

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

Зуев Е. В. ¹,

Маркова О. А. ¹,

Кулемзин С. В. ²,

Потеряев Д. А. ¹,

Литвинова Н. А. ¹,

Короткевич И. А. ¹,

Григорьева Т. В. ¹,

Хамитов Р. А. ¹

¹ АО «ГЕНЕРИУМ»;

² ООО «ИМГЕН+».

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

Zuev E. V. ^a,

Markova O. A. ^a,

Kulemzin S. V. ^b,

Poteryaev D. A. ^a,

Litvinova N. A. ^a,

Korotkevich I. A. ^a,

Grigoryeva T. V. ^a,

Khamitov R. A. ^a

^a GENERIUM JSC;

^b IMGEN+ LLC.

Резюме

Введение: пандемия короновиральной инфекции, вызванной SARS-CoV-2, явилась серьезным испытанием для всех сфер 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 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 применения двухкомпонентных препаратов Салнавак® (интраназально) и Гам-КОВИД-Вак® (внутримышечно). **Цель:** 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 HEK293T-hACE2. **Материалы и методы:** Всего 137 здоровых добровольцев, с исходным уровнем анти-RBD IgG не выше 100 ВАУ/мл получили иммунизацию 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 HEK293T-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 $238,34 \pm 3,93$ и $616,94 \pm 3,73$) в группах

Салнавак[®] и Гам-КОВИД-Вак[®] соответственно. Учитывая данные о высоком уровне протективности при титре ВНА более 100 при применении метода псевдовирусной 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 $131,22 \pm 3,91$ и $782,03 \pm 3,04$ в группах Салнавак[®] и Гам-КОВИД-Вак[®] соответственно. Показана прямая умеренная корреляция ВНА и анти-RBD IgG. **Вывод:** При проведении исследования для определения титра ВНА была успешно валидирована и использована реакция нейтрализации с применением псевдовирусных 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.

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 Salnavak[®] (intranasal) and Gam-COVID-Vac[®] (intramuscular) vaccination obtained in randomized double-blind multicenter phase 3 clinical trial interim analysis are presented.

Objective: 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 ± 3.93 and 616.94 ± 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 ± 3.91 and 782.03 ± 3.04 in the

Salnavac® and Gam-COVID-Vak® groups, respectively. A direct moderate correlation was shown between VHA 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-Vak® resulted in lower but sufficient stringency of humoral immunity.

Keywords: COVID-19, immunization, vaccine, coronavirus infection, immunogenicity, SARS-CoV-2.

1 **1 Введение.**

2 В последние годы одной из важных эпидемиологических событий для всего
3 мира являлись РНК-содержащие вирусы семейства Coronaviridae. За
4 последние несколько лет широкое распространение получили коронавирус
5 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV) и коронавирус
6 ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) [18, 16]. Новая
7 коронавирусная инфекция, вызывающая развитие COVID-19 (Coronavirus
8 Disease 2019), была выявлена в Ухане (Китай) в декабре 2019 г. [17]. Эту
9 инфекцию вызывает коронавирус, связанный с развитием тяжелого острого
10 респираторного синдрома (SARS-CoV-2). Из-за высокой контагиозности и
11 быстрого распространения вируса воздушно-капельным путем многие страны
12 оказались в зоне риска заражения, ввиду этого в 2019 году Всемирная
13 организация здравоохранения (ВОЗ) определила COVID-19 как всемирную
14 пандемию [19].

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

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

27 Компанией АО «ГЕНЕРИУМ» разработана новая форма выпуска на основе
28 ранее одобренной вакцины Гам-КОВИД-Вак[®] с интраназальным путем

29 введения, который в настоящее время проходит сравнительное клиническое
30 исследование VCI-COV-III.

31 Наличие в крови вируснейтрализующих антител против SARS-CoV-2 является
32 важным показателем защитного иммунитета, сформированного вакциной.
33 Поэтому для доклинических (ДоКИ) и клинических исследований (КИ)
34 вакцин необходимы методы надежного, чувствительного и быстрого
35 обнаружения ВНА против SARS-CoV-2. Классический метод определения
36 титра ВНА, основанный на снижении количества вирусных бляшек в монослое
37 культуры клеток (plaque reduction neutralization test (PRNT)), требует работы с
38 инфекционным, высокопатогенным живым аутентичным вирусом SARS-CoV-
39 2, в условиях изолированной лаборатории с уровнем защиты 3-4 (в
40 отечественной системе санитарного законодательства 1-2 группа
41 патогенности) [1]. Таких лабораторий в РФ крайне мало, риск работы с
42 образцами для оператора высокий, тесты трудоемкие, высокочатратные, и не
43 могут быть использованы в качестве биоаналитического этапа рутинного
44 контроля образцов ДоКИ и КИ. Модификацией этого метода является реакция
45 микронеutralизации, где подсчитываются уже не бляшки, а отдельные
46 инфицированные клетки, выявляемые иммуноцитохимическим способом
47 (microneutralization assay, MNA). Однако эти подходы также отнимают много
48 времени и требуют работы в лабораториях с высоким уровнем
49 биобезопасности. Разумной альтернативой аутентичному вирусу является
50 использование псевдовиральных частиц со сниженной патогенностью, которые
51 представляют собой неспособные к репликации частицы, содержащие
52 структурное и ферментативное ядро одного вируса, такого как вирус
53 везикулярного стоматита (VSV) или лентивирус (ВИЧ), и поверхностные
54 белки другого вируса, такого как S-белок вируса SARS-CoV-2. Для
55 определения инфекции псевдовиралы кодируют репортерный ген, такой как
56 люцифераза светлячка (Fluc) или зеленый флуоресцентный белок (GFP) [5]. Из
57 этого следует, что такой метод можно проводить в обычных лабораториях не

58 высокого класса защиты, имеющих лицензию на работы с 3-4 группой
59 патогенности или без нее. Следует отметить, что, несмотря на
60 привлекательность метода на основе псевдотипированных вирусов,
61 необходима разносторонняя валидация, поскольку на результат реакции на
62 вируснейтрализацию могут влиять многие параметры, такие как: оптимальная
63 концентрация вирусных частиц (выражаемая в единицах трансдукции, TE) в
64 применяемых для трансдукции клеток рабочих растворах, доля «пустых» и
65 «упакованных» лентивирусных частиц, наличие технологических
66 загрязнений, происхождение клеток для инфекции, время совместной
67 инкубации вируса и сыворотки, состав питательной среды/добавок и другие
68 параметры, вносящие вклад в гетерогенность результатов и общую
69 неопределённость методики [15]. В рамках настоящей работы проведена
70 валидация разработанного ранее метода определения ВНА вируса для целей
71 высокопроизводительного анализа образцов сыворотки вакцинированных
72 добровольцев клинического исследования VCI-COV-III.

