

# РЕАКЦИЯ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ПСЕВДОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИМИ АНТИТЕЛАМИ КАК БИОАНАЛИТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИНЫ САЛНАВАК®



Е.В. Зуев<sup>1</sup>, О.А. Маркова<sup>1</sup>, С.В. Кулемзин<sup>2</sup>, Д.А. Потеряев<sup>1</sup>, Н.А. Литвинова<sup>1</sup>,  
И.А. Короткевич<sup>1</sup>, Т.В. Григорьева<sup>1</sup>, Р.А. Хамитов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>АО «ГЕНЕРИУМ», пгт. Вольгинский, Петушинский район, Владимирская область, Россия

<sup>2</sup>ООО «ИМГЕН+», г. Новосибирск, Россия

**Резюме.** *Введение.* Пандемия коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, явилась серьезным испытанием для всех областей медицинской науки, вызвав всплеск новых разработок в различных сферах, начиная от диагностических методик, заканчивая терапевтическими и профилактическими подходами. Интраназальная вакцинация является инновационным подходом к иммунизации против SARS-CoV-2, к которому приковано внимание многих разработчиков препаратов. Одним из объективных параметров оценки иммунологической эффективности является изучение динамики накопления вируснейтрализующих антител (ВНА) в крови переболевших COVID-19 или получивших вакцинопрофилактику здоровых добровольцев, и требуют соблюдения высоких стандартов выполнения биоаналитической методики в рамках проведения клинических исследований. Представлены результаты промежуточного анализа данных иммуногенности, полученных в рамках рандомизированного двойного слепого многоцентрового клинического исследования 3 фазы двухкомпонентных препаратов Салнавак® (интраназально) и Гам-КОВИД-Вак® (внутримышечно). Целью исследования была оценка иммуногенности и безопасности интраназальной и внутримышечной форм комбинированной векторной вакцины против COVID-19 с помощью реакции нейтрализации с применением псевдовиральных частиц и культуры клеток НЕК293Т-hACE2. *Материалы и методы.* Всего 137 здоровых добровольцев с исходным уровнем анти-RBD IgG не выше 100 ВАУ/мл были иммунизированы двухкомпонентной (на основе Ad26 и Ad5) вакциной с интраназальным или внутримышечным способом введения в день 1 и день 21. Оценка иммуногенности проводилась на основании данных количественного определения ВНА с использованием реакции нейтрализации с применением псевдовиральных частиц и культуры клеток НЕК293Т-hACE2 и IgG-антител к рецептор-связывающему домену S-белка (анти-RBD) SARS-CoV-2 на 21 и 42 дни после введения компонента I. *Результаты.* Средний геометрический титр ВНА к SARS-CoV-2 в день 42 составил 238,34±3,93 и 616,94±3,73 в группах Салнавак® и Гам-КОВИД-Вак® соответственно. Учитывая данные о высоком уровне протективности при титре ВНА более 100 при применении метода псевдовиральной нейтрализации, полученные результаты свидетельствуют о достаточной иммунологической эффективности как внутримышечной, так и интраназальной вакцины. Среднее геометрическое значение уровня анти-RBD IgG в день 42 составило 131,22±3,91 и 782,03±3,04 в группах

#### Адрес для переписки:

Зуев Евгений Васильевич  
123112, Россия, Москва, ул. Тестовская, 10, АО «ГЕНЕРИУМ».  
Тел.: 8 916 641-96-98.  
E-mail: evzuev@generium.ru

#### Contacts:

Evgeniy V. Zuev  
123112, Russian Federation, Moscow, Testovskaya str., 10,  
JSC "GENERIUM".  
Phone: +7 916 641-96-98.  
E-mail: evzuev@generium.ru

#### Для цитирования:

Зуев Е.В., Маркова О.А., Кулемзин С.В., Потеряев Д.А., Литвинова Н.А., Короткевич И.А., Григорьева Т.В., Хамитов Р.А. Реакция нейтрализации псевдовиральных частиц вируснейтрализующими антителами как биоаналитическая часть клинического исследования вакцины Салнавак® // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 5. С. 853–863. doi: 10.15789/2220-7619-VNA-8054

#### Citation:

Zuev E.V., Markova O.A., Kulemzin S.V., Poteryaev D.A., Litvinova N.A., Korotkevich I.A., Grigoryeva T.V., Khamitov R.A. Virus neutralizing antibodies in pseudovirus particle neutralization reaction as a bioanalytical part of a Salnavac® vaccine clinical trial // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2023, vol. 13, no. 5, pp. 853–863. doi: 10.15789/2220-7619-VNA-8054

Салнавак® и Гам-КОВИД-Вак® соответственно. Показана прямая умеренная корреляция ВНА и анти-RBD IgG. **Выводы.** При проведении исследования для определения титра ВНА была успешно валидирована и использована реакция нейтрализации с применением псевдовиральных частиц. По итогам проведения промежуточного анализа данных была показана меньшая, чем у внутримышечного препарата, но достаточно высокая напряженность гуморального иммунитета после применения интраназальной вакцины Салнавак®.

**Ключевые слова:** COVID-19, иммунизация, вакцина, коронавирусная инфекция, иммуногенность, SARS-CoV-2.

## VIRUS NEUTRALIZING ANTIBODIES IN PSEUDOVIRUS PARTICLE NEUTRALIZATION REACTION AS A BIOANALYTICAL PART OF A SALNAVAC® VACCINE CLINICAL TRIAL

Zuev E.V.<sup>a</sup>, Markova O.A.<sup>a</sup>, Kulemzin S.V.<sup>b</sup>, Poteryaev D.A.<sup>a</sup>, Litvinova N.A.<sup>a</sup>, Korotkevich I.A.<sup>a</sup>, Grigoryeva T.V.<sup>a</sup>, Khamitov R.A.<sup>a</sup>

<sup>a</sup> JSC "GENERIUM", Volginsky, Petushinsky District, Vladimir Region, Russian Federation

<sup>b</sup> LLC "IMGEN+", Novosibirsk, Russian Federation

**Abstract. Introduction.** The SARS-CoV-2 coronavirus pandemic has been a major challenge for all areas of medical science, causing a surge of new developments in various fields ranging from diagnostic techniques to therapeutic and preventive approaches. Intranasal vaccination is an innovative approach to immunization against SARS-CoV-2, which has attracted the attention of many drug developers. Dynamics of blood virus-neutralizing antibodies (VNAs) in recovered COVID-19 patients or vaccinated healthy volunteers is one of the objective parameters for assessing vaccine immunological efficacy, which requires high standards of bioanalytical techniques within the framework of clinical trials. Immunogenicity data on the two-component Salnavac® (intranasal) and Gam-COVID-Vac® (intramuscular) vaccination obtained in randomized double-blind multicenter phase 3 clinical trial interim analysis are presented. The objective of the study was to assess immunogenicity of intranasal and intramuscular vaccination against COVID-19 using a neutralization reaction with pseudoviral particles and HEK293T-hACE2 cell culture. **Materials and methods.** A total of 137 healthy volunteers with a baseline anti-RBD IgG level not exceeding 100 BAU/ml received immunization by a two-component (Ad26 and Ad5 based) intranasal or intramuscular vaccine administered on day 1 and day 21. Immunogenicity level based on VNA quantitative analysis using a neutralization reaction with pseudoviral particles and a HEK293T-hACE2 cell culture as well as to SARS-CoV-2 S-protein receptor-binding domain (anti-RBD) IgG antibodies on days 21 and 42 after administration of component I was assessed. **Results.** The geometric mean VNA titer against SARS-CoV-2 on day 42 was  $238.34 \pm 3.93$  and  $616.94 \pm 3.73$  in the Salnavac® and Gam-COVID-Vac® groups, respectively. Trial data shows sufficient immunological efficacy of both intramuscular and intranasal vaccines based on a high protection level at VNA titer of more than 100 while using the pseudoviral neutralization method. The geometric mean of the anti-RBD IgG level by day 42 was  $131.22 \pm 3.91$  and  $782.03 \pm 3.04$  in the Salnavac® and Gam-COVID-Vac® groups, respectively. A direct moderate correlation was shown between VNA and anti-RBD IgG. **Conclusion.** Neutralization reaction using pseudoviral particles was successfully validated and used to determine the VNA titer during clinical trial. Trial interim data revealed that intranasal vaccine Salnavac® vs intramuscular vaccine Gam-COVID-Vac® resulted in lower but sufficient stringency of humoral immunity.

