята вируса, а именно 930C>T, 954T>G, 981T>C, 999T>C, 1005G>A, 1029C>T, 1047C>T, 1056T>C, 1162A>T. Несинонимическая нуклеотидная замена 1162A>T привела к аминокислотной замене I388F. Геномная последовательность ВГЕ ГТ3, выделенная из фекалий ОИ6, не содержала нуклеотидных замен в пределах исследованного фрагмента ORC2.

Согласно результатам ОТ-ПЦР в сыворотке крови ОИ, получивших р551, и в контрольной группе РНК ВГЕ отсутствовала в течение всего периода наблюдения длительностью девять недель.

В ходе иммунизации и после экспериментального заражения ни у одного животного не было обнаружено клинических признаков заболевания, все ОИ имели удовлетворительное общее состояние. Биохимические параметры функции печени (АЛТ, АСТ, ЛДГ и билирубин) в контрольной группе и группе животных, получивших р551, не различались до контрольного заражения (Рисунок 28, Таблица 19).

Таблица 18 — Обнаружение РНК ВГЕ в фекалиях обыкновенных игрунок, получивших кандидатный вакцинный препарат р551 и препарат плацебо

ID животного (иммунизация/челлендж)	Недели* после экспериментального заражения									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
4519 (вакцина/ВГЕ ГТ1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4537 (вакцина/ВГЕ ГТ1)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3018 (вакцина/ВГЕ ГТ3)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4516 (вакцина/ВГЕ ГТ3)	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3020 (плацебо/ВГЕ ГТ1)	–	–	+	+	+	+	+	–	–	–
3019 (плацебо/ВГЕ ГТ3)	–	–	+	+	–	–	–	–	–	–

* — Положительный результат свидетельствует о том, что минимум в одном из образцов, взятых ежедневно в течение соответствующей недели, была обнаружена РНК ВГЕ; отрицательный результат указывает на то, что во всех образцах, полученных ежедневно в течение соответствующей недели, РНК ВГЕ не была обнаружена.

Через 2, 3 и 4 недели после заражения ВГЕ у обоих животных из контрольной группы наблюдалось повышение уровня АЛТ, АСТ и ЛДГ в сыворотке крови (Рисунок 28, Таблица 19). Статистический анализ показал, что уровни АСТ и ЛДГ у ОИ, получавших плацебо, были значительно выше ($p < 0,05$; двухфакторный ANOVA/модель смешанных эффектов), чем у ОИ, получивших р551. Уровни билирубина в сыворотке крови не различались между исследуемыми группами на протяжении всего периода наблюдения (Рисунок 28, Таблица 19).

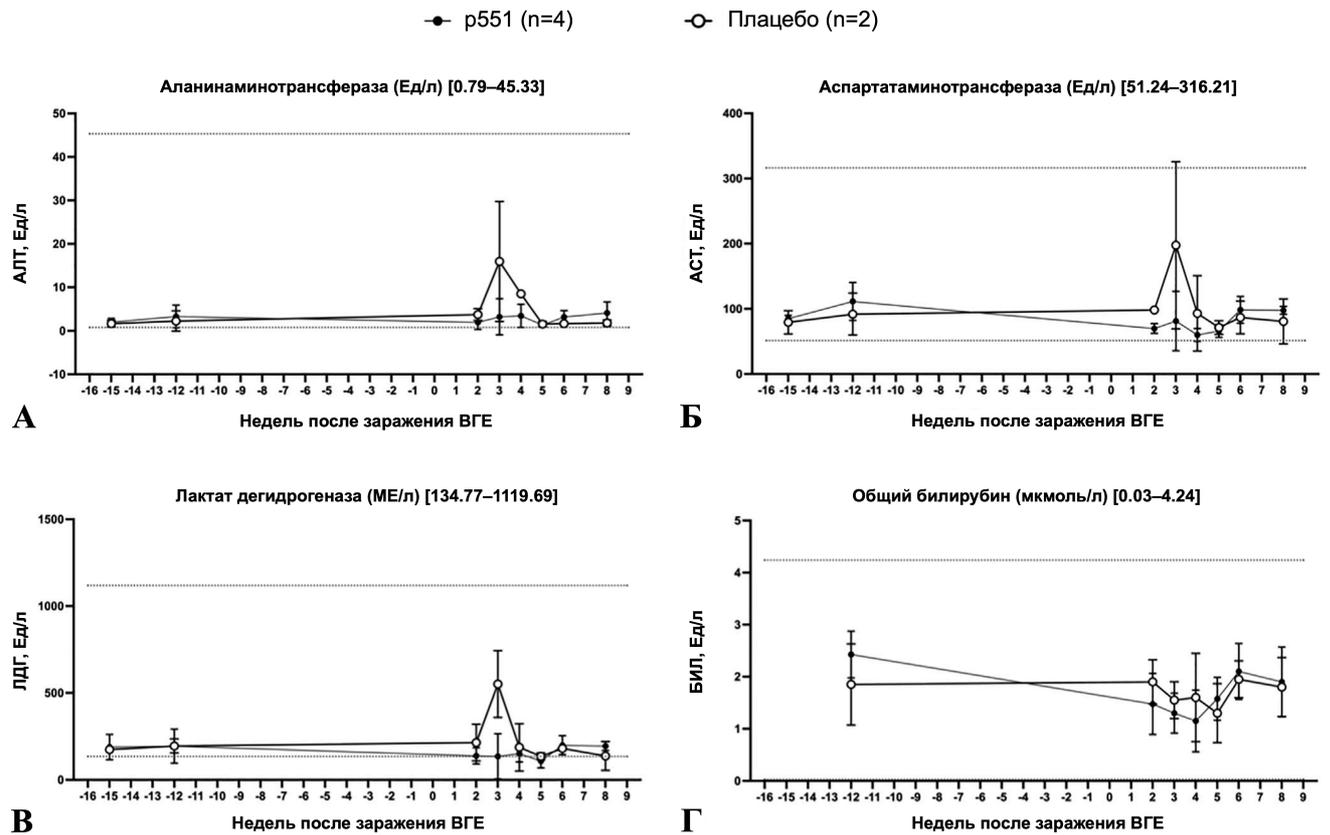


Рисунок 28 — Биохимические показатели сыворотки ОИ, иммунизированных рекомбинантным белком р551 (n=4), и в контрольной группе (n=2) после иммунизации и заражения ВГЕ. Значения аланинаминотрансферазы (А), аспартатаминотрансферазы (В), лактатдегидрогеназы (С) и общего билирубина (D) представлены как среднее \pm стандартное отклонение. Пунктирные линии и значения в квадратных скобках представляют референсные значения для ОИ [33]

4.3.3 Обсуждение

Разработка безопасной и эффективной вакцины против вирусного гепатита Е является важной глобальной задачей. ГТ1 и 2 ВГЕ выделяются от инфицированных людей и вызывают крупные вспышки острой инфекции с фекально-оральным механизмом передачи в Азии, Африке и Латинской Америке [173]. ВГЕ ГТ3 и 4 преимущественно связаны со спорадическими случаями гепатита в странах с умеренным климатом. Однако нами было показано, что ВГЕ ГТ3 может вызывать вспышки с водным путем передачи в эндемичных регионах [242]. Передача ВГЕ ГТ3 и ГТ4 через воду, а также через употребление мяса или субпродуктов дичи в промышленно развитых странах недооценивается, что отражается в различиях в частоте выявления антител к ВГЕ у людей в разных регионах [243].

ВГЕ широко распространен на территории России, при этом наблюдаются значительные региональные различия частоты выявления антител к ВГЕ среди населения: от 2,7% в Новосибирской области до 16,4% в Белгородской области. Показатели частоты выявления анти-ВГЕ IgG у людей значительно возрастают с возрастом: от 1,5% у детей и подростков до 20 лет до 16,7% у людей в возрасте 60 лет и старше. Нами показано, что изоляты вируса, выделенные от людей и животных в России, преимущественно относятся к ГТЗ, при этом данные филогенетического анализа свидетельствуют о циркуляции вируса в свиноводческих хозяйствах и его эпизодической передаче людям [244].

Несмотря на широкую антигенную перекрестную реактивность между генотипами ВГЕ, использование моноклональных антител против укороченных белков, кодируемых ОРС2, полученных из разных штаммов ВГЕ, указывает на существование не только пангенотипических, но и штаммоспецифических эпитопов [245]. Кроме того, существуют значительные различия в реактивности поствакцинальных антител с белками, полученными на основе последовательностей разных генотипов ВГЕ человека и животных [215]. Это указывает на необходимость оценки эффективности вакцин против гепатита Е на основе конкретных генотипов ВГЕ в экспериментах с заражением как гомологическими, так и гетерологическими генотипами ВГЕ. Поскольку ВГЕ ГТЗ является преобладающим генотипом вируса в странах с умеренным климатом, в том числе в России [246], в ходе конструирования иммуногена в данной работе в основу был положен консенсус последовательностей ГТЗ ВГЕ, выделенных в РФ. Благодаря этому полученный рекомбинантный белок ОРС2 потенциально пригоден не только для разработки вакцин для людей, но и в качестве ветеринарной вакцины, направленной на сдерживание циркуляции ВГЕ ГТЗ в популяции свиней.

Ранним этапам исследований ВГЕ мешало отсутствие восприимчивых и перmissive клеточных культур, дающих высокие урожаи вирусных частиц, которые были разработаны только в последние десять лет [247,248]. Из-за невозможности продуцировать достаточное количество вирусных частиц для инактивации, разработка вакцин против гепатита Е с самого начала была сосредоточена на производстве рекомбинантных фрагментов капсидного белка ВГЕ в

различных системах экспрессии [206]. Множество кандидатных вакцинных препаратов на основе бОРС2 оценивали на способность к самосборке, поскольку было показано, что самосборка бОРС2 в ВПЧ значительно увеличивает иммуногенность полученных препаратов [200]. Белки р495 (ак 112–606), р179 (ак 439–617) и р239 (ак 368–606) образуют высокоиммуногенные ВПЧ и были испытаны в клинических исследованиях [198,208,211].

Первая коммерчески доступная вакцина против гепатита Е (HEV-239) была основана на рекомбинантном бОРС2 ВГЕ ГТ1, экспрессированном в *E. coli*. Его иммуногенность в популяции с циркуляцией ВГЕ ГТ1 и 4 оценивали в исследованиях II фазы [211] и фазы III [212]. Другое исследование показало, что вакцина на основе р239 является иммуногенной и хорошо переносится людьми старше 65 лет [249]. В настоящее время проводятся два клинических исследования вакцины HEV-239, в том числе исследование безопасности I фазы в США (NCT03827395) и исследование безопасности и эффективности IV фазы у беременных женщин в Бангладеш (NCT02759991). Было показано, что устойчивость поствакцинального антительного ответа аналогична продолжительности постинфекционного ответа [214], при этом защитный эффект сохраняется в течение не менее 4,5 лет после вакцинации [213]. Препарат HEV-239 недоступен в большинстве стран мира, что требует разработки альтернативных вакцин против ГЕ.

В данном разделе диссертации описана экспрессия в *E. coli* участка бОРС2 ВГЕ ГТ3 с 110 по 660 ак (р551), который, как было показано ранее, способен к самосборке в ВПЧ при экспрессии в клетках насекомых [250]. Аминокислотная последовательность р551 основана на консенсусной аминокислотной последовательности штаммов ВГЕ ГТ3, циркулирующих в России. В частности, эта последовательность включает S-домен (ак 118–313), который имеет решающее значение для стабилизации капсида [251], но отсутствует в HEV-239, созданной на основе ак 368–606 ОРС2 ГТ1. Также в составе антигена, созданного в ходе данной работы, сохранены С-концевые 54 ак бОРС2, поскольку они предположительно обеспечивают правильную конформацию белка для распознавания анти-ВГЕ антителами [193]. Первые 109 кодонов ОРС2 были заменены на His-Tag для очистки белка. His-Tag способствуют селективному связыванию экспрессируемого белка с

Ni²⁺-аффинной колонкой [252], не влияя на его структуру, фолдинг и функции и позволяя получать биологически активный белок высокой чистоты [253].

Способность очищенного БОРС2 р551 образовывать ВПЧ оценивали с помощью просвечивающей электронной микроскопии. В целом частицы были неоднородными по размеру, однако большая их часть имела диаметр $27,71 \pm 2,417$ нм, что позволяет предположить, что очищенный р551 собирался в ВПЧ. Собранный в ВПЧ белок был стабилен при хранении при +4 °С, -20 °С и -80 °С до шести месяцев.