73 2 Материалы и методы.

74 1. Данные клинического исследования

75 Дизайн клинического исследования

76 Клиническое исследование, в ходе которого проводился отбор биообразцов
77 для анализа, является рандомизированным двойным слепым многоцентровым
78 исследованием 3 фазы, проводимым с целью оценки иммуногенности
79 интраназальной и внутримышечной форм комбинированной векторной
80 вакцины против COVID-19, индуцированного SARS-CoV-2, в дизайне
81 «double-dummy» для заслепления способа введения препарата. В целях
82 обеспечения возможности коррекции общего размера выборки в ходе
83 исследования по данным на 42 день после вакцинации был выбран групповой
84 последовательный дизайн исследования (group sequential design). Протокол
85 исследования одобрен Минздравом России (МЗ России) (№ 869 от 20.12.2021)
86 и независимыми локальными этическими комитетами клинических центров.

87 Исследование проводится в соответствии с требованиями Надлежащей
88 Клинической Практики и в соответствии с требованиями Хельсинкской
89 декларации Всемирной Медицинской Ассоциации пересмотра 2013 г.
90 Исследование состоит из следующих периодов: скрининг до 7 дней,
91 иммунизация компонентом I (день 1) и компонентом II (день 21) исследуемых
92 продуктов (ИП), период наблюдения I (до 42 дней) и период наблюдения II (до
93 365 дней). На сегодняшний день доступны результаты промежуточного
94 анализа данных на 42 день наблюдения. Исследование продолжается.

95 Критерии отбора добровольцев

96 Включение добровольцев проводится в 16 клинических центрах на базе
97 медицинских учреждений Российской Федерации.

98 *Критерии включения:* возраст 18–60 лет; индекс массы тела (ИМТ)
99 $18,5 \leq \text{ИМТ} \leq 29,9$ кг/м²; отсутствие существенных отклонений при
100 лабораторных, инструментальных и физикальных исследованиях; уровень
101 исходных анти-RBD IgG антител к SARS-CoV-2 не выше 100 ВАУ/мл;
102 согласие на использование эффективных методов контрацепции; отсутствие
103 острого инфекционного или неинфекционного заболевания и отсутствие
104 обострения хронического заболевания за 14 дней до иммунизации;
105 отрицательный анализ мочи на запрещенные препараты; отрицательный тест
106 на алкоголь в выдыхаемом воздухе и отсутствие каких-либо злокачественных
107 новообразований.

108 *Критерии исключения:* любая вакцинация в течение 30 дней до включения с
109 ограничением вакцинации против SARS-CoV-2 в течение 6 месяцев до
110 включения в исследование; COVID-19 в анамнезе в течение 6 месяцев до
111 включения; положительный тест на SARS-CoV-2 на скрининге;
112 положительный IgM к SARS-CoV-2 или SARS-CoV-2 анти-RBD IgG более 100
113 ВАУ/мл; контакт с больными COVID-19 в течение предшествующих
114 включению 14 дней; стероидные препараты (кроме контрацептивов),

115 иммуноглобулины и/или другие компоненты крови за 30 дней до
116 рандомизации; затруднение носового дыхания; злоупотребление
117 наркотическими препаратами; регулярное применение антиконгестантов;
118 использование иммунодепрессантов, завершившееся менее чем за 3 месяца до
119 рандомизации; положительный тест на беременность; положительный
120 результат диагностики ВИЧ, гепатит В или С; наличие в анамнезе
121 аллергических заболеваний любого генеза; систолическое артериальное
122 давление <100 или > 130 мм рт. ст. или диастолическое артериальное давление
123 <60 или >90 мм рт. ст.; частота сердечных сокращений <60 или >100 ударов в
124 минуту; наличие в анамнезе аутоиммунных заболеваний у добровольцев и у их
125 родственников 1-2 степени родства; употребление алкоголя выше уровня
126 низкого риска; госпитализация и/или хирургическое вмешательство во время
127 исследования и до 4 недель до введения исследуемых препаратов;
128 сопутствующие заболевания, влияющие на результаты исследования. Все
129 добровольцы предоставили подписанное информированное согласие перед
130 включением в исследование.

131 Исследуемые препараты

132 Салнавак® представляет собой формат интраназального введения ранее
133 одобренной к применению вакцины Гам-КОВИД-Вак® и состоит из двух
134 компонентов рекомбинантных вирусных частиц на основе аденовирусов
135 человека серотипа 26 (компонент I) и 5 (компонент II), несущих ген S-белка
136 вируса SARS-CoV-2. Полная доза обеих вакцин составляет 10¹¹ вирусных
137 частиц на дозу для каждого рекомбинантного аденовируса или 0,5 мл на дозу
138 для внутримышечной/интраназальной инъекции. Плацебо состоит из
139 буферной композиции, равной объему вакцины. Исследуемые препараты и
140 плацебо вводили внутримышечно или интраназально в соответствии со схемой
141 рандомизации.

