

*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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени доктора медицинских наук

Санкт-Петербург — 2026

Работа выполнена в Федеральном государственном автономном научном учреждении «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

**Научный консультант:** доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, и.о. генерального директора ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) Минобрнауки России  
**Ишмухаметов Айдар Айратович**

**Официальные оппоненты:** доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» Минобрнауки России

**Свитич Оксана Анатольевна**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заместитель директора по научной работе ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора

**Горелов Александр Васильевич**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом вакцинопрофилактики и поствакцинальной патологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр инфекционных болезней ФМБА»

**Харит Сусанна Михайловна**

**Ведущая организация:** ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 21.1.017.01. при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова 15/17).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова 15/17) и на сайте [influenza.spb.ru](http://influenza.spb.ru).

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2026 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета Д 21.1.017.01.  
кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

### 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 ключевые параметры, определяющие динамику нарастания численности лабораторной колонии ОИ; 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 Е 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, лимфопротеративный 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 avidности 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 игрунки 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 использовались в ходе доклинических исследований вакцин против COVID-19, разработанных в России, включая исследования безопасности и специфической активности инактивированной  $\beta$ -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; постерный 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; постерный 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 постерный 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

заклучение. Диссертация так же 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.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Материалы и методы исследования**

Все исследования проведены на ОИ, родившихся и содержавшихся в лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян (Лаборатория) ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), оборудованной 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.

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).

Взятие образцов цельной крови ОИ для гематологического и биохимического анализа проводили путем пункции бедренной вены с использованием трехкомпонентных шприцев объемом 2,5 мл с иглами 27G. Максимальный единовременно получаемый объем крови у ОИ массой 400 г составлял 4 мл, что соответствовало 10% объема циркулирующей крови. Подсчет клеточного состава крови и лейкоцитарной формулы проводили вручную с использованием камеры Горяева. Биохимический анализ сыворотки крови животных проводили с использованием автоматизированного биохимического анализатора Cobas с 111 с соответствующим набором жидких реагентов.

Для оценки уровня активации поствакцинального локального мукозального иммунного ответа в ходе испытаний интраназальной формы вакцины Спутник V мазки из полости носа ОИ получали с помощью медицинских урогенитальных зондов

типа А и помещали в 0,1 мл фосфатно-солевого буфера, содержащего коктейль ингибиторов протеиназ (Sigma-Aldrich) и 0,1% азида натрия.

Лимфоидные органы (тимус, селезенка, мезентериальный лимфатический узел и паховый лимфатический узел, региональный к месту введения препарата) для гистологического исследования были зафиксированы сразу после некропии путем погружения в 10% забуференный формалин. Эвтаназию проводили путем передозировки наркоза (внутримышечное введение трехкратной дозы смеси препаратов Ксила (De Adelaar, Нидерланды) и Золетил (Virbac, Франция) под изофлурановой анестезией.

Клоны антител к эпитопам альфа-цепи IgA человека были предоставлены руководителем лаборатории гибридомной технологии ФГБУ «РНЦРХТ им. ак. А.М. Гранова» Минздрава России д.б.н., проф. М.П. Самойлович. Подбор клонов производился в ИФА с рекомбинантным белком, соответствовавшим рецептор-связывающему домену (RBD) S-белка SARS-CoV-2 (B.1.1.1., ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Перечень подобранных в ходе работы клонов антител для проточной цитометрии приведен в Таблице 1.

Таблица 1 — 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	АТ мыши к АГ ОИ	6C9	PE	250204	BioLegend
2.	CD3	АТ мыши к АГ человека	SP34-2	Alexa Fluor 700	557917	BD biosciences
3.	CD20	АТ мыши к АГ человека	H299	FITC	6602381	Beckman Coulter
4.	CD4	АТ мыши к АГ человека	L200	PerCP-Cy5.5	552838	BD biosciences
5.	CD8	АТ мыши к АГ ОИ	6F10	PE	250304	BioLegend
6.	CD69	АТ мыши к АГ человека	L78	APC	654663	BD biosciences
7.	CD62L	АТ мыши к АГ человека	SK11	BV 421	743207	BD biosciences
8.	CD45RO	АТ мыши к АГ человека	UCHL1	PE-Cy7	304230	BioLegend
9.	CD107a	АТ мыши к АГ человека	H4A3	BV 421 421	562623	BD biosciences
10.	CD27	АТ мыши к АГ человека	M-T271	APC	356409	BioLegend

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

Рандомизацию животных в исследованиях безопасности и специфической иммуногенности вакцин КовиВак и Спутник V проводили методом случайных чисел.

Внутримышечное введение вакцин проводилось в переднюю поверхность бедра инсулиновым шприцем с иглой 30G. Интраназальное введение вакцины Спутник V проводили пипеткой в объеме 50 мкл в каждый носовой ход. Животным из контрольных групп вводили препарат плацебо в те же дни и тем же путем, что и исследуемые препараты.

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 подобранный в ходе работы клон антител распознающих альфа-1 и альфа-2-тяжёлые цепи IgA. Детекция сигнала проводилась путем добавления в лунку раствора тетраметилбензидина. Колориметрический сигнал измеряли с использованием 450 нм фильтра на планшетном спектрофотометрическом ридере Multiscan FC (Thermo Fisher, США) после добавления стоп-раствора (1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 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 8M 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.

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.

Уровень вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в крови ОИ оценивали в реакции нейтрализации по ингибированию формирования цитопатического эффекта на культуре клеток Vero с использованием штамма ПИК35 SARS-CoV-2 (GISAID ID EPI\_ISL\_428851) в ходе испытаний вакцины КовиВак и с использованием 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) в ходе испытаний вакцины Спутник V.

Уровень специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа оценивался в лимфопролиферативном тесте после антигенной стимуляции мононуклеаров периферической крови (МПК) с использованием клонов антител, приведенных в Таблице 1. 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.

Консенсусная последовательность гена ORC2 ВГЕ ГТЗ, использованная для получения кандидатного вакцинного препарата, была получена с использованием программного обеспечения SeqMan Ultra на основании последовательностей ВГЕ ГТЗ, выделенные в России от больных гепатитом Е. Синтетический ген длиной 1683 п.н., кодирующий ак 110–660 бОРС2 (далее обозначаемый р551), был сконструирован с использованием индекса адаптации кодонов [Sharp, Li, 1987]. Плазмиду, содержащую полученный ген, использовали для получения р551 в клетках клеток *E. coli* BL21.

Изоляты ВГЕ ГТ1, использованные для экспериментального заражения, были выделены от больных гепатитом Е на территории Кыргызской Республики, а ВГЕ ГТЗ из образцов фекалий свиней, полученных на фермах в Белгородской области в 2016 г. Наличие РНК ВГЕ в фекалиях определяли методом ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ). Наличие частиц ВГЕ в образцах тканей оценивали с помощью электронной микроскопии. Образцы сыворотки ОИ использовали для выявления антител классов IgM и IgG к ВГЕ (анти-ВГЕ), РНК ВГЕ и для измерения уровня биохимических маркеров функции печени (АСТ, АЛТ, ЛДГ, общий билирубин).

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.

Идентификаторы (ID) животных в таблицах соответствуют четырем последним цифрам кода подкожного радиочипа. 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.).

Статистическую значимость различий исследованных параметров оценивали с использованием программного обеспечения Prism (GraphPad, США). Различия считали значимыми при  $p < 0,05$ .

## **РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ**

### **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. Средний возраст самок на момент первых родов составил 37 (СО 12,2) месяцев, минимальный — 24,2 месяца. 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 [Tardif и др., 2003].

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. Поскольку продолжительность беременности у ОИ составляет в среднем 143–144 суток [Tardif и др., 2003], 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. 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.

### **Определение референсных значений гематологического и биохимического анализа крови обыкновенных игрунок**

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.

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.

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).

### **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.

**Морфология лимфоидных органов контрольных животных.** Тимус (Рисунок 1А) 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 [Kaspereit и др., 2006], в том числе присутствовали тельца Гассалья мозгового вещества. В селезенке (Рисунок 1В) 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.

У контрольных животных паховый лимфатический узел, регионарный к месту введения плацебо (Рисунок 1Д), 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.

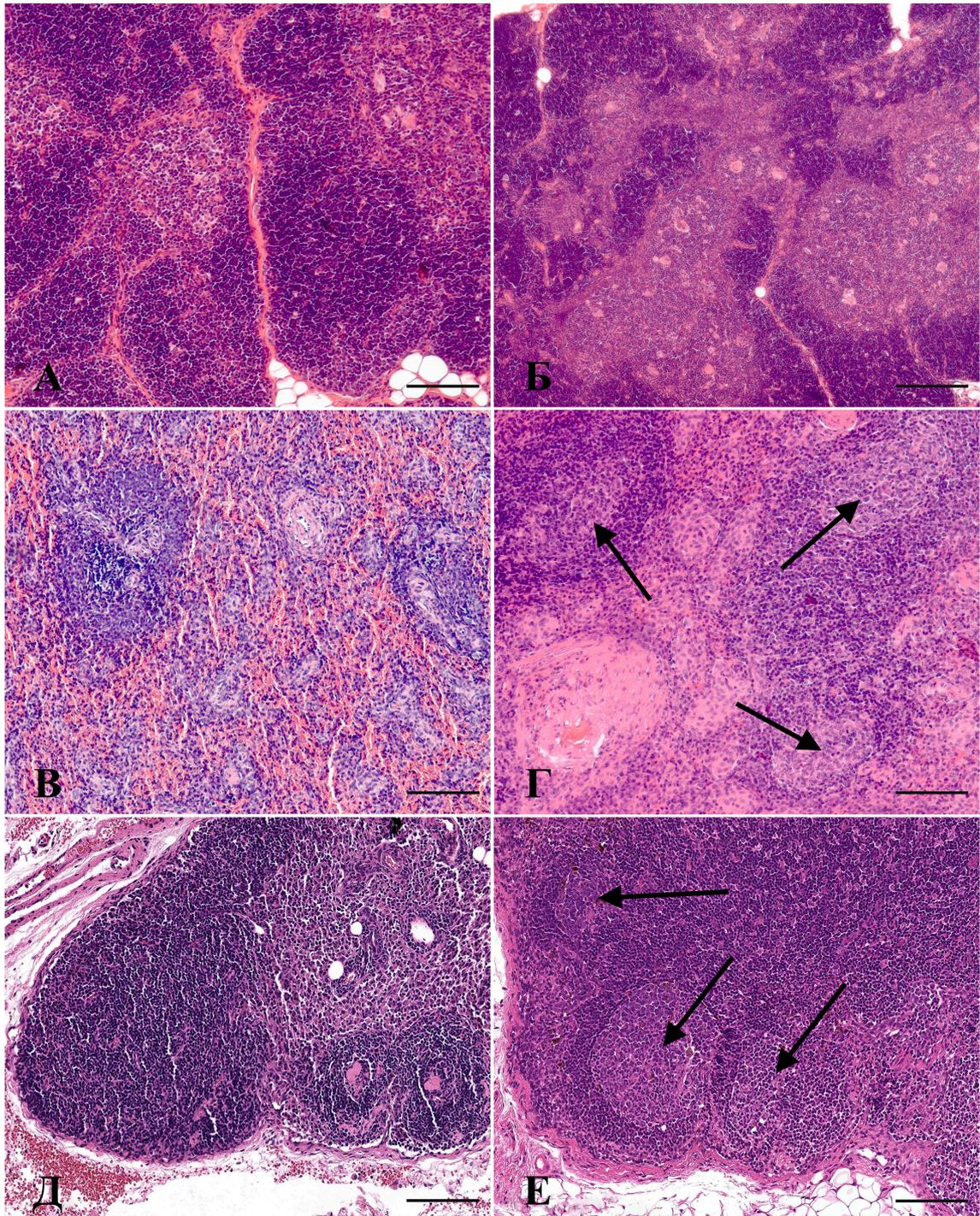


Рисунок 1 — Лимфоидные органы ОИ, получивших цельновирсионную инактивированную вакцину КовиВак (Б, Г, Е), в сравнении с контрольными животными, получившими плацебо (А, В, Д): тимус (А, Б), селезенка (В, Г), регионарный (паховый) лимфатический узел (Д, Е). Стрелки указывают на

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

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 1Б) 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 1Г), 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 1Е), 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.

### **Подбор клонов антител для детекции иммуноглобулинов класса А в образцах сыворотки крови, полученных от обыкновенных игрунок**

Оценка специфического локального мукозального поствакцинального адаптивного иммунного ответа на введение интраназальных вакцин на модели ОИ требовала подбора вторичных антивидовых антител, распознающих IgA ОИ. Семь клонов антител к эпитопам альфа-цепи IgA человека были исследованы в ИФА. Для этого образцы сыворотки крови ОИ, получивших аденовирусную векторную вакцину

против COVID-19 Спутник V, а также ОИ из контрольной группы, получивших плацебо, наносили на планшеты для ИФА, покрытые RBD SARS-CoV-2. Исследуемые клоны, конъюгированные с пероксидазой хрена, использовали в качестве вторичных антител для детекции IgA ОИ. На основании данных иммуноферментного анализа для дальнейшего изучения специфического локального мукозального поствакцинального иммунного ответа у ОИ был выбран клон 3В4 в разведении 1:40000.

### Разработка методики оценки уровня 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 [Brok и др., 2001; Neubert и др., 1995; Neumann и др., 2016]. 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 (Таблица 1), а также определено соотношение субпопуляций лимфоцитов и уровня их активации у здоровых интактных самок и самцов ОИ.

Соотношение субпопуляций МПК, окрашиваемых антиген-специфическими антителами, у интактных ОИ представлено в Таблице 2. CD45<sup>+</sup> лейкоциты составляли 54,3±11,8% от общего количества клеток после лизиса эритроцитов. CD45<sup>+</sup> популяция содержала 22,7±5,5% В-клеток (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup>CD20<sup>+</sup>) и 67,6±6,3% Т-клеток (CD45<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>CD20<sup>-</sup>). Среди CD3<sup>+</sup> клеток 55,7±5,5% составляли Т-хелперы (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>) и 34,3±3,7% — цитотоксические Т-лимфоциты (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>).