Ранее при однократной иммунизации беспородных мышей (самцов) нашей группой [254] оценивалась гуморальная иммуногенность р551 в эквитерапевтической дозе (20 мкг антигена/мл; согласно общим рекомендациям по доклиническим исследованиям препаратов). Эксперименты показали, что иммунизация р551 индуцировала продукцию специфических анти-ВГЕ IgG у всех иммунизированных животных [254].

Также в данном разделе представлены результаты оценки специфической иммуногенности и протективной активности р551 в эксперименте по заражению ОИ ВГЕ. ОИ хорошо подходят для исследований по оценке иммуногенности вакцин, поскольку их локусы МНС класса I и МНС класса II имеют ограниченную изменчивость [9,61], что приводит к низкой межиндивидуальной вариабельности иммунного ответа на вакцинные антигены. Кроме того, из-за частого рождения близнецов экспериментальные группы ОИ могут быть составлены таким образом, чтобы свести к минимуму влияние индивидуальных вариаций, увеличивая силу анализа, что было бы крайне сложно для других видов приматов. В совокупности эти особенности ОИ позволяют получать воспроизводимые результаты оценки иммуногенности, несмотря на относительно небольшой размер экспериментальных групп и аутбредный характер животных. В данной работе был использован близнецовый дизайн исследования, в соответствии с которым три пары близнецов ОИ были распределены между экспериментальными группами. ОИ в опытной группе иммунизировали четыре раза вакцинным препаратом, представляющим собой 20 мкг р551 с гидроокисью алюминия в качестве адьюванта, а затем заражали ВГЕ гомологического (ГТ3) или гетерологического (ГТ1) генотипа в дозе 10^5 МЕ РНК. Инфекцию контролировали путем оценки двух наиболее чувствительных маркеров

инфекции: выделения вируса с калом и уровня сывороточных анти-ВГЕ IgG. Было показано, что иммунизация ВПЧ р551, полученного на основе ГТ3 ВГЕ, защищает ОИ от формирования гепатита Е при заражении как ВГЕ ГТ3, так и ВГЕ ГТ1, в то время как у ОИ, получивших плацебо, развивается легкое поражение печени и наблюдается выделение ВГЕ в фекалиях.

Описываемые в этом разделе диссертации эксперименты позволили получить информацию о нескольких ранее неизвестных аспектах ВГЕ-инфекции у приматов. Во-первых, данные, полученные нами в контрольной группе, показали, что ОИ восприимчивы не только к ВГЕ ГТ1 [255], но и к ВГЕ ГТ3. У обезьян из контрольной группы, получавших ВГЕ ГТ1 и ГТ3, развилась ВГЕ-инфекция с выделением вируса с фекалиями на 2-6-й и 2-3-й неделях после заражения, соответственно. Согласно исследованиям вакцины HEV-239 на макаках-резусах, для ВГЕ ГТ1 и 4 экскреция вируса с фекалиями начиналась через 1 неделю после заражения и продолжалась в течение 2–5 недель [197]. У людей РНК ВГЕ обнаруживается в фекалиях в инкубационном периоде и сохраняется в течение примерно 6 недель [256]. Упомянутые данные согласуются с наблюдениями, полученными в данном разделе для ОИ, что дополнительно подтверждает адекватность модели.

Во-вторых, в ходе проведенной работы описана изменчивость ВГЕ при межвидовой передаче ОИ. Установлено, что передача ВГЕ ГТ1, выделенного от человека, ОИ сопровождалась появлением нуклеотидных замен в ОРС2, как синонимических, так и несинонимических, что свидетельствует об адаптации вируса к новому хозяину. За наблюдаемой изменчивостью стоят две возможные движущие силы. Синонимические замены могут отражать различное использование кодонов клетками ОИ по сравнению с клетками человека. Ранее сообщалось о различном использовании синонимических кодонов генома ВГЕ при межвидовой передаче [257]. Специфический отбор ОРС2 с I388F мог быть связан с уклонением от иммунного ответа нового хозяина. Эта аминокислотная позиция лежит вне Р-домена ОРС2 (ак 454–606), который содержит предполагаемую область связывания с рецептором и эпитопы вируснейтрализующих антител [195], однако она может находиться в составе Т-клеточного эпитопа. Кроме того, клетки ОИ могут представлять В-клеточные эпитопы, отличные от таковых у людей. Насколько известно диссертанту, это первые

данные о мутационном профиле ОРС2 ВГЕ при межвидовой передаче нечеловекообразным приматам. Интересно, что инфицирование ОИ ВГЕ ГТЗ, полученным из фекалий свиней, не сопровождалось какими-либо заменами в ОРС2, возможно, из-за короткой продолжительности инфекции, продолжавшейся всего две недели. Поскольку в данном исследовании использовалось только секвенирование по Сэнгеру, нельзя исключить, что выявленные мутации присутствовали в инокуляте в виде минорных вариантов. Адаптация ВГЕ к ОИ в качестве нового хозяина заслуживает дальнейшего изучения, включая мониторинг динамики вирусных субпопуляций с помощью глубокого секвенирования.

В-третьих, в данном разделе показано, что ВГЕ-инфекция у ОИ из контрольной группы протекает с минимальными проявлениями, выявляемыми в виде кратковременного повышения уровней АЛТ, АСТ и ЛДГ. Кроме того, уровни печеночных ферментов, наблюдаемые у зараженных ОИ из контрольной группы, оставались в пределах референсных значений для этого вида, т. е. не указывали на тяжелое поражение печени, а скорее на легкие изменения функции печени, аналогичные тем, которые наблюдались у ОИ с неалкогольным стеатогепатитом [258]. Описываемая клиническая картина отличается от течения у ОИ инфекций, вызываемых другими гепатотропными вирусами, такими как вирус гепатита А или вирус GBV-B, оба из которых вызывают у ОИ острый гепатит [259]. Это существенно отличает ОИ от узконосых обезьян, у которых ВГЕ-инфекция сопровождается выраженным повышением уровня печеночных ферментов. Интересно, что у обезьян Старого Света ВГЕ ГТ1 вызывает более выраженное заболевание, чем ВГЕ ГТЗ [260]. У ОИ наблюдается легкое течение заболевания при заражении как ВГЕ ГТ1, так и ВГЕ ГТЗ, что свидетельствует о том, что оно в целом характерно для ВГЕ-инфекции на данной животной модели. Хотя у животных в контрольной группе наблюдалось некоторое повышение уровня печеночных ферментов, его не наблюдалось у вакцинированных ОИ, что наряду с отсутствием РНК ВГЕ в фекалиях подтверждает, что животные, получившие р551 были защищены от вирусного гепатита Е.

К 3-й неделе после введения первой дозы вакцины у всех ОИ, получивших р551, вырабатывались специфические анти-ВГЕ IgG. Уровни анти-ВГЕ IgG на 124-й неделе после экспериментального заражения (двухлетнее наблюдение) оставались такими

же, как и на 6-й неделе после заражения. Учитывая среднюю ожидаемую продолжительность жизни ОИ менее 15 лет [61], стабильные титры анти-ВГЕ IgG в течение двух лет наблюдения указывают на высокую стойкость сформированного гуморального иммунитета.

Ранее было выдвинуто предположение о том, что относительно невысокий уровень IgG в плазме крови ОИ может быть недостаточным для нейтрализации вирусов, и следовательно — защиты от экспериментального заражения [59]. Приведенные в данном разделе результаты опровергают это предположение и подтверждают высокую применимость ОИ для исследований специфической активности противовирусных вакцин.

4.4 Заключение главы

В первом разделе данной главы описано экспериментальное воспроизведения ВГЕ-инфекции на ОИ, а также выявление сайтов репликации генома ВГЕ на различных стадиях инфекции. С использованием электронной микроскопии, а также ОТ-ПЦР с детекцией плюс-цепи и минус-цепи РНК ВГЕ в тканях ОИ подтверждено, что при экспериментальном заражении, репликация генома ВГЕ происходит в печени ОИ, в то время как предполагавшаяся репликация в тканях кишечника не подтвердилась. Кроме того, полученные данные позволили подтвердить, что ОИ являются адекватной лабораторной моделью для экспериментального воспроизведения ВГЕ-инфекции, что позволило перейти к исследованиям кандидатного вакцинного препарата против гепатита Е.

Во втором разделе главы описаны эксперименты, в ходе которых было установлено, что ОИ восприимчивы к заражению ВГЕ ГТ1 и 3. ВГЕ-инфекция протекает у ОИ с выделением вируса с фекалиями и кратковременным повышением уровня биохимических маркеров поражения гепатоцитов. Таким образом, ОИ могут служить ценной моделью для оценки эффективности кандидатных вакцин против гепатита Е, особенно в условиях возможности использования близнецового дизайна исследований, обусловленной биологическими особенностями вида. Вакцинация ВПЧ р551 ОРС2, полученного на основе последовательности ВГЕ ГТ3, защищала ОИ от заражения как гомологическим ГТ3 ВГЕ, так и гетерологическим ГТ1. Кросс-

генотипическая защита, индуцируемая вакцинным препаратом на основе ГТЗ ВГЕ, свидетельствует о том, что естественный иммунитет после инфицирования ВГЕ ГТЗ может обеспечивать защиту от более патогенного ГТ1.

Описанные в данной главе результаты опубликованы в журналах Бюллетень экспериментальной биологии и медицины [255] и Vaccine [6], а также представлены на ряде международных конференций, включая конференцию Mucosal Vaccines, Adjuvants and Delivery 2016 Лозанна, Швейцария, 14–16 сентября 2016.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для вирусных инфекционных заболеваний, поражающих людей, приматы являются наиболее адекватной моделью, позволяющей воспроизводить все этапы развития инфекции, включая путь заражения, места репродукции вируса, а также особенности развития заболевания и формирования всех звеньев иммунного ответа.

В ходе работ, описанных в диссертации, был применен комплексный подход к решению важной научно-практической проблемы — разработке доступной лабораторной приматной модели для оценки специфической активности противовирусных вакцин.

В Главе 1 описана разработка подходов к длительному лабораторному содержанию и разведению ОИ, установлены референсные значения основных клинических и биохимических показателей крови, оцениваемых в ходе доклинических исследований иммунобиологических препаратов, а также проведено гистологическое описание структуры лимфоидных органов в норме и в ходе формирования поствакцинального иммунного ответа. Показано, что ОИ, выращенные в лабораторных условиях, исключая фоновую инфекционную патологию, являются адекватной моделью, позволяющей с высоким уровнем достоверности характеризовать профиль безопасности и специфической активности противовирусных вакцин в ходе доклинических исследований.

В Главе 2 описаны работы по подбору клона антител для детекции IgA в биоматериале, полученном от ОИ, а также клонов флуоресцентно меченных антител, необходимых для дифференциации субпопуляций лимфоцитов и оценки уровня их созревания и активации. Подобранные клоны антител далее были использованы в методике оценки специфического поствакцинального Т-клеточного ответа в лимфопролиферативном тесте. Подбранная панель антител также позволила установить доли специфических клеточных популяций МПК у интактных ОИ и определить их функциональный статус, что в дальнейшем может быть использовано в экспериментах по оценке эффективности новых иммунобиологических препаратов, включая вакцины против вирусных и онкологических заболеваний. Возможность проведения доклинических исследований локального мукозального и Т-клеточного

иммунного ответа на введение иммунобиологических препаратов на лабораторных приматах значительно повышает трансляционный потенциал получаемых результатов.

В Главе 3 описано применение ОИ в доклинических исследованиях двух разработанных в Российской Федерации вакцин против COVID-19. На основании данных, полученных с использованием ОИ, был сделан вывод о безопасности вакцины КовиВак, а также о ее способности индуцировать выработку специфических вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2, что в совокупности с данными, полученными на лабораторных грызунах и кроликах, позволило обосновать возможность перехода к I–II фазе клинических исследований [42]. Во втором разделе главы описано применение лабораторных ОИ в исследованиях безопасности и специфической активности интраназальной и внутримышечной формы аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 Спутник V, а также представлены результаты изучения долгосрочного созревания поствакцинального иммунного ответа. Получены новые фундаментальные данные о созревании аффинности антител у приматов.