142 Рандомизация и маскировка

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

155 Процедуры

156 Помимо прочих стандартных методов обследования, предусмотренных
157 протоколом, для всех участников был произведен отбор биообразцов для
158 оценки титра ВНА к SARS-CoV-2 и анти-RBD IgG в День 1 (до введения
159 компонента I), День 21 (до введения компонента II) и День 42 с целью анализа
160 гуморального иммунитета.

161 Клинико-лабораторные данные были собраны с использованием электронной
162 платформы EDC.

163 Переменные интереса исследования

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

169 **2. Данные лабораторного исследования**

170 Методика определения ВНА против SARS-CoV-2 была разработана и описана
171 компанией ООО «ИМГЕН+» [8].

172 Получение и очистка лентивирусных частиц, псевдотипированных S-белком
173 SARS-CoV-2 (штамм Wuhan-Hu-1).

174 Псевдовirusы получали путем котрансфекции клеток HEK293T плазмидами
175 PLV-Fluc, psPAX2 и pCAGGS-SΔ19, кодирующими соответственно векторную
176 кассету, белки Gag, Pol и Rev вируса HIV-1 и S-белок вируса SARS-CoV-2
177 штамма Wuhan-Hu-1 без 19 С-терминальных аминокислотных остатков [8]. За
178 день до трансфекции клетки HEK293T высевали с плотностью 200000
179 клеток/мл в чашки для культивирования площадью 150 мм² и культивировали
180 в инкубаторе с CO₂. Через 24 часа клетки трансфицировали плазмидами PLV-
181 Fluc, psPAX2 и pCAGGS-SΔ19 кальций-фосфатным методом. На одну
182 трансфекцию использовали 70 мкг смеси плазмид (при соотношении PLV-Fluc:
183 psPAX2:pCAGGS-SΔ19 = 3 : 2 : 2). Для получения осадка 372 мкл 2М CaCl₂
184 добавляли в стерильную коническую пробирку, содержащую 1098 мкл смеси
185 плазмид в воде. Затем смесь плазмиды/кальций хлорид добавляли по каплям к
186 равному объему фосфатно-солевого буфера HEPES (50 мМ HEPES, 1,5 мМ
187 Na₂HPO₄, 280 мМ NaCl, 10 мМ KCl, 12 мМ сахарозы), pH 7,15 при постоянном
188 встряхивании. Сразу после перемешивания осадок кальций-фосфат/ДНК
189 переносили в клетки и оставляли на 7-8 часов. После промывания PBS
190 культуральную среду заменяли средой Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher
191 Scientific), содержащей 2,5% термоинактивированной фетальной телячьей
192 сыворотки. Через 68-72 часа после трансфекции культуральную среду,
193 содержащую псевдовirusные частицы, собирали в конические пробирки
194 объемом 50 мл, центрифугировали в течение 10 мин при 4500 g для удаления
195 клеток и крупного клеточного детрита и фильтровали с использованием
196 системы вакуумной фильтрации PES 0,45 мкм. Затем полученный супернатант
197 концентрировали с помощью модуля Vivaflow-50 100K (Sartorius) до 10-
198 кратного уменьшения объема. Затем концентрированную среду наслаивали на

199 20% раствор сахарозы и центрифугировали в центрифуге Avanti J-30 (Beckman
200 Coulter) при 24000 g в течение 90 мин с использованием ротора JS-24. Осадок
201 псевдовируса ресуспендировали в среде Opti-MEM, содержащей 2,5%
202 термоинактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, и аликвоты
203 помещали в криопробирки. После шоковой заморозки вирусные частицы
204 хранили в парах жидкого азота.

205 Частицы псевдовируса титровали на полученных ранее клетках НЕК 293Т-
206 hACE2., стабильно экспрессирующих рецептор SARS-CoV-2, человеческий
207 ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) [8].

208 Подготовка образцов сыворотки добровольцев

209 Обезличенные образцы сыворотки добровольцев инактивировали на водяной
210 бане при температуре $(56 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2) \text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин с целью истощения
211 компонентов системы комплемента. Образцы инактивированной сыворотки
212 использовали сразу или замораживали для последующего анализа. Образцы
213 сыворотки с признаками гемолиза или бактериальной контаминации для
214 анализа не использовались.

215 Анализ нейтрализации вируса

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

219 Далее в лунки 96-луночного планшета с U-образным дном вносили
220 двукратные разведения образцов сыворотки в среде Opti-MEM, начиная с
221 разведения 1:10 и до 1:1280 в объеме 80 мкл. . Для конкретных анализов
222 использовались другие коэффициенты разбавления, как указано в тексте.
223 Суспензию вирусных частиц в среде Opti-MEM 2,5% FBS добавляли во все
224 лунки (10 000 TE на лунку в 80 мкл среды), кроме лунок, служивших
225 отрицательным контролем. После этого содержимое лунок перемешивали

226 многоканальной пипеткой, затем планшет закрывали и инкубировали 30 мин в
227 CO₂-инкубаторе при 37°C.

228 Затем содержимое U-образных чашек переносили в белые культуральные
229 чашки, содержащие клетки НЕК 293T-hACE2. Среду для выращивания
230 предварительно осторожно удаляли из белых 96-луночных планшетов, не
231 нарушая прикрепленных клеток. Затем белые планшеты оставляли в
232 инкубаторе с CO₂ на 36–48 часов при 37°C и 5% CO₂.

233 Далее питательную среду отсасывали и в каждую лунку добавляли по 40 мкл
234 раствора PBS. В каждую лунку добавляли предварительно нагретый до 25 °C
235 реагент OneGlo (Promega), содержащий субстрат для люциферазы, и планшеты
236 инкубировали в течение 60–75 минут при комнатной температуре (20–25°C) в
237 темноте на орбитальном шейкере. После этого измеряли люминесценцию с
238 помощью люминометра Luminoskan Microplate (Thermofisher). За 100%-ную
239 нейтрализацию принимали среднее значение люминесценции, полученное в
240 лунках с добавленным нейтрализующим антителом iB20, описанным ранее [8].
241 За 0% нейтрализации принимали среднее значение люминесценции,
242 полученное в лунках без добавления сыворотки. Среднее значение
243 люминесценции, полученное в лунках без добавления вирусных частиц,
244 принимали за фоновое значение. Расчет ID₅₀ (расчётное значение,
245 составляющее разведение сыворотки, необходимое для 50% нейтрализации
246 вируса) был проведен с помощью анализа нелинейной регрессии в пакете
247 GraphPad Prism.