**Key words:** COVID-19, immunization, vaccine, coronavirus infection, immunogenicity, SARS-CoV-2.

## Введение

За последние два десятилетия в мире было зафиксировано несколько крупных вспышек инфекционных заболеваний, обусловленных представителями семейства *Coronaviridae*, а именно коронавирусом тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) и коронавирусом ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) [14, 18]. Однако одним из главных событий последних нескольких лет стала объявленная ВОЗ в марте 2020 г. пандемия новой коронавирусной инфекции, вызванная еще одним вариантом коронавируса — SARS-CoV-2 [19]. Впервые появившаяся в китайском городе Ухань в декабре 2019 г. [17], эта инфекция вследствие высокой контагиозности и воздушно-капельного пути передачи быстро распространилась по всему земному шару.

ВОЗ координирует группу экспертов по разработке вакцины против COVID-19. Так, на сегодняшний день в разработке находится 366 вакцин, из них 169 препаратов проходят клинические испытания и 198 — доклиническую разработку [20].

Разработка мукозальных вакцин является многообещающим направлением профилактики SARS-CoV-2. Слизистые оболочки дыхательных путей являются входными воротами возбудителя COVID-19, поэтому индукция иммунитета слизистых оболочек представляется целесообразной. В то же время использование мукозальных вакцин приводит в числе прочего к индукции системного иммунного ответа [2, 4]. Кроме того, использование интраназальных форм препаратов менее травматично и требует меньшего участия медицинского персонала.

Компанией АО «ГЕНЕРИУМ» разработана новая форма выпуска на основе ранее одобренной вакцины Гам-КОВИД-Вак® с интраназальным путем введения, который в настоящее время проходит сравнительное клиническое исследование VCI-COV-III.

Наличие в крови вируснейтрализующих антител против SARS-CoV-2 является важным показателем защитного иммунитета, сформированного вакциной. Поэтому для доклинических (ДоКИ) и клинических исследований (КИ) вакцин необходимы методы надежного, чувствительного и быстрого обнаружения ВНА против SARS-CoV-2. Классический метод определения титра ВНА, основанный на снижении количества вирусных бляшек в монослое культуры клеток (plaque reduction neutralization test, PRNT), требует работы с инфекционным, высокопатогенным живым аутентичным вирусом SARS-CoV-2 в условиях изолированной лаборатории с уровнем защиты 3–4 (в отечественной системе санитарного законодательства 1–2 группа патогенности) [1]. Таких лабораторий в РФ крайне мало, риск работы с образцами для оператора высокий, тесты трудоемкие, высокочувствительные и не могут быть использованы в качестве биоаналитического этапа рутинного контроля образцов ДоКИ и КИ. Модификацией этого метода является реакция микронейтрализации, где подсчитываются уже не бляшки, а отдельные инфицированные клетки, выявляемые иммуноцитохимическим способом (microneutralization assay, MNA). Однако эти подходы также отнимают много времени и требуют работы в лабораториях с высоким уровнем биобезопасности. Разумной альтернативой аутентичному вирусу является использование псевдовиральных частиц со сниженной патогенностью, которые представляют собой неспособные к репликации частицы, содержащие структурное и ферментативное ядро одного вируса, такого как вирус везикулярного стоматита (VSV) или лентивирус (ВИЧ), и поверхностные белки другого вируса, такого как S-белок вируса SARS-CoV-2. Для определения инфекции псевдовиральные кодируют репортерный белок, такой как люцифераза светлячка (Fluc) или зеленый флуоресцентный белок (GFP) [5]. Из этого следует, что такой метод можно проводить в обычных лабораториях невысокого класса защиты, имеющих лицензию на работе с 3–4 группами патогенности или без нее. Следует отметить, что несмотря на привлекательность метода на основе псевдотипированных вирусов, необходима разносторонняя валидация, поскольку на результат реакции на вируснейтрализацию могут влиять многие параметры, такие как: оптимальная концентрация вирусных частиц (выражаемая в единицах трансдукции, ТЕ) в применяемых для трансдукции клеток ра-

бочих растворах, доля «пустых» и «упакованных» лентивирусных частиц, наличие технологических загрязнений, происхождение клеток для инфекции, время совместной инкубации вируса и сыворотки, состав питательной среды/добавок и другие параметры, вносящие вклад в гетерогенность результатов и общую неопределенность методики [13]. В рамках настоящей работы проведена валидация разработанного ранее метода определения ВНА вируса для целей высокопроизводительного анализа образцов сыворотки вакцинированных добровольцев клинического исследования VCI-COV-III.

## Материалы и методы

### Данные клинического исследования

*Дизайн клинического исследования.* Клиническое исследование, в ходе которого проводился отбор биообразцов для анализа, являлось рандомизированным двойным слепым многоцентровым исследованием 3 фазы, проводимым с целью оценки иммуногенности интраназальной и внутримышечной форм комбинированной векторной вакцины против COVID-19, индуцированного SARS-CoV-2, в дизайне «double-dummy» для «заслепления» способа введения препарата. В целях обеспечения возможности коррекции общего размера выборки в ходе исследования по данным на 42 день после вакцинации был выбран групповой последовательный дизайн исследования (group sequential design). Протокол исследования одобрен Минздравом России (МЗ России) (№ 869 от 20.12.2021) и независимыми локальными этическими комитетами клинических центров. Исследование проводится в соответствии с требованиями Надлежащей Клинической Практики и Хельсинкской декларации Всемирной Медицинской Ассоциации пересмотра 2013 г. Исследование состоит из следующих периодов: скрининг до 7 дней, иммунизация компонентом I (день 1) и компонентом II (день 21) исследуемых продуктов (ИП), период наблюдения I (до 42 дней) и период наблюдения II (до 365 дней). На сегодняшний день доступны результаты промежуточного анализа данных на 42 день наблюдения. Исследование продолжается.

*Критерии отбора добровольцев.* Включение добровольцев проводится в 16 клинических центрах на базе медицинских учреждений Российской Федерации.

Критерии включения: возраст 18–60 лет; индекс массы тела (ИМТ)  $18,5 \leq \text{ИМТ} \leq 29,9$  кг/м<sup>2</sup>; отсутствие существенных отклонений при лабораторных, инструментальных и физических исследованиях; уровень исходных анти-RBD IgG антител к SARS-CoV-2 не выше 100 ВАУ/мл; согласие на использование эф-

фективных методов контрацепции; отсутствие острого инфекционного или неинфекционного заболевания и отсутствие обострения хронического заболевания за 14 дней до иммунизации; отрицательный анализ мочи на запрещенные препараты; отрицательный тест на алкоголь в выдыхаемом воздухе и отсутствие каких-либо злокачественных новообразований.