В ходе работ, описанных в Главе 4, установлено, что печень является преобладающим сайтом репликации генома ВГЕ при экспериментальном заражении ОИ, в то время как предполагаемая репликация в тканях кишечника не подтвердилась. Кроме того, полученные данные позволили подтвердить, что ОИ являются адекватной лабораторной моделью для экспериментального воспроизведения ВГЕ-инфекции, что позволило перейти к исследованиям кандидатного вакцинного препарата против гепатита Е. Во втором разделе главы описаны эксперименты, в ходе которых было установлено, что ОИ восприимчивы к заражению ВГЕ ГТ1 и 3. Вакцинация ВПЧ белка p551 ОРС2, полученного на основе последовательности ВГЕ ГТ3, защищала ОИ от заражения как гомологическим ГТ3 ВГЕ, так и гетерологическим ГТ1.

Результаты работы расширяют представления о физиологии иммунной системы ОИ, в частности о закономерностях формирования системного гуморального, Т-клеточного и локального мукозального противовирусного иммунитета, а также дополняют представления о долгосрочном созревании поствакцинального иммунного ответа у приматов.

ВЫВОДЫ

1. Для обыкновенных игрунок, родившихся и постоянно содержащихся в лабораторных условиях, установлены референсные значения основных гематологических и биохимических показателей крови, оцениваемых в ходе доклинических исследований противовирусных вакцин.
2. На основании результатов гистологического исследования установлена высокая степень сходства структуры лимфоидных органов (тимуса, селезенки, лимфатических узлов) обыкновенных игрунок с человеческими в норме, а также в ходе формирования поствакцинального иммунного ответа.
3. Разработаны методики комплексной оценки специфического поствакцинального локального мукозального, системного гуморального и Т-клеточного адаптивного иммунного ответа у обыкновенных игрунок. С использованием подобранных клонов антител к поверхностным маркерам субпопуляций лимфоцитов обыкновенных игрунок установлено, что доля субпопуляции В-клеток памяти $CD45^+CD20^+CD27^+$ в крови достоверно коррелировала с возрастом животных.
4. С использованием лабораторных обыкновенных игрунок получены подтверждения безопасности и специфической активности инактивированной цельновирионной коронавирусной вакцины КовиВак (индукция специфических вируснейтрализующих антител).
5. С использованием лабораторных обыкновенных игрунок получены подтверждения безопасности и специфической активности интраназальной и внутримышечной формы аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 Спутник V (индукция специфических IgG, вируснейтрализующих антител, специфического Т-клеточного и локального мукозального иммунного ответа).
6. Установлено, что как интраназальное, так и внутримышечное введение обыкновенным игрункам аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 Спутник V приводило к выработке специфических поствакцинальных антител и последующему созреванию их аффинности.

7. Установлено, что в течение двух лет после введения аденовирусной векторной вакцины Спутник V в сыворотке крови обыкновенных игрунок, содержащихся в изолированных условиях, непрерывно повышались титры вируснейтрализующих антител не только против гомологичного варианта SARS-CoV-2 B.1.1.1 (Wuhan-Hu-1), но также против гетерологичных вариантов B.1.617.2 (дельта) и B.1.1.529.5 (омикрон ВА.5), не циркулировавших на момент вакцинации.
8. Обыкновенные игрушки восприимчивы к экспериментальному заражению ВГЕ как генотипа 1, так и генотипа 3. При экспериментальном заражении генотипом 1 ВГЕ репликация вирусного генома происходила в печени ОИ, при этом вирус выявлялся в фекалиях, а в сыворотке крови животных наблюдалось повышение уровня биохимических маркеров повреждения печени.
9. Кандидатный вакцинный препарат p551 на основе белка ORC2 ВГЕ индуцировал выработку специфических анти-ВГЕ IgG и защищал обыкновенных игрунок от гепатита E при экспериментальном заражении ВГЕ гомологичного и гетерологичного генотипа.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Установленные в ходе работы средний возраст самок ОИ на момент первых родов, средний интервал между родами, выживаемость детенышей и минимальный возраст включения животных в эксперименты в совокупности позволяют проводить долгосрочное планирование численности колонии ОИ в зависимости от экспериментальных задач.
2. Подобранный в ходе работы клон антител для детекции IgA в биоматериале, полученном от ОИ, а также клоны флуоресцентно меченных антител, необходимых для дифференциации субпопуляций лимфоцитов ОИ и оценки уровня их созревания и активации могут быть в дальнейшем использованы для оценки антиген-специфического Т-клеточного и локального мукозального ответа на введение кандидатных противовирусных вакцин, включая вакцины нового поколения на основе мРНК.
3. Заключительные этапы доклинических исследований специфической иммуногенности и протективной активности кандидатных вакцин против вирусного гепатита E целесообразно проводить на лабораторных ОИ.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Дальнейшая оценка восприимчивости ОИ к патогенам, актуальным для Российской Федерации, включая вирус гепатита В и арбовирусы.
2. Разработка методик оценки биораспределения биомолекул в организме ОИ с целью разработки приматной модели для оценки эффективности и безопасности генотерапевтических препаратов и вакцин нового поколения.
3. Разработка лабораторных моделей для изучения хронических вирусных инфекций, актуальных для Российской Федерации (хронический вирусный гепатит В, энтеровирусные инфекции), использованием ОИ.
4. Разработка методик оценки эффективности и безопасности генотерапевтических препаратов с использованием ОИ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает благодарность своим учителям: академику РАН А.А. Ишмухаметову, академику РАН М.И. Михайлову, профессору РАН К.К. Кюрегяну, профессору Л.Ю. Ильченко и к.х.н. М.Г. Беликовой-Исагулянц.

Сотрудникам Лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) и в особенности — Т.В. Гуляевой, к.б.н. Е.О. Баюровой, к.б.н. А.С. Житкевич, Д.В. Авдошиной, С.А. Гуляеву, к.в.н. М.А. Ваннусу и А.В. Морозу за многолетний добросовестный совместный труд, позволивший решить поставленные задачи.

Сотрудникам лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора — к.м.н. И.А. Потемкину и А.А. Карлсен.

Сотрудникам ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России — академику РАН Д.Ю. Логунову, к.б.н. И.В. Должиковой, к.б.н. А.Ш. Джаруллаевой и в особенности — к.б.н. А.И. Тухватулину, без советов и настойчивости которого многие из идей, изложенных в этой работе, не были бы воплощены в жизнь.

Родителям за настойчивость и поддержку.

Семье за вдохновение.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ак — аминокислота;

АЛТ — аланинаминотрансфераза;

АСТ — аспартатаминотрансфераза;

БВРС — ближневосточный респираторный синдром;

ВГА — вирус гепатита А;

ВГЕ — вирус гепатита Е;

ВОЗ — Всемирная организация здравоохранения;

ВПЧ — вирусоподобная частица;

ДМЕМ — среда Игла MEM, модифицированная по Дульбекко;

ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота;

дНТФ — динуклеотидтрифосфат;

ИА — индекс авидности;

Игла MEM — питательная среда Eagle's minimal essential medium;

ИФА — иммуноферментный анализ;

Лаборатория — Лаборатория моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита);

ЛДГ — лактатдегидрогеназа;

МЕ — международная единица;

МПК — мононуклеары периферической крови;

НТ — нуклеотидтрифосфат;

ОИ — обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*);

ОРС — открытая рамка считывания;

ОТ — обратная транскрипция;

ОТ-ПЦР — полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

ПБА — патогенные биологические агенты;

ПЦР — полимеразная цепная реакция;

РНК — рибонуклеиновая кислота;

РНК ВГЕ — рибонуклеиновая кислота вируса гепатита Е;

ТОРС — тяжелый острый респираторный синдром;
ФБС — фетальная бычья сыворотка;
ACE2 — ангиотензинпревращающий фермент 2;
APC — аллофикоцианин;
BALT — лимфоидная ткань, ассоциированная с бронхами;
CD — кластер дифференцировки; поверхностные маркеры клеток;
CFSE — сукцинимидиловый эфир карбоксифлуоресцеина;
COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года;
Cy — цианин;
DAPI — 4',6-диамидино-2-фенилиндол;
DPP4 — дипептидилпептидаза-4;
FITC — флуоресцеинизотиоцианат;
FSC — прямое светорассеивание;
HEPA — воздушный фильтр с высокоэффективным удалением частиц;
HLA — человеческие лейкоцитарные антигены, ортологи молекул главного комплекса гистосовместимости;
ID — идентификатор животного;
Ig — иммуноглобулин;
LSM — среда для выделения лимфоцитов на основе полисахарозы 400;
 $M \pm \sigma$ — среднее значение \pm стандартное отклонение;
MERS-CoV — коронавирус ближневосточного респираторного синдрома;
MHC — молекулы главного комплекса гистосовместимости;
Na-ЭДТА — натриевая соль этилендиаминтетрауксусной кислоты;
PE — фикоэритрин;
PerCP — перидинин-хлорофилл протеин;
RBD — рецептор-связывающий домен;
SARS-CoV — коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома;
SARS-CoV-2 — коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2;
SSC — боковое светорассеивание;
TPBS — фосфатно-солевой буфер с Tween 20.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Estes, J.D. Nonhuman primate models of human viral infections / J. D. Estes, S. W. Wong, J. M. Brenchley // *Nat. Rev. Immunol.* — 2018. — Vol. 18. — № 6. — P. 390–404.
2. Heijmans, C.M.C. Comparative genetics of the major histocompatibility complex in humans and nonhuman primates / C. M. C. Heijmans, N. G. de Groot, R. E. Bontrop // *International Journal of Immunogenetics* 2020. — Vol. 47. — № 3. — P. 243–260.
3. 't Hart, B.A. The marmoset monkey: a multi-purpose preclinical and translational model of human biology and disease / B. A. 't Hart, D. H. Abbott, K. Nakamura, E. Fuchs // *Drug Discov. Today.* — 2012. — Vol. 17. — № 21–22. — P. 1160–1165.
4. Tardif, S.D. Reproduction in captive common marmosets (*Callithrix jacchus*) / S. D. Tardif, D. A. Smucny, D. H. Abbott et al. // *Comparative Medicine* 2003. — Vol. 53. — № 4. — P. 364–368.
5. Jagessar, S.A. An overview of models, methods, and reagents developed for translational autoimmunity research in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) / S. A. Jagessar, M. Vierboom, E. L. A. Blezer et al. // *Experimental Animals* 2013. — Vol. 62. — № 3. — P. 159–171.
6. Gordeychuk, I. Immunization with recombinant ORF2 p551 protein protects common marmosets (*Callithrix jacchus*) against homologous and heterologous hepatitis E virus challenge / I. Gordeychuk, K. Kyuregyan, A. Kondrashova et al. // *Vaccine.* — 2022. — Vol. 40. — № 1. — P. 89–99.
7. Benirschke, K. Marrow Chimerism in Marmosets / K. Benirschke, J. M. Anderson, L. E. Brownhill // *Science.* — 1962. — Vol. 138. — № 3539. — P. 513–515.
8. Bayurova, E. Common Marmoset Cell Lines and Their Applications in Biomedical Research / E. Bayurova, A. Zhitkevich, D. Avdoshina et al. // *Cells.* — 2023. — Vol. 12. — № 16. — P. 2020.
9. Antunes, S.G. The common marmoset: a new world primate species with limited MHC class II variability. / S. G. Antunes, N. G. de Groot, H. Brok et al. // *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 1998. — Vol. 95. — № 20. — P. 11745–11750.
10. Cao, Y.H. Identification of MHC I class genes in two Platyrrhini species / Y. H. Cao, J. W. Fan, A. X. Li et al. // *Am. J. Primatol.* — 2015. — Vol. 77. — № 5. — P. 527–534.
 11. Maccari, G. IPD-MHC 2.0: an improved inter-species database for the study of the major histocompatibility complex / G. Maccari, J. Robinson, K. Ballingall et al. // *Nucleic Acids Res.* — 2017. — Vol. 45. — № D1. — P. D860–D864.
 12. Neubert, R. Cross-reactivity of antihuman monoclonal antibodies with cell surface receptors in the common marmoset / R. Neubert, M. Foerster, A. C. Nogueira, H. Helge // *Life Sci.* — 1995. — Vol. 58. — № 4. — P. 317–324.
 13. Brok, H.P.M. An extensive monoclonal antibody panel for the phenotyping of leukocyte subsets in the common marmoset and the cotton-top tamarin / H. P. M. Brok, R. J. Hornby, G. D. Griffiths et al. // *Cytometry.* — 2001. — Vol. 45. — № 4. — P. 294–303.
 14. Neumann, B. Comprehensive panel of cross-reacting monoclonal antibodies for analysis of different immune cells and their distribution in the common marmoset (*Callithrix jacchus*) / B. Neumann, T. Shi, L. L. Gan et al. // *J. Med. Primatol.* — 2016. — Vol. 45. — № 3. — P. 139–146.
 15. Gordeychuk, I.V. Assessment of the Parameters of Adaptive Cell-Mediated Immunity in Naïve Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) / I. V. Gordeychuk, A. I. Tukhvatulin, S. P. Petkov et al. // *Acta Naturae.* — 2018. — Vol. 10. — № 4. — P. 63–69.
 16. Carrion, R. An animal model that reflects human disease: The common marmoset (*Callithrix jacchus*) / R. Carrion, J. L. Patterson // *Current Opinion in Virology* 2012. — Vol. 2. — № 3. — P. 357–362.
 17. Mätz-Rensing, K. Viral diseases of common marmosets / K. Mätz-Rensing, M. Bleyer // *The Common Marmoset in Captivity and Biomedical Research* 2018. — P. 251–264.
 18. Lukashevich, I.S. Safety, immunogenicity, and efficacy of the ML29 reassortant vaccine for Lassa fever in small non-human primates / I. S. Lukashevich, R.