248 Анализы, выполненные в рамках валидации метода

249 *Чувствительность/специфичность* — для определения этих параметров была
250 измерена нейтрализующая активность 24 образцов сыворотки
251 выздоравливающих/вакцинированных пациентов с подтвержденными ИФА
252 антителами к S-белку SARS-CoV-2. Отрицательными пробами являлись

253 замороженные до начала 2020 года архивные образцы сывороток от доноров,
254 постоянно проживающих в РФ.

255 *Воспроизводимость* — уровни ID₅₀ у серопозитивных доноров исследовали в
256 течение 6 аналитических циклов.

257 *Прецизионность внутри планшета* - исследовали вариабельность измерения
258 ID₅₀ в пределах одного планшета, измеренного для одного образца сыворотки.

259 *Внутрилабораторная прецизионность* — значения ID₅₀ были измерены для
260 одного и того же образца сыворотки при настройке реакции разными
261 операторами в один и тот же день или одним и тем же оператором в разные
262 дни.

263 *Устойчивость (робастность)* - значения ID₅₀ были измерены для одного и
264 того же образца сыворотки с использованием различных партий вирусных
265 частиц.

266 *Линейность* — изменение уровня ID₅₀, измеренного для серийных разведений
267 контрольной сыворотки. В качестве меры линейности мы рассматривали
268 коэффициент R², полученный путем линейной регрессии значений log₂
269 (коэффициент разбавления) в зависимости от log₂ (ID₅₀), как меру
270 линейности.

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

275 **3. Статистический анализ**

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

278 В анализ были включены данные без значимых отклонений от протокола
279 исследования. Все сравнения добровольцев между группами препаратов

280 проводились с помощью двусторонних критериев (кроме анализа первичной
281 конечной точки с помощью одностороннего критерия).

282 При сравнении исходных характеристик добровольцев использовался t-
283 критерий Стьюдента для независимых выборок или критерий Манна-Уитни, в
284 зависимости от вида распределения добровольцев по значениям этих
285 переменных. Для сравнений групп добровольцев по полу использовался
286 критерий χ^2 .

287 Так как все переменные, проанализированные в рамках промежуточного
288 анализа, будут повторно анализироваться и сравниваться между группами в
289 рамках финального анализа всего объема данных за период со скрининга до
290 Дня 42, все сравнения между добровольцами в группах по препаратам
291 корректировались поправками на множественные сравнения. При сравнениях
292 групп добровольцев по исходным характеристикам, титру ВНА на День 21 и
293 День 42, титру RBD на День 1, День 21 и День 42, а также при сравнениях по
294 титру ВНА и титру RBD в динамике нулевая гипотеза об отсутствии различий
295 между группами/визитами отвергалась и принималась альтернативная
296 гипотеза о наличии различий между группами/визитами при уровне p
297 $<0,000001$.

298 Анализ первичной конечной точки проводился на логарифмированных данных
299 титра ВНА. Тестирование гипотез по первичной конечной точке проводилось
300 с помощью одностороннего t-критерия Стьюдента для независимых выборок
301 при уровне ошибки I рода (α) = 0,0000005. При превышении разницей средних
302 титра ВНА границы доказательства эффективности в 1,042 планировалось
303 принять утверждение о не меньшей иммунологической эффективности
304 интраназальной вакцины Салнавак® по сравнению с вакциной Гам-КОВИД-
305 Вак® по разнице средних титров ВНА.

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

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

313 Анализ корреляций между титром ВНА и титром анти-RBD IgG-антител
314 проводился с помощью коэффициента Спирмена. Для трактовки силы
315 корреляций использовалась следующая шкала: $0 < |r| < 0,3$ – слабая корреляция;
316 $0,3 \leq |r| < 0,9$ – умеренная корреляция; $|r| \geq 0,9$ – сильная корреляция.

317 **4. Надзор за исследованием**

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

328 **3 Результаты.**

329 **1. Профиль исследования**

330 На момент проведения промежуточного анализа в исследование было
331 скринировано 703 добровольца, 138 из которых (19,63%) соответствовали всем
332 критериям включения/невключения и были рандомизированы в две группы
333 вакцинопрофилактики. Один из рандомизированных добровольцев отозвал

информированное согласие до введения Компонента I вакцины, что было расценено как ошибка рандомизации. Полную анализируемую 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) (Рисунок 1).

2. 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 – $p < 0,000001$) (Таблица 1).

3. 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 стабильным²; 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 раза¹ (Рисунок 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

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

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

359 статистически значимые изменения титра ВНА относительно Дня 21
360 отсутствовали: титр на 42 день составил $616,94 \pm 3,73^2$. В целом за время,
361 прошедшее с начала исследования, титр ВНА в группе Гам-КОВИД-Вак®
362 увеличился в 14,2 раза¹ (Рисунок 2).

363 Титр ВНА на 42 день на логарифмированных данных составил 5,47 и 6,42 в
364 группах Салнавак® и Гам-КОВИД-Вак® соответственно. Межгрупповая
365 разница средних геометрических титров ВНА на 42 день исследования
366 составила -0,95 (нижняя граница 99,9% ДИ для разницы титров ВНА -2,16).
367 Полученный уровень p для сравнения $p=0,99$ был больше, и величина эффекта,
368 равная -0,95, была меньше уровней, заданных для доказательства не меньшей
369 иммуногенности вакцины Салнавак® по сравнению с вакциной Гам-КОВИД-
370 Вак®. Отношение геометрических средних титра ВНА на 42 день
371 исследования составило 0,39 с нижней границей 99,99% ДИ равной 0,12.