**Критерии исключения:** любая вакцинация в течение 30 дней до включения с ограничением вакцинации против SARS-CoV-2 в течение 6 месяцев до включения в исследование; COVID-19 в анамнезе в течение 6 месяцев до включения; положительный тест на SARS-CoV-2 на скрининге; положительный IgM к SARS-CoV-2 или SARS-CoV-2 анти-RBD IgG более 100 BAU/мл; контакт с больными COVID-19 в течение предшествующих включению 14 дней; стероидные препараты (кроме контрацептивов), иммуноглобулины и/или другие компоненты крови за 30 дней до рандомизации; затруднение носового дыхания; злоупотребление наркотическими препаратами; регулярное применение антиконгестантов; использование иммунодепрессантов, завершившееся менее чем за 3 месяца до рандомизации; положительный тест на беременность; положительный результат диагностики ВИЧ, гепатит В или С; наличие в анамнезе аллергических заболеваний любого генеза; систолическое артериальное давление < 100 или > 130 мм рт. ст. или диастолическое артериальное давление < 60 или > 90 мм рт. ст.; частота сердечных сокращений < 60 или > 100 ударов в минуту; наличие в анамнезе аутоиммунных заболеваний у добровольцев и у их родственников 1–2 степени родства; употребление алкоголя выше уровня низкого риска; госпитализация и/или хирургическое вмешательство во время исследования и до 4 недель до введения исследуемых препаратов; сопутствующие заболевания, влияющие на результаты исследования. Все добровольцы предоставили подписанное информированное согласие перед включением в исследование.

**Исследуемые препараты.** Салнавак® представляет собой формат интраназального введения ранее одобренной к применению вакцины Гам-КОВИД-Вак® и состоит из двух компонентов рекомбинантных вирусных частиц на основе аденовирусов человека серотипа 26 (компонент I) и 5 (компонент II), несущих ген S-белка вируса SARS-CoV-2. Полная доза обеих вакцин составляет  $10^{11}$  вирусных частиц на дозу для каждого рекомбинантного аденовируса или 0,5 мл на дозу для внутримышечной/интраназальной инъекции. Плацебо состоит из буферной композиции, равной объему вакцины. Исследуемые препараты и плацебо вводили внутримышечно или интраназально в соответствии со схемой рандомизации.

**Рандомизация и маскировка.** После подтверждения критериев отбора все добровольцы были распределены с использованием системы IWRS методом блоковой рандомизации (блоки переменного размера 4 или 6) в соотношении 1:1 в две группы: группа 1 получала Салнавак® путем интраназального введения и плацебо путем внутримышечной инъекции; группа 2 получала Гам-Ковид-Вак® внутримышечно и плацебо интраназально. Препараты и плацебо внешне неотличимы по упаковке, этикетке и содержанию. Групповое распределение добровольцев было замаскировано для исследователей, добровольцев и всего исследовательского персонала (двойной слепой формат). В соответствии с протоколом исследования снятие маскировки данных проведено с целью подготовки промежуточного отчета в минимальном объеме, достаточном и необходимом для проведения анализа данных.

**Процедуры.** Помимо прочих стандартных методов обследования, предусмотренных протоколом, для всех участников был произведен отбор биообразцов для оценки титра ВНА к SARS-CoV-2 и анти-RBD IgG в день 1 (до введения компонента I), день 21 (до введения компонента II) и день 42 с целью анализа гуморального иммунитета. Клинико-лабораторные данные были собраны с использованием электронной платформы EDC.

**Переменные интереса исследования.** Первичной переменной интереса является иммунологическая эффективность вакцины Салнавак® относительно вакцины Гам-КОВИД-Вак®, выраженная в соотношении средних геометрических титров ВНА против SARS-CoV-2 на 42-й день. Титр RBD-специфичного IgG против SARS-CoV-2 на 42-й день является одной из вторичных переменных.

### Данные лабораторного исследования

Методика определения ВНА против SARS-CoV-2 была разработана и описана компанией ООО «ИМГЕН+» [7].

**Получение и очистка лентивирусных частиц, псевдотипированных S-белком SARS-CoV-2 (штамм Wuhan-Hu-1).** Псевдовirusы получали путем котрансфекции клеток HEK293T плазмидами PLV-Fluc, psPAX2 и pCAGGS- $\Delta$ I19, кодирующими соответственно векторную кассету, белки Gag, Pol и Rev вируса HIV-1 и S-белок вируса SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 без 19 С-терминальных аминокислотных остатков [7]. За день до трансфекции клетки HEK293T высевали с плотностью 200 000 клеток/мл в чашки для культивирования площадью 150 мм<sup>2</sup> и культивировали в инкубаторе с CO<sub>2</sub>. Через 24 ч клетки трансфицировали плазмидами PLV-Fluc, psPAX2 и pCAGGS- $\Delta$ I19 кальций-фосфатным методом. На одну трансфекцию использовали

70 мкг смеси плазмид (при соотношении PLV-Fluc : psPAX2 : pCAGGS- $\Delta$ I19 = 3 : 2 : 2). Для получения осадка 372 мкл 2М CaCl<sub>2</sub> добавляли в стерильную коническую пробирку, содержащую 1098 мкл смеси плазмид в воде. Затем смесь плазмиды/кальций хлорид добавляли по каплям к равному объему фосфатно-солевого буфера HEPES (50 мМ HEPES, 1,5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 280 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 12 мМ сахарозы), pH 7,15 при постоянном встряхивании. Сразу после перемешивания осадок кальций-фосфат/ДНК переносили в клетки и оставляли на 7–8 часов. После промывания PBS культуральную среду заменяли средой Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США), содержащей 2,5% термоинактивированной фетальной телячьей сыворотки. Через 68–72 ч после трансфекции культуральную среду, содержащую псевдовирусные частицы, собирали в конические пробирки объемом 50 мл, центрифугировали в течение 10 мин при 4500g для удаления клеток и крупного клеточного детрита и фильтровали с использованием системы вакуумной фильтрации PES 0,45 мкм. Затем полученный супернатант концентрировали с помощью модуля Vivaflow-50 100K (Sartorius, Германия) до 10-кратного уменьшения объема. Затем концентрированную среду наслаивали на 20% раствор сахарозы и центрифугировали в центрифуге Avanti J-30 (Beckman Coulter, США) при 24 000g в течение 90 мин с использованием ротора JS-24. Осадок псевдовируса ресуспендировали в среде Opti-MEM, содержащей 2,5% термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, и аликвоты помещали в криопробирки. После шоковой заморозки вирусные частицы хранили в парах жидкого азота.

Частицы псевдовируса титровали на полученных ранее клетках НЕК 293Т-hACE2, стабильно экспрессирующих рецептор SARS-CoV-2 — человеческий ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [7].

*Подготовка образцов сыворотки добровольцев.* Обезличенные образцы сыворотки добровольцев инактивировали на водяной бане при температуре (56±2)°C в течение 30 мин с целью истощения компонентов системы комплемента. Образцы инактивированной сыворотки использовали сразу или замораживали для последующего анализа. Образцы сыворотки с признаками гемолиза или бактериальной контаминации для анализа не использовались.

*Анализ нейтрализации вируса.* Клетки НЕК 293Т-hACE2 добавляли в лунки белых 96-луночных планшетов (Corning-3916 или Thermofisher 136101), по 15 000 клеток в 100 мкл среды на лунку.