- Carrion, M. S. Salvato et al. // *Vaccine*. — 2008. — Vol. 26. — № 41. — P. 5246–5254.
19. Luo, S. A high infectious simian adenovirus type 23 vector based vaccine efficiently protects common marmosets against Zika virus infection / S. Luo, W. Zhao, X. Ma et al. // *PLoS Negl. Trop. Dis.* — / ed. Beasley D. W. C. 2020. — Vol. 14. — № 2. — P. e0008027.
 20. Minakawa, E.N. Establishment of a second-generation transgenic marmoset with germline transmission that models polyglutamine disease / E. N. Minakawa, K. Owari, N. Nogami et al. // *Dis. Model. Mech.* — 2025. — Vol. 18. — № 10.
 21. Новодержкина, Ю.К. Особенности содержания мармозет обыкновенных (*Callithrix jacchus*) для вирусологических исследований / Ю. К. Новодержкина, Т. В. Гуляева, Ю. А.-К. Хубиев и др. // *Мед. вирусол.* — 2014. — Т. 28. — № 2. — С. 48–57.
 22. Ziegler, T.E. Measurement of 25-hydroxyvitamin D_{2&3} and 1,25-dihydroxyvitamin D_{2&3} by tandem mass spectrometry: A primate multispecies comparison / T. E. Ziegler, A. Kapoor, C. J. Hedman et al. // *Am. J. Primatol.* — 2015. — Vol. 77. — № 7. — P. 801–810.
 23. Jarcho, M.R. Digestive Efficiency Mediated by Serum Calcium Predicts Bone Mineral Density in the Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) / M. R. Jarcho, M. L. Power, D. G. Layne-Colon, S. D. Tardif // *Am. J. Primatol.* — 2013. — Vol. 75. — № 2. — P. 153–160.
 24. Power, M.L. Does the milk of callitrichid monkeys differ from that of larger anthropoids? / M. L. Power, O. T. Oftedal, S. D. Tardif // *Am. J. Primatol.* — 2002. — Vol. 56. — № 2. — P. 117–127.
 25. Kiernan, J.A. *Histological and histochemical methods : theory and practice* / J. A. Kiernan 2008. — 606 p.
 26. Мужикян, А. Особенности гистологической обработки органов и тканей лабораторных животных / А. Мужикян, М. Макарова, Я. Гуцин // *Международный вестник ветеринарии.* — 2014. — № 2. — С. 103–109.
 27. Greaves, P. *Histopathology of preclinical toxicity studies : interpretation and*

- relevance in drug safety evaluation / P. Greaves 2007. — 953 p.
28. Войно-Ясенецкий, М.В. Источники ошибок при морфологических исследованиях / М. В. Войно-Ясенецкий, Ю. М. Жаботинский Л, 1970. — 319 с.
 29. Kaspereit, J. Background pathology of the common marmoset (*Callithrix jacchus*) in toxicological studies. / J. Kaspereit, S. Friderichs-Gromoll, E. Buse, G. Habermann // Exp. Toxicol. Pathol. — 2006. — Vol. 57. — № 5–6. — P. 405–410.
 30. De Fátima Arruda, M. Taxonomy and natural history / M. De Fátima Arruda, M. E. Yamamoto, D. M. De Almeida Pessoa, A. Araujo // The Common Marmoset in Captivity and Biomedical Research 2018. — P. 3–15.
 31. Stevenson, M. EAZA Best Practice Guidelines: Callitrichidae / M. Stevenson, A. B. Rylands // EAZA. — 2022. — Vol. 3.2. — P. 115–140.
 32. Power, M.L. Marmoset nutrition and dietary husbandry / M. L. Power, L. Koutsos // The Common Marmoset in Captivity and Biomedical Research 2018. — P. 63–76.
 33. Kuehnel, F. Parameters of haematology, clinical chemistry and lipid metabolism in the common marmoset and alterations under stress conditions / F. Kuehnel, J. Grohmann, U. Buchwald et al. // J. Med. Primatol. — 2012. — Vol. 41. — № 4. — P. 241–250.
 34. Kramer, R.M. Factors Affecting Hematologic and Serum Biochemical Parameters in Healthy Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) / R. M. Kramer, A. Sheh, C. H. Toolan et al. // J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci. — 2022. — Vol. 61. — № 2. — P. 113–131.
 35. Pearse, G. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus / G. Pearse // Toxicol. Pathol. — 2006. — Vol. 34. — № 5. — P. 504–514.
 36. Манских, В.Н. Патоморфология лабораторной мыши Т.1 Технические аспекты. Общая и органная патология / В. Н. Манских 2016. — 208 с.
 37. Treuting, P.M. Comparative Anatomy and Histology / P. M. Treuting, S. M. Dintzis, K. S. Montine // Comparative Anatomy and Histology 2012.
 38. David, J.M. Spontaneous pathology of the common marmoset (*Callithrix jacchus*)

- and tamarins (*Saguinus oedipus*, *Saguinus mystax*) / J. M. David, E. J. Dick, G. B. Hubbard // J. Med. Primatol. — 2009. — Vol. 38. — № 5. — P. 347–359.
39. McInnes, E.F. Background Lesions in Laboratory Animals / E. F. McInnes // Background Lesions in Laboratory Animals 2011. — 130 p.
40. Zinnen, A.D. Alpha-synuclein and tau are abundantly expressed in the ENS of the human appendix and monkey cecum. / A. D. Zinnen, J. Vichich, J. M. Metzger et al. // PLoS One. — 2022. — Vol. 17. — № 6. — P. e0269190.
41. Kozlovskaya, L.I. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies / L. I. Kozlovskaya, A. N. Piniyeva, G. M. Ignatyev et al. // Emerg. Microbes Infect. — 2021. — Vol. 10. — № 1. — P. 1790–1806.
42. Gordeychuk, I. V. Safety and Immunogenicity of Inactivated Whole Virion COVID-19 Vaccine CoviVac in Clinical Trials in 18–60 and 60+ Age Cohorts / I. V. Gordeychuk, L. I. Kozlovskaya, A. A. Siniugina et al. // Viruses. — 2023. — Vol. 15. — № 9. — P. 1828.
43. 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 / A. I. Tukhvatulin, I. V. Gordeychuk, I. V. Dolzhikova et al. // Emerg. Microbes Infect. — 2022. — Vol. 11. — № 1. — P. 2229–2247.
44. Ковыршина, А. В. Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КоВ / А. В. Ковыршина, И. В. Должикова, Д. М. Гроусова и др. // Иммунология. — 2020. — Т. 41. — № 2. — С. 135–143.
45. Dolzhikova, I.V. Preclinical Studies of Immunogenicity, Protectivity, and Safety of the Combined Vector Vaccine for Prevention of the Middle East Respiratory Syndrome / I. V. Dolzhikova, D. M. Grousova, O. V. Zubkova et al. // Acta Naturae. — 2020. — Vol. 12. — № 3. — P. 114–123.
46. Gordeychuk, I.V. Experimental Use of Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) in Preclinical Trials of Antiviral Vaccines / I. V. Gordeychuk, O. S. Gancharova, S.

- A. Gulyaev et al. // *Acta Naturae*. — 2024. — Vol. 16. — № 2. — P. 30–39.
47. Polack, F.P. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine / F. P. Polack, S. J. Thomas, N. Kitchin et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2020. — Vol. 383. — № 27. — P. 2603–2615.
48. Baden, L.R. Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine / L. R. Baden, H. M. El Sahly, B. Essink et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2021. — Vol. 384. — № 5. — P. 403–416.
49. Logunov, D.Y. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia / D. Y. Logunov, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakov et al. // *Lancet*. — 2021. — Vol. 397. — № 10275. — P. 671–681.
50. Focosi, D. Mucosal Vaccines, Sterilizing Immunity, and the Future of SARS-CoV-2 Virulence / D. Focosi, F. Maggi, A. Casadevall // *Viruses*. — 2022. — Vol. 14. — № 2. — P. 187.
51. Rijkers, G.T. Antigen presentation of mrna-based and virus-vectored sars-cov-2 vaccines / G. T. Rijkers, N. Weterings, A. Obregon-Henao et al. // *Vaccines* 2021. — Vol. 9. — № 8. — P. 848.
52. Leitner, W.W. DNA and RNA-based vaccines: principles, progress and prospects / W. W. Leitner, H. Ying, N. P. Restifo // *Vaccine*. — 1999. — Vol. 18. — № 9–10. — P. 765–777.
53. Kohu, K. Comparison of 30 Immunity-Related Genes from the Common Marmoset with Orthologues from Human and Mouse / K. Kohu, E. Yamabe, A. Matsuzawa et al. // *Tohoku J. Exp. Med.* — 2008. — Vol. 215. — № 2. — P. 167–180.
54. Kitaura, K. A new method for quantitative analysis of the T cell receptor V region repertoires in healthy common marmosets by microplate hybridization assay / K. Kitaura, Y. Fujii, T. Matsutani et al. // *J. Immunol. Methods*. — 2012. — Vol. 384. — № 1–2. — P. 81–91.
55. Olivieri, D.N. Immunoglobulin genes in Primates / D. N. Olivieri, F. Gambón Deza // *Mol. Immunol.* — 2018. — Vol. 101. — P. 353–363.
56. Garzón-Ospina, D. Igh locus structure and evolution in Platyrrhines: new insights

- from a genomic perspective / D. Garzón-Ospina, S. P. Buitrago // *Immunogenetics*. — 2020. — Vol. 72. — № 3. — P. 165–179.
57. Cadavid, L.F. Evolutionary instability of the major histocompatibility complex class I loci in New World primates. / L. F. Cadavid, C. Shufflebotham, F. J. Ruiz et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1997. — Vol. 94. — № 26. — P. 14536–14541.
58. Van Der Wiel, M.K. The repertoire of MHC class I genes in the common marmoset: Evidence for functional plasticity / M. K. Van Der Wiel, N. Otting, N. G. De Groot et al. // *Immunogenetics*. — 2013. — Vol. 65. — № 12. — P. 841–849.
59. Kametani, Y. Comparative immunity of antigen recognition, differentiation, and other functional molecules: similarities and differences among common marmosets, humans, and mice / Y. Kametani, T. Shiina, R. Suzuki et al. // *Exp. Anim.* — 2018. — Vol. 67. — № 3. — P. 301–312.
60. Neehus, A. Gene conversion of the major histocompatibility complex class I *Caja-G* in common marmosets (*Callithrix jacchus*) / A. Neehus, J. Wistuba, N. Ladas et al. // *Immunology*. — 2016. — Vol. 149. — № 3. — P. 343–352.
61. Abbott, D.H. Aspects of common marmoset basic biology and life history important for biomedical research / D. H. Abbott, D. K. Barnett, R. J. Colman et al. // *Comparative Medicine* 2003. — Vol. 53. — № 4. — P. 339–350.
62. Gough, A.W. Poxvirus infection in a colony of common marmosets (*Callithrix jacchus*). / A. W. Gough, N. J. Barsoum, S. I. Gracon et al. // *Lab. Anim. Sci.* — 1982. — Vol. 32. — № 1. — P. 87–90.
63. Mätz-Rensing, K. Fatal Herpes simplex infection in a group of common marmosets (*Callithrix jacchus*). / K. Mätz-Rensing, K. D. Jentsch, S. Rensing et al. // *Vet. Pathol.* — 2003. — Vol. 40. — № 4. — P. 405–411.
64. Moi, M.L. Demonstration of marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for secondary dengue virus infection: high levels of viraemia and serotype cross-reactive antibody responses consistent with secondary infection of humans / M. L. Moi, T. Takasaki, T. Omatsu et al. // *J. Gen. Virol.* — 2014. — Vol. 95. — № 3. — P. 591–600.

65. McIntosh, G.H. Spontaneous nasopharyngeal malignancies in the common marmoset. / G. H. McIntosh, R. Giesecke, D. F. Wilson, A. N. Goss // *Vet. Pathol.* — 1985. — Vol. 22. — № 1. — P. 86–88.
66. Haworth, R. Ovarian teratoma in a common marmoset (*Callithrix jacchus*). / R. Haworth, S. Jones, J. Sanchez-Morgado, A. Pilling // *Vet. Rec.* — 2003. — Vol. 153. — № 11. — P. 332–333.
67. Zöller, M. Malignant nephroblastoma in a common marmoset (*Callithrix jacchus*). / M. Zöller, K. Mätz-Rensing, A. Fahrion, F.-J. Kaup // *Vet. Pathol.* — 2008. — Vol. 45. — № 1. — P. 80–84.
68. Miller, A.D. Small intestinal adenocarcinoma in common marmosets (*Callithrix jacchus*). / A. D. Miller, J. A. Kramer, K. C. Lin et al. // *Vet. Pathol.* — 2010. — Vol. 47. — № 5. — P. 969–976.
69. Laufs, R. Latent Infection and Malignant Lymphoma in Marmosets (*Callithrix jacchus*) After Infection With Two Oncogenic Herpesviruses From Primates / R. Laufs, H. Steinke, S. Gisela, D. Petzold // *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* — 1974. — Vol. 53. — № 1. — P. 195–199.
70. Wolfe, L.G. Overview of viral oncology studies in *Saguinus* and *Callithrix* species. / L. G. Wolfe, F. Deinhardt // *Primates Med.* — 1978. — Vol. 10. — P. 96–118.
71. Wright, J. Susceptibility of common marmosets (*Callithrix jacchus*) to oncogenic and attenuated strains of Herpesvirus saimiri. / J. Wright, L. A. Falk, L. G. Wolfe et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* — 1977. — Vol. 59. — № 5. — P. 1475–1478.
72. Nelson, M. Exploring the Innate Immunological Response of an Alternative Nonhuman Primate Model of Infectious Disease; the Common Marmoset / M. Nelson, M. Loveday // *J. Immunol. Res.* — 2014. — Vol. 2014. — P. 1–8.
73. Reichert, T. Lymphocyte subset reference ranges in adult Caucasians. / T. Reichert, M. DeBruyère, V. Deneys et al. // *Clin. Immunol. Immunopathol.* — 1991. — Vol. 60. — № 2. — P. 190–208.
74. Chng, W.J. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference range for an Asian population by single-platform flow cytometry: influence of age, sex, and race and comparison with other published studies. / W. J. Chng, G. B. Tan,

- P. Kuperan // *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* — 2004. — Vol. 11. — № 1. — P. 168–173.
75. Yoshida, T. Dynamics of cellular immune responses in the acute phase of dengue virus infection / T. Yoshida, T. Omatsu, A. Saito et al. // *Arch. Virol.* — 2013. — Vol. 158. — № 6. — P. 1209–1220.
76. Коржуева, А.С. Взаимодействие различных молекулярных форм иммуноглобулина класса А и рекомбинантных дериватов рецепторного Вас белка стрептококков группы В / А. С. Коржуева, Д. Г. Ибрагимова, И. А. Устинович и др. // *Медицинская иммунология.* — 2014. — Т. 10. — № 4–5. — С. 327.
77. Tukhvatulin, A.I. Immunization route-mediated differences in long-term maturation of humoral immune response induced by adenovirus vector-based COVID-19 vaccine Sputnik V in nonhuman primates / A. I. Tukhvatulin, I. V. Gordeychuk, A. S. Dzharullaeva et al. // *Front. Immunol.* — 2025. — Vol. 16.
78. Klinger, A. Cyclical expression of L-selectin (CD62L) by recirculating T cells / A. Klinger, A. Gebert, K. Bieber et al. // *Int. Immunol.* — 2009. — Vol. 21. — № 4. — P. 443–455.
79. Galkina, E. L-selectin shedding does not regulate constitutive T cell trafficking but controls the migration pathways of antigen-activated T lymphocytes. / E. Galkina, K. Tanousis, G. Preece et al. // *J. Exp. Med.* — 2003. — Vol. 198. — № 9. — P. 1323–1335.
80. Das, A. Double-Positive CD21+CD27+ B Cells Are Highly Proliferating Memory Cells and Their Distribution Differs in Mucosal and Peripheral Tissues / A. Das, H. Xu, X. Wang et al. // *PLoS One.* — / ed. Chen Z. 2011. — Vol. 6. — № 1. — P. e16524.
81. Sengstake, S. CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs. / S. Sengstake, E.-M. Boneberg, H. Illges // *Int. Immunol.* — 2006. — Vol. 18. — № 7. — P. 1171–1178.
82. BO3 COVID-19 deaths | WHO COVID-19 dashboard [Electronic resource] / BO3 // WHO 2025. — URL: <https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths> (accessed:

- 09.07.2025).
83. Falsey, A.R. Phase 3 Safety and Efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) Covid-19 Vaccine / A. R. Falsey, M. E. Sobieszczyk, I. Hirsch et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2021.
 84. Heath, P.T. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine / P. T. Heath, E. P. Galiza, D. N. Baxter et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2021. — Vol. 385. — № 13. — P. 1172–1183.
 85. Gattinger, P. Fusion protein-based COVID-19 vaccines exemplified by a chimeric vaccine based on a single fusion protein (W-PreS-O) / P. Gattinger, L. I. Kozlovskaya, A. S. Lunin et al. // *Front. Immunol.* — 2025. — Vol. 16.
 86. Zhang, Y. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial / Y. Zhang, G. Zeng, H. Pan et al. // *Lancet Infect. Dis.* — 2021. — Vol. 21. — № 2. — P. 181–192.
 87. 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 / R. Ella, S. Reddy, W. Blackwelder et al. // *Lancet.* — 2021.
 88. Al Kaabi, N. Effect of 2 Inactivated SARS-CoV-2 Vaccines on Symptomatic COVID-19 Infection in Adults: A Randomized Clinical Trial / N. Al Kaabi, Y. Zhang, S. Xia et al. // *JAMA.* — 2021. — Vol. 326. — № 1. — P. 35–45.
 89. Zakarya, K. Safety and immunogenicity of a QazCovid-in® inactivated whole-virion vaccine against COVID-19 in healthy adults: A single-centre, randomised, single-blind, placebo-controlled phase 1 and an open-label phase 2 clinical trials with a 6 months follow-up in K / K. Zakarya, L. Kutumbetov, M. Orynbayev et al. // *EClinicalMedicine.* — 2021. — Vol. 39. — P. 101078.
 90. Woo, P.C.Y. ICTV Virus Taxonomy Profile: Coronaviridae 2023 / P. C. Y. Woo, R. J. de Groot, B. Haagmans et al. // *J. Gen. Virol.* — 2023. — Vol. 104. — № 4.
 91. Yao, H. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus / H. Yao, Y. Song, Y. Chen et al. // *Cell.* — 2020. — Vol. 183. — № 3. — P. 730-738.e13.

92. Osuagwu, A.E. Non-neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein mediate variant transcendent antibody-dependent cellular cytotoxicity / A. E. Osuagwu, M. Payne, J. Bosch et al. // *J. Immunol.* — 2025. — Vol. 214. — № 12. — P. 3385–3398.
93. Kuwentrai, C. Induction of Humoral and Cellular Immunity by Intradermal Delivery of SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein Using Dissolvable Microneedles / C. Kuwentrai, J. Yu, B. Zhang et al. // *J. Immunol. Res.* — / ed. Milito C. 2021. — Vol. 2021. — P. 1–8.
94. Matchett, W.E. Cutting Edge: Nucleocapsid Vaccine Elicits Spike-Independent SARS-CoV-2 Protective Immunity / W. E. Matchett, V. Joag, J. M. Stolley et al. // *J. Immunol.* — 2021. — Vol. 207. — № 2. — P. 376–379.
95. Rabdano, S.O. Immunogenicity and In Vivo Protective Effects of Recombinant Nucleocapsid-Based SARS-CoV-2 Vaccine Convacell® / S. O. Rabdano, E. A. Ruzanova, I. V. Pletyukhina et al. // *Vaccines.* — 2023. — Vol. 11. — № 4. — P. 874.
96. Zhong, G. Identification of HRH1 as an alternative receptor for SARS-CoV-2: insights from viral inhibition by repurposable antihistamines / G. Zhong, J. Li, H. Wang // *MBio.* — / ed. Klein S. 2024. — Vol. 15. — № 8.
97. Hoffmann, M. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor / M. Hoffmann, H. Kleine-Weber, S. Schroeder et al. // *Cell.* — 2020. — Vol. 181. — № 2. — P. 271-280.e8.
98. Wrapp, D. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation / D. Wrapp, N. Wang, K. S. Corbett et al. // *Science.* — 2020. — Vol. 367. — № 6483. — P. 1260–1263.
99. Walls, A.C. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein / A. C. Walls, Y.-J. Park, M. A. Tortorici et al. // *Cell.* — 2020. — Vol. 181. — № 2. — P. 281-292.e6.
100. Roy, A. Determinants of protection against SARS-CoV-2 Omicron BA.1 and Delta infections in fully vaccinated outpatients / A. Roy, C. Saade, L. Josset et al. // *J. Med. Virol.* — 2023. — Vol. 95. — № 8.

101. Almendro-Vázquez, P. Longitudinal dynamics of SARS-CoV-2-specific cellular and humoral immunity after natural infection or BNT162b2 vaccination / P. Almendro-Vázquez, R. Laguna-Goya, M. Ruiz-Ruigomez et al. // *PLOS Pathog.* — / ed. Shresta S. 2021. — Vol. 17. — № 12. — P. e1010211.
102. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты) / А. Н. Миронов, В. А. Меркулов, Н. Д. Бунятян / ред. Миронов А. Н. Москва, 2012. — 536 с.
103. Chu, H. Animal models in SARS-CoV-2 research / H. Chu, J. F.-W. Chan, K.-Y. Yuen // *Nat. Methods.* — 2022. — Vol. 19. — № 4. — P. 392–394.
104. McCray, P.B. Lethal Infection of K18- hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus / P. B. McCray, L. Pewe, C. Wohlford-Lenane et al. // *J. Virol.* — 2007. — Vol. 81. — № 2. — P. 813–821.
105. Yinda, C.K. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19 / C. K. Yinda, J. R. Port, T. Bushmaker et al. // *PLOS Pathog.* — / ed. Subbarao K. 2021. — Vol. 17. — № 1. — P. e1009195.
106. Vidal, E. Chronological brain lesions after SARS-CoV-2 infection in hACE2-transgenic mice / E. Vidal, C. López-Figueroa, J. Rodon et al. // *Vet. Pathol.* — 2022. — Vol. 59. — № 4. — P. 613–626.
107. Chow, Y.-H. Development of an epithelium-specific expression cassette with human DNA regulatory elements for transgene expression in lung airways / Y.-H. Chow, H. O’Brodivich, J. Plumb et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 1997. — Vol. 94. — № 26. — P. 14695–14700.
108. Pons-Grífols, A. A human-ACE2 knock-in mouse model for SARS-CoV-2 infection recapitulates respiratory disorders but avoids neurological disease associated with the transgenic K18-hACE2 model / A. Pons-Grífols, F. Tarrés-Freixas, M. Pérez et al. // *MBio.* — / ed. Lednicky J. A. 2025. — Vol. 16. — № 5.
109. Mestas, J. Of Mice and Not Men: Differences between Mouse and Human Immunology / J. Mestas, C. C. W. Hughes // *J. Immunol.* — 2004. — Vol. 172. — № 5. — P. 2731–2738.

110. Falzarano, D. Infection with MERS-CoV Causes Lethal Pneumonia in the Common Marmoset / D. Falzarano, E. de Wit, F. Feldmann et al. // PLoS Pathog. — / ed. Denison M. R. 2014. — Vol. 10. — № 8. — P. e1004250.
111. Greenough, T.C. Pneumonitis and Multi-Organ System Disease in Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) Infected with the Severe Acute Respiratory Syndrome-Associated Coronavirus / T. C. Greenough, A. Carville, J. Coderre et al. // Am. J. Pathol. — 2005. — Vol. 167. — № 2. — P. 455–463.
112. Chan, J.F.-W. Treatment With Lopinavir/Ritonavir or Interferon- β 1b Improves Outcome of MERS-CoV Infection in a Nonhuman Primate Model of Common Marmoset / J. F.-W. Chan, Y. Yao, M.-L. Yeung et al. // J. Infect. Dis. — 2015. — Vol. 212. — № 12. — P. 1904–1913.
113. Mou, H. The Receptor Binding Domain of the New Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Maps to a 231-Residue Region in the Spike Protein That Efficiently Elicits Neutralizing Antibodies / H. Mou, V. S. Raj, F. J. M. van Kuppeveld et al. // J. Virol. — 2013. — Vol. 87. — № 16. — P. 9379–9383.
114. Hofmann, H. Cellular entry of the SARS coronavirus / H. Hofmann, S. Pöhlmann // Trends Microbiol. — 2004. — Vol. 12. — № 10. — P. 466–472.
115. Ireland, R.E. Histopathological and Immunological Findings in the Common Marmoset Following Exposure to Aerosolized SARS-CoV-2 / R. E. Ireland, C. D. Davies, E. Keyser et al. // Viruses. — 2022. — Vol. 14. — № 7. — P. 1580.
116. Lu, S. Comparison of SARS-CoV-2 infections among 3 species of non-human primates / S. Lu, Y. Zhao, W. Yu 2020.
117. Liu, Y. Functional and genetic analysis of viral receptor ACE2 orthologs reveals a broad potential host range of SARS-CoV-2 / Y. Liu, G. Hu, Y. Wang et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2021. — Vol. 118. — № 12.
118. Damas, J. Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis of ACE2 in vertebrates / J. Damas, G. M. Hughes, K. C. Keough et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. — 2020. — Vol. 117. — № 36. — P. 22311–22322.
119. Marini, R. The common marmoset in captivity and biomedical research / R. Marini, L. Wachtman, S. Tardif et al. // The Common Marmoset in Captivity and

- Biomedical Research 2018. — 1–570 p.
120. Yarbrough, L.W. Serum biochemical, hematological and body measurement data for common marmosets (*Callithrix jacchus jacchus*). / L. W. Yarbrough, J. L. Tollett, R. D. Montrey, R. J. Beattie // *Lab. Anim. Sci.* — 1984. — Vol. 34. — № 3. — P. 276–280.
 121. Pettersson, J. Muscular exercise can cause highly pathological liver function tests in healthy men. / J. Pettersson, U. Hindorf, P. Persson et al. // *Br. J. Clin. Pharmacol.* — 2008. — Vol. 65. — № 2. — P. 253–259.
 122. Казакова, М.С. Референсные значения показателей общего анализа крови взрослого работающего населения. / М. С. Казакова, С. А. Луговская, В. В Долгов // *Клин. лаб. диагн.* — 2012. — № 6. — С. 43–49.
 123. Crawford, K.H.D. Dynamics of Neutralizing Antibody Titers in the Months After Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Infection / K. H. D. Crawford, A. S. Dingens, R. Eguia et al. // *J. Infect. Dis.* — 2021. — Vol. 223. — № 2. — P. 197–205.
 124. Levin, E.G. Waning Immune Humoral Response to BNT162b2 Covid-19 Vaccine over 6 Months / E. G. Levin, Y. Lustig, C. Cohen et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2021. — Vol. 385. — № 24. — P. e86.
 125. Fadlyana, E. A phase III, observer-blind, randomized, placebo-controlled study of the efficacy, safety, and immunogenicity of SARS-CoV-2 inactivated vaccine in healthy adults aged 18–59 years: An interim analysis in Indonesia / E. Fadlyana, K. Rusmil, R. Tarigan et al. // *Vaccine.* — 2021. — Vol. 39. — № 44. — P. 6520–6528.
 126. Sarwar, M.U. Real-world effectiveness of the inactivated COVID-19 vaccines against variant of concerns: meta-analysis / M. U. Sarwar, F. Z. Waasia, A. A. Aloqbi et al. // *J. Infect. Public Health.* — 2024. — Vol. 17. — № 2. — P. 245–253.
 127. Vorovitch, M.F. Evervac: phase I/II study of immunogenicity and safety of a new adjuvant-free TBE vaccine cultivated in Vero cell culture. / M. F. Vorovitch, K. G. Grishina, V. P. Volok et al. // *Hum. Vaccin. Immunother.* — 2020. — Vol. 16. —

- № 9. — P. 2123–2130.
128. Piniaeva, A. Immunogenicity and Safety of Inactivated Sabin-Strain Polio Vaccine “PoliovacSin”: Clinical Trials Phase I and II / A. Piniaeva, G. Ignatyev, L. Kozlovskaya et al. // *Vaccines*. — 2021. — Vol. 9. — № 6.
 129. Kozlovskaya, L. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak / L. Kozlovskaya, A. Piniaeva, G. Ignatyev et al. // *Int. J. Infect. Dis.* — 2020. — Vol. 99. — P. 40–46.
 130. Nurmi, V. Comparison of approaches for IgG avidity calculation and a new highly sensitive and specific method with broad dynamic range / V. Nurmi, L. Hedman, M. F. Perdomo et al. // *Int. J. Infect. Dis.* — 2021. — Vol. 110. — P. 479–487.
 131. Logunov, D.Y. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / D. Y. Logunov, I. V Dolzhikova, O. V Zubkova et al. // *Lancet*. — 2020. — Vol. 396. — № 10255. — P. 887–897.
 132. Tikhvatulin, 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 / A. I. Tikhvatulin, I. V. Dolzhikova, D. V. Shcheblyakov et al. // *Lancet Reg. Heal. Eur.* — 2021. — Vol. 11. — P. 100241.
 133. Mietsch, M. The aging common marmoset’s immune system: From junior to senior / M. Mietsch, K. Paqué, C. Drummer et al. // *Am. J. Primatol.* — 2020. — Vol. 82. — № 6.
 134. Harkema, J.R. Comparative pathology of the nasal mucosa in laboratory animals exposed to inhaled irritants. / J. R. Harkema // *Environ. Health Perspect.* — 1990. — Vol. 85. — P. 231–238.
 135. Harkema, J.R. The Nose Revisited: A Brief Review of the Comparative Structure, Function, and Toxicologic Pathology of the Nasal Epithelium / J. R. Harkema, S. A. Carey, J. G. Wagner // *Toxicol. Pathol.* — 2006. — Vol. 34. — № 3. — P. 252–269.
 136. Sheikh-Mohamed, S. Systemic and mucosal IgA responses are variably induced in

- response to SARS-CoV-2 mRNA vaccination and are associated with protection against subsequent infection / S. Sheikh-Mohamed, B. Isho, G. Y. C. Chao et al. // *Mucosal Immunol.* — 2022. — Vol. 15. — № 5. — P. 799–808.
137. Hickey, T.E. SARS-CoV-2 IgG Spike antibody levels and avidity in natural infection or following vaccination with mRNA-1273 or BNT162b2 vaccines. / T. E. Hickey, T. J. Kemp, J. Bullock et al. // *Hum. Vaccin. Immunother.* — 2023. — Vol. 19. — № 2. — P. 2215677.
138. Nakagama, Y. Antibody Avidity Maturation Following Recovery From Infection or the Booster Vaccination Grants Breadth of SARS-CoV-2 Neutralizing Capacity / Y. Nakagama, K. Candray, N. Kaku et al. // *J. Infect. Dis.* — 2023. — Vol. 227. — № 6. — P. 780–787.
139. Garcia, L. Kinetics of the SARS-CoV-2 Antibody Avidity Response Following Infection and Vaccination / L. Garcia, T. Woudenberg, J. Rosado et al. // *Viruses.* — 2022. — Vol. 14. — № 7. — P. 1491.
140. Tauzin, A. Evolution of Anti-RBD IgG Avidity following SARS-CoV-2 Infection / A. Tauzin, G. Gendron-Lepage, M. Nayrac et al. // *Viruses.* — 2022. — Vol. 14. — № 3. — P. 532.
141. Goldblatt, D. Correlates of protection against SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease / D. Goldblatt, G. Alter, S. Crotty, S. A. Plotkin // *Immunol. Rev.* — 2022. — Vol. 310. — № 1. — P. 6–26.
142. Moriyama, S. Temporal maturation of neutralizing antibodies in COVID-19 convalescent individuals improves potency and breadth to circulating SARS-CoV-2 variants / S. Moriyama, Y. Adachi, T. Sato et al. // *Immunity.* — 2021. — Vol. 54. — № 8. — P. 1841-1852.e4.
143. Wang, M. Microglia-Mediated Neuroinflammation: A Potential Target for the Treatment of Cardiovascular Diseases / M. Wang, W. Pan, Y. Xu et al. // *J. Inflamm. Res.* — 2022. — Vol. 15. — P. 3083–3094.
144. Dapporto, F. Antibody Avidity and Neutralizing Response against SARS-CoV-2 Omicron Variant after Infection or Vaccination / F. Dapporto, S. Marchi, M. Leonardi et al. // *J. Immunol. Res.* — / ed. Passero L. F. 2022. — Vol. 2022. — P.

- 1–9.
145. Monroe, J.M. Longitudinal antibody titer, avidity, and neutralizing responses after SARS-CoV-2 infection / J. M. Monroe, I. H. Haralambieva, N. D. Warner et al. // *Heliyon*. — 2022. — Vol. 8. — № 11. — P. e11676.
146. Bellusci, L. Antibody affinity and cross-variant neutralization of SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.2 and BA.3 following third mRNA vaccination / L. Bellusci, G. Grubbs, F. T. Zahra et al. // *Nat. Commun.* — 2022. — Vol. 13. — № 1. — P. 4617.
147. Gushchin, V.A. Neutralizing Activity of Sera from Sputnik V-Vaccinated People against Variants of Concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants / V. A. Gushchin, I. V. Dolzhikova, A. M. Shchetinin et al. // *Vaccines*. — 2021. — Vol. 9. — № 7. — P. 779.
148. Hassan, A.O. A SARS-CoV-2 Infection Model in Mice Demonstrates Protection by Neutralizing Antibodies / A. O. Hassan, J. B. Case, E. S. Winkler et al. // *Cell*. — 2020. — Vol. 182. — № 3. — P. 744-753.e4.
149. Alsoussi, W.B. A Potently Neutralizing Antibody Protects Mice against SARS-CoV-2 Infection / W. B. Alsoussi, J. S. Turner, J. B. Case et al. // *J. Immunol.* — 2020. — Vol. 205. — № 4. — P. 915–922.
150. Bauer, G. The potential significance of high avidity immunoglobulin G (IgG) for protective immunity towards SARS-CoV-2 / G. Bauer // *Int. J. Infect. Dis.* — 2021. — Vol. 106. — P. 61–64.
151. Muecksch, F. Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency, breadth, and resilience to viral escape mutations / F. Muecksch, Y. Weisblum, C. O. Barnes et al. // *Immunity*. — 2021. — Vol. 54. — № 8. — P. 1853-1868.e7.
152. Victora, G.D. Germinal Centers / G. D. Victora, M. C. Nussenzweig // *Annu. Rev. Immunol.* — 2022. — Vol. 40. — № 1. — P. 413–442.
153. Izhaeva, F.M. The Parameters of Long-Term Humoral Immunity Induced by a Single Injection of the Sputnik Light Vaccine Among Noninfected Volunteers and Those Infected with SARS-CoV-2. / F. M. Izhaeva, A. I. Tukhvatulin, A. S.

- Dzharullaeva et al. // *Acta Naturae*. — 2025. — Vol. 17. — № 1. — P. 52–63.
154. Löfström, E. Dynamics of IgG-avidity and antibody levels after Covid-19 / E. Löfström, A. Eringfält, A. Kötz et al. // *J. Clin. Virol.* — 2021. — Vol. 144. — P. 104986.
155. Rayon, T. Species-specific pace of development is associated with differences in protein stability / T. Rayon, D. Stamataki, R. Perez-Carrasco et al. // *Science*. — 2020. — Vol. 369. — № 6510.
156. Bjornson-Hooper, Z.B. A Comprehensive Atlas of Immunological Differences Between Humans, Mice, and Non-Human Primates / Z. B. Bjornson-Hooper, G. K. Fragiadakis, M. H. Spitzer et al. // *Front. Immunol.* — 2022. — Vol. 13.
157. Collier, A.Y. Differential Kinetics of Immune Responses Elicited by Covid-19 Vaccines / A. Y. Collier, J. Yu, K. McMahan et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2021. — Vol. 385. — № 21. — P. 2010–2012.
158. Ssewanyana, I. Impact of a Rapid Decline in Malaria Transmission on Antimalarial IgG Subclasses and Avidity / I. Ssewanyana, J. Rek, I. Rodriguez et al. // *Front. Immunol.* — 2021. — Vol. 11.
159. Bullock, J.L. Longitudinal Assessment of BNT162b2- and mRNA-1273-Induced Anti-SARS-CoV-2 Spike IgG Levels and Avidity Following Three Doses of Vaccination / J. L. Bullock, T. E. Hickey, T. J. Kemp et al. // *Vaccines*. — 2024. — Vol. 12. — № 5. — P. 516.
160. Madhavan, M. Tolerability and immunogenicity of an intranasally-administered adenovirus-vectored COVID-19 vaccine: An open-label partially-randomised ascending dose phase I trial / M. Madhavan, A. J. Ritchie, J. Aboagye et al. // *eBioMedicine*. — 2022. — Vol. 85. — P. 104298.
161. Irvine, D.J. Controlling timing and location in vaccines / D. J. Irvine, A. Aung, M. Silva // *Adv. Drug Deliv. Rev.* — 2020. — Vol. 158. — P. 91–115.
162. Kehagia, E. Advances in intranasal vaccine delivery: A promising non-invasive route of immunization / E. Kehagia, P. Papakyriakopoulou, G. Valsami // *Vaccine*. — 2023. — Vol. 41. — № 24. — P. 3589–3603.
163. You, X. Heterogeneity of tertiary lymphoid structures in cancer / X. You, K. Koop,

- A. Weigert // *Front. Immunol.* — 2023. — Vol. 14.
164. Pizzolla, A. Nasal-associated lymphoid tissues (NALTs) support the recall but not priming of influenza virus-specific cytotoxic T cells / A. Pizzolla, Z. Wang, J. R. Groom et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci.* — 2017. — Vol. 114. — № 20. — P. 5225–5230.
165. Carvalho, T. Intranasal COVID-19 vaccine fails to induce mucosal immunity / T. Carvalho // *Nat. Med.* — 2022. — Vol. 28. — № 12. — P. 2439–2440.
166. van Doremalen, N. Intranasal ChAdOx1 nCoV-19/AZD1222 vaccination reduces viral shedding after SARS-CoV-2 D614G challenge in preclinical models / N. van Doremalen, J. N. Purushotham, J. E. Schulz et al. // *Sci. Transl. Med.* — 2021. — Vol. 13. — № 607.
167. Schultz, M.D. A single intranasal administration of AdCOVID protects against SARS-CoV-2 infection in the upper and lower respiratory tracts / M. D. Schultz, J. J. Suschak, D. Botta et al. // *Hum. Vaccin. Immunother.* — 2022. — Vol. 18. — № 6.
168. Moi, M.L. Marmosets (*Callithrix jacchus*) as a non-human primate model for evaluation of candidate dengue vaccines: Induction and maintenance of specific protective immunity against challenges with clinical isolates / M. L. Moi, Y. Ami, N. A. Muhammad Azami et al. // *J. Gen. Virol.* — 2017. — Vol. 98. — № 12. — P. 2955–2967.
169. Gaebler, C. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2 / C. Gaebler, Z. Wang, J. C. C. Lorenzi et al. // *Nature.* — 2021. — Vol. 591. — № 7851. — P. 639–644.
170. Chen, S. Intranasal adenovirus-vectored Omicron vaccine induced nasal immunoglobulin A has superior neutralizing potency than serum antibodies / S. Chen, Z. Zhang, Q. Wang et al. // *Signal Transduct. Target. Ther.* — 2024. — Vol. 9. — № 1. — P. 190.
171. Waki, K. Comprehensive analysis of nasal IgA antibodies induced by intranasal administration of the SARS-CoV-2 spike protein / K. Waki, H. Tani, E. Kawahara et al. // *Elife.* — 2025. — Vol. 12.

172. Rein, D.B. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005 / D. B. Rein, G. A. Stevens, J. Theaker et al. // *Hepatology*. — 2012. — Vol. 55. — № 4. — P. 988–997.
173. Khuroo, M.S. Hepatitis E: Discovery, global impact, control and cure / M. S. Khuroo, M. S. Khuroo, N. S. Khuroo // *World Journal of Gastroenterology* 2016. — Vol. 22. — № 31. — P. 7030–7045.
174. Webb, G.W. Hepatitis E: an expanding epidemic with a range of complications / G. W. Webb, H. R. Dalton // *Clinical Microbiology and Infection* 2020. — Vol. 26. — № 7. — P. 828–832.
175. Kamar, N. Hepatitis E virus infection / N. Kamar, H. R. Dalton, F. Abravanel, J. Izopet // *Clin. Microbiol. Rev.* — 2014. — Vol. 27. — № 1. — P. 116–138.
176. Pavio, N. Zoonotic origin of hepatitis E / N. Pavio, X. J. Meng, V. Doceul // *Curr. Opin. Virol.* — 2015. — Vol. 10. — P. 34–41.
177. Smith, D.B. Classification and Genomic Diversity of Enterically Transmitted Hepatitis Viruses. / D. B. Smith, P. Simmonds // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* — 2018. — Vol. 8. — № 9.
178. Purdy, M.A. ICTV virus taxonomy profile: Hepeviridae / M. A. Purdy, T. J. Harrison, S. Jameel et al. // *J. Gen. Virol.* — 2017. — Vol. 98. — № 11. — P. 2645–2646.
179. Takahashi, M. Hepatitis E virus (HEV) strains in serum samples can replicate efficiently in cultured cells despite the coexistence of HEV antibodies: Characterization of HEV virions in blood circulation / M. Takahashi, T. Tanaka, H. Takahashi et al. // *J. Clin. Microbiol.* — 2010. — Vol. 48. — № 4. — P. 1112–1125.
180. Reyes, G.R. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis / G. R. Reyes, M. A. Purdy, J. P. Kim et al. // *Science*. — 1990. — Vol. 247. — № 4948. — P. 1335–1339.
181. Nan, Y. Molecular biology and infection of hepatitis E virus / Y. Nan, Y. J. Zhang // *Frontiers in Microbiology*. — 2016. — Vol. 7. — № SEP. — P. 1419.
182. Chandra, V. The Hepatitis E Virus ORF3 Protein Modulates Epidermal Growth

- Factor Receptor Trafficking, STAT3 Translocation, and the Acute-Phase Response / V. Chandra, A. Kar-Roy, S. Kumari et al. // *J. Virol.* — 2008. — Vol. 82. — № 14. — P. 7100–7110.
183. Lei, Q. HEV ORF3 downregulates TLR7 to inhibit the generation of type I interferon via impairment of multiple signaling pathways / Q. Lei, L. Li, S. Zhang et al. // *Sci. Rep.* — 2018. — Vol. 8. — № 1.
184. Yang, Y.L. Open reading frame 3 protein of hepatitis e virus: Multi-function protein with endless potential / Y. L. Yang, Y. C. Nan // *World Journal of Gastroenterology* 2021. — Vol. 27. — № 20. — P. 2458–2473.
185. Nair, V.P. Endoplasmic Reticulum Stress Induced Synthesis of a Novel Viral Factor Mediates Efficient Replication of Genotype-1 Hepatitis E Virus / V. P. Nair, S. Anang, C. Subramani et al. // *PLoS Pathog.* — / ed. Meng X.-J. 2016. — Vol. 12. — № 4. — P. e1005521.
186. Jameel, S. Expression in animal cells and characterization of the hepatitis E virus structural proteins. / S. Jameel, M. Zafrullah, M. H. Ozdener, S. K. Panda // *J. Virol.* — 1996. — Vol. 70. — № 1.
187. Yin, X. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection / X. Yin, D. Ying, S. Lhomme et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2018. — Vol. 115. — № 18. — P. 4773–4778.
188. Montpellier, C. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein / C. Montpellier, C. Wychowski, I. M. Sayed et al. // *Gastroenterology.* — 2018. — Vol. 154. — № 1. — P. 211-223.e8.
189. Li, Y. Prophylactic hepatitis E vaccines: Antigenic analysis and serological evaluation / Y. Li, X. Huang, Z. Zhang et al. // *Viruses* 2020. — Vol. 12. — № 1.
190. Shiota, T. The Hepatitis E Virus Capsid C-Terminal Region Is Essential for the Viral Life Cycle: Implication for Viral Genome Encapsidation and Particle Stabilization / T. Shiota, T.-C. Li, S. Yoshizaki et al. // *J. Virol.* — 2013. — Vol. 87. — № 10. — P. 6031–6036.
191. Wang, B. Structural and molecular biology of hepatitis E virus / B. Wang, X. J. Meng // *Computational and Structural Biotechnology Journal* 2021. — Vol. 19. —

- P. 1907–1916.
192. Guu, T.S.Y. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding / T. S. Y. Guu, Z. Liu, Q. Ye et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2009. — Vol. 106. — № 31. — P. 12992–12997.
 193. Li, S.-W.W. Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid / S.-W. W. Li, J. Zhang, Z.-Q. Q. He et al. // *J. Biol. Chem.* — 2005. — Vol. 280. — № 5. — P. 3400–3406.
 194. Li, S. Dimerization of hepatitis E virus capsid protein E2s domain is essential for virus-host interaction / S. Li, X. Tang, J. Seetharaman et al. // *PLoS Pathog.* — 2009. — Vol. 5. — № 8. — P. e1000537.
 195. Yamashita, T. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure / T. Yamashita, Y. Mori, N. Miyazaki et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2009. — Vol. 106. — № 31. — P. 12986–12991.
 196. Zhang, J.-Z. Conformational antigenic determinants generated by interactions between a bacterially expressed recombinant peptide of the hepatitis E virus structural protein / J.-Z. Zhang, M. H. Ng, N. S. Xia et al. // *J. Med. Virol.* — 2001. — Vol. 64. — № 2. — P. 125–132.
 197. Li, S.W. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: Antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates / S. W. Li, J. Zhang, Y. M. Li et al. // *Vaccine.* — 2005. — Vol. 23. — № 22. — P. 2893–2901.
 198. Cao, Y.F. A phase 1 randomized open-label clinical study to evaluate the safety and tolerability of a novel recombinant hepatitis E vaccine / Y. F. Cao, H. Tao, Y. M. Hu et al. // *Vaccine.* — 2017. — Vol. 35. — № 37. — P. 5073–5080.
 199. Zheng, M. Characterization of capsid protein (p495) of hepatitis E virus expressed in *Escherichia coli* and assembling into particles in vitro / M. Zheng, J. Jiang, X. Zhang et al. // *Vaccine.* — 2018. — Vol. 36. — № 16. — P. 2104–2111.
 200. Mazalovska, M. Progress in the production of virus-like particles for vaccination against hepatitis E virus / M. Mazalovska, J. C. Kouokam // *Viruses* 2020. — Vol. 12. — № 8.

201. Zhang, J. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein / J. Zhang, Y. Gu, S. X. Ge et al. // *Vaccine*. — 2005. — Vol. 23. — № 22. — P. 2881–2892.
202. Innis, B.L. Immunization against Hepatitis E / B. L. Innis, J. A. Lynch // *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2018. — Vol. 8. — № 11.
203. Wu, T. Difference of T cell and B cell activation in two homologous proteins with similar antigenicity but great distinct immunogenicity / T. Wu, X. lu Wu, S. hai Ou et al. // *Mol. Immunol.* — 2007. — Vol. 44. — № 12. — P. 3261–3266.
204. Milich, D.R. Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core / D. R. Milich, M. Chen, F. Schödel et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 1997. — Vol. 94. — № 26. — P. 14648–14653.
205. Wang, S. Rabbit and human hepatitis E virus strains belong to a single serotype / S. Wang, X. Cheng, X. Dai et al. // *Virus Res.* — 2013. — Vol. 176. — № 1–2. — P. 101–106.
206. Meng, J. Identification and characterization of the neutralization epitope(s) of the hepatitis E virus / J. Meng, X. Dai, J. C. Chang et al. // *Virology*. — 2001. — Vol. 288. — № 2. — P. 203–211.
207. Cao, Y. Development of new hepatitis E vaccines / Y. Cao, Z. Bing, S. Guan et al. // *Human Vaccines and Immunotherapeutics* 2018. — Vol. 14. — № 9. — P. 2254–2262.
208. Shrestha, M.P. Safety and Efficacy of a Recombinant Hepatitis E Vaccine / M. P. Shrestha, R. M. Scott, D. M. Joshi et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2007. — Vol. 356. — № 9. — P. 895–903.
209. Xiamen Innovax Biotech CO., LTD. (INNOVAX) [Electronic resource] URL: http://www.innovax.cn/en/news_view.aspx?newsCateid=56&cateid=56&NewsId=1005 (accessed: 31.05.2021).
210. Kirkwood, C.D. Hepatitis E should be a global public health priority: recommendations for improving surveillance and prevention / C. D. Kirkwood, K. R. Dobscha, A. D. Steele // *Expert Review of Vaccines* 2020. — Vol. 19. — № 12. — P. 1129–1140.

211. Zhang, J. Randomized-controlled phase II clinical trial of a bacterially expressed recombinant hepatitis E vaccine / J. Zhang, C. bo Liu, R. cheng Li et al. // *Vaccine*. — 2009. — Vol. 27. — № 12. — P. 1869–1874.
212. Zhu, F.C. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: A large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial / F. C. Zhu, J. Zhang, X. F. Zhang et al. // *Lancet*. — 2010. — Vol. 376. — № 9744. — P. 895–902.
213. Zhang, J. Long-term efficacy of a hepatitis E vaccine. / J. Zhang, X.-F. Zhang, S.-J. Huang et al. // *N. Engl. J. Med.* — 2015. — Vol. 372. — № 15. — P. 1478.
214. Kmush, B.L. Long-term antibody persistence after hepatitis e virus infection and vaccination in Dongtai, China / B. L. Kmush, H. Yu, S. Huang et al. // *Open Forum Infect. Dis.* — 2019. — Vol. 6. — № 4.
215. Wen, J. Immunogenicity difference between two hepatitis e vaccines derived from genotype 1 and 4 / J. Wen, N. Behloul, X. Dai et al. // *Antiviral Res.* — 2016. — Vol. 128. — P. 36–42.
216. Wang, X. Characterization of Two Novel Linear B-Cell Epitopes in the Capsid Protein of Avian Hepatitis E Virus (HEV) That Are Common to Avian, Swine, and Human HEVs / X. Wang, Q. Zhao, L. Dang et al. // *J. Virol.* — / ed. Ou J.-H. J. 2015. — Vol. 89. — № 10. — P. 5491–5501.
217. Zhao, Q. Antigenic properties of avian hepatitis E virus capsid protein / Q. Zhao, S. F. Syed, E. M. Zhou // *Veterinary Microbiology* 2015. — Vol. 180. — № 1–2. — P. 10–14.
218. Михайлов, М.И. Энтеральные вирусные гепатиты (этиология, эпидемиология, диагностика, профилактика) / М. И. Михайлов, И. В. Шахгильдян, Г. Г. Онищенко Москва, 2007. — 349 с.
219. Догадов, Д.И. Энтеральные вирусные гепатиты у обезьян / Д. И. Догадов, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов // *Вопросы вирусологии*. — 2022. — Т. 67. — № 3. — С. 173–184.
220. Balayan, M.S. Evidence for a virus in Non-A, Non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route / M. S. Balayan, A. G. Andjaparidze, S. S. Savin Skaya et al. //

- Intervirology. — 1983. — Vol. 20. — № 1. — P. 23–31.
221. Corneillie, L. Animal models for hepatitis e virus / L. Corneillie, D. H. Banda, P. Meuleman // *Viruses* 2019. — Vol. 11. — № 6.
222. Huang, W. Cross-protection of hepatitis E virus genotypes 1 and 4 in rhesus macaques / W. Huang, H. Zhang, T. J. Harrison et al. // *J. Med. Virol.* — 2008. — Vol. 80. — № 5. — P. 824–832.
223. Wang, L. Animal models for hepatitis E virus / L. Wang, L. Wang // *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2016. — Vol. 948. — P. 161–173.
224. Гуляев, С.А. Моделирование вирусного гепатита Е на карликовых домашних свиньях. / С. А. Гуляев, И. А. Потемкин, В. С. Кичатова и др. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* — 2017. — Т. 94. — № 4. — С. 48–54.
225. Krawczynski, K. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection / K. Krawczynski, X. J. Meng, J. Rybczynska // *Virus Res.* — 2011. — Vol. 161. — № 1. — P. 78–83.
226. Ma, H. Experimental infection of rabbits with rabbit and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses / H. Ma, L. Zheng, Y. Liu et al. // *PLoS One.* — 2010. — Vol. 5. — № 2.
227. Полещук, В.Ф. Моделирование гепатита А и энтерально передающегося гепатита ни А ни В (гепатит Е) на тамаринах *Saguinus mustax* / В. Ф. Полещук, М. С. Балаян, А. Г. Анджапаридзе и др. // *Вопросы вирусологии.* — 1990. — Т. 35. — № 5. — С. 379–382.
228. Balayan, M.S. Experimental infection with enterically transmitted non-A,non-B hepatitis in monkeys and serial passages of the virus / M. S. Balayan, N. A. Zamiatina, A. G. Andjaparidze // *Sov. Med. Rev. E Virol. Rev.* — 1992. — № 4. — P. 19–29.
229. Orsi, A. Overview of the marmoset as a model in nonclinical development of pharmaceutical products / A. Orsi, D. Rees, I. Andreini et al. // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* — 2011. — Vol. 59. — № 1. — P. 19–27.
230. Полещук, В.Ф. Моделирование гепатита Е на тамаринах (*S. mustax*), мармозетах (*C. jacchus*) и яванских макаках (*M. fascicularis*) / В. Ф. Полещук,

- К. К. Кюрегян, Н. А. Замятина и др. // Мир вирусных гепатитов. — 2008. — Т. 2. — С. 2–4.
231. Meng, X.J. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus / X. J. Meng, R. H. Purcell, P. G. Halbur et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. — 1997. — Vol. 94. — № 18. — P. 9860–9865.
232. Lee, Y.H. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs / Y. H. Lee, Y. Ha, K. K. Ahn, C. Chae // Vet. J. — 2009. — Vol. 179. — № 3. — P. 417–421.
233. de Deus, N. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm / N. de Deus, M. Casas, B. Peralta et al. // Vet. Microbiol. — 2008. — Vol. 132. — № 1–2. — P. 19–28.
234. Choi, C. Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization / C. Choi, C. Chae // J. Hepatol. — 2003. — Vol. 38. — № 6. — P. 827–832.
235. Sharp, P.M. The codon adaptation index—a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications / P. M. Sharp, W. H. Li // Nucleic Acids Res. — 1987. — Vol. 15. — № 3. — P. 1281–1295.
236. Кюрегян, К.К. Белгородская область — эндемичный по гепатиту Е регион / К. К. Кюрегян, А. Д. Поляков, И. А. Потемкин и др. // Вопросы вирусологии. — 2019. — Т. 64. — № 6. — С. 274–280.
237. Jothikumar, N. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus / N. Jothikumar, T. L. Cromeans, B. H. Robertson et al. // J. Virol. Methods. — 2006. — Vol. 131. — № 1. — P. 65–71.
238. Inoue, H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids / H. Inoue, H. Nojima, H. Okayama // Gene. — 1990. — Vol. 96. — № 1. — P. 23–28.
239. Дьяррассуба, А. Стандартизация диагностики гепатита Е / А. Дьяррассуба, И. А. Потемкин, М. А. Лопатухина и др. // Клин. лаб. диагн. — 2016. — Т. 2016. — № 5. — С. 299–303.
240. Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // Mol. Biol. Evol. — 2016. —

- Vol. 33. — № 7. — P. 1870–1874.
241. Smith, D.B. Proposed reference sequences for hepatitis E Virus subtypes / D. B. Smith, P. Simmonds, J. Izopet et al. // *Journal of General Virology* 2016. — Vol. 97. — № 3. — P. 537–542.
242. Михайлов М.И. Групповая заболеваемость гепатитом Е в г. Коврове Владимирской области (предварительное сообщение) / М. И. Михайлов, Е. Ю. Малинникова, К. К. Кюрегян и др. // *Медицинская вирусология*. — 2009. — Т. 26. — С. 239–245.
243. Mansuy, J.M. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors / J. M. Mansuy, P. Gallian, C. Dimeglio et al. // *Hepatology*. — 2016. — Vol. 63. — № 4. — P. 1145–1154.
244. Mikhailov, M.I. Geographic and Temporal Variability of Hepatitis E Virus Circulation in the Russian Federation / M. I. Mikhailov, A. A. Karlsen, I. A. Potemkin et al. // *Viruses*. — 2022. — Vol. 15. — № 1. — P. 37.
245. Liang, J.-H. A Single Amino Acid Substitution Changes Antigenicity of ORF2-Encoded Proteins of Hepatitis E Virus / J.-H. Liang, X. Dai, C. Dong, J.-H. Meng // *Int. J. Mol. Sci.* — 2010. — Vol. 11. — № 8. — P. 2962–2975.
246. Pallerla, S.R. Hepatitis e virus infection: Circulation, molecular epidemiology, and impact on global health / S. R. Pallerla, D. Harms, R. Johne et al. // *Pathogens* 2020. — Vol. 9. — № 10. — P. 1–21.
247. Todt, D. Robust hepatitis e virus infection and transcriptional response in human hepatocytes / D. Todt, M. Friesland, N. Moeller et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* — 2020. — Vol. 117. — № 3. — P. 1731–1741.
248. Shukla, P. Adaptation of a Genotype 3 Hepatitis E Virus to Efficient Growth in Cell Culture Depends on an Inserted Human Gene Segment Acquired by Recombination / P. Shukla, H. T. Nguyen, K. Faulk et al. // *J. Virol.* — 2012. — Vol. 86. — № 10. — P. 5697–5707.
249. Yu, X. Safety and immunogenicity of hepatitis E vaccine in elderly people older than 65 years / X. Yu, Z. Chen, S. Wang et al. // *Vaccine*. — 2019. — Vol. 37. — № 32. — P. 4581–4586.

250. Li, T.C. Expression and self-assembly of empty virus-like particles of hepatitis E virus. / T. C. Li, Y. Yamakawa, K. Suzuki et al. // *J. Virol.* — 1997. — Vol. 71. — № 10. — P. 7207–7213.
251. Xing, L. Structure of hepatitis E virion-sized particle reveals an RNA-dependent viral assembly pathway / L. Xing, T. C. Li, N. Mayazaki et al. // *J. Biol. Chem.* — 2010. — Vol. 285. — № 43. — P. 33175–33183.
252. Carson, M. His-tag impact on structure / M. Carson, D. H. Johnson, H. McDonald et al. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* — 2007. — Vol. 63. — № 3. — P. 295–301.
253. Glynou, K. One-step purification and refolding of recombinant photoprotein aequorin by immobilized metal-ion affinity chromatography / K. Glynou, P. C. Ioannou, T. K. Christopoulos // *Protein Expr. Purif.* — 2003. — Vol. 27. — № 2. — P. 384–390.
254. Гуляев, С.А. Изучение иммуногенности прототипного вакцинного препарата против гепатита Е. / С. А. Гуляев, А. А. Ляшенко, А. М. Чумаков и др. // *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* — 2017. — № 3. — С. 35–43.
255. Кюрегян, К.К. Моделирование вирусного гепатита Е на игрунковых обезьянах / К. К. Кюрегян, В. Ф. Полещук, И. В. Гордейчук и др. // *Бюлл. эксп. биол. мед.* — 2015. — Т. 160. — № 9. — С. 355–359.
256. Dalton, H.R. Transmission and Epidemiology of Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infections. / H. R. Dalton, J. Izopet // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* — 2018. — Vol. 8. — № 11.
257. Primadharsini, P.P. Mechanism of cross-species transmission, adaptive evolution and pathogenesis of hepatitis E virus / P. P. Primadharsini, S. Nagashima, H. Okamoto // *Viruses.* — 2021. — Vol. 13. — № 5.
258. Kramer, J.A. The Common Marmoset as a Model for the Study of Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis: / J. A. Kramer, J. Grindley, A. M. Crowell et al. // *Vet. Pathol.* — 2014. — Vol. 52. — № 2. — P. 404–413.
259. Aravalli, R.N. Utility of Common Marmoset (*Callithrix jacchus*) Embryonic Stem

- Cells in Liver Disease Modeling, Tissue Engineering and Drug Metabolism / R. N. Aravalli, C. J. Steer // *Genes (Basel)*. — 2020. — Vol. 11. — № 7. — P. 1–25.
260. Lanford, R.E. Nonhuman primate models of hepatitis A virus and hepatitis E virus infections / R. E. Lanford, C. M. Walker, S. M. Lemon // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* — 2019. — Vol. 9. — № 2.