372 Титр уровня RBD в группе Салнавак® составил $15,23 \pm 4,74$ ВАУ/мл в День 1.
373 Ко Дню 21 он увеличился в 5,6 раза по сравнению с Днем 1 – до $85,32 \pm 7,91$
374 ВАУ/мл¹. На День 42 титр RBD составил $131,22 \pm 3,91$ ВАУ/мл, значимо не
375 изменившись относительно Дня 21². В целом за время исследования в группе
376 Салнавак® титр RBD возрос в 8,6 раза¹ (Рисунок 3).

377 В группе Гам-КОВИД-Вак® титр RBD в День 1 составил $14,21 \pm 4,22$ ВАУ/мл,
378 далее увеличившись до $490,76 \pm 4,66$ ВАУ/мл – в 34,5 раза¹. Ко Дню 42
379 статистически значимые изменения титра RBD относительно Дня 21
380 отсутствовали, титр RBD составил $782,03 \pm 3,04$ ВАУ/мл². В целом титр RBD в
381 группе Гам-КОВИД-Вак® с Дня 1 до Дня 42 увеличился в 55 раз¹ (Рисунок 3).

382 Отношение геометрических средних титра RBD на 42 день исследования
383 составило 0,17 [99,99% ДИ 0,05;0,56] ($p < 0,001$) (Рисунок 3). Средний титр
384 RBD в группе Салнавак® был ниже, чем в группе Гам-КОВИД-Вак® в 6 раз¹.

385 Проведенный корреляционный анализ титра ВНА и анти-RBD IgG обнаружил
386 прямую умеренную корреляцию показателей на 21 день ($r=0,78$, $p<0,001$) и на
387 42 день исследования ($r=0,84$, $p<0,001$).

388 4 Обсуждения и выводы.

389 На сегодняшний день вакцинация является одной из основных мер
390 здравоохранения для борьбы с пандемией COVID-19. Несколько вакцин на
391 разных платформах были разработаны вскоре после появления SARS-CoV-2 в
392 Китае, а чуть позже в зону интересов исследователей попал мукозальный
393 способ проведения иммунопрофилактики. Белок шипа (S) вируса SARS-CoV-
394 2 является целевым иммуногеном в большинстве разработок вакцин [11]. Это
395 связано с тем, что RBD является областью вируса, которая связывается с
396 ангиотензин-превращающим ферментом 2 клетки-хозяина (ACE2). RBD
397 расположен в субъединице S1 белка S, и связывание RBD вируса и клетки-
398 хозяина ACE-2 инициирует проникновение вируса [9]. ВНА, антитела,
399 которые связываются с RBD, могут предотвратить проникновение вируса в
400 клетки-хозяева [13].

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

406 В ряде работ была установлена достоверная корреляция титров ВНА,
407 определяемых исходной референтной методикой PRNT, с титрами,
408 определяемыми с использованием псевдотипированного вируса (PNA).
409 Например, в работе Bewley et al, коэффициент корреляции Пирсона между
410 PRNT и MNA составил $r=0,0963$ ($p<0,001$), а между PRNT и PNA была
411 выявлена значительно более сильная корреляция – $r=0,8620$ ($p<0,001$) [3].
412 Теоретически это дает возможность сравнивать результаты разных

413 исследований, где титры ВНА измерялись разными методами. При таком
414 сравнении следует учитывать, что если титры PRNT и MNA соотносятся
415 примерно, как 1:1 (что логично, поскольку в обоих случаях используется
416 идентичный вирус дикого типа и та же клеточная линия), то титры,
417 получаемые PNA, примерно в 10 раз ниже титров PRNT, измеренных в том же
418 образце.

419 В последний год в научном сообществе неоднократно высказывалось мнение
420 о том, что вводимые внутримышечно вакцины, включая самые эффективные
421 мРНК и вирусные векторные вакцины, обеспечивающие хорошую защиту от
422 тяжелого течения COVID-19, мало повлияли на цепочку передачи инфекции,
423 особенно в случае новых штаммов SARS-CoV-2, таких как омикрон. Вместе с
424 тем большие надежды на прерывание передачи инфекции возлагались именно
425 на интраназальные вакцины, должны сформировать, помимо системного
426 гуморального и клеточного иммунитета, барьерную защиту на слизистых
427 оболочках [10]. Интраназальные вакцины, разработанные Bharat Biotech и
428 CanSino Biologics уже одобрены к применению в Индии и Китае,
429 соответственно [6].

430 Опубликованное клиническое исследование безопасности и иммуногенности
431 вакцины Ad5-nCoV (CanSino Biologics), вводимой аэрозольно через
432 небулайзер, показало титры ВНА в сыворотке крови, значительно
433 превосходящие таковые при внутримышечном введении цельновирионной
434 инактивированной вакцины CoronaVac. Геометрическое среднее титра ВНА
435 после применения Ad5-nCoV составил 714 (95% ДИ: 479,4–1063,7) при
436 высокой дозе и 744 на низкой (95% ДИ: 520,1–1065,6), в то время как после
437 применения CoronaVac титр ВНА был равен 78,5 [95% ДИ: 60,5–101,7] [12].
438 Следует отметить, что Ad5-nCoV – это тоже векторная вакцина, аналогичная
439 второму компоненту Салнавак®.

440 В то же время, клиническое исследование другой интраназальной вакцины
441 ChAdOx1 (AstraZeneca) не достигло запланированных конечных точек.

442 Антиген-специфические антитела слизистой оболочки сформировались у
443 меньшинства участников и их уровень редко превышал титры, наблюдаемые
444 после заражения SARS-CoV-2. Системные ответы на интраназальную
445 вакцинацию были слабее, чем после внутримышечной вакцинации ChAdOx1.
446 Антиген-специфические антитела слизистой оболочки были обнаружены
447 только у участников, получивших внутримышечную мРНК-вакцину после
448 интраназальной вакцинации. Исследователи сделали вывод, что
449 интраназальное введение ChAdOx1 не индуцировало ни устойчивого ответа
450 антител слизистой оболочки, ни сильного системного ответа. Одной из
451 вероятных причин такого неуспеха авторы считают меньшую способность
452 обезьяньего аденовируса заражать слизистые оболочки человека [14].