Таблица 2 — 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 <sup>+</sup>	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 <sup>+</sup> CD3 <sup>-</sup> CD20 <sup>+</sup>	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 <sup>+</sup> CD20 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	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 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD20 <sup>-</sup>	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 <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> CD27 <sup>+</sup>	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 <sup>+</sup> CD4 <sup>-</sup> CD8 <sup>+</sup>	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 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	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 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	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 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	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 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup>	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 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	49,9	57,7	51,2	49,7	57,8	53,3±4,1	55,5	57,8	66,1	59,8±5,6	<b>55,7±5,5</b>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD62L <sup>+</sup>	47,3	56	73,8	66	43	57,2±12,8	49,1	48,6	47,8	48,5±0,7	<b>54,0±10,7</b>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD69 <sup>+</sup>	1,1	2,3	3,8	4,2	1,7	2,6±1,3	2,0	4,0	2,7	2,9±1,0	<b>2,7±1,2</b>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD45RO <sup>+</sup>	2	1,7	2,3	2,4	1,1	1,9±0,5**	1,3	0,9	1,0	1,1±0,2**	<b>1,6±0,6</b>
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup> CD107a <sup>+</sup>	1,2	0,6	1,5	0,9	0,2	0,9±0,5	0,2	0,9	0,4	0,5±0,4	<b>0,7±0,5</b>

\* — среди популяции лимфоцитов, дифференцированных на основе графика FSC-A/SSC-A при исключении неодинокных 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<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток и на 74,4±12,1% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD69 (ранний маркер Т-клеточной активации): на 2,7±1,2% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток и 1,2±0,5% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD45RO (активированные Т-клетки памяти): на 1,6±0,6% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток и 1,8±0,7% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD107a (активированные Т-клетки): на 0,7±0,5% CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> клеток и 0,5±0,3% CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> клеток; CD27 (TNFRSF7, представитель суперсемейства рецепторов фактора некроза опухолей-7; В-клетки памяти, зрелые Т-клетки): на 94,6±2,1% Т-клеток (CD20<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>). Значения находились в пределах, описанных в исследовании распределения субпопуляций иммунных клеток интактных ОИ, проведенном Neumann и соавт. [Neumann и др., 2016].

В ходе работ, описываемых в данном разделе, была обнаружена более низкая в сравнении с опубликованными данными [Neumann и др., 2016] доля популяции В-клеток памяти CD45<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> (8,9±3,9%), что свидетельствует о низком уровне активации В-клеток ОИ. Причиной наблюдаемых различий может быть более молодой средний возраст (29,3±8,0 месяцев, Таблица 2) 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<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> лимфоцитов, наблюдавшиеся в данном исследовании, были ниже, чем соответствующие показатели, описанные в работе Yoshida и соавт. [Yoshida и др., 2013], что свидетельствовало об активации Т-клеток. Следует отметить, что доля активированных CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> В-клеток коррелировала с долей неактивных CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD62<sup>+</sup> Т-хелперов, но не коррелировала с долей цитотоксических CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>CD62<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> клеток (1,9±0,5% у самок против 1,1±0,2 у самцов;  $t = 2,5658$ ,  $df = 6$ ,  $p = 0,0426$ ; t-тест). Наблюдаемые доли

CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> клеток у самцов и самок находились в рамках значений, описанных ранее для интактных животных [Brok и др., 2001].

Возраст ОИ, использованных в исследовании, был неоднородным, при этом одно животное было значительно старше других (№3016, Таблица 2). В этой связи была проанализирована взаимосвязь между возрастом животных и оцениваемыми иммунными параметрами. Доля В-клеток памяти CD45<sup>+</sup>CD20<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup> 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 ( $p > 0,05$ ).

### **Оценка безопасности вакцины КовиВак на обыкновенных игрунках**

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 ежедневно со дня, предшествующего дню введения первой дозы вакцины. 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. Уровень видимых повреждений и сопутствующий отек значительно уменьшились в течение недели и полностью исчезли к 16 суткам после введения первой дозы вакцины. Незначительная травматизация фаланг животных при ежедневной ловле для взвешивания и термометрии является относительно распространенным явлением и не связано с введением исследуемого препарата. 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. Отек значительно уменьшился в течение недели и практически полностью исчез к окончанию периода наблюдения (28 сутки).

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.

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

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 [Pettersson и др., 2008]. 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% [Marini и др., 2018], так и достигать 5% [Yarbrough и др., 1984]. По нашим собственным данным повышение уровня базофилов до 1% может наблюдаться у клинически здоровых взрослых ОИ [Gordeychuk и др., 2024].

Других значимых различий уровня оцениваемых параметров гематологического и биохимического анализа крови у 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.

### Оценка специфической иммуногенности вакцины КовиВак на обыкновенных игрунках

Результаты сравнительной оценки уровня специфических поствакцинальных вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 у животных в экспериментальной и контрольной группе приведены в Таблице 3.

Таблица 3 — 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.

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.

### **Оценка безопасности интраназальной и внутримышечной форм вакцины Спутник V на обыкновенных игрунках**

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 ( $2 \times 10^{10}$  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,  $2 \times 10^{10}$  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 (Рисунок 2).

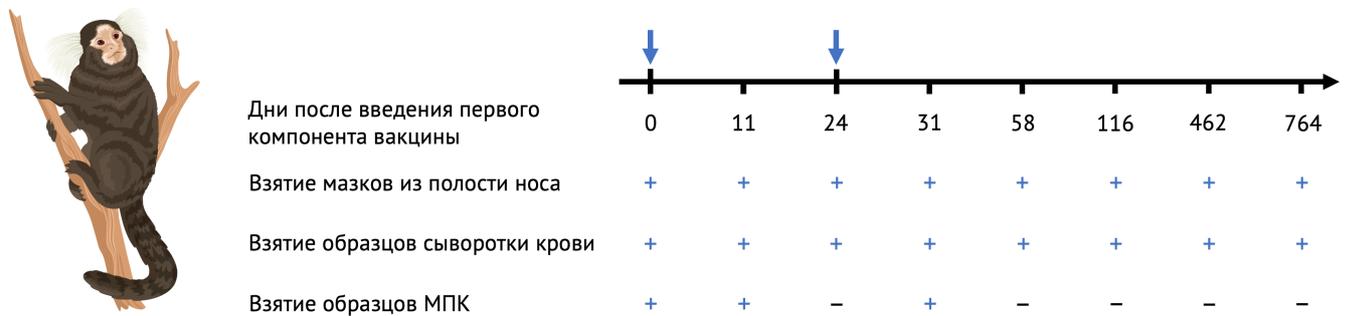


Рисунок 2 — Схема эксперимента. Синими стрелками обозначены дни введения первого и второго компонента вакцины Спутник V. МПК — мононуклеары периферической крови. Плюсами обозначены дни взятия соответствующих образцов

На протяжении исследования только в двух случаях наблюдалось статистически достоверное отличие в уровне оцениваемых показателей безопасности вакцины между экспериментальными группами и контрольной группой. 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  $0,8$  °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 [Logunov и др., 2020; Tikhvatulin и др., 2021]. 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 переносили как внутримышечное, так и интраназальное введение вакцины Спутник V.

### Оценка 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 2). Уровень специфического поствакцинального Т-клеточного иммунного ответа оценивался в лимфопролиферативном тесте после антигенной стимуляции МПК (Рисунок 3).

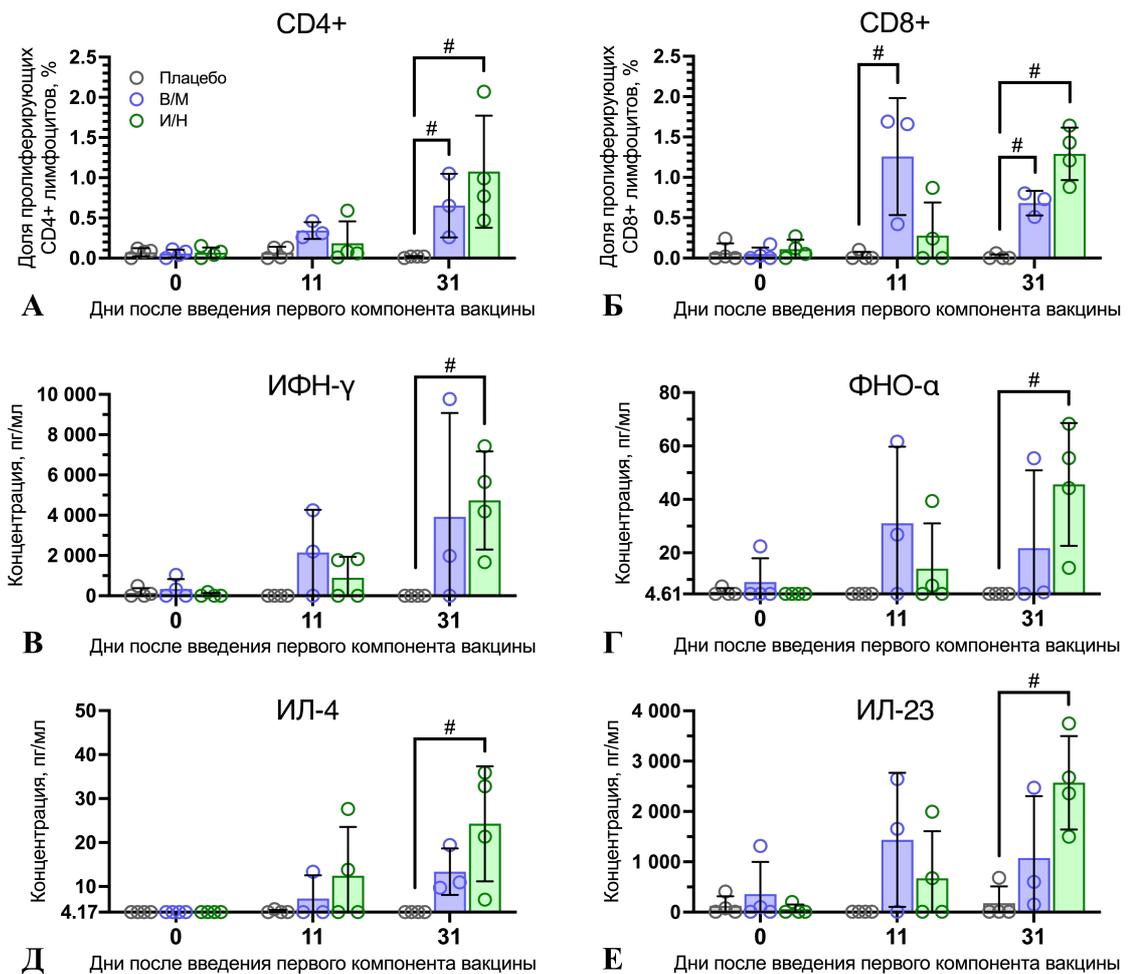


Рисунок 3 — Уровень антиген-специфической пролиферации CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> и CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Т-клеток, а также уровень продукции ИФН- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ , ИЛ-4 и ИЛ-23 после антигенной

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- $\gamma$ ), (Г) фактора некроза опухолей альфа (ФНО- $\alpha$ ), (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 [Mietsch и др., 2020]. 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 3А).

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- $\gamma$ , ФНО- $\alpha$ ), Th2 (ИЛ-4) и Th17 (ИЛ-23) цитокинов после антигенной стимуляции МПК в сравнении с контрольной группой (Рисунок 3Б).

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.

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

Ввиду наличия значительных различий в анатомии верхних дыхательных путей, а также эффективности презентации антигенов со слизистых оболочек носовой полости между людьми и грызунами [Harkema, 1990; Harkema, Carey, Wagner, 2006], 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 4А), что подтвердило предположение о том, что локальный IgA-ответ, вызванный вакцинацией, имеет ограниченную продолжительность [Sheikh-Mohamed и др., 2022]. 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 4Б). Интраназальное введение вакцины не привело к формированию статистически значимого повышения уровня анти-RBD IgG в смывах с полости носа ОИ (Рисунок 4В).

Внутримышечное введение вакцины Спутник V не привело к выработке детектируемых уровней анти-RBD IgA в мазках из полости носа (Рисунок 4А), однако титры анти-RBD IgA в сыворотке крови животных (Рисунок 4Б), а также титры специфических IgG в мазках из полости носа (Рисунок 4В) 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.

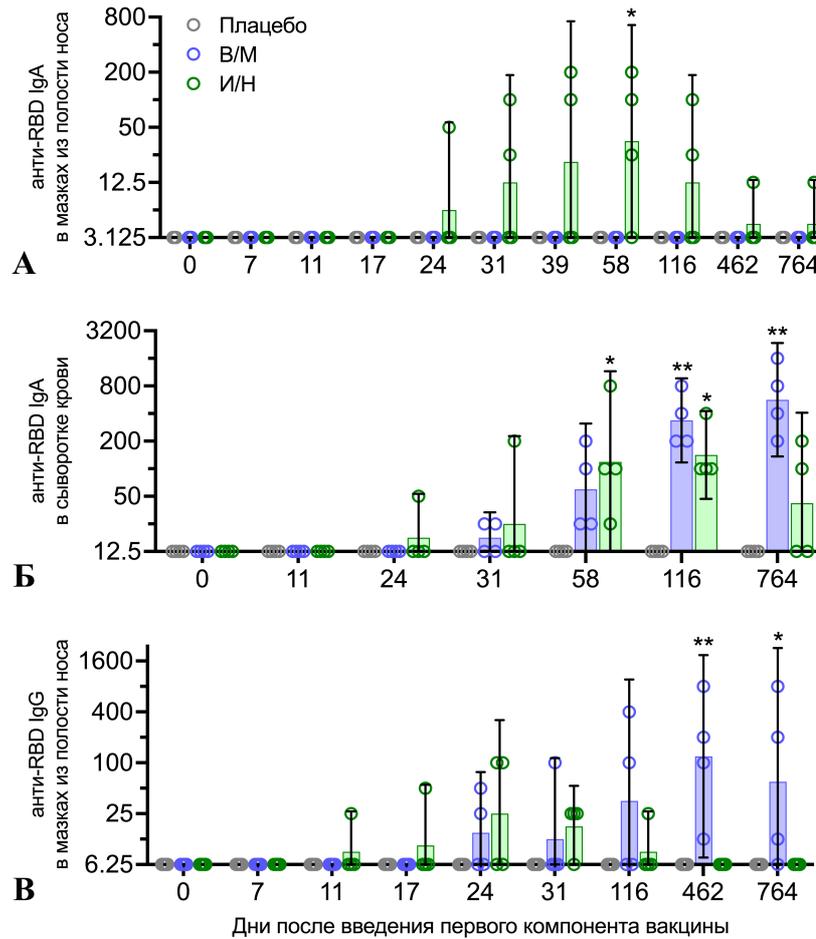


Рисунок 4 — Долгосрочный специфический локальный гуморальный иммунный ответ у ОИ, получивших вакцину Спутник V (два компонента с интервалом 24 суток) внутримышечно (В/М,  $n=4$ ) или интраназально (И/Н,  $n=4$ ), а также в контрольной группе (Плацебо,  $n=4$ ). Уровень IgA, специфичных к RBD S-белка 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

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 [Roy и др., 2023]. 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 5).

Во-первых, титры анти-RBD IgG были в целом выше во всех точках наблюдения в группе ОИ, получивших вакцину внутримышечно (Рисунок 5А). 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).

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 [García и др., 2022; Hickey и др., 2023; Nakagata и др., 2023; Tauzin и др., 2022]. В ходе данной работы оценивали долгосрочные изменения авидности поствакцинальных антител, сформированных в результате внутримышечного и интраназального введения ОИ вакцины Спутник V (Рисунок 5Б).

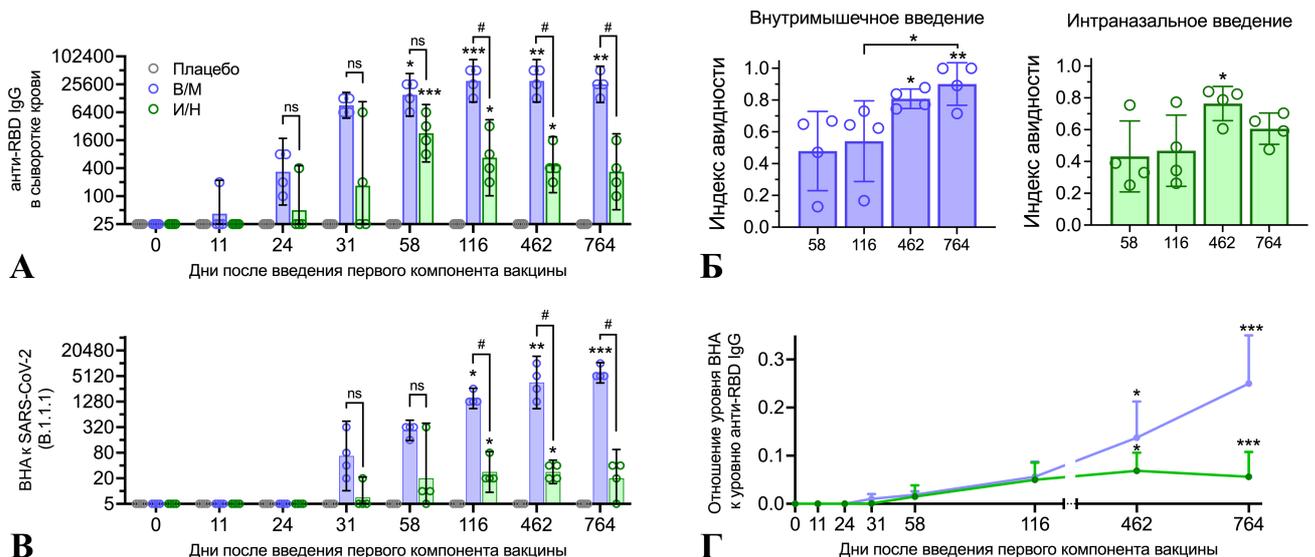


Рисунок 5 — Долгосрочный специфический системный гуморальный иммунный ответ у ОИ, получивших вакцину Спутник V (два компонента с интервалом 24 суток) внутримышечно (В/М, n=4) или интраназально (И/Н, n=4), а также в контрольной группе (Плацебо, n=4). Уровень (А) и индекс авидности (Б) IgG, специфичных к RBD S-белка SARS-CoV-2 в сыворотке крови ОИ; уровень вируснейтрализующих антител

(ВНА) к SARS-CoV-2 (вариант В.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 внутримышечного 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 5Б). 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 [Goldblatt и др., 2022]. На первом этапе данной работы была проведена оценка динамики изменения уровня ВНА к SARS-CoV-2 варианта В.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 5В) — 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 [Moriyama и др., 2021; Wang и др., 2022]. В обеих группах животных, получивших вакцину, наблюдалось повышение соотношения ВНА/IgG с течением времени (Рисунок 5Г). 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 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 иммуоферментного анализа было проведено определение титров антиген-связывающих антител к S-белку варианта В.1.1.1 (штамм Wuhan-Hu-1), гомологичного штамму, использованному при разработке вакцины Спутник V, а также гетерологичных вариантов В.1.617.2 (дельта) и В.1.1.529.5 (омикрон ВА.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 В.1.1.1. (СГТ 36204 и 951, соответственно), титр IgG, специфичных к S-белку гетерологичного варианта SARS-CoV-2 дельта (В.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 (В.1.1.529.5; СГТ 15221 и 400, соответственно) был статистически достоверно ниже ( $p < 0,05$ ) (Рисунок 6А). На 764-й день у животных, получивших вакцину внутримышечно, титры IgG к S-белкам гомологичного (В.1.1.1) и гетерологичных (В.1.617.2 и В.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 6Б).

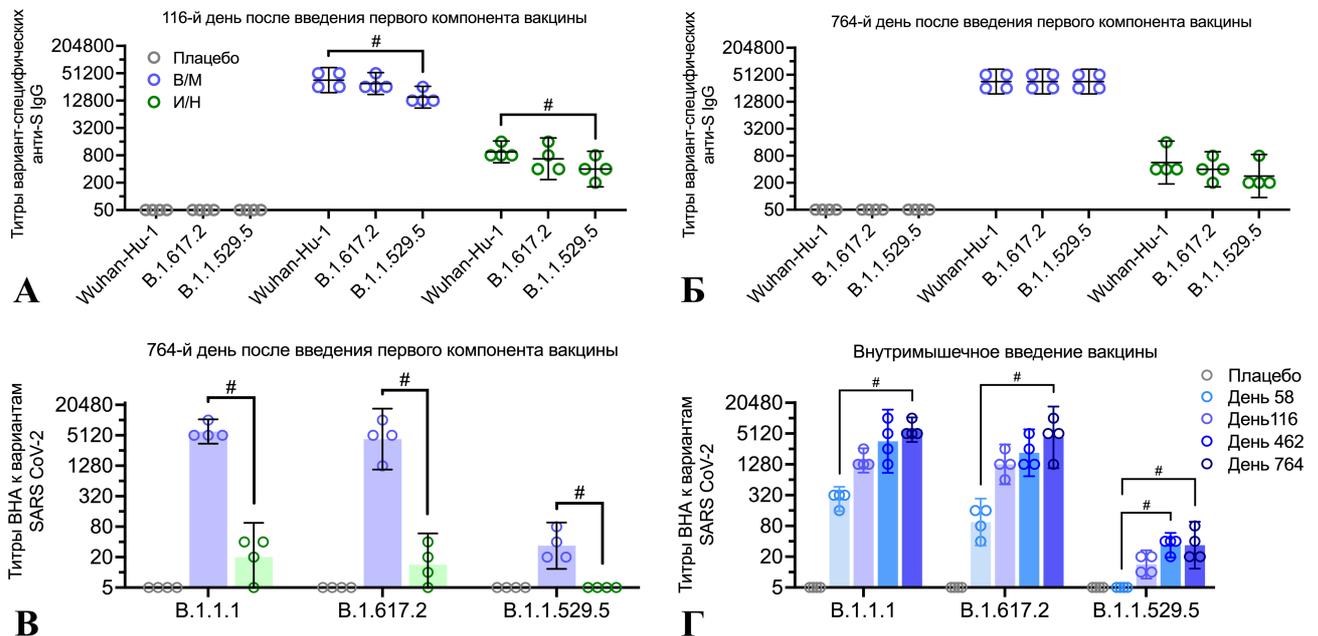


Рисунок 6 — Долгосрочная оценка кросс-вариантной реактивности IgG, специфических к S-белку SARS-CoV-2, и вируснейтрализующих антител (ВНА) у ОИ, получивших вакцину Спутник V (два компонента с интервалом 24 суток) внутримышечно (В/М, n=4) или интраназально (И/Н, n=4), а также в контрольной группе (Плацебо, 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 различным 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 6B). 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 BA.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 6Г). 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).

### **Определение сайтов репликации генома вируса гепатита E в организме обыкновенных игрунок**

Локализацию репликации генома ВГЕ на ранней и поздней стадиях инфекции изучали на двух ОИ (самец и самка). Одно животное было подвергнуто эвтаназии через 1 неделю после заражения, а второе — через 6 недель. 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). Анти-ВГЕ (IgM и IgG) после заражения были обнаружены у обоих животных.

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 [Deus de и др., 2008; Lee и др., 2009], 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 [Choi, Chae, 2003].

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 4).

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 4 — 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 7), 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.

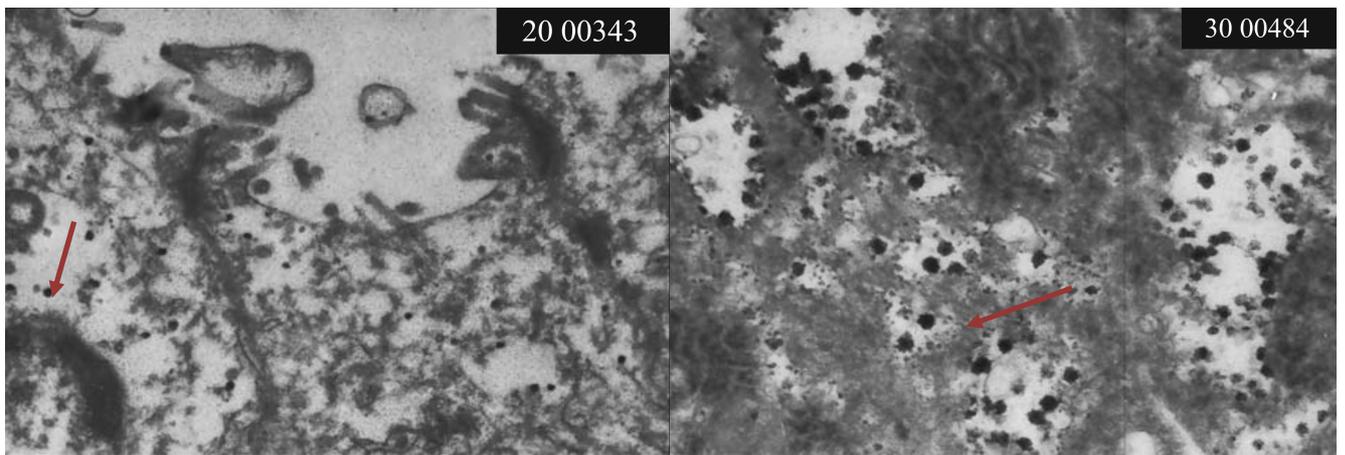


Рисунок 7 — Вирусные частицы ВГЕ (стрелка) в гепатоцитах экспериментально зараженных обыкновенных игрунок. Увеличение 20 тыс. (слева) и 30 тыс. (справа)

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.

### **Оценка специфической иммуногенности и протективности кандидатной вакцины против гепатита Е на обыкновенных игрунках**

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 5). 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 5 — Обыкновенные игрушки, получившие белок р551 ВГЕ ГТЗ ОРС2 с адьювантом или только адьювант и зараженные ВГЕ гомологического ГТЗ или гетерологического ГТ1

ИН	ID	Пол	Иммунизация				Заражение, неделя 27
			№1, неделя 0	№2, неделя 3	№3, неделя 7	№4, неделя 19	
ОИ1 <sup>α</sup>	4519	самец	р551/ адьювант	р551/ адьювант	р551/ адьювант	р551/ адьювант	ВГЕ ГТ1
ОИ2 <sup>β</sup>	4537	самка	р551/ адьювант	р551/ адьювант	р551/ адьювант	р551/ адьювант	ВГЕ ГТ1
ОИ3 <sup>α</sup>	3018	самец	р551/ адьювант	р551/ адьювант	р551/ адьювант	р551/ адьювант	ВГЕ ГТ3
ОИ4 <sup>γ</sup>	4516	самка	р551/ адьювант	р551/ адьювант	р551/ адьювант	р551/ адьювант	ВГЕ ГТ3
ОИ5 <sup>β</sup>	3020	самец	адьювант	адьювант	адьювант	адьювант	ВГЕ ГТ1
ОИ6 <sup>γ</sup>	3019	самец	адьювант	адьювант	адьювант	адьювант	ВГЕ ГТ3

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

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 (Таблица 6). В сыворотках крови контрольных животных анти-ВГЕ IgG отсутствовали до экспериментального заражения (Таблица 6)

Таблица 6 — 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

Дни после введения первой дозы	Процедура	Недели после введения первой дозы	Недели после заражения	Животные (ID, пол)					
				Получившие р551 (n=4)				Получившие плацебо (n=2)	
				4519 самец α	4537 самка β	3018 самец α	4516 самка γ	3020 самец β	3019 самец γ
0	Доза 1	0		0	0	0	0	0	0
24	Доза 2	3		320	160	160	160	0	0
52	Доза 3	7		1280	1280	1280	5120	0	0

84		12		1280	1280	320	1280	0	0
131	Доза 4	19		320	320	320	1280	0	0
188	Заражение	27	0	<b>Заражение ВГЕ ГТ1</b>	<b>Заражение ВГЕ ГТ1</b>	<b>Заражение ВГЕ ГТ3</b>	<b>Заражение ВГЕ ГТ3</b>	<b>Заражение ВГЕ ГТ1</b>	<b>Заражение ВГЕ ГТ3</b>
194		28	1	5120	5120	5120	5120	80	160
201		29	2	5120	5120	5120	5120	5120	5120
208		30	3	5120	5120	5120	5120	5120	5120
215		31	4	5120	5120	5120	5120	5120	5120
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

$\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  — животные, промаркированные одинаковой буквой — близнецы. Разведение видоспецифического конъюгата — 1:10 000. ОП крит. = 0,242.

Через неделю после заражения ВГЕ титры анти-ВГЕ IgG у всех животных, получивших р551, повысились до 1:5120. Средний титр анти-ВГЕ IgG у контрольных животных повысился с 1:113 на 1-й неделе после заражения до 1:5120 на 2 неделе после заражения (Таблица 6). К 33 неделе после введения первой дозы вакцины (6-я неделя после заражения), СГТ анти-ВГЕ IgG у животных, получивших р551, снизился до 1:2560 и оставался на этом уровне более двух лет (до 124-й недели после заражения).

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 7).

Таблица 7 — 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.

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 7). 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 930С>Т, 954Т>G, 981Т>С, 999Т>С, 1005G>А, 1029С>Т, 1047С>Т, 1056Т>С, 1162А>Т. Несинонимическая нуклеотидная замена 1162А>Т 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 (Таблица 8).

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 (Таблица 8). Статистический анализ показал, что уровни АСТ и ЛДГ у ОИ, получивших 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 (Таблица 8).



## 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 разработке экспериментальной модели для оценки специфической активности и безопасности противовирусных вакцин на основе обыкновенных игрунок (*Callithrix jacchus*) включая оптимизацию условий длительного лабораторного содержания животных, определение референсных интервалов основных клинических и биохимических показателей крови, оцениваемых в ходе доклинических исследований иммунобиологических препаратов, гистологическое описание структуры лимфоидных органов в норме и в ходе формирования поствакцинального иммунного ответа и разработку методик оценки уровня активации специфического локального мукозального, системного гуморального и Т-клеточного поствакцинального иммунного ответа.

Разработанные методики успешно применялись в ходе доклинических исследований 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 [Gordeychuk и др., 2023]. С использованием лабораторных ОИ подтверждена безопасность и специфическая иммуногенность интраназальной и внутримышечной формы аденовирусной векторной вакцины против COVID-19 Спутник V, а также проведено исследование долгосрочного созревания поствакцинального иммунного ответа. Получены новые фундаментальные данные о созревании аффинности антител у приматов.

Показано, что ОИ представляют собой адекватную модель для испытаний эффективности кандидатных вакцин против вирусного гепатита E, а также продемонстрирована протективная активность кандидатного препарата, полученного на основе последовательности капсидного белка ВГЕ в отношении заражения как гомологическим ГТЗ ВГЕ, так и гетерологическим ГТ1 ВГЕ.

Результаты работы расширяют представления о физиологии иммунной системы, 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<sup>+</sup> в крови достоверно коррелировала с возрастом животных.
4. С использованием лабораторных обыкновенных игрунок получены подтверждения безопасности и специфической активности инактивированной цельновиральной 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 BA.5), не циркулировавших на момент вакцинации.
8. Обыкновенные игрунки 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 ОРС2 ВГЕ индуцировал выработку специфических анти-ВГЕ IgG и защищал обыкновенных игрунок от гепатита Е 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 Е 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.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

(жирным шрифтом отмечены публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования)

1. Кюрегян К.К., Полещук В.Ф., Гордейчук И.В., Гуляева Т.В., Исаева О.В., Морозов И.А., Михайлов М.И. / Моделирование вирусного гепатита Е на игрунковых обезьянах // **Бюлл. эксп. биол. мед.** — 2015. — Т. 160. — № 9. — С. 355–359 (Web of Science, Scopus, Q3). 0,250/0,036 п.л.
2. Гуляев С.А., Ляшенко А.А., Чумаков А.М., Сорокин А.А., Гордейчук И.В., Потемкин И.А., Исаева О.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. / Изучение иммуногенности прототипного вакцинного препарата против гепатита Е. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 3. – С.35-43. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-3-35-43 (Scopus, RSCI, K1). 0,563/0,063 п.л.
3. Гуляев С.А., Потемкин И.А., Кичатова В.С., Карлсен А.А., Исаева О.В., Гуляева Т.В., Ваннус М.А., Гордейчук И.В., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. / Моделирование вирусного гепатита Е на карликовых домашних свиньях. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 4. – С. 48-54. DOI: 10.36233/0372-9311-2017-4-48-54. (Scopus, RSCI, K1). 0,438/0,044 п.л.
4. Gordeychuk I.V., Tukhvatulina A.I., Petkov S.P., Abakumov M.A., Gulyaev S.A., Tukhvatulina N.M., Gulyaeva T.V., Mikhaylov M.I., Logunov D.Y., Isagulians M.G. / Assessment of the Parameters of Adaptive Cell-Mediated Immunity in Naïve Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) // **Acta Naturae** (англоязычная версия). – 2018. – V. 10. – N. 4 (39). – P. 63-69. – DOI 10.32607/20758251-2018-10-4-63-69 (Web of Science, Scopus, RSCI, Q2). 0,438/0,044 п.л.
5. Dolzhikova I.V., Grousova D.M., Zubkova O.V., Tukhvatulina A.I., Kovyrshina A.V., Lubenets N.L., Ozharovskaia T.A., Popova O., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Evgrafova I.M., Nedorubov A.A., Gordeichuk I.V., Gulyaev S.A., Botikov A.G., Panina L.V., Mishin D.V., Loginova S.Y., Borisevich S.V., Deryabin P.G., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. / Preclinical studies of immunogenicity, protectivity, and safety of the combined vector vaccine for prevention of the middle east respiratory syndrome // **Acta Naturae** (англоязычная версия). – 2020. – V. 12. – N. 3 (46). – P. 114-123. DOI: 10.32607/actanaturae.11042 (Web of Science, Scopus, RSCI, Q2). 0,625/0,027 п.л.
6. Ковыршина А.В., Должикова И.В., Гроусова Д.М., Балясин М.В., Ботиков А.Г., Панина Л.В., Гордейчук И.В., Гуляев С.А., Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Попова О., Тухватулин А.И., Токарская Е.А., Симакова Я.В., Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Евграфова И.М., Дерябин П.Г., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. / Комбинированная векторная вакцина для профилактики ближневосточного респираторного синдрома индуцирует формирование длительного протективного иммунного ответа к коронавирусу БВРС-КОВ. // Иммунология. – 2020. – Т. 41. – № 2. – С. 135-143. DOI: 10.33029/0206-4952-2020-41-2-135-143 (Scopus, RSCI, K1). 0,563/0,026 п.л.

7. Kozlovskaya L., Piniava A., Ignatyev G., Selivanov A., Shishova A., Kovpak A., Gordeychuk I., Ivin Y., Ishmukhametov A., Berestovskaya A., Protsenko D., Prokhortchouk E., Rychev M. / Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak. // **International Journal of Infectious Diseases**. – 2020. – V. 99. – P. 40-46. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.07.024 (Web of Science, Scopus, Q1). 0,563/0,034 п.л.

CORRIGENDUM to Kozlovskaya L., Piniava A., Ignatyev G., Selivanov A., Shishova A., Kovpak A., Gordeychuk I., Ivin Y., Ishmukhametov A., Berestovskaya A., Protsenko D., Rychev M., Prokhortchouk E. / Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak. [Int. J. Infect. Dis. 99 (2020) 40-46] // **International Journal of Infectious Diseases**. – 2021. – V. 103. – P. 644. DOI: 10.1016/j.ijid.2020.12.020.

8. Kozlovskaya L.I., Piniava A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Antonova L.P., Mefyod K.M., Prokosheva L.S., Sibirskina A.S., Tarasova Y.Y., Bayurova E.O., Gancharova O.S., Illarionova V.V., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Gmyl L.V., Ipatova E.G., Egorov A.M., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A., Glukhov G.S., Sokolova O.S., Shaitan K.V., Moysenovich A.M., Kirpichnikov M.P. / Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. // **Emerging Microbes & Infections**. – 2021. – V. 10. – N. 1. – P. 1790-1806. DOI: 10.1080/22221751.2021.1971569 (Web of Science, Scopus, Q1). 1,063/0,036 п.л.

9. Tukhvatulin A.I., Gordeychuk I.V., Dolzhikova I.V., Dzharullaeva A.S., Krasina M.E., Bayurova E.O., Grousova D.M., Kovyryshina A.V., Kondrashova A.S., Avdoshina D.V., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Illarionova V.V., Zorkov I.D., Iliukhina A.A., Shelkov A.Y., Botikov A.G., Erokhova A.S., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Zubkova O.V., Tokarskaya E.A., Savina D.M., Vereveyko Yu.R., Ungur A.S., Naroditsky B.S., Ishmukhametov A.A., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. / Immunogenicity and protectivity of intranasally delivered vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine Sputnik V in mice and non-human primates // **Emerging Microbes & Infections**. – 2022. – V. 11. – N. 1. – P. 2229-2247. DOI: 10.1080/22221751.2022.2119169 (Web of Science, Scopus, Q1). 1,188/0,040 п.л.

10. Gordeychuk I., Kyuregyan K., Kondrashova A., Bayurova E., Gulyaev S., Gulyaeva T., Potemkin I., Karlsen A., Belyakova A., Lyashenko A., Sorokin A., Chumakov A., Morozov I., Isaguliants M., Ishmukhametov A., Isaeva O., Mikhailov M. / Immunization with recombinant ORF2 p551 protein protects common marmosets (*Callithrix Jacchus*) against homologous and heterologous hepatitis E virus challenge. // **Vaccine**. – 2022. – V. 40. – N. 1. – P. 89-99. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.11.042 (Web of Science, Scopus, Q1). 0,688/0,040 п.л.

11. Gordeychuk I.V., Kozlovskaya L.I., Siniugina A.A., Yagovkina N.V., Kuzubov V.I., Zakharov K.A., Volok V.P., Dodina M.S., Gmyl L.V., Korotina N.A., Theodorovich R.S., Ulitina Y.I., Vovk D.I., Alikova M.V., Kataeva A.A., Kalenskaya A.V., Solovjeva I.V., Tivanova E.V., Kondrasheva L.Y., Ploskireva A.A., Akimkin V.G., Subbotina K.A., Ignatyev G.M., Korduban A.K., Shustova E.Y., Bayurova E.O., Zhitkevich A.S., Avdoshina D.V., Piniava A.N., Kovpak A.A., Antonova L.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Ivin Y.Y., Sotskova

S.E., Chernov K.A., Ipatova E.G., Korduban E.A., Ishmukhametov A.A. / Safety and immunogenicity of inactivated whole virion COVID-19 vaccine CoviVac in clinical trials in 18–60 and 60+ age cohorts. // **Viruses**. – 2023. – V. 15. – N. 9. – P. 1828. DOI: 10.3390/v15091828 (Web of Science, Scopus, Q1). 1,563/0,040 п.л.

12. Mikhailov M.I., Karlsen A.A., Potemkin I.A., Isaeva O.V., Kichatova V.S., Malinnikova E.Yu., Asadi Mobarkhan F.A., Mullin E.V., Lopatukhina M.A., Manuylov V.A., Mazunina E.P., Bykonina E.N., Kleymenov D.A., Popova L.I., Gushchin V.A., Tkachuk A.P., Polyakov A.D., Eladly A.M., Solonin S.A., Gordeychuk I.V., Kyuregyan K.K. / Geographic and temporal variability of hepatitis E virus circulation in the Russian Federation. // **Viruses**. – 2022. – V. 15. – N. 1. – P. 37. DOI: 10.3390/v15010037 (Web of Science, Scopus, Q1). 1,375/0,065 п.л.

13. Gordeychuk I.V., Gancharova O.S., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Zhitkevich A.S., Avdoshina D.V., Moroz A.V., Lunin A.S., Sotskova S.E., Korduban E.A., Tukhvatulina A.I., Bayurova E.O., Ishmukhametov A.A. / Experimental Use of Common Marmosets (*Callithrix jacchus*) in Preclinical Trials of Antiviral Vaccines // **Acta Naturae** (англоязычная версия). – 2024. – V. 16. – N. 2. – P. 30-39. DOI 10.32607/actanaturae.27372. (Web of Science, Scopus, RSCI, Q2) 0,625/0,048 п.л.

14. Gattinger P., Kozlovskaya L.I., Lunin A.S., Gancharova O.S., Sirazova D.I., Apolokhov V.D., Chekina E.S., Gordeychuk I.V., Karaulov A.V., Valenta R., Ishmukhametov A.A. / Fusion protein-based COVID-19 vaccines exemplified by a chimeric vaccine based on a single fusion protein (W-PreS-O). // **Frontiers in Immunology**. – 2025. – V. 16. – P. 1452814.

DOI: 10.3389/fimmu.2025.1452814 (Web of Science, Scopus, Q1). 0,563/0,051 п.л.

15. Tukhvatulina A.I., Gordeychuk I.V., Dzharrullaeva A.S., Dolzhikova I.V., Bayurova E.O., Izhaeva F.M., Kovyrshina A.V., Zhitkevich A.S., Avdoshina D.V., Gulyaev S.A., Gulyaeva T.V., Moroz A.V., Esmagambetov I.B., Zorkov I.D., Iliukhina A.A., Shelkov A.Y., Erokhova A.S., Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Ishmukhametov A.A., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. / 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 // **Frontiers in Immunology**. – 2025. – T. 16. – С. 1634187. DOI: 10.3389/fimmu.2025.1634187 (Web of Science, Scopus, Q1). 0,813/0,037 п.л.

16. Bayurova E., Zhitkevich A., Avdoshina D., Kupriyanova N., Kolyako Yu., Kostyushev D., Gordeychuk I. / Common marmoset cell lines and their applications in biomedical research. // **Cells**. – 2023. – V. 12. – N. 16. – P. 2020. DOI: 10.3390/cells12162020 (Web of Science, Scopus, Q1). 0,938/0,134 п.л.

### Глава в монографии

17. Гордейчук И.В., Дейкин А.В., Исакова-Сивак И.Н., Крышень К.Л., Соколова А.Р., Трофимец Е.И., Тулегенова А.У., Шипаева Е.В. / Исследования COVID-19 // В книге: Консультант GLP-Planet 2022. Мнение фармацевтической отрасли: монография. Под ред. Макаров В.Г., Шестаков В.Н. // Санкт-Петербург, НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», 2022. С. 96-110. DOI: 10.57034/978-5-6048955-0-4. ISBN 978-5-6048955-0-4.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ — антиген;  
ак — аминокислота;  
АТ — антитело;  
АЛТ — аланинаминотрансфераза;  
АСТ — аспартатаминотрансфераза;  
ВГЕ — вирус гепатита Е;  
ВПЧ — вирусоподобная частица;  
ИА — индекс авидности;  
ИФА — иммуноферментный анализ;  
ЛДГ — лактатдегидрогеназа;  
МПК — моноклеары периферической крови;  
ОИ — обыкновенные игрунки (*Callithrix jacchus*);  
ОРС — открытая рамка считывания;  
ПЦР — полимеразная цепная реакция;  
РНК — рибонуклеиновая кислота;  
АРС — аллофикоцианин;  
CD — кластер дифференцировки; поверхностные маркеры клеток;  
COVID-19 — коронавирусная инфекция 2019 года;  
Су — цианин;  
FITC — флуоресцеинизотиоцианат;  
FSC — прямое светорассеивание;  
ID — идентификатор животного;  
Ig — иммуноглобулин;  
 $M \pm \sigma$  — среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение;  
МНС — молекулы главного комплекса гистосовместимости;  
РЕ — фикоэритрин;  
PerCP — перидинин-хлорофилл протеин;  
RBD — рецептор-связывающий домен;  
SARS-CoV-2 — коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2;  
SSC — боковое светорассеивание.