Далее в лунки 96-луночного планшета с U-образным дном вносили двукратные разведения образцов сыворотки в среде Opti-MEM,

начиная с разведения 1:10 и до 1:1280 в объеме 80 мкл. Для конкретных анализов использовались другие коэффициенты разбавления, как указано в тексте. Суспензию вирусных частиц в среде Opti-MEM 2,5% FBS добавляли во все лунки (10 000 ТЕ на лунку в 80 мкл среды), кроме лунок, служивших отрицательным контролем. После этого содержимое лунок перемешивали многоканальной пипеткой, затем планшеты закрывали и инкубировали 30 мин в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37°C.

Затем содержимое U-образных чашек переносили в белые культуральные чашки, содержащие клетки НЕК 293Т-hACE2. Среду для выращивания предварительно осторожно удаляли из белых 96-луночных планшетов, не нарушая прикрепленных клеток. Затем белые планшеты оставляли в инкубаторе с CO<sub>2</sub> на 36–48 ч при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

Далее питательную среду отсасывали и в каждую лунку добавляли по 40 мкл раствора PBS, а затем — предварительно нагретый до 25°C реагент OneGlo (Promega), содержащий субстрат для люциферазы, и планшеты инкубировали в течение 60–75 мин при комнатной температуре (20–25°C) в темноте на орбитальном шейкере. После этого измеряли люминесценцию с помощью люминометра Luminoskan Microplate (Thermo Fisher Scientific, США). За 100%-ную нейтрализацию принимали среднее значение люминесценции, полученное в лунках с добавленным нейтрализующим антителом iB20, описанным ранее [7]. За 0% нейтрализации принимали среднее значение люминесценции, полученное в лунках без добавления сыворотки. Среднее значение люминесценции, полученное в лунках без добавления вирусных частиц, принимали за фоновое значение. Расчет ID<sub>50</sub> (расчетное значение, составляющее разведение сыворотки, необходимое для 50% нейтрализации вируса) был проведен с помощью анализа нелинейной регрессии в пакете GraphPad Prism.

*Анализы, выполненные в рамках валидации метода.* Чувствительность/специфичность — для определения этих параметров была измерена нейтрализующая активность 24 образцов сыворотки выздоравливающих/вакцинированных пациентов с подтвержденными ИФА антителами к S-белку SARS-CoV-2. Отрицательными пробами являлись замороженные до начала 2020 г. архивные образцы сывороток от доноров, постоянно проживающих в РФ.

Воспроизводимость — уровни ID<sub>50</sub> у серопозитивных доноров исследовали в течение 6 аналитических циклов.

Прецизионность внутри планшета — исследовали вариабельность измерения ID<sub>50</sub> в пределах одного планшета, измеренного для одного образца сыворотки.

Внутрилабораторная прецизионность — значения  $ID_{50}$  были измерены для одного и того же образца сыворотки при настройке реакции разными операторами в один и тот же день или одним и тем же оператором в разные дни.

Устойчивость (робастность) — значения  $ID_{50}$  были измерены для одного и того же образца сыворотки с использованием различных партий вирусных частиц.

Линейность — изменение уровня  $ID_{50}$ , измеренного для серийных разведений контрольной сыворотки. В качестве меры линейности мы рассматривали коэффициент R2, полученный путем линейной регрессии значений  $\log_2$  (коэффициент разбавления) в зависимости от  $\log_2$  ( $ID_{50}$ ), как меру линейности.

По всем перечисленным выше параметрам были достигнуты приемлемые значения, позволяющие признать данную методику валидированной. Подробный протокол валидации и полученные результаты будут опубликованы отдельно.

### Статистический анализ

Для проведения статистического анализа был использован язык программирования статистических расчетов R версии 4.1.2.

В анализ были включены данные без значимых отклонений от протокола исследования. Все сравнения добровольцев между группами препаратов проводились с помощью двусторонних критериев (кроме анализа первичной конечной точки с помощью одностороннего критерия).

При сравнении исходных характеристик добровольцев использовался t-критерий Стьюдента для независимых выборок или критерий Манна–Уитни, в зависимости от вида распределения добровольцев по значениям этих переменных. Для сравнений групп добровольцев по полу использовался критерий  $\chi^2$ .

Так как все переменные, проанализированные в рамках промежуточного анализа, будут повторно анализироваться и сравниваться между группами в рамках финального анализа всего объема данных за период со скрининга до дня 42, все сравнения между добровольцами в группах по препаратам корректировались поправками на множественные сравнения. При сравнениях групп добровольцев по исходным характеристикам, титру ВНА на день 21 и день 42, титру RBD на день 1, день 21 и день 42, а также при сравнениях по титру ВНА и титру RBD в динамике нулевая гипотеза об отсутствии различий между группами/визитами отвергалась и принималась альтернативная гипотеза о наличии различий между группами/визитами при уровне  $p < 0,000001$ .

Анализ первичной конечной точки проводился на логарифмированных данных титра ВНА. Тестирование гипотез по первичной ко-

нечной точке проводилось с помощью одностороннего t-критерия Стьюдента для независимых выборок при уровне ошибки I рода ( $\alpha$ ) = 0,0000005. При превышении разницей средних титра ВНА границы доказательства эффективности в 1,042 планировалось принять утверждение о не меньшей иммунологической эффективности интраназальной вакцины Салнавак® по сравнению с вакциной Гам-КОВИД-Вак® по разнице средних титров ВНА.

Сравнение добровольцев в группах препаратов по значениям титра RBD на 42 день исследования выполнялось с помощью t-критерия Стьюдента для независимых выборок на логарифмированных данных.

Динамика титров ВНА и RBD со дня 1 до дня 42 исследования оценивалась с помощью t-критерия Стьюдента для зависимых выборок на логарифмированных данных, уровни значимости корректировались поправкой Холма для множественных сравнений.

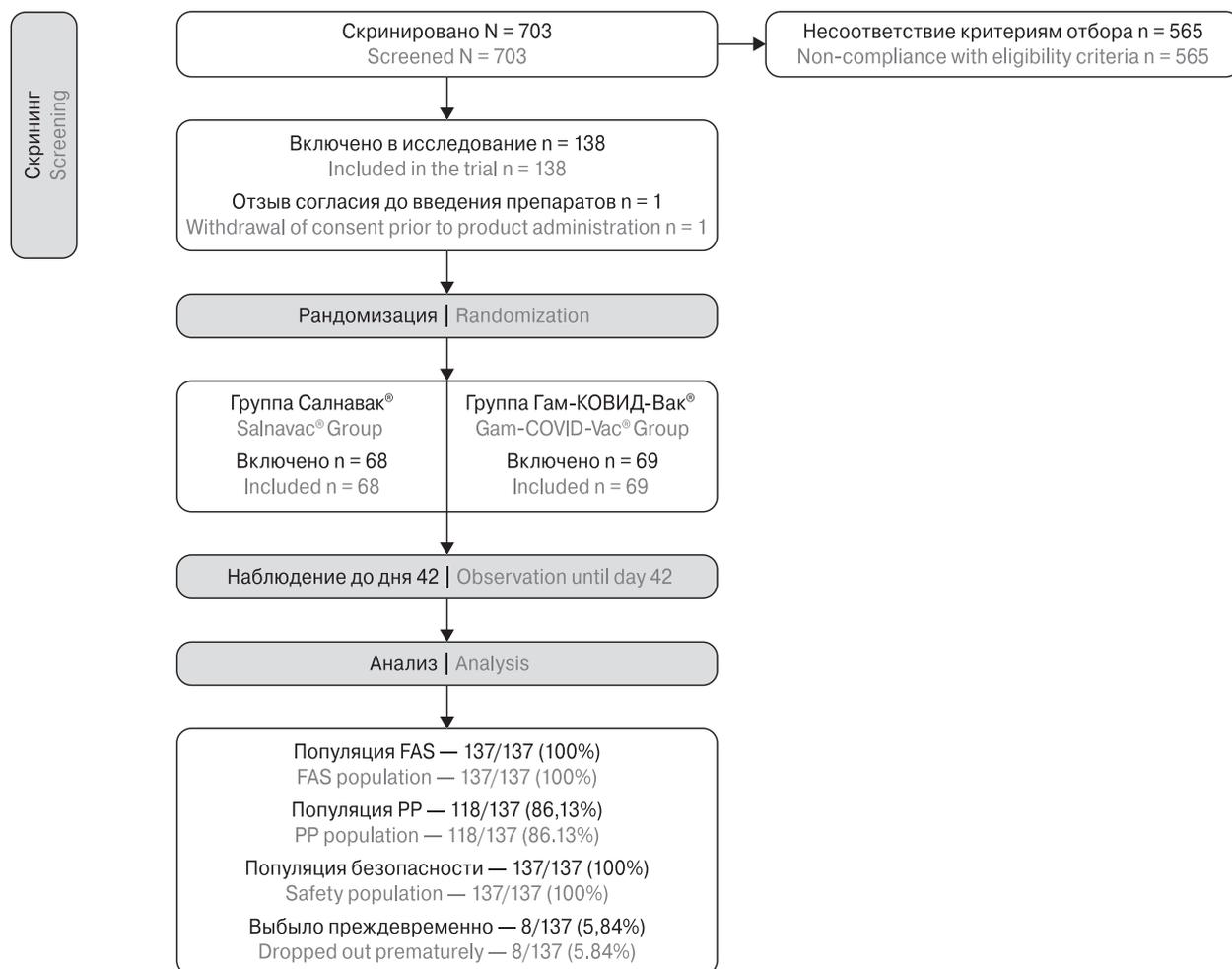
Анализ корреляций между титром ВНА и титром анти-RBD IgG-антител проводился с помощью коэффициента Спирмена. Для трактовки силы корреляций использовалась следующая шкала:  $0 < |r| < 0,3$  — слабая корреляция;  $0,3 \leq |r| < 0,9$  — умеренная корреляция;  $|r| \geq 0,9$  — сильная корреляция.

### Надзор за исследованием

Исследование проведено спонсором (ОАО «ГЕНЕРИУМ») в соответствии с одобренным протоколом исследования, согласовано с исследователями и авторами публикации. Сбор данных проводился исследователями с верификацией данных персоналом спонсора с использованием продукции ENNOV CLINICAL S.A.S. Статистический и медицинский анализ данных, а также подготовка промежуточного отчета об исследовании были выполнены спонсором. Спонсор гарантирует полноту и точность данных и проведенного анализа и подтверждает, что публикация соответствует протоколу и другим документам исследования. Все авторы имели доступ к данным исследования, рукописи и одобрили окончательный вариант настоящей статьи.

### Результаты

*Профиль исследования.* На момент проведения промежуточного анализа в исследование было скринировано 703 добровольца, 138 из которых (19,63%) соответствовали всем критериям включения/невключения и были рандомизированы в две группы вакцинопрофилактики. Один из рандомизированных добровольцев отозвал информированное согласие до введения Компонента I вакцины, что было расценено как ошибка рандомизации. Полную анализируемую



**Рисунок 1. Распределение добровольцев в исследовании**

Figure 1. Distribution of volunteers in the trial

совокупность (Full Analysis Set, FAS) составило 137 добровольцев. Из 137 рандомизированных добровольцев 19 пациентов были исключены из популяции «по протоколу» (Per Protocol, PP), и их данные не учитывались при анализе иммуногенности. Среди причин исключения из анализа были заболевание COVID-19 (для 7 добровольцев) и значимые отклонения от протокола с воздействием на результаты исследования (для 12 добровольцев) (рис. 1).

**Исходные характеристики добровольцев.** Добровольцы в сравниваемых группах не отличались между собой по исходным характеристикам (полученные для всех показателей уровни  $p$  больше уровня, заданного для сравнения между группами по демографическим и исходным характеристикам на промежуточном этапе —  $p < 0,000001$ ) (табл.).

**Оценка иммуногенности.** В группе препарата Салнавак® титр ВНА — геометрическое среднее

значение (геометрическое стандартное отклонение) — составил в день 1  $76,7 \pm 3,36$ . Ко дню 21 исследования титр ВНА в группе препарата Салнавак® возрос в 3,2 раза от исходного уровня — до  $243,85 \pm 3,33^1$  — и далее, до дня 42, оставался стабильным<sup>2</sup>; титр ВНА на день 42 составил  $238,34 \pm 3,23$ . С момента начала исследования (день 1) до дня 42 титр ВНА в группе Салнавак® увеличился в 3,1 раза<sup>1</sup> (рис. 2).

В группе Гам-КОВИД-Вак® титр ВНА в день 1 составил  $43,35 \pm 4,27$  и ко дню 21 увеличился до  $526,5 \pm 3,76$  — в 12,1 раза от исходного. Ко дню 42 статистически значимые изменения титра ВНА относительно дня 21 отсутствовали: титр на 42 день составил  $616,94 \pm 3,73^2$ . В целом за время, прошедшее с начала исследования, титр ВНА в группе Гам-КОВИД-Вак® увеличился в 14,2 раза<sup>1</sup> (рис. 2).

Титр ВНА на 42 день на логарифмированных данных составил 5,47 и 6,42 в группах

<sup>1</sup> Уровень  $p$  для сравнения между визитами был меньше уровня, установленного для принятия альтернативной гипотезы о наличии различий между визитами  $p < 0,000001$ .

<sup>2</sup> Уровень  $p$  был больше уровня, установленного для принятия альтернативной гипотезы о наличии различий между визитами  $p > 0,000001$ .

**Таблица. Исходные характеристики добровольцев. Популяция FAS**

Table. Baseline characteristics of volunteers. FAS population

Параметр Parameter	Салнавак® Salnavac® (N = 68)	Гам-КОВИД-Вак® Gam-COVID-Vac® (N = 69)	Уровень p (критерий) p-value (criteria)
Женский пол, n (%) Female, n (%)	31 (45,6)	31 (44,9)	1 $\chi^2$
Мужской пол, n (%) Male, n (%)	37 (54,4)	38 (55,1)	
Возраст, годы (среднее [CO]) Age, years (mean [SD])	34,43 (8,99)	36,25 (9,18)	0,24 t-критерий Стьюдента Student's t-test
САД, мм рт.ст. (медиана [МКР]) SAP, mmHg (median [IQR])	118 (110; 124,25)	120 (112; 125)	0,31 Манна-Уитни Mann-Whitney
ДАД, мм рт.ст. (медиана [МКР]) DAP, mmHg (median [IQR])	75 (70; 80)	75 (68; 80)	0,38 Манна-Уитни Mann-Whitney
ЧСС, уд./мин (медиана [МКР]) HR, bpm (median [IQR])	71,5 (67; 79,25)	69 (68; 76)	0,14 Манна-Уитни Mann-Whitney
ЧДД, в мин (медиана [МКР]) RR, in min (median [IQR])	16 (16;17)	16 (16; 17)	0,80 Манна-Уитни Mann-Whitney
Температура тела, °C (медиана [МКР]) Body temperature, °C (median [IQR])	36,5 (36,4; 36,6)	36,5 (36,4; 36,6)	0,94 Манна-Уитни Mann-Whitney

**Примечание.** Описательные статистики пола представлены в виде частот (n) и долей в процентах (%), возраста — в виде среднего и стандартного отклонения (CO), жизненно важных показателей (систолического артериального давления — САД, диастолического артериального давления — ДАД, частоты сердечных сокращений — ЧСС, частоты дыхательных движений — ЧДД и температуры тела) — в виде медианы и межквартильного размаха (МКР) в виде 25%–75% квартилей.

Note. Gender-related descriptive statistics is presented as frequencies (n) and percentages (%), age — as mean and standard deviation (SD), vital signs (systolic blood pressure — SBP, diastolic blood pressure — DBP, heart rate — HR), contractions — heart rate, respiratory rate — RR and body temperature) — as a median and interquartile range (IQR) in the form of 25%–75% quartiles.

Салнавак® и Гам-КОВИД-Вак® соответственно. Межгрупповая разница средних геометрических титров ВНА на 42 день исследования составила  $-0,95$  (нижняя граница 99,9% ДИ для разницы титров ВНА  $-2,16$ ). Полученный уровень р для сравнения  $p = 0,99$  был больше, и величина эффекта, равная  $-0,95$ , была меньше уровней, заданных для доказательства не меньшей иммуногенности вакцины Салнавак® по сравнению с вакциной Гам-КОВИД-Вак®. Отношение геометрических средних титра ВНА на 42 день исследования составило  $0,39$  с нижней границей 99,99% ДИ, равной  $0,12$ .

Титр уровня RBD в группе Салнавак® составил  $15,23 \pm 4,74$  ВАУ/мл в день 1. Ко дню 21 он увеличился в  $5,6$  раза по сравнению с днем 1 — до  $85,32 \pm 7,91$  ВАУ/мл<sup>1</sup>. На день 42 титр RBD составил  $131,22 \pm 3,91$  ВАУ/мл, значимо не изменившись относительно дня 21<sup>2</sup>. В целом за время исследования в группе Салнавак® титр RBD возрос в  $8,6$  раз<sup>1</sup> (рис. 3).

В группе Гам-КОВИД-Вак® титр RBD в день 1 составил  $14,21 \pm 4,22$  ВАУ/мл, далее уве-

личившись до  $490,76 \pm 4,66$  ВАУ/мл — в  $34,5$  раз<sup>1</sup>. Ко дню 42 статистически значимые изменения титра RBD относительно дня 21 отсутствовали, титр RBD составил  $782,03 \pm 3,04$  ВАУ/мл<sup>2</sup>. В целом титр RBD в группе Гам-КОВИД-Вак® со дня 1 до дня 42 увеличился в  $55$  раз<sup>1</sup> (рис. 3).

Отношение геометрических средних титра RBD на 42 день исследования составило  $0,17$  [99,99% ДИ  $0,05; 0,56$ ] ( $p < 0,001$ ) (рис. 3). Средний титр RBD в группе Салнавак® был ниже, чем в группе Гам-КОВИД-Вак® в  $6$  раз<sup>1</sup>.

Проведенный корреляционный анализ титра ВНА и анти-RBD IgG обнаружил прямую умеренную корреляцию показателей на 21 день ( $r = 0,78$ ,  $p < 0,001$ ) и на 42 день исследования ( $r = 0,84$ ,  $p < 0,001$ ).

## Обсуждения и выводы

На сегодняшний день вакцинация является одной из основных мер здравоохранения для борьбы с пандемией COVID-19. Несколько вакцин на разных платформах были разработаны

<sup>1</sup> Уровень p для сравнения между визитами был меньше уровня, установленного для принятия альтернативной гипотезы о наличии различий между визитами  $p < 0,000001$ .

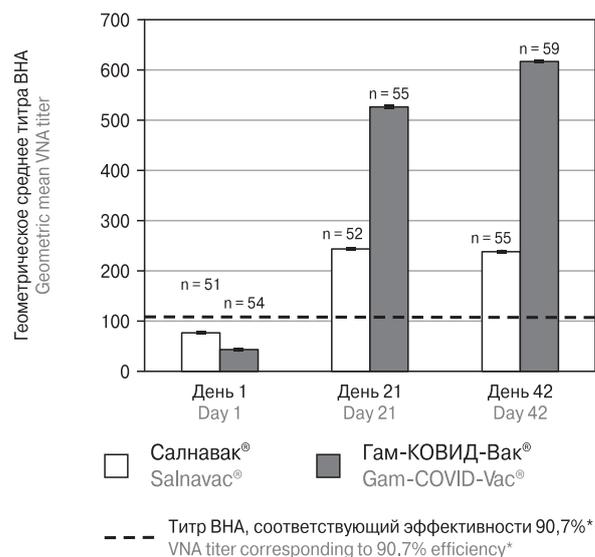
<sup>2</sup> Уровень p был больше уровня, установленного для принятия альтернативной гипотезы о наличии различий между визитами  $p > 0,000001$ .

вскоре после появления SARS-CoV-2 в Китае, а чуть позже в зону интересов исследователей попал мукозальный способ проведения иммунопрофилактики. Белок шипа (S) вируса SARS-CoV-2 является целевым иммуногеном в большинстве разработок вакцин [9]. Это связано с тем, что RBD является областью вируса, которая связывается с ангиотензин-превращающим ферментом 2 клетки-хозяина (ACE2). RBD расположен в субъединице S1 белка S, и связывание RBD вируса и клетки-хозяина ACE-2 инициирует проникновение вируса [9]. ВНА, антитела, которые связываются с RBD, могут предотвратить проникновение вируса в клетки-хозяева [11].

В рамках клинического исследования была использована методика, позволяющая определить наличие специфических к антигену SARS-CoV-2 ВНА антител в реакции нейтрализации на культуре клеток НЕК 293-T-hAce2 с применением псевдовиральных частиц в сыворотке крови добровольцев. Были успешно проанализированы все доступные образцы.

В ряде работ была установлена достоверная корреляция титров ВНА, определяемых исходной референтной методикой PRNT, с титрами, определяемыми с использованием псевдотипированного вируса (PNA). Например, в работе Bewley и соавт., коэффициент корреляции Пирсона между PRNT и MNA составил  $r = 0,0963$  ( $p < 0,001$ ), а между PRNT и PNA была выявлена значительно более сильная корреляция —  $r = 0,8620$  ( $p < 0,001$ ) [3]. Теоретически это дает возможность сравнивать результаты разных исследований, где титры ВНА измерялись разными методами. При таком сравнении следует учитывать, что если титры PRNT и MNA соотносятся примерно, как 1:1 (что логично, поскольку в обоих случаях используется идентичный вирус дикого типа и та же клеточная линия), то титры, получаемые PNA, примерно в 10 раз ниже титров PRNT, измеренных в том же образце.

В последний год в научном сообществе неоднократно высказывалось мнение о том, что вводимые внутримышечно вакцины, включая самые эффективные мРНК и вирусные векторные вакцины, обеспечивающие хорошую защиту от тяжелого течения COVID-19, мало повлияли на цепочку передачи инфекции, особенно в случае новых штаммов SARS-CoV-2, таких как омикрон. Вместе с тем большие надежды на прерывание передачи инфекции возлагались именно на интраназальные вакцины, которые должны были сформировать в организме вакцинированного, помимо системного гуморального и клеточного иммунитета, барьерную защиту на слизистых оболочках [16]. Интраназальные вакцины, разработанные Bharat Biotech и CanSino Biologics, уже одобрены к применению в Индии и Китае соответственно [15].

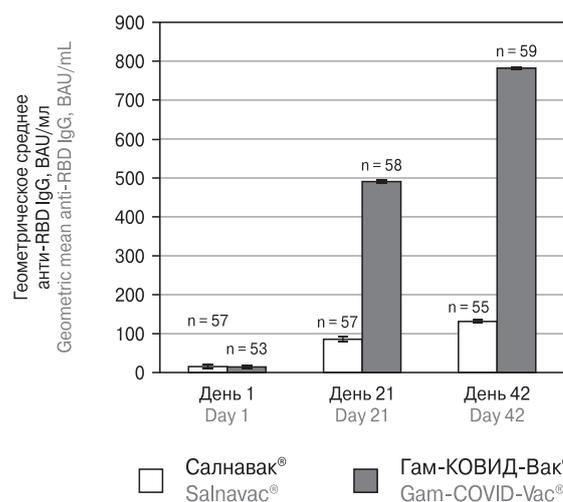


**Рисунок 2. Геометрические средние титра ВНА с указанием стандартного отклонения в группах добровольцев, получавших препарат Салнавак® и Гам-КОВИД-Вак®**

Figure 2. Geometric mean VNA titers and standard deviation in groups of volunteers treated with Salnavac® and Gam-COVID-Vac®

**Примечание.** ВНА — вируснейтрализующие антитела; на оси Y представлены геометрическое среднее и стандартное отклонение; \* в соответствии с опубликованными данными изучения вакцины mRNA-1273 (Moderna) [14].

Note. VNA — virus-neutralizing antibodies; Y-axis: geometric mean and standard deviation; \*the data according published for mRNA-1273 vaccine study (Moderna) [14].



**Рисунок 3. Концентрации анти-RBD-IgG с указанием стандартного отклонения в группах добровольцев, получавших препарат Салнавак® и Гам-КОВИД-Вак®**

Figure 3. Anti-RBD-IgG concentrations and standard deviation in groups of volunteers treated with Salnavac® and Gam-COVID-Vac®

Опубликованное клиническое исследование безопасности и иммуногенности вакцины Ad5-nCoV (CanSino Biologics, Китай), вводимой аэрозольно через небулайзер, показало титры ВНА в сыворотке крови, значительно превосходящие таковые при внутримышечном введении цельновирионной инактивированной вакцины CoronaVac. Геометрическое среднее титра ВНА после применения Ad5-nCoV составило 714 (95% ДИ: 479,4–1063,7) при высокой дозе и 744 — на низкой (95% ДИ: 520,1–1065,6), в то время как после применения CoronaVac титр ВНА был равен 78,5 [95% ДИ: 60,5–101,7] [10]. Следует отметить, что Ad5-nCoV — это тоже векторная вакцина, аналогичная второму компоненту Салнавак®.

В то же время клиническое исследование другой интраназальной вакцины ChAdOx1 (AstraZeneca, Великобритания) не достигло запланированных конечных точек. Антиген-специфические антитела слизистой оболочки сформировались у меньшинства участников и их уровень редко превышал титры, наблюдаемые после заражения SARS-CoV-2. Системные ответы на интраназальную вакцинацию были слабее, чем после внутримышечной вакцинации ChAdOx1. Антиген-специфические антитела слизистой оболочки были обнаружены только у участников, получивших внутримышечную мРНК-вакцину после интраназальной вакцинации. Исследователи сделали вывод, что интраназальное введение ChAdOx1 не индуцировало ни устойчивого ответа антител слизистой оболочки, ни сильного системного ответа. Одной из ве-

роятных причин такого неуспеха авторы считают меньшую способность обезьяньего аденовируса заражать слизистые оболочки человека [12].

Несмотря на показанную в ходе настоящего промежуточного анализа меньшую системную гуморальную иммуногенность интраназальной вакцины Салнавак® по сравнению с внутримышечной вакциной Гам-КОВИД-Вак®, было обнаружено наличие высоких титров ВНА и анти-RBD-IgG у добровольцев в обеих группах через 21 и 42 дня после включения в исследование, что подтверждает напряженность иммунного ответа в отношении SARS-CoV-2 после применения вакцины Салнавак®. В соответствии с опубликованными данными изучения вакцины mRNA-1273 (Moderna, США), титр ВНА (ID<sub>50</sub>), выявляемый с помощью метода псевдонейтрализации, равный 100 на 57 день исследования, соответствует эффективности вакцинации на уровне 90,7% (95% ДИ: 86,7–93,6) [6].

Учитывая применение сопоставимых методов определения ВНА в клиническом исследовании VCI-COV-III и при изучении препарата mRNA-1273 (Moderna, США), можно сделать предварительное заключение о достаточной протективной активности препарата Салнавак®.

## Благодарности

Авторы хотели бы поблагодарить всех исследователей и добровольцев, принимающих участие в этом исследовании, сотрудников центральной лаборатории «ИМГЕН+».

## Список литературы/References

1. СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Утв. постановлением Главного государственного санитарного врача РФ от 28.01.2021 № 4. [3.3686-21. Sanitary rules for prevention of infectious diseases. Approved by Decree of the Chief State Sanitary Doctor of the Russian Federation No. 4 dated 28.01.2021. (In Russ.)] URL: [https://www.rosпотребнадзор.ru/files/news/SP\\_infections\\_compressed.pdf](https://www.rosпотребнадзор.ru/files/news/SP_infections_compressed.pdf) (09.08.2023)
2. Almeida A.J., Alpar H.O. Nasal delivery of vaccines. *J. Drug Target.*, 1996, vol. 3, no. 6, pp. 455–467. doi: 10.3109/10611869609015965
3. Bewley K.R., Coombes N.S., Gagnon L., McInroy L., Baker N., Shaik I., St-Jean J.R., St-Amant N., Buttigieg K.R., Humphries H.E., Godwin K.J., Brunt E., Allen L., Leung S., Brown Ph.J., Penn E.J., Thomas K., Kulnis G., Hallis B., Carroll M., Funnell S., Charlton S. Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays. *Nature Protocols*, 2021, vol. 16, no. 6, pp. 3114–3140. doi: 10.1038/s41596-021-00536-y
4. Boyaka P.N., Tafaro A., Fischer R., Leppla S.H., Fujihashi K., McGhee J.R. Effective mucosal immunity to anthrax: neutralizing antibodies and Th cell responses following nasal immunization with protective antigen. *J. Immunol.* 2003, vol. 170, no. 11, pp. 5636–5643. doi: 10.4049/jimmunol.170.11.5636
5. Chen M., Zhang X.E. Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: a mini review. *Int. J. Biol. Sci.*, 2021, vol. 17, no. 6, pp. 1574–1580. doi: 10.7150/ijbs.59184
6. Gilbert P.B., Montefiori D.C., McDermott A.B., Fong Y., Benkeser D., Deng W., Zhou H., Houchens C.R., Martins K., Jayashankar L., Castellino F., Flach B., Lin B.C., O'Connell S., McDanal C., Eaton A., Sarzotti-Kelsoe M., Lu Y., Yu C., Borate B., van der Laan L.W.P., Hejazi N.S., Huynh C., Miller J., El Sahly H.M., Baden L.R., Baron M., De La Cruz L., Gay C., Kalams S., Kelley C.F., Andrasik M.P., Kublin J.G., Corey L., Neuzil K.M., Carpp L.N., Pajon R., Follmann D., Donis R.O., Koup R.A., Immune Assays Team§, Moderna, Inc. Team§, Coronavirus Vaccine Prevention Network (CoVPN)/Coronavirus Efficacy (COVE) Team§, United States Government (USG)/CoVPN Biostatistics Team§. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. *Science*, 2022, no. 375, no. 6576, pp. 43–50. doi: 10.1126/science.abm3425
7. Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Guseynikov S.V., Baranov K.O., Belovezhets T.N., Mechetina L.V., Volkova O.Yu., Najakshin A.M., Chikaev N.A., Chikaev A.N., Solodkov P.P., Larichev V.F., Gulyaeva M.A., Markhaev A.G., Kononova Yu.V., Alekseyev A.Yu., Shestopalov A.M., Yusubaliev G.M., Klypa T.V., Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Baklaushev V.P., Taranin A.V. Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern. *Cell Discov.*, 2021, vol. 7, no. 1: 96. doi: 10.1038/s41421-021-00340-8

8. Heinz F.X., Stiasny K. Distinguishing features of current COVID-19 vaccines: knowns and unknowns of antigen presentation and modes of action. *NPJ Vaccines*, 2021, vol. 6, no. 1, pp. 1–13. doi: 10.1038/s41541-021-00369-6
9. Jiang Y., Wu Q., Song P., You C. The variation of SARS-CoV-2 and advanced research on current vaccines. *Front. Med. (Lausanne)*, 2022, vol. 8: 806641. doi: 10.3389/fmed.2021.806641
10. Li J.X., Wu S.P., Guo X.L., Tang R., Huang B.Y., Chen X.Q., Chen Y., Hou L.H., Liu J.X., Zhong J., Pan H.X., Shi F.J., Xu X.Y., Li Z.P., Zhang X.Y., Cui L.B., Tan W.J., Chen W., Zhu F.C., Huang H.T., Gou J.B., Si W.X., Wang X., Zhao X.L., Zhu T. Safety and immunogenicity of heterologous boost immunisation with an orally administered aerosolised Ad5-nCoV after two-dose priming with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chinese adults: a randomised, open-label, single-centre trial. *Lancet Respir. Med.*, 2022, vol. 10, no. 8, pp. 739–748. doi:10.1016/S2213-2600(22)00087-X
11. Lombardi A., Bozzi G., Ungaro R., Villa S., Castelli V., Mangioni D., Muscatello A., Gori A., Bandera A. Mini review immunological consequences of immunization with COVID-19 mRNA vaccines: preliminary results. *Front. Immunol.*, 2021, vol. 12: 657711 doi: 10.3389/fimmu.2021.657711
12. Madhavan M., Ritchie A.J., Aboagye J., Jenkin D., Provstgaard-Morys S., Tarbet I., Woods W., Davies S., Baker M., Platt A., Flaxman A., Smith H., Belij-Rammerstorfer S., Wilkins D., Kelly E.J., Villafana T., Green J.A., Poulton I., Lambe T., Hill A.V.S., Ewer K.J., Douglas A.D. Tolerability and immunogenicity of an intranasally-administered adenovirus-vectored COVID-19 vaccine: an open-label partially-randomised ascending dose phase I trial. *EBioMedicine*, 2022, vol. 85: 104298. doi:10.1016/j.ebiom.2022.104298
13. Powers A.D., Drury J.E., Hoehamer C.F., Lockey T.D., Meagher M.M. Lentiviral vector production from a stable packaging cell line using a packed bed bioreactor. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2020, vol. 19, pp. 1–13. doi: 10.1016/j.omtm.2020.08.010
14. Shanmugaraj B., Malla A., Phoolcharoen W. Emergence of novel Coronavirus 2019-nCoV: need for rapid vaccine and biologics development. *Pathogens*, 2020, vol. 9, no. 2: 148. doi: 10.3390/pathogens9020148
15. Waltz E. China and India approve nasal COVID vaccines — are they a game changer? *Nature*, vol. 609, no. 7927, p. 450. doi: 10.1038/d41586-022-02851-0
16. Waltz E. How nasal-spray vaccines could change the pandemic. *Nature*, 2022, vol. 609, no. 7926, pp. 240–242. doi: 10.1038/d41586-022-02824-3
17. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., Wang B., Xiang H., Cheng Zh., Xiong Y., Zhao Y., Li Y., Wang X., Peng Zh. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel Coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, 2020, vol. 323, no. 11, pp. 1061–1069. doi:10.1001/jama.2020.1585
18. Wang S., Zhang Y., Liu S., Peng H., Mackey V., Sun L. Coronaviruses and the associated potential therapeutics for the viral infections. *J. Infect. Dis. Ther.*, 2020, vol. 8, no. 2: 417. doi: 10.4172/2332-0877.1000417
19. WHO. Coronavirus (COVID-19) dashboard. URL: <https://covid19.who.int> (09.08.2023)
20. WHO. COVID-19 vaccine tracker and landscape. 30.03.2023. URL: <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines> (09.08.2023)

**Авторы:**

**Зуев Е.В.**, ведущий эксперт группы научно-медицинской экспертизы и клинической разработки отдела научной экспертизы и фармаконадзора дирекции по клиническим исследованиям и фармаконадзору АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

**Маркова О.А.**, руководитель отдела научной экспертизы и фармаконадзора дирекции по клиническим исследованиям и фармаконадзору АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

**Кулемзин С.В.**, к.б.н., научный сотрудник ООО «ИМГЕН+», г. Новосибирск, Россия;

**Потеряев Д.А.**, к.б.н., советник по науке АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

**Литвинова Н.А.**, к.б.н., руководитель отдела молекулярной диагностики департамента фармацевтического анализа АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

**Короткевич И.А.**, специалист по биостатистике группы биостатистики и управления данными отдела научной экспертизы и фармаконадзора дирекции по клиническим исследованиям и фармаконадзору АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

**Григорьева Т.В.**, младший менеджер проектов клинических исследований медицинского операционного отдела дирекции по клиническим исследованиям и фармаконадзору АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия;

**Хамитов Р.А.**, д.м.н., профессор, вице-президент по исследованиям и разработкам АО «ГЕНЕРИУМ», Владимирская область, Петушинский район, пгт. Вольгинский, Россия.

**Authors:**

**Zuev E.V.**, Lead Expert of the Group of Scientific and Medical Expertise and Clinical Development, Department of Scientific Expertise and Pharmacovigilance, Directorate for Clinical Trials and Pharmacovigilance, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

**Markova O.A.**, Head of the Department of Scientific Expertise and Pharmacovigilance, Directorate for Clinical Trials and Pharmacovigilance, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

**Kulemzin S.V.**, PhD (Biology), Researcher, LLC "IMGEN+", Novosibirsk, Russian Federation;

**Poteryaev D.A.**, PhD (Biology), Science Adviser, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

**Litvinova N.A.**, PhD (Biology), Head of Department of Molecular Diagnostics, Department of Pharmaceutical Analysis, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

**Kortkevich I.A.**, Biostatistician, Group of Biostatistics and Data Management, Department of Scientific Expertise and Pharmacovigilance, Directorate for Clinical Trials and Pharmacovigilance, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

**Grigoryeva T.V.**, Junior Clinical Research Project Manager, Medical Operations Department, Directorate for Clinical Trials and Pharmacovigilance, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation;

**Hamitov R.A.**, DSc (Medicine), Professor, Vice President of Research and Development, JSC "GENERIUM", Vladimir Region, Petushinsky district, Volginsky settlement, Russian Federation.

Поступила в редакцию 21.03.2023  
Отправлена на доработку 02.10.2023  
Принята к печати 05.10.2023

Received 21.03.2023  
Revision received 02.10.2023  
Accepted 05.10.2023