453 Несмотря на показанную в ходе настоящего промежуточного анализа
454 меньшую системную гуморальную иммуногенность интраназальной вакцины
455 Салнавак® по сравнению с внутримышечной вакциной Гам-КОВИД-Вак®,
456 было обнаружено наличие высоких титров ВНА и анти-RBD-IgG у
457 добровольцев в обеих группах через 21 и 42 дня после включения в
458 исследование, что подтверждает напряженность иммунного ответа в
459 отношении SARS-CoV-2 после применения вакцины Салнавак®. В
460 соответствии с опубликованными данными изучения вакцины mRNA-1273
461 (Moderna), титр ВНА (ID50), выявляемый с помощью метода
462 псевдонейтрализации, равный 100 на 57 день исследования, соответствует
463 эффективности вакцинации на уровне 90,7% (95% ДИ: 86,7%–93,6%) [7].

464 Учитывая применение сопоставимых методов определения ВНА в
465 клиническом исследовании VCI-COV-III и при изучении препарата mRNA-
466 1273 (Moderna), можно сделать предварительное заключение о достаточной
467 протективной активности препарата Салнавак®.

468 **Благодарности:** авторы хотели бы поблагодарить всех исследователей и
469 добровольцев, принимающих участие в этом исследовании, сотрудников
470 центральной лаборатории «ИМГЕН+».

РИСУНКИ

Рисунок 1. Распределение добровольцев в исследовании.

Figure 1. Distribution of volunteers in the trial.

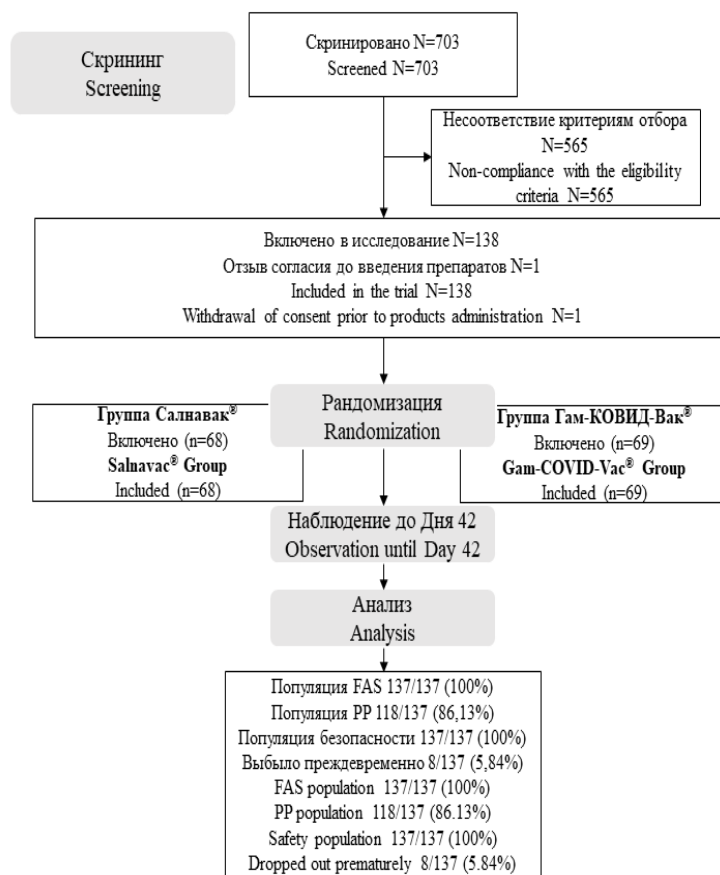


Рисунок 2. Геометрические средние титра ВНА с указанием стандартного отклонения в группах добровольцев, получавших препарат Салनावак® и Гам-КОВИД-Вак®.

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

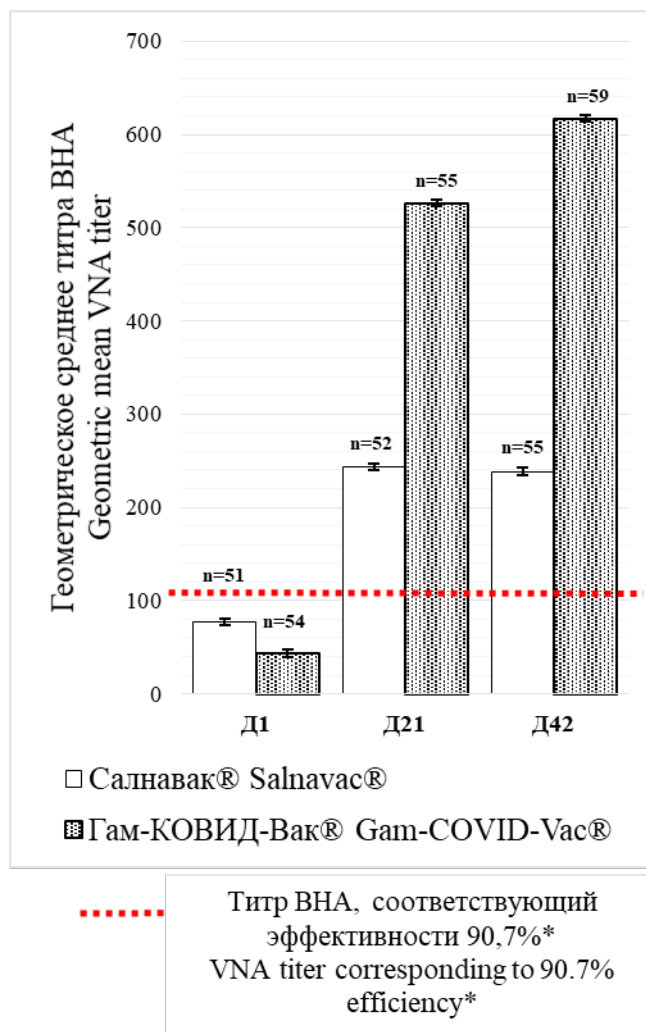
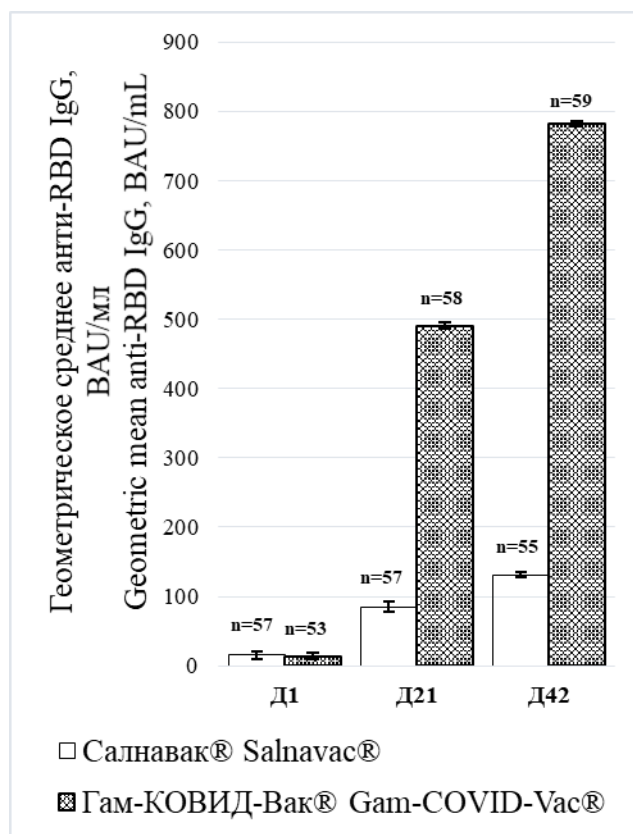


Рисунок 3. Концентрации анти-RBD-IgG с указанием стандартного отклонения в группах добровольцев, получавших препарат Салнавак® и Гам-КОВИД-Вак®.

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



Примечание: ВНА – вируснейтрализующие антитела; на оси Y представлены геометрическое среднее и стандартное отклонение; * в соответствии с опубликованными данными изучения вакцины mRNA-1273 (Moderna) [16]; на оси Y представлены геометрическое среднее и стандартное отклонение.

Note: VNA - virus-neutralizing antibodies; Y-axis: geometric mean and standard deviation; *the data according published for mRNA-1273 vaccine study (Moderna) [16];

The Y-axis represents the geometric mean and standard deviation.

ТАБЛИЦЫ

Таблица 1. Исходные характеристики добровольцев. Популяция FAS.

Table 1. Baseline characteristics of volunteers. FAS population.

Параметр Parameter	Салनावак® Salnavac® (N=68)	Гам-КОВИД- Вак® Gam-COVID- Vac® (N=69)	Уровень р (критерий) p-value (criteria)
Женский пол Female n (%)	31 (45,6)	31 (44,9)	1
Мужской пол Male n (%)	37 (54,4)	38 (55,1)	χ^2
Возраст, лет Age, years Среднее (СО) Mean (SD)	34,43 (8,99)	36,25 (9,18)	0,24 t-критерий Стьюдента Student's t-test
САД, мм рт. ст. SAP, mmHg Медиана (МКР) Median (IQR)	118 (110;124,25)	120 (112;125)	0,31 Манна-Уитни Mann-Whitney
ДАД, мм рт. ст. DAP, mmHg Медиана (МКР) Median (IQR)	75 (70;80)	75 (68;80)	0,38 Манна-Уитни Mann-Whitney
ЧСС, уд. /мин	71,5 (67;79,25)	69 (68;76)	0,14 Манна-Уитни

HR, bpm Медиана (МКР) Median (IQR)			Mann-Whitney
ЧДД, мин⁻¹ RR, min⁻¹ Медиана (МКР) Median (IQR)	16 (16;17)	16 (16;17)	0,80 Манна-Уитни Mann-Whitney
Температура тела, °C Body temperature, °C Медиана (МКР) 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 (СО), 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.

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДААННЫЕ**Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку**

Зуев Евгений Васильевич, Ведущий эксперт группы научно-медицинской экспертизы и клинической разработки отдела научной экспертизы и фармаконадзора дирекции по клиническим исследованиям и фармаконадзору АО «ГЕНЕРИУМ».

адрес: г. Москва, ул. Тестовская, 10;

телефон: +7 9166419698;

e-mail: evzuev@generium.ru

Zuev Evgeniy Vasilyevich, Lead Expert of the group of scientific and medical expertise and clinical development of the department of scientific expertise and pharmacovigilance of the directorate for clinical trials and pharmacovigilance of GENERIUM JSC.

address: Moscow, st. Testovskaya, 10.

telephone: +7 9166419698;

e-mail: evzuev@generium.ru

Блок 2. Информация об авторах

Маркова О. А., Руководитель отдела научной экспертизы и фармаконадзора дирекции по клиническим исследованиям и фармаконадзору АО «ГЕНЕРИУМ»;

Markova O. A., Head of the Department of Scientific Expertise and Pharmacovigilance of the Directorate for Clinical Trials and Pharmacovigilance of GENERIUM JSC;

Кулемзин С. В., Кандидат биологических наук; Научный сотрудник ООО «ИМГЕН+»;

Kulemzin S. V., PhD in Biology; Researcher at IMGEN+ LLC;

Потеряев Д. А., Кандидат биологических наук; Советник по науке АО «ГЕНЕРИУМ»;

Poteryaev D. A., PhD in Biology; Science Adviser of GENERIUM JSC;

Литвинова Н. А., Кандидат Биологических наук; Руководитель отдела молекулярной диагностики Департамента фармацевтического анализа АО «ГЕНЕРИУМ»;

Litvinova N. A., PhD in Biology; Head of the Department of Molecular Diagnostics of the Department of Pharmaceutical Analysis of JSC "GENERIUM";

Короткевич И. А., Специалист по биостатистике; Группа биостатистики и управления данными отдела научной экспертизы и фармаконадзора дирекции по клиническим исследованиям и фармаконадзору АО «ГЕНЕРИУМ»;

Korotkevich I. A., Biostatistician; Group of Biostatistics and Data Management of the Department of Scientific Expertise and Pharmacovigilance of the Directorate for Clinical Trials and Pharmacovigilance of GENERIUM JSC;

Григорьева Т. В., Младший менеджер проектов клинических исследований Медицинский операционный отдел дирекции по клиническим исследованиям и фармаконадзору АО «ГЕНЕРИУМ»;

Grigoryeva T. V., Junior Clinical Research Project Manager; Medical Operations Department of the Directorate for Clinical Trials and Pharmacovigilance JSC "GENERIUM";

Хамитов Р. А., Вице-президент по исследованиям и разработкам АО «ГЕНЕРИУМ»;

Khamitov R. A., Vice President for Research and Development of GENERIUM JSC.

Блок 3. Метаданные статьи

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

NEUTRALIZATION REACTION OF PSEUDOVIRUS PARTICLES WITH
VIRUS NEUTRALIZING ANTIBODIES AS A BIOANALYTICAL PART OF A
SALNAVAC VACCINE CLINICAL TRIAL

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

ИММУНОГЕННОСТЬ САЛНАВАК

IMMUNOGENICITY OF SALNAVAK

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

Keywords: COVID-19, immunization, vaccine, coronavirus infection, immunogenicity, SARS-CoV-2.

Количество страниц текста: **18,**

Количество рисунков: **3,**

Количество таблиц: **1.**

Статья предназначена для раздела: **«оригинальные статьи».**

Дата отправки: 21.03.2022

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи и/или DOI
1	Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней. СанПиН 3.3686-21, утверждены постановлением Главного санитарного врача РФ от 01.09.2021 №4	Sanitary and epidemiological requirements for the prevention of infectious diseases. SanPiN 3.3686-21, approved by the Decree of the Chief Sanitary Doctor of the Russian Federation of 09/01/2021 No. 4	https://sudact.ru/law/postanovlenie-glavnogo-gosudarstvennogo-sanitarnogo-vracha-rf-ot_1377/sanpin-3.3686-21/
2	Almeida A.J., Alpar H.O. Nasal delivery of vaccines. J Drug Target, 1996, vol. 3, no. 6, pp. 455–67	-	https://doi.org/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.,	-	https://www.nature.com/articles/s41596-021-00536-y

	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.		
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. 5636–43.	-	https://doi.org/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.	-	https://doi:10.7150/ijbs.59184

6	China and India approve nasal COVID vaccines — are they a game changer? Nature. News. 07 September 2022.		https://www.nature.com/articles/d41586-022-02851-0
7	Gilbert PB, Montefiori DC, McDermott AB, Fong Y, Benkeser D, Deng W, Zhou H, Houchens CR, Martins K, Jayashankar L, Castellino F, Flach B, Lin BC, O'Connell S, McDanal C, Eaton A, Sarzotti-Kelsoe M, Lu Y, Yu C, Borate B, van der Laan LWP, Hejazi NS, Huynh C, Miller J, El Sahly HM, Baden LR, Baron M, De La Cruz L, Gay C, Kalams S, Kelley CF, Andrasik MP, Kublin JG, Corey L, Neuzil KM, Carpp LN, Pajon R, Follmann D, Donis RO, Koup RA; Immune Assays Team§; Moderna, Inc. Team§; Coronavirus Vaccine Prevention Network (CoVPN)/Coronavirus Efficacy (COVE) Team§; United States Government	-	https://doi:10.1126/science.abm342

	(USG)/CoVPN Biostatistics Team§. Immune correlates analysis of the mRNA-1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial. <i>Science</i> , 2022375(6576), 43-50. vol. 375, no. 6576 pp. 43-50.		
8	Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Guselnikov S.V. Konstantin O. 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., Yusubalieva 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. <i>Cell Discovery</i> , 2021, vol. 7, no. 1, pp. 1-15.	-	doi: 10.1038/s41421-021-00340-8

9	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.
10	How nasal-spray vaccines could change the pandemic. Nature. News feature. 06 September 2022.	-	https://www.nature.com/articles/d41586-022-02824-3
11	Jiang Y., Wu Q., Song P., You C. The Variation of SARS-CoV-2 and Advanced Research on Current Vaccines. Front. Med. 2021, vol. 8: pp. 806641	-	doi: 10.3389/fmed.2021.806641.
12	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	-	doi:10.1016/S2213-2600(22)00087-X

	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. <i>Lancet Respir Med.</i> 2022, vol. 10, no. 8, pp. 739-748.		
13	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. <i>Front. Immunol.</i> 2021; vol. 12, pp. 657711	-	doi: 10.3389/fimmu.2021.657711.
14	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	-	doi:10.1016/j.ebiom.2022.104298

	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, pp. 104298.		
15	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, Molecular Therapy - Methods & Clinical Development, 2020, vol. 19, pp. 1-13, ISSN 2329-0501,	-	https://doi.org/10.1016/j.omtm.2020.08.010
16	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, pp.148.	-	https://www.mdpi.com/2076-0817/9/2/148

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 - J Am Med Assoc., 2020, vol. 323, no. 11, pp. 1061–9.	-	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, pp. 1–8.	-	https://www.researchgate.net/publication/339796674
19	WHO Coronavirus Disease (COVID-19) Dashboard. Дата последнего обновления: 01.11.2022	-	https://covid19.who.int/
20	WHO COVID-19 vaccine tracker and landscape: World Health Organization	-	https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines