

ISSN 2221-996X (Print)
ISSN 2619-1156 (Online)

БИО

ПРЕПАРАТЫ

ПРОФИЛАКТИКА, ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ

Том / Volume

№ / No.

22

4

BIOLOGICAL PRODUCTS.
PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

2022

www.biopreparations.ru





Уважаемые коллеги!

В конце 2019 г. в китайском городе Ухань началась эпидемия новой коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2, которая развивалась настолько быстро, что уже в начале марта 2020 г. ВОЗ объявила о начале пандемии.

Впервые в истории человечества были приняты беспрецедентные меры по борьбе с инфекцией: было ограничено передвижение между странами, объявлен локдаун и др. Все это привело к тому, что пандемия из медицинской приобрела черты социально-экономической проблемы.

Данная инфекция является новой, поэтому естественно, что к началу пандемии отсутствовали средства как для лечения, так и для профилактики COVID-19. Многолетний опыт борьбы с эпидемиями доказал, что наиболее эффективным ее способом является вакцинация. В данной ситуации перед органами здравоохранения, фармпроизводителями, учеными встала задача разработки и внедрения в практику препаратов против COVID-19, для решения которой было необходимо не только разработать препараты, но и оценить их эффективность и безопасность, наладить их производство в больших объемах. Включение в данный процесс структур различного уровня, начиная с Правительства Российской Федерации, позволило в очень короткие

сроки разработать впервые в мире вакцину для профилактики COVID-19 на совершенно новой технологической платформе, начать вакцинацию населения в нашей стране, а также поставлять вакцину в другие страны.

Впервые разработанные Правительством Российской Федерации нормативные требования позволяют регистрировать новые вакцины на основании ограниченных данных о безопасности и эффективности, при условии что полные исследования безопасности и эффективности будут проведены в пострегистрационном периоде.

Пандемия COVID-19 стала причиной активной разработки новых вакцин и адъювантов, большая часть которых в настоящее время находится на этапе клинических исследований. Разработанные технологические платформы при условии подтверждения их эффективности и безопасности могут быть использованы для получения новых вакцин для профилактики различных инфекций.

Вирус SARS-CoV-2 активно мутирует, поэтому разработка вакцин на основе новых актуальных штаммов вируса продолжается. Несмотря на успехи в проведении санитарно-противоэпидемических мероприятий и вакцинации большей части населения, признаков затухания пандемии пока не наблюдается.

Учитывая высокую социально-экономическую значимость борьбы с пандемией, данный номер журнала полностью посвящен актуальным вопросам разработки, оценки качества, безопасности и эффективности вакцин для профилактики заболевания, лекарственных средств для борьбы с инфекцией, а также средств диагностики COVID-19.

С уважением,
главный редактор

МЕРКУЛОВ Вадим Анатольевич

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie

**ТОМ 22, № 4,
ОКТАБРЬ – ДЕКАБРЬ 2022**

**VOLUME 22, NO. 4,
OCTOBER–DECEMBER 2022**

Научно-практический журнал
Выходит ежеквартально (четыре выпуска в год)
Основан в 2001 году

Research and practice journal
Published quarterly (four issues per year)
Founded in 2001

Учредитель:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России)

Founder:

Federal State Budgetary Institution “Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products” of the Ministry of Health of the Russian Federation (Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products)

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук, включен в «Белый список» научных журналов. Принимает статьи по следующим группам специальностей: биологические науки, профилактическая медицина.

The journal is included in the White list of Russian scientific journals and in the List of peer-reviewed scientific publications that the State Commission for Academic Degrees and Titles recommends for publishing the main scientific results of theses for Candidate of Science and Doctor of Science degrees. The journal accepts manuscripts in the fields of biological sciences and preventive medicine

Журнал индексируется в базах данных: Российский индекс научного цитирования (РИНЦ), Russian Science Citation Index (RSCI), Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM каталог, DOAJ, Ulrichsweb и др.

The journal is indexed in the following databases: Russian Index of Science Citation, Russian Science Citation Index (RSCI), Chemical Abstract Service (CAS), BASE, NLM Catalog, DOAJ, Ulrichsweb, etc.

Двухлетний импакт-фактор РИНЦ 1,182.

The journal's two-year RSCI impact factor is 1,182.

Плата за публикацию статьи и рецензирование рукописи не взимается. Контент доступен по лицензии Creative Commons Attribution International CC-BY 4.0

There is no fee for publishing an article and reviewing a manuscript. The content is licensed under Creative Commons Attribution International CC-BY 4.0

На обложке: «Вирус SARS-CoV-2» (лицензированное изображение фотобанка Depositphotos)

Cover image: “SARS-CoV-2 virus” (a licensed image from Depositphotos.com stock photo platform)

Главный редактор

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф., Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Москва, Россия)

Заместители главного редактора

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Хайтов Муса Рахимович, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН, ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России (Москва, Россия)

Ответственный секретарь

Гойкалова Ольга Юрьевна, канд. биол. наук, доц., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

В журнале публикуются обзорные, оригинальные, дискуссионные статьи по вопросам разработки регуляторных процедур, стандартизации, контроля качества, производства и применения терапевтических, профилактических и диагностических биологических лекарственных препаратов — иммунобиологических, биотехнологических, генотерапевтических и лекарственных препаратов, полученных из плазмы крови человека и животных; а также различных групп иммуномодулирующих лекарственных препаратов и биомедицинских клеточных продуктов.

Редакционная коллегия

Авдеева Жанна Ильдаровна, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Амвросьева Тамара Васильевна, д-р мед. наук, проф., РНПЦ эпидемиологии и микробиологии (Минск, Республика Беларусь)

Аракелов Сергей Александрович, канд. биол. наук, ФГУП «СПбНИИВС» ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

Бакулин Михаил Константинович, д-р мед. наук, проф., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Борисевич Игорь Владимирович, д-р мед. наук, проф., ФМБА России (Москва, Россия)

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Брико Николай Иванович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Москва, Россия)

Валента Рудольф, проф., Венский медицинский университет (Вена, Австрия)

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Москва, Россия)

Дармов Илья Владимирович, д-р мед. наук, проф., филиал ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Киров, Россия)

Дегтярев Сергей Харитонович, д-р биол. наук, проф., НПО «СибЭнзайм» (Новосибирск, Россия)

Дятлов Иван Алексеевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФБУН ГНЦ ПМБ (Оболенск, Московская область, Россия)

Зверев Виталий Васильевич, д-р биол. наук, проф., академик РАН, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Москва, Россия)

Иванов Вячеслав Борисович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф., ФГУП «СПбНИИВС» ФМБА России (Санкт-Петербург, Россия)

Климов Владимир Иванович, канд. мед. наук, ст. науч. сотр., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Кутырев Владимир Викторович, д-р мед. наук, проф., академик РАН, ФКУЗ РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора (Саратов, Россия)

Леви Диана Тимофеевна, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Медуницын Николай Васильевич, д-р мед. наук, проф., академик РАН (Москва, Россия)

Миронов Александр Николаевич, д-р мед. наук, проф., ООО «Национальное агентство лекарственных средств» (Москва, Россия)

Мовсесянц Арташес Авакович, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Мосягин Вячеслав Дмитриевич, д-р мед. наук, проф., ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России (Москва, Россия)

Пашенко Юрий Иванович, д-р биол. наук, проф., ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России (Сергиев Посад, Московская область, Россия)

Токарев Николай Константинович, д-р мед. наук, проф., ФБУН «НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» (Санкт-Петербург, Россия)

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф., АО «Генериум» (Вольгинский, Владимирская область, Россия)

Чумаков Константин Михайлович, д-р биол. наук, проф., Управление по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Силвер-Спринг, Мэриленд, США)

Учредитель и издатель

ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России

Шеф-редактор

Федотова О.Ф.

+7 (495) 121-06-00 (доб. 63-05)

Fedotovaof@expmed.ru

Научные редакторы

Гуасова Н.В., канд. биол. наук

Лебединская Е.В., канд. биол. наук

Редактор перевода

Балтина Л.А.

Адрес учредителя и редакции

127051, Москва,

Петровский б-р, д. 8, стр. 2

тел.: +7 (499) 190-18-18

(доб. 63-42, 63-02, 63-35)

biopreparaty@expmed.ru

Исполнитель

ООО «НЭИКОН ИСП»: 115114, Москва,

ул. Летниковская, д. 4, стр. 5

Типография

ООО «Издательство «Триада»: 170034,

Тверь, пр. Чайковского, д. 9, оф. 514

Тираж

100 экз. Цена свободная

Подписано в печать

22.12.2022

Дата выхода в свет

29.12.2022

Подписной индекс

в каталоге «Пресса России» – 57941,

в каталоге агентства «Урал-Пресс» –

57941

Журнал зарегистрирован в Федеральной службе по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций. Свидетельство ПИ № ФС77-82918 от 14 марта 2022 г.

© Составление. Оформление. ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России, 2022

СОДЕРЖАНИЕ

Тема номера: Разработка биологических лекарственных препаратов для профилактики, диагностики и лечения COVID-19

Т.Е. Сизикова, В.Н. Лебедев, С.В. Борисевич Природные, биологические и социальные факторы, способствующие возникновению новых подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации	351
А.А. Солдатов, Д.В. Горенков, В.А. Меркулов, В.П. Бондарев Особенности и проблемы регистрации и применения препаратов для профилактики COVID-19 в период пандемии	361
А.Н. Морозов, И.Р. Яхин, Н.В. Стратонова, М.В. Куцкир, Д.А. Потеряев, Р.А. Хамитов Опыт масштабирования и интенсификации промышленного производства векторной аденовирусной вакцины Гам-КОВИД-Вак в лимитирующих условиях пандемии	382
Т.И. Смолянова, А.М. Николаева, Т.В. Вязникова, А.В. Иванов, О.В. Белякова, Е.И. Саканян Выбор метода и разработка стандартного образца для количественного определения антител к SARS-CoV-2 методом ИФА в препаратах иммуноглобулинов	392
А.С. Оксанич, А.Г. Красько, Т.Г. Самарцева, Е.Л. Гасич, Г.М. Игнатъев Применение количественного иммуноферментного анализа для определения концентрации S-антигена в цельновирионных инактивированных адсорбированных коронавирусных вакцинах	405
Е.В. Шипаева, О.В. Филон, А.В. Зинченко, Г.А. Шипунов, А.А. Дмитриева, М.С. Лемак, С.А. Гришин, Е.И. Трофимец, К.Л. Крышень, Л.И. Козловская, А.С. Луин, В.Д. Аполохов, С.Ф. Барбашов, Я.В. Лавровский, М.Ю. Самсонов Доклинические исследования противовирусной активности гибридного белка RPH-137 и молнупиравира в отношении COVID-19	414
И.А. Кириллов, А.П. Пирожков, В.В. Рубцов, С.Я. Логинова, Н.А. Сайфулина, Т.М. Плеханова, М.А. Тимофеев, Д.А. Кутаев, Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург, С.В. Борисевич Изучение иммуногенности вакцины Гам-КОВИД-Вак	435
Н.В. Ломакин, Б.А. Бакиров, Г.Х. Мусаев, В.В. Попов, Е.А. Смолярчук, Ю.Н. Линькова, Д.В. Богдан, А.В. Еремеева, П.С. Пухтинская, М.А. Морозова, А.В. Зинкина-Орихан, А.А. Луцкий Клиническая эффективность ингибирования рецептора интерлейкина-6 при COVID-19 левалимабом и перспективы его применения при синдроме высвобождения цитокинов другой этиологии	446
Благодарности рецензентам	460

BIOLOGICAL PRODUCTS. PREVENTION, DIAGNOSIS, TREATMENT

Editor-in-Chief

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal State Budgetary Institution "Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products" of the Ministry of Health of the Russian Federation (Moscow, Russia)

Deputy Editors-in-Chief

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Musa R. Khaitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Corr. Member of RAS, National Research Center "Institute of Immunology" (Moscow, Russia)

Executive Secretary

Olga Yu. Goykalova, Cand. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

The journal *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* publishes reviews, original articles, and discussion articles on such issues as development of regulatory procedures, standardisation, quality control, production and use of biological products for disease prevention, diagnosis, and treatment immunobiological, biotechnological, gene therapy, human and animal blood plasma products, as well as various groups of immunomodulatory and biomedical cell products.

Editorial Board

Zhanna I. Avdeeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Tamara V. Amvrosyeva, Dr. Sci. (Med.), Prof., Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology (Minsk, Republic of Belarus)

Sergey A. Arakelov, Cand. Sci. (Biol.), Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations (Saint Petersburg, Russia)

Mikhail K. Bakulin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Igor V. Borisevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Federal Medical Biological Agency of Russia (Moscow, Russia)

Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

Nikolay I. Briko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Rudolf Valenta, MD, Prof., Medical University of Vienna (Vienna, Austria)

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology (Moscow, Russia)

Ilya V. Darmov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Branch Office of the 48 Central Scientific Research Institute (Kirov, Russia)

Sergey Kh. Degtyarev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., SibEnzyme Ltd (Novosibirsk, Russia)

Ivan A. Dyatlov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, State Research Center for Applied Microbiology & Biotechnology (Obolensk, Moscow Region, Russia)

Vitaly V. Zverev, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Academician of RAS, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Moscow, Russia)

Vyacheslav B. Ivanov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint-Petersburg Scientific Research Institute of Vaccines and Serums and the Enterprise for the Production of Bacterial Preparations (Saint Petersburg, Russia)

Vladimir I. Klimov, Cand. Sci. (Med.), Senior Research Associate, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vladimir V. Kutyrev, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS, Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe" (Saratov, Russia)

Diana T. Levi, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Nikolay V. Medunitsyn, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of RAS (Moscow, Russia)

Aleksandr N. Mironov, Dr. Sci. (Med.), Prof., National Agency of Medicines (Moscow, Russia)

Artashes A. Movsesyants, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Vyacheslav D. Mosyagin, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (Moscow, Russia)

Yuri I. Pashchenko, Dr. Sci. (Biol.), Prof., 48 Central Scientific Research Institute (Sergiev Posad, Moscow Region, Russia)

Nikolay K. Tokarevich, Dr. Sci. (Med.), Prof., Saint-Petersburg Pasteur Institute (Saint Petersburg, Russia)

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Prof., Generium JSC (Volginsky, Vladimir Region, Russia)

Konstantin M. Chumakov, Dr. Sci. (Biol.), PhD, Food and Drug Administration (Silver Spring, Maryland, USA)

Founder and publisher

Federal State Budgetary Institution
"Scientific Centre for Expert Evaluation
of Medicinal Products" of the Ministry
of Health of the Russian Federation

Managing Editor

Olga F. Fedotova
+7 (495) 121-06-00 (63-05)
Fedotovaof@expmed.ru

Science Editor

Nadezhda V. Gukasova, Cand. Sci. (Biol.)
Elena V. Lebedinskaya, Cand. Sci. (Biol.)

Translation Editor

Liubov A. Baltina

Postal address of the founder and editorial office

8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051
Tel.: +7 (499) 190-18-18
(63-42, 63-02, 63-35)
biopreparaty@expmed.ru

Contract publisher

NEICON ISP LLC: 4/5 Letnikovskaya St.,
Moscow 115114

Printing office

"Triada" publishing house: 9 Tchaikovsky
Ave, office 514, Tver 170034

Print run

100 copies. Free price

Passed for printing

22 December 2022

Date of publication

29 December 2022

Subscription codes

are provided in the catalogues of
Pressa Rossii—57941 and Ural-Press
agency—57941

The journal is registered as mass media
by the Federal Service for Supervision
of Communications, Information
Technologies and Mass Communications.
Certificate PI No. FS77-82918 dated
14 March 2022

© Compilation, design. Scientific Centre
for Expert Evaluation of Medicinal
Products, 2022

CONTENTS

Issue topic: Development of biologicals for the prevention, diagnosis, and treatment of COVID-19

T.E. Sizikova, V.N. Lebedev, S.V. Borisevich Environmental, biological and social factors contributing to new rises in COVID-19 morbidity in Russia	351
A.A. Soldatov, D.V. Gorenkov, V.A. Merkulov, V.P. Bondarev Aspects and issues of marketing authorisation and use of medicinal products for COVID-19 prevention during the pandemic	361
A.N. Morozov, I.R. Yakhin, N.V. Stratonova, M.V. Kutsir, D.A. Poteryaev, R.A. Khamitov An experience of scaling and intensifying the industrial production of the Gam-COVID-Vac vector adenovirus vaccine in the limiting conditions of the pandemic	382
T.I. Smolyanova, A.M. Nikolaeva, T.V. Vyaznikova, A.V. Ivanov, O.V. Belyakova, E.I. Sakanyan Selection of a SARS-CoV-2 antibody quantification method and development of an antibody reference standard for ELISA to test immunoglobulin preparations	392
A.S. Oksanich, A.G. Krasko, T.G. Samartseva, E.L. Gasich, G.M. Ignatyev The use of quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of S-antigen concentration in whole-virion inactivated adsorbed coronavirus vaccines	405
E.V. Shipaeva, O.V. Filon, A.V. Zintchenko, G.A. Shipunov, A.A. Dmitrieva, M.S. Lemak, S.A. Grishin, E.I. Trofimets, K.L. Kryshen, L.I. Kozlovskaya, A.S. Lunin, V.D. Apolokhov, S.F. Barbashov, Ya.V. Lavrovsky, M.Yu. Samsonov Preclinical studies of antiviral activity of the RPH-137 fusion protein and molnupiravir against COVID-19	414
I.A. Kirillov, A.P. Pirozhkov, V.V. Rubtsov, S.Ya. Loginova, N.A. Saifulina, T.M. Plekhanova, M.A. Timofeev, D.A. Kutaev, D.Y. Logunov, A.L. Gintsburg, S.V. Borisevich Immunogenicity evaluation of Gam-COVID-Vac (Sputnik V)	435
N.V. Lomakin, B.A. Bakirov, G.H. Musaev, V.V. Popov, E.A. Smolyarchuk, Yu.N. Linkova, D.V. Bogdan, A.V. Ereemeeva, P.S. Pukhtinskaia, M.A. Morozova, A.V. Zinkina-Orikhan, A.A. Lutckii Levilimab clinical efficacy for interleukin-6 receptor inhibition in COVID-19 and its potential for treating cytokine release syndrome of other aetiologies	446
Thank you to all our reviewers	460

УДК 578.7:578.834.1:614.446

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-351-360>

Обзорная статья | Review article



Природные, биологические и социальные факторы, способствующие возникновению новых подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации

Т.Е. Сизикова, В.Н. Лебедев, С.В. Борисевич✉

Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, ул. Октябрьская, д. 11, г. Сергиев Посад-6, Московская область, 141306, Российская Федерация

✉ Борисевич Сергей Владимирович; 48cnii@mail.ru

Резюме

В ходе пандемии COVID-19 при анализе заболеваемости в определенных регионах установлен волнообразный характер распространения инфекции, включающий периоды подъемов и спадов заболеваемости. Анализ развития эпидемии COVID-19 в Российской Федерации показывает, что основными показателями, способствующими возникновению подъемов заболеваемости, являются сезонный фактор, недостаточный уровень коллективного иммунитета и распространение новых геновариантов вируса SARS-CoV-2, характеризующихся высокой контагиозностью. Цель работы — анализ природных, биологических и социальных факторов, способствующих возникновению новых подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации. Рассмотрена эпидемиологическая ситуация по COVID-19 в мире к середине 2022 г. Проанализирована роль природных, биологических и социальных факторов при распространении COVID-19 в Российской Федерации. Показано, что возникновению новых подъемов заболеваемости в наибольшей степени способствует появление новых высококонтагиозных вариантов вируса SARS-CoV-2 и сезонный фактор. Сделано предположение о том, что шестой и седьмой подъемы заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации пройдут по оптимистическому сценарию, который предусматривает распространение высококонтагиозного варианта вируса SARS-CoV-2 со сниженной вирулентностью.

Ключевые слова: COVID-19; вирус SARS-CoV-2; вариант вируса; коллективный иммунитет; контагиозность; вирулентность

Для цитирования: Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Борисевич С.В. Природные, биологические и социальные факторы, способствующие возникновению новых подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4): 351–360. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-351-360>

Environmental, biological and social factors contributing to new rises in COVID-19 morbidity in Russia

T.E. Sizikova, V.N. Lebedev, S.V. Borisevich✉

48 Central Research Institute, 11 Oktyabrskaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Region 141306, Russian Federation

✉ Sergey V. Borisevich; 48cnii@mil.ru

Abstract

Morbidity surveys in certain regions during the COVID-19 pandemic have established that the infection spreads in a wave-like manner characterised with peaks and troughs in incidence. According to the analysis of COVID-19 epidemic development in Russia, surges in COVID-19 infections are mainly driven by seasonal factors, insufficient herd immunity, and emerging SARS-CoV-2 variants with increased transmissibility. The aim of the study was to analyse environmental, biological and social factors contributing to new rises in COVID-19 cases in Russia. The study covers the global epidemiological situation as of mid-2022 and the role of environmental, biological, and social factors in the spread of COVID-19 in the Russian Federation. The results suggest that new highly contagious SARS-CoV-2 variants and seasonality are the principal factors driving new rises in morbidity. The authors assume that the sixth and the seventh COVID-19 waves in Russia will be in line with the best case scenario, which predicts the spread of a SARS-CoV-2 variant with increased transmissibility and reduced virulence.

Key words:

COVID-19; SARS-CoV-2 virus; virus variant; herd immunity; transmissibility; virulence

For citation:

Sizikova T.E., Lebedev V.N., Borisevich S.V. Environmental, biological and social factors contributing to new rises in COVID-19 morbidity in Russia. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):351–360. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-351-360>

Введение

На начало ноября 2022 г. в мире зарегистрировано свыше 627 млн случаев заболевания новой коронавирусной инфекцией COVID-19, вызванной ранее неизвестным коронавирусом, впоследствии получившим название вирус SARS-CoV-2, из которых более 6,5 млн завершились летальным исходом¹. Эпидемия COVID-19 в России началась в начале марта 2020 г., когда в Москве были выявлены первые случаи заболеваний граждан Российской Федерации, вернувшихся из туристической поездки по Италии. В ходе пандемии COVID-19 для определенных регионов установлен волнообразный характер распространения инфекции, включающий периоды подъемов и спадов заболеваемости, возникновению которых способствуют различные природные, биологические и социальные факторы.

Цель работы — анализ природных, биологических и социальных факторов, способствующих возникновению новых подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации.

Основная часть

Заболеваемость COVID-19 в определенном регионе носит так называемый волнообразный характер. При рассмотрении кривой заболеваемости в ходе эпидемии можно выделить фазу экспоненциального роста, во время которой постоянно происходит увеличение числа заболевших в сутки; фазу «выхода на плато», для которой прирост количества заболевших в сутки находится примерно на одном уровне; фазу (1) «схода с плато», характеризующуюся выраженной тенденцией к снижению числа новых случаев заболевания; фазу (2) «схода с плато», когда в рассматриваемом временном интервале отмечается функциональная зависимость снижения показателя заболеваемости; фазу стабилизации, в ходе которой либо происходит медленное снижение заболеваемости, либо заболеваемость остается на одном и том же относительно низком уровне. Фаза стабилизации завершается либо полным прекращением новых случаев заболеваний (в течение достаточно продолжи-

¹ <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---2-november-2022>

тельного времени), либо сменяется, при возникновении подъема заболеваемости, фазой экспоненциального роста.

Продолжительность фаз не является постоянной. В таблице 1 приведена продолжительность указанных фаз для 1–5 подъемов заболеваемости COVID-19 в России.

Анализ второго и последующего подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации показывает, что факторами, способствующими их возникновению, являются следующие.

1. Сезонный фактор, при котором трансмиссии возбудителя в человеческой популяции способствует повышение интенсивности пассажиропотоков. Сезонный фактор сыграл решающее значение при возникновении второго и четвертого подъема заболеваемости в Российской Федерации (начавшихся в сентябре 2020 и 2021 гг. соответственно).
2. Недостаточный уровень коллективного иммунитета. Вследствие снижения эффективности трансмиссии возбудителя от одного индивида к другому популяционный иммунитет косвенно защищает людей, у которых отсутствует личный иммунитет.

3. Распространение новых геновариантов вируса SARS-CoV-2, обладающих повышенной контагиозностью, которая характеризуется величиной базового репродуктивного числа (R_0) – равной среднему числу новых случаев заболевания, источником которых является один инфицированный человек. Чем выше контагиозность возбудителя, тем выше должен быть уровень коллективного иммунитета, необходимый для затухания вспышки [1]. Эксперты полагают, что минимальное значение этого показателя для COVID-19 составляет 70% [2]. В ходе естественной эволюции вируса SARS-CoV-2 выявлена тенденция постоянного повышения контагиозности. Величина R_0 для заболевания, вызванного исходным (уханьским) вариантом вируса, составляла примерно 1,5 [1], вариантом «дельта» – 4,5–5,7 [3–6], вариантом «омикрон» (в начале вызванного им подъема заболеваемости) – более 10,0 [7]. Следует отметить, что вспышки заболевания, вызванные вариантами «дельта» и особенно «омикрон», произошли на фоне уже существующей в популяции иммунной прослойки,

Таблица 1. Продолжительность различных фаз для 1–5 подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации²
Table 1. Duration of phases constituting COVID-19 waves 1–5 in the Russian Federation²

Фаза кривой заболеваемости <i>Morbidity curve phases</i>	Продолжительность подъемов заболеваемости, сут <i>Wave duration, days</i>				
	1 подъем <i>Wave 1</i>	2 подъем <i>Wave 2</i>	3 подъем <i>Wave 3</i>	4 подъем <i>Wave 4</i>	5 подъем <i>Wave 5</i>
Фаза экспоненциального роста <i>Exponential growth</i>	49	79	24	41	40
Фаза «выхода на плато» <i>Switch to the plateau</i>	38	44	31	25	15
Фаза (1) «схода с плато» <i>Descent (1) from the plateau</i>	18	22	19	15	9
Фаза (2) «схода с плато» <i>Descent (2) from the plateau</i>	58	78	25	35	41
Фаза стабилизации <i>Stabilisation</i>	16	50	– ^a	– ^a	99
Общая продолжительность подъема заболеваемости с учетом фазы стабилизации <i>Total wave duration, including the stabilisation phase</i>	179	273	99	116	204
Общая продолжительность подъема заболеваемости без учета фазы стабилизации <i>Total wave duration, excluding the stabilisation phase</i>	163	223	99	116	105

^a Фаза стабилизации для 3 и 4 подъемов заболеваемости отсутствовала.

^a There were no stabilisation phases during waves 3 and 4.

² Стопкоронавирус.рф. Официальная информация о коронавирусе в России. <https://стопкоронавирус.рф/>

сформировавшейся в ходе распространения заболевания и проведенной вакцинации.

В конце июля 2022 г. в Российской Федерации начался шестой подъем заболеваемости COVID-19. Предыдущий пятый подъем характеризовался наивысшим уровнем заболеваемости. Однако еще в ходе достижения при данном подъеме фазы стабилизации (более продолжительной, чем для предыдущих подъемов заболеваемости, при этом в период с середины февраля по конец июня 2022 г. заболеваемость снизилась практически на два порядка) анализ ряда показателей указывал на неизбежность возникновения новых подъемов заболеваемости. Среди этих показателей можно отметить следующие.

1. Первый подъем заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации начался примерно на 1–1,5 месяца позже, чем в странах Европы и США. Указанный интервал сохранился также для всех последующих подъемов заболеваемости COVID-19 в России. Таким образом, очередной подъем заболеваемости за рубежом является своеобразным предупреждающим сигналом для системы здравоохранения Российской Федерации. Максимальный подъем заболеваемости COVID-19 в европейских странах наблюдался в конце мая – начале июня 2022 г.³, возникновение шестого подъема заболеваемости COVID-19 в России в июле 2022 г. подтверждает отмеченную закономерность [8, 9].
2. Уровень коллективного иммунитета. Этот показатель является одним из определяющих факторов возможности нового подъема заболеваемости. Расчет уровня коллективного иммунитета целесообразно проводить с учетом эффективного срока действия естественного (при заболевании) или искусственного (при вакцинации) активного иммунитета. Продолжительность естественного активного иммунитета, помимо индивидуальных особенностей макроорганизма, зависит главным образом от варианта вируса, вызвавшего заболевание, и тяжести перенесенного заболевания. С учетом данных, опубликованных в работе S. Gazit с соавт. [10], среднее значение этой величины, с высокой долей вероятности, находится в интервале 6–12 месяцев. Продолжительность искусственного активного иммунитета зависит от индивидуальных особенностей макроорганизма, а также от используемой при им-

мунизации вакцины. Исходя из имеющихся данных, средняя продолжительность искусственного активного иммунитета находится в интервале 3–6 месяцев. Следствием ограниченной продолжительности иммунитета к заболеванию, вызываемому вирусом SARS-CoV-2, приобретенного как после вакцинации, так и после перенесенного заболевания, является то, что, несмотря на общий рост численности переболевших и вакцинированных, наблюдается снижение уровня коллективного иммунитета, рассчитываемого в соответствии с математической моделью эпидемического процесса [2]. Так, в конце января 2022 г. указанный показатель составлял 63%, в конце июля, ко времени начала шестого подъема заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации, при увеличении числа переболевших с 10,7 до 18,6 млн, а числа прошедших полный цикл иммунизации с 79 до 89 млн – около 10%.

3. Сезонный фактор. В 2020 и 2021 г. начало осеннего сезона в Российской Федерации сопровождалось подъемом заболеваемости COVID-19. Подъем заболеваемости в летний период, вследствие факторов, препятствующих скоплению большого числа людей в замкнутом пространстве (социальная динамика) и оказывающих неблагоприятное влияние на устойчивость возбудителя в окружающей среде (в частности, высокая температура и инсоляция) менее вероятен, чем осенью [11], но возможен при появлении нового высококонтагиозного варианта вируса SARS-CoV-2, при недостаточно высоком показателе коллективного иммунитета (как это имело место в Российской Федерации летом 2021 г. при распространении варианта «дельта» и летом 2022 г. при распространении сублиний варианта «омикрон»). Поэтому произошедший осенью 2022 г. подъем заболеваемости являлся ожидаемым.
4. Частичная отмена противозидемических ограничений (обязательное использование масок в торговых организациях, в транспорте общего пользования, соблюдение социального дистанцирования, измерение температуры тела работникам при допуске на рабочие места и др.⁴).

Как фактор возникновения подъема заболеваемости наибольшую угрозу представляет появление более заразного, чем существующие варианты, вируса SARS-CoV-2. Поэтому при оценке

³ <https://coronavirus-monitoring.info/v-evrope/>

⁴ https://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_348585/2120bc2604ba478ab19baf9c09265887ce0b6be7/

эпидемической опасности вновь появляющихся вариантов вируса SARS-CoV-2 следует прежде всего обратить внимание на контагиозность возбудителя и тяжесть вызываемого им заболевания. Считается, что для максимальной распространяемости возбудителя необходимо сочетание высокой контагиозности при снижении тяжести заболевания [12]. Что же касается тяжести вызываемого заболевания, то по мере возникновения новых генетических линий вируса SARS-CoV-2 сначала выявлено утяжеление заболевания (что нашло отражение в росте показателя летальности, достигшего максимума при заболевании, вызванном вариантом «дельта») с последующим снижением тяжести заболевания (что стало характерным для варианта «омикрон»).

Изменение контагиозности генетических линий вируса SARS-CoV-2 и тяжести вызываемого ими заболевания иллюстрируют представленные в таблице 2 характеристики всплеск заболевания в Российской Федерации, вызванных

линиями «дельта» и «омикрон». Представленные данные свидетельствуют, о том, что по показателю максимального числа заболевших в сутки пятый подъем заболеваемости почти в пять раз превосходит четвертый, но при сравнении показателя летальности для сравниваемых подъемов заболеваемости наблюдается обратная картина.

К сожалению, нет полной уверенности в том, что наметившаяся тенденция к «ослаблению» тяжести заболевания, вызываемого вирусом SARS-CoV-2, сохранится в обязательном порядке. В процессе естественной эволюции коронавируса помимо точечных мутаций изменения генома могут происходить и в результате внутривидовой рекомбинации между различными вариантами, что делает возможным возникновение варианта вируса с контагиозностью, характерной для варианта «омикрон», и патогенностью, свойственной для варианта «дельта»⁵ [13]. Следовательно, мутационный потенциал вируса SARS-CoV-2 еще не исчерпан и на варианте «омикрон» пандемия не завершится [13].

Таблица 2. Сравнение некоторых показателей четвертого и пятого подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации⁶

Table 2. Comparison of selected characteristics of the fourth and the fifth waves of COVID-19 in the Russian Federation⁶

Показатель <i>Parameter</i>	Характеристика показателя для подъема заболеваемости COVID-19 <i>Parameter values for COVID-19 waves</i>	
	4 подъем <i>Wave 4</i>	5 подъем <i>Wave 5</i>
Доминантный вариант вируса SARS-CoV-2 <i>Dominant variant of SARS-CoV-2</i>	Вариант «дельта» <i>Delta</i>	Вариант «омикрон» <i>Omicron</i>
Величина коллективного иммунитета на начало подъема заболеваемости, % <i>Herd immunity rate at the beginning of the wave, %</i>	30,3	58,7
Общее количество заболевших в ходе подъема заболеваемости <i>Total number of new cases during the wave</i>	3452159	7734248 ^a
Максимальное количество заболевших в сутки <i>Maximum number of new cases per day</i>	41355	203949
Общее количество летальных случаев в ходе подъема заболеваемости <i>Total number of deaths during the wave</i>	121069	63613 ^a
Летальность в ходе подъема заболеваемости, % <i>Case fatality ratio of the wave, %</i>	3,74	0,82 ^a

^a Данные на 20.06.2022.

^a As of 20.06.2022.

⁵ <https://www.nature.com/articles/d41586-022-01069-4>

⁶ Статистика коронавируса в России: онлайн, на сегодня, по дням. <https://gogov.ru/articles/covid-19>

Вскоре после выявления варианта «омикрон» (B.1.1.529) были установлены три его сублинии (BA.1, BA.2 и BA.3)⁷. Наибольшее число заболеваний в ходе пятого подъема заболеваемости COVID-19 в 2022 г. вызвано заражением линией BA.2 (вариант «стелс-омикрон»⁸). На основе этой линии возникли субварианты (сублинии) BA.4, BA.5 и BA.2.12.1, вызвавшие новый подъем заболеваемости в Европе и США.

Варианты BA.4, BA.5 (как и исходный вариант «омикрон») впервые были выявлены в Южно-Африканской Республике (ЮАР) в январе-феврале 2022 г. По данным секвенирования, уже в начале апреля эти субварианты вызвали 50% всех зарегистрированных случаев заболевания в ЮАР. В марте 2022 г. Европейский центр профилактики и контроля заболеваний (European Centre for Disease Prevention and Control, ECDC) квалифицировал сублинии BA.4 и BA.5 как «вызывающие озабоченность» и предсказал значительное увеличение числа новых случаев COVID-19 в странах Европейского союза в ближайшее время.

Подъем заболеваемости COVID-19 в Европе в мае 2022 г. связан главным образом с распространением варианта BA.5. При этом заболевание распространилось и в странах, где более половины населения прошли полный цикл иммунизации⁹.

В конце мая 2022 г. единичные случаи заболеваний, вызванных сублиниями BA.4 и BA.5, были выявлены и в Российской Федерации. При этом один случай заболевания (вызванного субвариантом BA.5) выявлен у гражданина Российской Федерации, который сам не выезжал за рубеж и не контактировал с теми, кто был за границей. Это может свидетельствовать об уже имевшей место циркуляции субварианта BA.5 на территории России. Тем не менее, исходя из признанной в настоящее время монофилетической теории происхождения новых вариантов вируса [14], обнаруженные в Российской Федерации субварианты BA.4 и BA.5 — завозные; вероятность того, что возбудитель COVID-19 независимо возник на территории России, крайне мала.

В конце июня 2022 г. подавляющее большинство новых случаев заражения в России (более 95%) приходилось на вариант BA.2 — «стелс-омикрон» [15]. Одной из характерных особенностей варианта «омикрон» и всех его сублиний является большое количество аминокислотных замен в S-белке по сравнению с исходным уханьским вариантом вируса SARS-CoV-2.

Важной особенностью субвариантов BA.4 и BA.5 является мутация F486V. Замена аминокислоты происходит в позиции, близкой к месту связывания S-белка с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 типа (ACE2). Следствием данной замены является снижение уровня нейтрализации вируса антителами и, следовательно, ослабление иммунитета, сформированного после вакцинации или ранее перенесенного заболевания. Другой отличительной аминокислотной заменой, общей для субвариантов BA.4 и BA.5, является замена L452R, впервые выявленная у варианта «дельта». Данная замена также облегчает связывание с рецептором ACE2¹⁰.

Основным различием между вариантом «омикрон» (B.1.1.529) и линией BA.2 заключается в том, что у последней в S-белке отсутствует делеция Δ69-70. У субвариантов BA.4 и BA.5 произошла обратная мутация, что сделало их более похожими на первоначальный уханьский штамм.

Субварианты BA.4 и BA.5 вируса SARS-CoV-2 обладают более высокой способностью преодолевать специфический иммунитет, приобретенный в результате вакцинации или ранее перенесенного заболевания, по сравнению с вариантом «омикрон» и его сублинией BA.2 [16]. Вместе с тем для данных вариантов не отмечена более высокая вирулентность по сравнению с вариантом «омикрон»¹¹. Место новых сублиний на филогенетическом древе вируса SARS-CoV-2 представлено на рисунке 1.

На основании данных, полученных в ходе предыдущих подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации, были спрогнозированы количественные значения следующих показателей шестого подъема заболеваемости:

⁷ Стопкоронавирус.рф. Официальная информация о коронавирусе в России. <https://stopkoronavirus.rf/news/20220224-0801.html>

⁸ Стопкоронавирус.рф. Официальная информация о коронавирусе в России. <https://stopkoronavirus.rf/news/20220403-1300.html>

⁹ https://www.sciencesetavenir.fr/sante/variant-ba-5-apres-le-portugal-les-autres-pays-europeens-vont-connaître-leur-sixième-vague_163686

¹⁰ Rambaut A., Loman N., Pybus O., et al. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>

¹¹ Стопкоронавирус.рф. Официальная информация о коронавирусе в России. <https://xn--80aesfpebagmfbcl0a.xn--p1ai/news/20220716-1506.html>

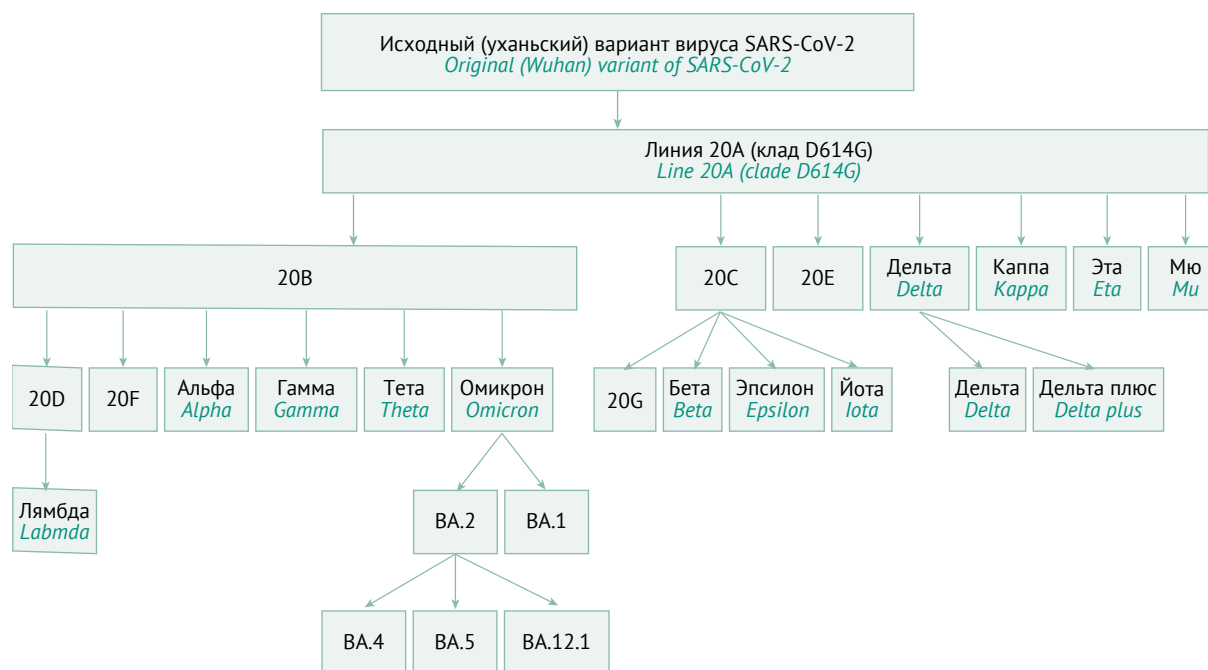


Рис. 1. Положение новых линий возбудителя COVID-19 на филогенетическом древе вируса SARS-CoV-2.

Fig. 1. Positions of new SARS-CoV-2 lines in the virus phylogenetic tree.

- продолжительность около 55 сут, при этом фаза стабилизации с большой долей вероятности не наступит;
- общее количество заболевших в ходе данного подъема заболеваемости – около 1 млн человек;
- общее количество летальных случаев – не более 4 тыс. человек;
- летальность среди заболевших – не более 0,4%.

При оценке вероятности возникновения новых подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации следует рассматривать следующие факторы: сезонный фактор; возможность распространения новых вариантов вируса SARS-CoV-2, характеризующихся повышенной заразностью – в качестве биологического фактора; уровень коллективного иммунитета и повышение интенсивности социальных контактов в условиях отмены ряда противоэпидемических ограничений – в качестве социальных факторов.

Так, в качестве аргументов в пользу возможности возникновения нового подъема заболеваемости осенью 2022 г. рассмотрены следующие факторы.

- Возникающие в этот период в течение последних двух лет подъемы заболеваемости

COVID-19, связанные не только с холодной погодой, но и с повышением интенсивности социальных контактов (возвращение из отпусков, окончание школьных каникул) [17]. В этом году сезонное повышение интенсивности социальных контактов будет проходить в условиях отмены ряда противоэпидемических мероприятий, в частности масочного режима.

- Снижение уровня коллективного иммунитета. Максимальное значение данного показателя в Российской Федерации – 64,1% зарегистрировано 26.01.2022; с тех пор происходит его снижение, составляющее в последнее время 2,5–3,1% в неделю¹². Для достижения показателя коллективного иммунитета, реально способного препятствовать распространению заболевания, необходимо было вернуть темпы вакцинации населения к максимальным показателям – 450–500 тыс. человек в сутки, что в 10–12 раз выше показателей на начало лета 2022 г.¹³
- Продолжающееся спонтанное появление вариантов вируса SARS-CoV-2, характеризующихся повышенным уровнем заразности по сравнению с вариантами возбудителя COVID-19, отнесенными ВОЗ к группе

¹² <https://gogov.ru/covid-v-stats/russia#data>

Стопкоронавирус.рф. Официальная информация о коронавирусе в России. <https://стопкоронавирус.рф/news/20220204-1600.html>

¹³ <https://library.mededtech.ru/rest/documents/vmr11/>

«вызывающих опасение»¹⁴ [18], и повышенная способность этих вариантов вызывать заболевание у вакцинированных и ранее переболевших [19, 20].

Совокупность биологических, социальных и природных факторов позволяет рассмотреть возможные сценарии развития нового подъема заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации.

Оптимистический сценарий предусматривает распространение в России высокозаразного, но не более вирулентного, чем «стелс-омикрон», варианта вируса SARS-CoV-2, представляющего угрозу главным образом для групп риска. Однако даже при оптимистическом сценарии, при отсутствии резкого роста числа госпитализаций, нагрузка на систему здравоохранения усилится.

При промежуточном сценарии новый эпидемический подъем заболеваемости по масштабам будет сопоставим с четвертым подъемом заболеваемости COVID-19. В этом случае вероятно возвращение противоэпидемических мер (масочный режим в общественных местах, ограничение массовых мероприятий). Нагрузка на систему здравоохранения будет сопоставима с таковой для конца 2021 г. — начала 2022 г.

Пессимистический вариант предусматривает распространение гипотетического варианта вируса SARS-CoV-2, характеризующегося заразностью варианта «омикрон» и вирулентностью варианта «дельта». В этом случае необходимо возобновление массовой вакцинации (хотя бы для того, чтобы снизить тяжесть заболевания у инфицированных). При данном сценарии нагрузка на систему здравоохранения является максимальной. При пессимистическом сценарии следует ожидать продления жестких антиковидных ограничений как минимум до середины весны 2023 г.

Вследствие преобладающего распространения в настоящее время в мире вариантов вируса SARS-CoV-2 с пониженной вирулентностью

наиболее вероятным является оптимистический вариант. Согласно прогнозу, сделанному нами летом 2022 г. после возникновения шестого подъема заболеваемости, в конце года в России начнется очередной подъем заболеваемости COVID-19, который не будет иметь значительных негативных последствий для здравоохранения.

Заключение

Для COVID-19 при распространении заболевания в определенном регионе установлен волнообразный характер, включающий периоды подъемов и спадов заболеваемости.

Возникновению новых подъемов заболеваемости способствуют биологические факторы, в частности распространение новых вариантов вируса SARS-CoV-2, характеризующихся повышенной заразностью, социальные факторы (снижение уровня коллективного иммунитета и повышение интенсивности социальных контактов в условиях отмены ряда противоэпидемических ограничений) и природные факторы, связанные с повышенной трансмиссией возбудителя SARS-CoV-2 в осенне-зимний период.

Распространение новых геновариантов вируса SARS-CoV-2 имеет особо важное значение. Так, возникновение в Российской Федерации третьего, пятого и шестого подъема заболеваемости COVID-19 связано с распространением новых разновидностей вируса SARS-CoV-2 (вариантов «дельта», «омикрон» и его разновидностей соответственно).

Анализ эпидемиологической ситуации по COVID-19 в мире к середине 2022 г. позволил высказать предположение, что новый подъем заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации осенью-зимой 2022 г. пройдет по так называемому оптимистическому сценарию, предполагающему распространение высококонтагиозного варианта вируса SARS-CoV-2 с пониженной вирулентностью, представляющего угрозу главным образом для групп риска.

Литература/References

1. Акимкин ВГ, Попова АЮ, Плоскирева АА, Углева СВ, Семененко ТА, Пшеничная НЮ и др. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение I: проявления эпидемического процесса COVID-19. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(3):269–86. [Akimkin VG, Popova AY, Ploskireva AA, Ugleva SV, Semenenko TA, Pshenichnaya NYu, et al. COVID-19: the evolution of the pandemic in Russia. Report I: manifestations of the COVID-19 epidemic process. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii* = *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2022;99(3):269–86. (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0372-9311-276>
2. Britton T, Ball F, Trapman P. A mathematical model reveals the influence of population heterogeneity on herd immunity to SARS-CoV-2. *Science*. 2020;369(6505):846–9. <https://doi.org/10.1126/science.abc6810>
3. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*.

¹⁴ Tracking SARS-CoV-2 variants. WHO. <https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>

- 2020;382(13):1199–207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
4. Riou J, Althaus CL. Pattern of early human-to-human transmission of Wuhan 2019 novel coronavirus (2019-nCoV), December 2019 to January 2020. *Euro Surveill.* 2020;25(4):2000058. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.4.2000058>
 5. Wu JT, Leung K, Bushman M, Kishore N, Niehus R, de Salazar PM, et al. Estimating clinical severity of COVID-19 from the transmission dynamics in Wuhan, China. *Nat Med.* 2020;26(4):506–10. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-0822-7>
 6. Акимкин ВГ, Попова АЮ, Хафизов КФ, Дубоделов ДВ, Углева СВ, Семененко ТА и др. COVID-19: эволюция пандемии в России. Сообщение II: динамика циркуляции геновариантов вируса SARS-CoV-2. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2022;99(4):381–96. [Akimkin VG, Popova AY, Khafizov KF, Dubodelov DV, Ugleva SV, Semenenko TA, et al. COVID-19: evolution of the pandemic in Russia. Report II: dynamics of the circulation of SARS-CoV-2 genetic variants. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2022;99(4):381–96 (In Russ.)] <https://doi.org/10.36233/0372-9311-295>
 7. Singanayagam A, Hakki S, Dunning J, Madon KJ, Crone MA, Koycheva A, et al. Community transmission and viral load kinetics of the SARS-CoV-2 delta (B.1.617.2) variant in vaccinated and unvaccinated individuals in the UK: a prospective, longitudinal, cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(2):183–95. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00648-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00648-4)
 8. Стародубов ВИ, Береговых ВВ, Акимкин ВГ, Семененко ТА, Углева СВ, Авдеев СН и др. COVID-19 в России: эволюция взглядов на пандемию (часть 1). *Вестник РАМН.* 2022;77(3):199–207. [Starodubov VI, Beregovykh VV, Akimkin VG, Semenenko TA, Ugleva SV, Avdeev SN, et al. COVID-19 in Russia: evolution of views on the pandemic. Report I. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2022;77(3):199–207 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15690/vramn2118>
 9. Стародубов ВИ, Береговых ВВ, Акимкин ВГ, Семененко ТА, Углева СВ, Авдеев СН и др. COVID-19 в России: эволюция взглядов на пандемию. Сообщение 2. *Вестник РАМН.* 2022;77(4):291–306. [Starodubov VI, Beregovykh VV, Akimkin VG, Semenenko TA, Ugleva SV, Avdeev SN, et al. COVID-19 in Russia: Evolution of views on the pandemic. Report II. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2022;77(4):291–306 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15690/vramn2122>
 10. Gazit S, Shlezinger R, Perez G, Lotan R, Peretz A, Ben-Tov A, et al. Comparing SARS-CoV-2 natural immunity to vaccine-induced immunity: reinfections versus breakthrough infections. *medRxiv.* 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.08.24.21262415>
 11. Акимкин ВГ, Семененко ТА, Углева СВ, Дубоделов ДВ, Кузин СН, Яцышина СБ и др. COVID-19 в России: эпидемиология и молекулярно-генетический мониторинг. *Вестник РАМН.* 2022;77(4):254–
 60. [Akimkin VG, Semenenko TA, Ugleva SV, Dubodelov DV, Kuzin SN, Yacyshina SB, et al. COVID-19 in Russia: epidemiology and molecular genetic monitoring. *Vestnik RAMN = Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2022;77(4):254–60 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15690/vramn2121>
 12. Брико НИ, Покровский ВИ, ред. *Эпидемиология: учебник.* М.: ГЭОТАР-Медиа; 2015. [Briko NI, Pokrovsky VI, eds. *Epidemiology: textbook.* Moscow: GEOTAR-Media; 2015 (In Russ.)]
 13. Wei C, Shan KJ, Wang W, Zhang S, Huan Q, Qian W. Evidence for a mouse origin of the SARS-CoV-2 Omicron variant. *J Genet Genomics.* 2021;48(12):1111–21. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.12.003>
 14. Генералов ИИ, ред. *Медицинская вирусология: учебное пособие.* Витебск: ВГМУ; 2017. [Generalov II, ed. *Medical Virology: textbook.* Vitebsk: VSMU; 2017 (In Russ.)]
 15. Семененко ТА, Акимкин ВГ, Бурцева ЕИ, Ноздрачева АВ, Симонова ЕГ, Тутельян АВ и др. Особенности эпидемической ситуации по острым респираторным вирусным инфекциям с учетом пандемического распространения COVID-19. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2022;21(4):4–15. [Semenenko TA, Akimkin VG, Burtseva EI, Nozdracheva AV, Simonova EG, Tutelyan AV, et al. Characteristics of the epidemic situation associated with acute respiratory viral infections in the Russian Federation during the pandemic spread of COVID-19. *Epidemiologiya i vaktsinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccinal Prevention.* 2022;21(4):4–15 (In Russ.)] <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2022-21-4-4-15>
 16. Gruell H, Vanshylla K, Tober-Lau P, Hillus D, Sander LE, Kurth F, Klein F. Neutralisation sensitivity of the SARS-CoV-2 omicron BA.2.75 sublineage. *Lancet Infect Dis.* 2022;22(10):1422–23. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00580-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00580-1)
 17. Акимкин ВГ, Давидова НГ, Углева СВ, Понежева ЖБ, Шабалина СВ. Формирование очагов COVID-19 в закрытых коллективах. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2022.12(2):55–9. [Akimkin VG, Davidova NG, Ugleva SV, Ponezheva ZB, Shabalina SV. Formation of COVID-19 foci in closed collectives. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktualnye voprosy = Epidemiology and Infectious Diseases. Current Items.* 2022.12(2):55–9 (In Russ.)] <https://dx.doi.org/10.18565/epidem.2022.12.2.55-9>
 18. Campbell F, Archer B, Laurenson-Schafer H, Jinnai Y, Konings F, Batra N, et al. Increased transmissibility and global spread of SARS-CoV-2 variants of concern as at June 2021. *Euro Surveill.* 2021;26(24):2100509. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100509>
 19. Shahhosseini N, Babuadze GG, Wong G, Kobinger GP. Mutation signatures and *in silico* docking of novel SARS-CoV-2 variants of concern. *Microorganisms.* 2021;9(5):926. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050926>
 20. Cele S, Jackson L, Khoury DS, Khan K, Moyo-Gwete T, Tegally H, et al. SARS-CoV-2 Omicron has extensive but incomplete escape of Pfizer BNT162b2 elicited neutralization and requires ACE2 for infection. *Nature.* 2022;602:654–6. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-04387-1>

Вклад авторов. *Т.Е. Сизикова* — анализ и обобщение данных литературы по заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации, написание текста рукописи; *В.Н. Лебедев* — анализ биологических факторов, способствующих возникновению новых подъемов заболеваемости COVID-19 в Российской Федерации; *С.В. Борисевич* — обоснование концепции исследования, редактирование и переработка текста рукописи. **Благодарности.** Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. С.В. Борисевич является членом редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contributions. *T.E. Sizikova*—analysis and consolidation of literature data on COVID-19 morbidity in the Russian Federation, writing of the text of the manuscript; *V.N. Lebedev*—analysis of biologic factors contributing to new waves of COVID-19 in the Russian Federation; *S.V. Borisevich*—substantiation of the study concept; editing and revision of the text of the manuscript.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. S.V. Borisevich is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Сизикова Татьяна Евгеньевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Лебедев Виталий Николаевич, д-р биол. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., академик РАН. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

48cnii@mil.ru

Tatyana E. Sizikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1817-0126>

Vitaliy N. Lebedev, Dr. Sci. (Biol.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6552-4599>

Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Academician of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

48cnii@mil.ru

Поступила 01.08.2022

После доработки 23.11.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Received 1 August 2022

Revised 23 November 2022

Accepted 7 December 2022



Особенности и проблемы регистрации и применения препаратов для профилактики COVID-19 в период пандемии

А.А. Солдатов^{1,✉}, Д.В. Горенков¹, В.А. Меркулов^{1,2}, В.П. Бондарев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

✉ Солдатов Александр Алексеевич; Soldatov@expmed.ru

Резюме

В конце 2019 г. в городе Ухань (провинция Хубэй) в Китае началась вспышка новой корона-вирусной инфекции COVID-19, которая переросла в пандемию. В кратчайшие сроки, в том числе отечественными производителями, были разработаны вакцины для профилактики COVID-19 и проведена вакцинация населения. В условиях пандемии ускоренная регистрация вакцин является одним из важных факторов, сокращающих срок их выведения на рынок в целях массовой вакцинации. Опыт быстрой разработки и внедрения вакцинных препаратов в рутинную практику важен не только для управления текущей пандемией, но и окажется ценным в случае будущих пандемий, вероятность которых крайне высока. Цель работы — анализ основных проблем оценки безопасности и эффективности вакцин для профилактики COVID-19 при их регистрации и широком применении в условиях пандемии и продолжающейся эволюции вируса SARS-CoV-2. Учитывая скорость разработки и внедрения в практику здравоохранения вакцин для профилактики COVID-19 в условиях пандемии, в процессе их применения был выявлен ряд проблем, которые требуют дальнейшего исследования. Проведенный анализ показал, что к числу наиболее важных проблем относятся необходимость ускоренной оценки безопасности и иммуногенности новых вакцин; отсутствие иммунологических маркеров эффективности; снижение антительного иммунитета с течением времени и, соответственно, необходимость определения параметров ревакцинации и вакцинации переболевших; появление мутантных вариантов SARS-CoV-2. Отмечено, что одним из важных аспектов является разработка рекомендаций по смене штаммового состава в зарегистрированных вакцинах для профилактики COVID-19. Сделан вывод о том, что в условиях пандемии в эволюции вируса определенную роль играет уровень популяционного иммунитета, в том числе сформировавшийся в результате вакцинации. Регулярная ревакцинация может иметь существенное значение при вероятном переходе COVID-19 к модели сезонного заболевания.

Ключевые слова: вакцины против COVID-19; эффективность вакцин; безопасность вакцин

Для цитирования: Солдатов А.А., Горенков Д.В., Меркулов В.А., Бондарев В.П. Особенности и проблемы регистрации и применения препаратов для профилактики COVID-19 в период пандемии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):361–381. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-361-381>

Aspects and issues of marketing authorisation and use of medicinal products for COVID-19 prevention during the pandemic

A.A. Soldatov^{1,✉}, D.V. Gorenkov¹, V.A. Merkulov^{1,2}, V.P. Bondarev¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, 8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

✉ Aleksandr A. Soldatov; Soldatov@expmed.ru

Abstracts

At the end of 2019, an outbreak of a new coronavirus began in the city of Wuhan (Hubei Province) in the People's Republic of China. The outbreak turned into a pandemic. In the shortest possible time, national and international manufacturers developed preventive COVID-19 vaccines, and the population was vaccinated. During pandemics, accelerated approval of vaccines is an important factor that shortens the time to market with the aim of mass vaccination. The experience of rapidly developing and introducing vaccines into routine practice is not only important for managing the current pandemic, but also valuable in case of extremely likely future ones. The aim of this study was to analyse the main issues associated with assessing the safety and efficacy of vaccines for COVID-19 prevention during their registration and widespread use amid the pandemic and ongoing SARS-CoV-2 evolution. The vaccines for COVID-19 prevention were developed and introduced into healthcare practice very rapidly and under the circumstances of the pandemic, and the use of these vaccines has surfaced a number of concerns requiring further research. The most important issues identified in the performed analysis include, but are not limited to the need for accelerated assessment of the safety and immunogenicity of new vaccines; the lack of immune correlates of protection against SARS-CoV-2; the waning of antibody immunity over time, motivating the need to determine revaccination and post-recovery vaccination timelines; and the emergence of mutant SARS-CoV-2 variants. One of noteworthy aspects is the need to develop recommendations for updating the strain composition of registered COVID-19 vaccines. According to the conclusions, the level of herd immunity, including vaccine-induced protection, plays a certain role in virus evolution during the pandemic. If COVID-19 becomes seasonal, which is a probable scenario, regular revaccination can be essential.

Key words: COVID-19 vaccines; vaccine efficacy; vaccine safety

For citation: Soldatov A.A., Gorenkov D.V., Merkulov V.A., Bondarev V.P. Aspects and issues of marketing authorisation and use of medicinal products for COVID-19 prevention during the pandemic. *BIO-preparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):361–381. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-361-381>

Введение

В конце 2019 г. в городе Ухань (провинция Хубэй) в Китае началась вспышка новой коронавирусной инфекции. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) 11 февраля 2020 г. присвоила заболеванию название — COVID-19 (coronavirus disease 2019), а Международный комитет по таксономии вирусов присвоил официальное название возбудителю заболевания — SARS-CoV-2¹ [1, 2]. Из Китая инфекция бы-

стро распространилась по странам мира, и уже 11 марта 2020 г. ВОЗ объявила о начале пандемии COVID-19. По данным ВОЗ по состоянию на ноябрь 2022 г. в мире COVID-19 переболели более 627 млн человек, при этом зарегистрировано 6,5 млн смертельных случаев².

В кратчайшие сроки были разработаны вакцины для профилактики COVID-19, в том числе на новых технологических платформах, и проведена вакцинация населения. Это было до-

¹ Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it. WHO. [https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)

² <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---2-november-2022>

стигнуто благодаря активному взаимодействию разработчиков, органов здравоохранения и фармпроизводителей. Учитывая то, что вакцины для профилактики COVID-19 в условиях пандемии были разработаны и внедрены в практику здравоохранения в очень короткие сроки, в процессе их применения был выявлен ряд проблем, которые требуют дальнейшего исследования.

Цель работы — анализ основных проблем оценки безопасности и эффективности вакцин для профилактики COVID-19 при их регистрации и широком применении в условиях пандемии и продолжающейся эволюции вируса SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2

Вирус SARS-CoV-2 относится к большому семейству РНК-содержащих вирусов (*Coronaviridae*) рода *Betacoronavirus*. SARS-CoV-2 является вирусом с одноцепочечной РНК, имеет округлую или овальную форму с диаметром 60–140 нм. Генетическая последовательность SARS-CoV-2 на 79,5% идентична вирусу SARS-CoV и на 50% коронавирусу ближневосточного респираторного синдрома (MERS-CoV) [3].

Дискуссионным остается вопрос о происхождении вируса — нет единого окончательного мнения относительно его появления. ВОЗ сформировала Международную научно-консультативную группу по вопросу о происхождении новых патогенов (SAGO, International Scientific Advisory Group for Origins of Novel Pathogens) для выяснения происхождения вируса. Группа рассматривает 4 возможные гипотезы происхождения вируса, в том числе и гипотезу лабораторного происхождения. Пока еще не опровергнута ни одна из этих гипотез³.

Основным механизмом передачи вируса является аэрогенный (респираторный) [4, 5]; при этом в научном сообществе продолжается активная дискуссия о том, какой именно путь передачи является ведущим — воздушно-капельный или аэрозольный [5–8]. Также SARS-CoV-2 может распространяться контактно-бытовым путем через зараженные предметы (фомиты), но этот путь передачи, вероятно, слабо влияет на эпидемиологию вируса [5, 6, 9, 10]. Имеются сведения о возможной передаче вируса фекально-оральным путем, но такие случаи

окончательно не подтверждены [4]. В редких случаях возможна внутриутробная передача вируса [4]. Факторами риска тяжелого течения заболевания являются пожилой возраст (лица старше 60 лет), сопутствующие заболевания и состояния (в том числе хронические заболевания сердца и легких, диабет, иммунодефицитные состояния)⁴.

Клетками-мишенями для SARS-CoV-2 у человека являются клетки дыхательной системы и желудочно-кишечного тракта, имеющие рецептор ангиотензинпревращающего фермента 2 типа (ACE2). Основными клетками-мишенями являются альвеолярные клетки II типа легких, что и обуславливает развитие симптомов заболевания. Связыванию вируса с рецептором ACE2 способствует клеточная трансмембранная сериновая протеаза типа 2 (transmembrane protease serine 2, TMPRSS2), активирующая S-белок SARS-CoV-2 [11].

При развитии легкой формы основными симптомами COVID-19 являются: лихорадка, непродуктивный кашель, явления интоксикации (миалгия, слабость, тошнота и др.), боль в горле, заложенность носа и др. Более тяжелые формы заболевания характеризуются развитием двусторонней пневмонии (вирусное диффузное альвеолярное повреждение с микроангиопатией). Механизм развития критической формы заболевания, вероятно, обусловлен цитокиновым штормом, при котором развивается патологическая активация системы иммунитета с преобладанием синтеза провоспалительных цитокинов, хемокинов и других регуляторных молекул. Это сопровождается повышением синтеза таких цитокинов, как ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-8, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-17, ИЛ-18, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, фактор некроза опухоли и др. При этом концентрация этих цитокинов в сыворотке крови коррелирует со степенью тяжести заболевания [12–15].

Учитывая высокую контагиозность и тяжесть инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, Постановлением Правительства Российской Федерации (Постановление) от 31.01.2020 № 66⁵ новая инфекция была добавлена в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих⁶, и классифицирована как B34.2 «Корона-

³ Preliminary Report for the Scientific Advisory Group for the Origins of Novel Pathogens (SAGO). WHO; 2022. <https://www.who.int/publications/m/item/scientific-advisory-group-on-the-origins-of-novel-pathogens-report>

⁴ COVID-19: vulnerable and high risk groups. WHO. <https://www.who.int/westernpacific/emergencies/covid-19/information/high-risk-groups>

⁵ Постановление Правительства Российской Федерации от 31.01.2020 № 66 «О внесении изменения в перечень заболеваний, представляющих опасность для окружающих».

⁶ Постановление Правительства Российской Федерации от 01.12.2004 № 715 «Об утверждении перечня социально значимых заболеваний и перечня заболеваний, представляющих опасность для окружающих».

вирусная инфекция неуточненная»⁷. Для борьбы с пандемией Министерством здравоохранения Российской Федерации были подготовлены Приказ от 19.03.2020 № 198н «О временном порядке организации работы медицинских организаций в целях реализации мер по профилактике и снижению рисков распространения новой коронавирусной инфекции COVID-19»⁸ и Временные методические рекомендации по профилактике, диагностике и лечению COVID-19⁹. По мере развития пандемии и появления новой информации, касающейся диагностики, профилактики и лечения COVID-19, методические рекомендации постоянно обновлялись.

Основные типы вакцин и мишени для иммунопрофилактики COVID-19

До начала пандемии в практике здравоохранения преобладали вакцины, получаемые на основе традиционных производственных платформ – живых аттенуированных или цельных инактивированных. Основной сложностью производства цельновирусных вакцин (как аттенуированных, так и инактивированных) является необходимость культивировать большое количество вируса, для чего необходимо соблюдение нормативных требований, касающихся биологической безопасности, а процесс разработки вакцины является длительным. Кроме того, для повышения иммуногенной активности в вакцины добавляют адъювант [16].

Успехи биотехнологии позволили разработать способы получения белковых субъединичных вакцин. При этом ключевые вирусные белки или пептиды (антигены) получают *in vitro* в клетках бактерий, дрожжей, насекомых или млекопитающих. Основным преимуществом субъединичных вакцин является безопасность их производства, так как вакцины не содержат вирус. В качестве недостатков следует указать, что поскольку для эффективного иммунного ответа часто приходится проводить вакцинацию в несколько этапов и добавлять иммуностимуляторы и адъюванты, то это увеличивает риск развития побочных эффектов [17].

За последние десятилетия успехи ученых в таких областях, как молекулярная биология, иммунология, биотехнология и другие смежные дисциплины, позволили значительно усо-

вершенствовать подходы к разработке вакцин. В частности, к началу пандемии активно разрабатывались производственные платформы на основе вирусных векторов и мРНК.

Преимущество ДНК- и мРНК-вакцин, в сравнении с классическими вакцинами, заключается в возможности их быстрого производства против новых патогенов. В ДНК-вакцинах вирусный антиген(ы), кодируемый рекомбинантной ДНК-плазмидой, продуцируется в клетках-хозяевах посредством последовательных процессов транскрипции и трансляции. Напротив, мРНК-вакцины синтезируются путем транскрипции *in vitro* и продуцируют вирусный антиген(ы) в цитоплазме путем прямой трансляции белка *in vivo* [18].

Важным моментом при разработке вакцин на основе белковых антигенов (субъединичные, векторные, мРНК и др.) является выбор оптимальной мишени (антигена) – белка вируса SARS-CoV-2, против которого вакцина должна будет инициировать развитие иммунного ответа. На поверхности SARS-CoV-2 находятся шиповидный белок (spike protein, S-белок), мембранный белок (М-белок) и оболочечный белок (Е-белок), внутри вируса находится нуклеопротеин (N-белок). В дополнение к этим структурным белкам SARS-CoV-2 кодирует 16 неструктурных белков (nsf1–16) и 9 дополнительных белков [19].

С теоретической точки зрения в качестве основных антигенов-мишеней могут рассматриваться два белка SARS-CoV-2: S и N. Наличие специфических антител к N-белку является одним из основных иммунологических маркеров перенесенного COVID-19. Однако, учитывая, что N-белок защищен от специфических антител вирусной оболочкой, маловероятно, что антитела к N-белку могут эффективно нейтрализовать SARS-CoV-2 [20].

Более обоснованной мишенью для системы иммунитета является S-белок. Это большой гликопротеин, содержащий рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain, RBD), который используется для связывания вируса с клеточным рецептором ACE2. S-белок состоит из двух субъединиц: S1 и S2. S1-субъединица взаимодействует с клетками хозяина через RBD, который связывается с рецептором ACE2, тем самым инициируя процесс внедре-

⁷ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 16 от 18.08.2022 (утв. Министерством здравоохранения Российской Федерации).

⁸ Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.03.2020 № 198н «О временном порядке организации работы медицинских организаций в целях реализации мер по профилактике и снижению рисков распространения новой коронавирусной инфекции COVID-19».

⁹ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 16 от 18.08.2022 (утв. Министерством здравоохранения Российской Федерации).

ния вируса в клетку. Антитела, способные связываться с RBD S-белка, могут блокировать контакт с рецептором ACE2 и препятствовать проникновению вируса в клетки человека. Это делает S-белок главной потенциальной мишенью для нейтрализующих антител [17–19]. В настоящее время в практически всех вакцинах для профилактики COVID-19 на основе белковых антигенов в качестве мишени для иммунной системы используются RBD или S-белок коронавируса [21].

Отечественные вакцины для профилактики COVID-19

Разработка вакцин для профилактики COVID-19, несомненно, является историей успеха совместной деятельности ученых, производителей, правительства и регуляторных органов в Российской Федерации, как и в других странах. Эта работа была завершена в очень короткие сроки (несколько месяцев), тогда как в обычных условиях (до 2021 г.) разработка вакцины для профилактики инфекционного заболевания составляла 7–9 лет. Этому способствовали, во-первых, опыт предыдущих разработок вакцин, что позволило обосновать возможность использования новых технологических платформ для получения препарата. Во-вторых, беспрецедентный уровень взаимодействия всех заинтересованных сторон. В-третьих, использование адаптивного дизайна клинического исследования (КИ) и, в-четвертых, принятие нормативных документов, позволяющих ускорить процедуры экспертизы и регистрации препарата в условиях пандемии.

Можно рассмотреть несколько путей ускорения процесса регистрации вакцин против COVID-19. Оно возможно за счет параллельного проведения отдельных доклинических и клинических исследований; совмещения различных фаз КИ; сокращения сроков экспертизы или проведения экспертизы по мере поступления материалов от разработчика (процедура «rolling review»¹⁰); а также за счет так называемой регистрации «на условиях» (на основании сокращенного объема данных, при условии, что впоследствии исследования будут дополнены). При этом стоит отметить, что зарубежные регулятор-

ные органы не допускают регистрацию, даже по чрезвычайным обстоятельствам, без предоставления первичных данных III фазы — то есть данных по протективным свойствам вакцины, что является существенным отличием от подхода российских регуляторных органов.

Как и во всем мире, в России для ускорения создания и регистрации препаратов для профилактики и лечения COVID-19 и их быстрого внедрения в практику здравоохранения в условиях пандемии потребовалась разработка соответствующих нормативных документов. Учитывая отечественный и мировой опыт борьбы с пандемиями, было принято Постановление № 441, регламентирующее регистрацию препаратов в чрезвычайных условиях¹¹. Согласно Постановлению № 441 в чрезвычайной ситуации (в условиях пандемии) государственная регистрация препаратов от COVID-19 осуществляется в срок до 20 рабочих дней, при этом допускается регистрация на основании демонстрации результатов доклинической оценки токсичности и протективной эффективности и результатов оценки безопасности и переносимости препарата в КИ (I–II фазы). При этом доклиническая оценка репродуктивной токсичности и клиническая оценка эффективности и безопасности вакцины (исследования III фазы) могут быть проведены после регистрации. По результатам экспертизы Минздравом России выдается регистрационное удостоверение с ограниченным сроком действия, в котором прописаны условия, которые обязуется соблюдать заявитель. С учетом того, что регистрация проводится «на условиях», то есть на основании ограниченных данных о безопасности и эффективности вакцины, все вакцинированные пациенты должны быть занесены в специальную базу данных Минздрава России. В данную базу также вносится информация о развитии побочных эффектов в ответ на вакцинацию. По мере появления новой информации о безопасности и эффективности она вносится в инструкцию по применению препарата.

Также согласно указанному Постановлению допускается ускоренная (в течение 5 рабочих дней) регистрация препаратов, зарегистрированных в Европейском союзе (ЕС), США, Канаде

¹⁰ EMA starts first rolling review of a COVID-19 vaccine in the EU. EMA; 2020. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ema-starts-first-rolling-review-covid-19-vaccine-eu>

¹¹ Постановление Правительства Российской Федерации от 03.04.2020 № 441 «Об особенностях обращения лекарственных препаратов для медицинского применения, которые предназначены для применения в условиях угрозы возникновения, возникновения и ликвидации чрезвычайной ситуации и для организации оказания медицинской помощи лицам, пострадавшим в результате чрезвычайных ситуаций, предупреждения чрезвычайных ситуаций, профилактики и лечения заболеваний, представляющих опасность для окружающих, заболеваний и поражений, полученных в результате воздействия неблагоприятных химических, биологических, радиационных факторов».

или ином государстве, по перечню, установленному Минздравом России.

В нашей стране в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в течение многих лет активно занимались разработкой аденовирусных векторов для производства вакцин. Технологические платформы на основе аденовирусных векторов начали разрабатываться с середины 1980-х гг. с целью создания вакцин для лечения опухолевых заболеваний. На основе данной платформы были разработаны вакцины для профилактики лихорадки Эбола, которые продемонстрировали эффективность (в доклинических исследованиях), клиническую иммуногенность и безопасность [22]. Именно с использованием опыта получения вакцин против лихорадки Эбола в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России была разработана и зарегистрирована первая в мире векторная вакцина для профилактики COVID-19 – Гам-КОВИД-Вак (Спутник V) [23, 24]. Аналогичные вакцины на основе аденовирусных векторов были разработаны и зарегистрированы в других странах (вакцины компаний Janssen¹² и AstraZeneca) [25].

Вакцина Гам-КОВИД-Вак – вирусная векторная двухкомпонентная вакцина, полученная на основе аденовируса человека 26 серотипа (Ad26, компонент I) и 5 серотипа (Ad5, компонент II). Оба вирусных вектора являются репликативно-дефектными, несущими генетический материал, кодирующий S-белок SARS-CoV-2. Безопасный аденовирус используется в качестве «контейнера» для доставки отдельных генов, кодирующих целевые белки коронавируса. Вакцина получена биотехнологическим путем без использования патогенного вируса [26].

Для регистрации вакцины по Постановлению № 441 были представлены результаты оценки качества препарата, описание производственного процесса, проект нормативной документации, результаты доклинических исследований (оценка токсичности, протективной эффективности и др.) и результаты КИ безопасности и иммуногенности.

Следует отметить, что пандемия COVID-19 инициировала использование при проведении КИ так называемого адаптивного дизайна, который ранее применялся очень редко. При использовании традиционного дизайна КИ цели исследования, объем выборки и длительность исследования остаются неизменными в течение

всего исследования. Под адаптивным дизайном понимают программу КИ, которую можно изменять в процессе исследования. Наиболее распространенный вид адаптивного дизайна – последовательный анализ. Он позволяет останавливать исследование на основе результатов промежуточного анализа. При этом остановка исследования возможна при достижении конечных точек: эффективности, безопасности и эффективности или безопасности. Принятие столь гибкого и удобного инструмента связано с необходимостью сокращения сроков исследований и расходов на них, наличия соответствующих методик и прозрачности процедур регуляторных органов.

КИ вакцины Гам-КОВИД-Вак были начаты в июне 2020 г. по программе адаптивного дизайна. Для регистрации вакцины были представлены промежуточные результаты КИ I фазы на 38 добровольцах при наблюдении в течение 42 дней. В процессе наблюдения наиболее частыми нежелательными явлениями были боль в месте введения, гипертермия, головная боль, астения, мышечная боль и боль в суставах. Большинство побочных явлений имели легкую степень тяжести; серьезных нежелательных явлений зарегистрировано не было. Введение вакцины добровольцам приводило как к выработке нейтрализующих антител, так и к формированию Т-клеточного иммунного ответа [23]. На основании представленных результатов исследований уже в августе вакцина Гам-КОВИД-Вак была зарегистрирована¹³ в соответствии с Постановлением № 441.

После регистрации препарата Гам-КОВИД-Вак КИ I–II фаз продолжались, затем были начаты КИ III фазы среди добровольцев старше 60 лет и плацебо-контролируемые КИ III–IV фаз для оценки эффективности и безопасности с участием около 30000 добровольцев. Согласно инструкции по медицинскому применению проведенные исследования показали, что введение препарата вызывает сероконверсию на 42 сут исследования у 99,1% пациентов и на 180 сут у 93,9%. При этом на 42 сут среднее геометрическое значение титра специфических антител составило 9009,0, а на 180 сут – 1708,0, в то время как в группе добровольцев, получавших плацебо, значение титра составило 55,6 и 110,2 соответственно¹⁴. По результатам промежуточного анализа протективная эффективность вакцины

¹² <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/jcovden-previously-covid-19-vaccine-janssen>;

<https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vaxzevria>

¹³ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru/>

¹⁴ Там же.

в отношении лабораторно-подтвержденного COVID-19 начиная с 21 сут после первой вакцинации составила 91,6% [27].

На основе технологии получения и результатов КИ вакцины Гам-КОВИД-Вак были разработаны вакцины для применения в детской популяции, для интраназального введения и моновакцина на основе I компонента (табл. 1, 2).

К аденовирусам некоторых серотипов (1, 5, 7 и др.) достаточно часто у человека определяются специфические антитела. Поэтому теоретически (при использовании данных серотипов аденовируса для получения вакцины) специфические антитела могут нейтрализовать вирус и тем самым подавлять активность иммунного ответа на вакцину. В частности, клинические исследования разработанной в Китае вакцины на основе 5 серотипа аденовируса показали, что у 50% здорового населения определяются специфические антитела к аденовирусу 5 серотипа и у вакцинированных такой вакциной иммунный ответ значительно ниже, чем в группе добровольцев, у которых не определялись антитела [28]. Поэтому для разработки вакцин для профилактики COVID-19 на основе адено-

вирусных векторов используются те серотипы аденовируса, против которых у человека не определяются специфические антитела (например, Vaxzevria (AZD1222), AstraZeneca, Швеция, на основе аденовируса шимпанзе и Jcovden (Ad26.COVS2.S), Janssen Biotech Inc., США, на основе 26 серотипа аденовируса). Тем не менее вакцинация данными вакцинами может вызвать выработку специфических антител к аденовирусу после первичной иммунизации, что делает проблематичным вторичную (бустерную) вакцинацию. В отличие от аналогичных зарубежных вакцин на основе аденовирусных векторов вакцина Гам-КОВИД-Вак на основе двух разных компонентов имеет преимущества. Это обусловлено тем, что I компонент разработан на основе 26 серотипа, а II компонент – на основе 5 серотипа, что позволяет проводить вакцинацию по схеме прайм-буст. Поэтому даже если в ответ на первичное введение и будут выработаны специфические антитела к I компоненту, то эти антитела не являются специфическими ко II компоненту. При этом двойная иммунизация позволяет достичь более высокого иммунного ответа, чем однократная.

Таблица 1. Вакцины для профилактики COVID-19, зарегистрированные в Российской Федерации (данные Государственного реестра лекарственных средств)¹⁵

Table 1. Vaccines for COVID-19 prevention approved in the Russian Federation (according to the Russian State Register of Medicines)¹⁵

№	Вакцина <i>Vaccine</i>	РУ <i>MA</i>	Дата регистрации <i>Approval date</i>	Держатель РУ <i>MA holder</i>	Тип вакцины <i>Vaccine type</i>
1	Гам-КОВИД-Вак Комбинированная векторная вакцина ^a <i>Gam-COVID-Vac Combined viral vector vaccine</i>	ЛП-006395	11.08.2020	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России <i>N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology</i>	Векторная (на основе аденовирусных векторов 26 и 5 серотипов) <i>Vector vaccine (based on adenoviral vectors type 26 and type 5)</i>
2	Гам-КОВИД-Вак-Лео Комбинированная векторная вакцина <i>Gam-COVID-Vac Leo Combined viral vector vaccine</i>	ЛП-006423	25.08.2020	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России <i>N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology</i>	Векторная (на основе аденовирусных векторов 26 и 5 серотипов) <i>Vector vaccine (based on adenoviral vectors type 26 and type 5)</i>
3	ЭпиВакКорона Вакцина на основе пептидных антигенов <i>EpiVacCorona Peptide-based vaccine</i>	ЛП-006504	13.10.2020	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <i>Vector State Research Center of Virology and Biotechnology</i>	Субъединичная белковая (на основе пептидов S-белка) <i>Protein subunit vaccine (based on S-protein peptides)</i>
4	КовиВак Инактивированная цельновирионная концентрированная очищенная вакцина <i>CoviVac Inactivated whole-virion purified and concentrated vaccine</i>	ЛП-006800	19.02.2021	ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) <i>M.P. Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of the Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis)</i>	Инактивированная цельновирионная <i>Inactivated whole-virion vaccine</i>

¹⁵ Там же.

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

№	Вакцина <i>Vaccine</i>	РУ <i>MA</i>	Дата регистрации <i>Approval date</i>	Держатель РУ <i>MA holder</i>	Тип вакцины <i>Vaccine type</i>
5	Спутник Лайт Векторная вакцина <i>Sputnik Light Viral vector vaccine</i>	ЛП-006993	06.05.2021	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России <i>N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology</i>	Векторная (на основе аденовирусного вектора 26 серотипа) <i>Vector vaccine (based on adenoviral vector type 26)</i>
6	АВРОРА-КоВ Вакцина на основе пептидных антигенов <i>AURORA-CoV Peptide-based vaccine</i>	ЛП-007326	26.08.2021	ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <i>Vector State Research Center of Virology and Biotechnology</i>	Субъединичная белковая (на основе пептидов S-белка) <i>Protein subunit vaccine (based on S-protein peptides)</i>
7	Гам-КОВИД-Вак-М Комбинированная векторная вакцина для применения среди детей <i>Gam-COVID-Vac-M Combined viral vector vaccine for children</i>	ЛП-007632	24.11.2021	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России <i>N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology</i>	Векторная (на основе аденовирусных векторов 26 и 5 серотипов) <i>Vector vaccine (based on adenoviral vectors type 26 and type 5)</i>
8	Конвасэл® Вакцина субъединичная рекомбинантная <i>Convacell® Recombinant subunit vaccine</i>	ЛП-007967	18.03.2022	ФГУП СПбНИИВС ФМБА <i>St. Petersburg Research Institute of Vaccines and Sera</i>	Субъединичная белковая (на основе пептидов S-белка) <i>Protein subunit vaccine (based on S-protein peptides)</i>
9	Гам-КОВИД-Вак Комбинированная векторная вакцина <i>Gam-COVID-Vac Combined viral vector vaccine</i>	ЛП-008005	31.03.2022	ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России <i>N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology</i>	Векторная (на основе аденовирусных векторов 26 и 5 серотипов) <i>Vector vaccine (based on adenoviral vectors type 26 and type 5)</i>
10	Салнавак Комбинированная векторная вакцина <i>Salnavac Combined viral vector vaccine</i>	ЛП-008297	04.07.2022	АО «ГЕНЕРИУМ» <i>Generium JSC</i>	Векторная (на основе аденовирусных векторов 26 и 5 серотипов) <i>Vector vaccine (based on adenoviral vectors type 26 and type 5)</i>

Примечание. РУ — регистрационное удостоверение.

a Вакцина получила постоянное РУ.

Note. MA—marketing authorisation.

a The vaccine has been granted a full marketing authorisation.

Другая зарегистрированная в Российской Федерации вакцина ЭпиВакКорона является субъединичной, содержит три антигена — синтетические пептидные антигены S-белка, которые конъюгированы с белком-носителем, который представляет собой нуклеокапсидный белок вируса SARS-CoV-2. Данная вакцина была получена на основе подходов, которые использовались ранее в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора при разработке вакцины для профилактики лихорадки Эбола. Опыт применения субъединичных вакцин свидетельствует, что сами по себе пептидные вакцины довольно слабо стимулируют иммунный ответ, и для его усиления обычно в состав вакцины включают адъю-

ванты. В ЭпиВакКороне в качестве адъюванта используется гидроокись алюминия¹⁶.

Для регистрации вакцины ЭпиВакКорона были проведены КИ с использованием адаптивного дизайна [29]. На основании промежуточных результатов КИ вакцина ЭпиВакКорона была зарегистрирована в порядке, установленном Постановлением № 441. Позднее разработчики объединили второй и третий пептидные антигены вакцины в один более длинный антиген, в результате чего была получена вакцина АВРОРА-КоВ, содержащая два антигена, конъюгированных с белком-носителем (табл. 1).

На основе классической технологии была разработана инактивированная вакцина

¹⁶ Государственный реестр лекарственных средств. <https://grls.rosminzdrav.ru/>

КовиВак. Вакцина представляет собой очищенную концентрированную суспензию коронавируса SARS-CoV-2, полученную путем репродукции в перевиваемой культуре клеток линии Vero, инактивированного бета-пропиолактоном. Для усиления иммунного ответа в состав вакцины включен адъювант (гидроокись алюминия)¹⁷. Вакцина также была зарегистрирована на основании Постановления № 441 после I–II фаз КИ, в которых была продемонстрирована ее безопасность и иммуногенность (в том числе выработка нейтрализующих антител) [30].

Субъединичная вакцина Конвасэл представляет собой рекомбинантный нуклеокапсидный белок (N-белок) вируса SARS-CoV-2, полученный в *Escherichia coli*. N-белок, в отличие от S-белка вируса SARS-CoV-2, является более консервативным и меньше подвержен мутациям. Предполагается, что вакцина будет эффективна в отношении разных штаммов, в отличие от вакцин, мишенью для которых являются S-белок или RBD S-белка. Тем не менее следует отметить, что мутации происходят и в N-белке SARS-CoV-2: так, например, варианты «омикрон» BA.4 и BA.5, различаются в том числе мутацией в N-белке (N:P151S), при этом не имея никаких отличий в S-белке [31]. При регистрации данной вакцины в качестве основных показателей специфической (иммунологической) активности вакцины были представлены результаты выработки специфических антител к N-белку вируса SARS-CoV-2¹⁸.

Среди зарегистрированных Минздравом России вакцин для профилактики COVID-19 (табл. 1) только КИ вакцины Гам-КОВИД-Вак III фазы с целью оценки эффективности и безопасности было завершено полностью при участии более 20000 добровольцев после регистрации вакцины согласно Постановлению № 441. Результаты данных КИ позволили перерегистрировать вакцину Гам-КОВИД-Вак по обычной процедуре регистрации.

В случае всех вакцин для профилактики COVID-19, которые были зарегистрированы на основании Постановления № 441, за исключением вакцины Гам-КОВИД-Вак, еще продолжаются КИ III фазы с целью оценки эффективности и безопасности в большой популяции (табл. 2).

Кроме описанных вакцин были разработаны вакцины с использованием совершенно новых технологических подходов или новые комбинации, которые в настоящее время проходят КИ

I–II фаз с целью оценки безопасности и иммуногенности (табл. 3).

Проблемы при проведении клинических исследований вакцин для профилактики COVID-19

Учитывая, что разработка, доклинические и клинические исследования в условиях пандемии проводятся в очень сжатые сроки, причем регистрация вакцин на основании Постановления № 441 осуществляется без оценки протективной эффективности вакцин, можно выделить ряд проблем, которые в связи с этим встают перед производителями и регуляторными органами: адекватная оценка безопасности и эффективности разрабатываемых вакцин, актуализация их штаммового состава, оценка необходимости ревакцинации и вакцинации переболевших.

1. Безопасность вакцин для профилактики COVID-19

Вакцины для профилактики COVID-19 являются новыми вакцинами, и большинство из них разработано на основе новых технологических платформ (вирусные векторы, мРНК и др.), в связи с чем особое внимание в процессе КИ и практического применения было обращено на оценку безопасности вакцин. В частности, в ходе применения вакцины Comirnaty (BNT162b2) производства Pfizer/BioNTech на основе мРНК были зарегистрированы ожидаемые побочные реакции, такие как боль в месте введения, лихорадка, гриппоподобный синдром, а также гиперчувствительность (сыпь, зуд, крапивница и ангионевротический отек) и анафилаксия [18]. Однако были выявлены и побочные реакции, которые ранее не ассоциировались с вакцинами: острый периферический паралич лицевого нерва, миокардит и перикардит. Если развитие паралича лицевого нерва зарегистрировано в четырех случаях, то развитие миокардита и перикардита встречается значительно чаще. В США были описаны случаи развития побочных эффектов у подростков со стороны сердечно-сосудистой системы [32–34]. При этом в 226 случаях эти побочные реакции были подтверждены у американцев моложе 30 лет; у лиц в возрасте от 30 лет и старше было зарегистрировано 475 случаев миокардита или перикардита [32]. Информация о случаях развития данных осложнений была получена и при вакцинации

¹⁷ Там же.

¹⁸ Государственный реестр лекарственных средств. https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=11d8e5d1-2320-46ec-a4aa-c2e63ff45751

Таблица 2. Проводимые в настоящее время клинические исследования вакцин для профилактики COVID-19, которые были зарегистрированы на основании Постановления Правительства Российской Федерации № 441 (данные Государственного реестра разрешений на проведение клинических исследований)¹⁹

Table 2. Ongoing clinical trials of vaccines for COVID-19 prevention, approved under Decree 441 of the Government of the Russian Federation (according to the State Register of Clinical Trial Approvals)¹⁹

№.	Номер РКИ CTR No.	Наименование ЛП Vaccine name	Дата начала КИ CT start date	Дата окончания КИ CT completion date	Цель КИ CT aim	Фаза КИ CT phase	Количество пациентов Number of subjects
1	640	Гам-КОВИД-Вак <i>Gam-COVID-Vac</i>	12.10.2021	31.12.2023	Оценка безопасности, переносимости и иммуногенности ЛП в лекарственной форме спрей назальный при участии взрослых добровольцев <i>Safety, tolerability, and immunogenicity evaluation of the nasal spray vaccine in adult volunteers</i>	II	2220
2	336	Гам-КОВИД-Вак-М <i>Gam-COVID-Vac-M</i>	02.07.2021	31.12.2023	Оценка безопасности, переносимости и иммуногенности ЛП у подростков <i>Safety, tolerability, and immunogenicity evaluation of the vaccine in adolescents</i>	I–II, III	3660
3	31	Гам-КОВИД-Вак-М <i>Gam-COVID-Vac-M</i>	24.01.2022	31.12.2023	Оценка безопасности, переносимости и иммуногенности ЛП у детей <i>Safety, tolerability, and immunogenicity evaluation of the vaccine in children</i>	I–II, III	2200
4	197	ЭпиВак-Корона-Н (АВРОРА-КоВ) <i>EpiVacCorona-N (AURORA-CoV)</i>	08.04.2021	20.12.2022	Оценка безопасности, переносимости, реактогенности и иммуногенности вакцины с участием добровольцев в возрасте от 18 до 60 лет <i>Safety, tolerability, reacto- and immunogenicity evaluation of the vaccine in volunteers aged 18–60</i>	I–II	300
5	89	ЭпиВак-Корона-Н (АВРОРА-КоВ) <i>EpiVacCorona-N (AURORA-CoV)</i>	10.02.2022	30.12.2022	Исследование показателей безопасности, переносимости и иммуногенности при двукратном и трехкратном введении вакцины с участием добровольцев в возрасте от 60 лет и старше, а также исследование возможности однократного (бустерного) применения вакцины после перенесенного заболевания у добровольцев в возрасте от 60 лет и старше, перенесших COVID-19 6 и 12 месяцев назад, а также у добровольцев, вакцинированных 6 месяцев назад <i>Study of the safety, tolerability, and immunogenicity of two- and three-dose courses of the vaccine in volunteers aged 60 and over, and of the possibility of single (booster) immunisation in volunteers aged 60 and over who had COVID-19 6/12 months prior to enrolment or was immunised 6 months prior to enrolment</i>	III	300
6	279	КовиВак <i>CoviVac</i>	02.06.2021	30.12.2022	Оценка профилактической эффективности и иммуногенности и безопасности ЛП на здоровых добровольцах в возрасте от 18 до 60 лет <i>Protective efficacy, immunogenicity, and safety evaluation of the vaccine in healthy volunteers aged 18–60</i>	III	32000
7	869	GNR-099 (Салनावак) <i>GNR-099 (Salnavac)</i>	20.12.2021	31.12.2023	Изучение безопасности и иммуногенности интраназальной вакцины GNR-099 по сравнению с вакциной Гам-КОВИД-Вак у здоровых добровольцев <i>Safety and immunogenicity study of the intranasal GNR-099 vaccine in comparison with Gam-COVID-Vac</i>	II–III	7000

¹⁹ Государственный реестр разрешений на проведение клинических исследований. <https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionReg.aspx>

Продолжение таблицы 2
Table 2 (continued)

№.	Номер РКИ CTR No.	Наименование ЛП Vaccine name	Дата начала КИ CT start date	Дата окончания КИ CT completion date	Цель КИ CT aim	Фаза КИ CT phase	Количество пациентов Number of subjects
8	583	Конвасэл Convacell	05.10.2022	31.12.2026	Изучение иммуногенности, эффективности и безопасности вакцины от коронавирусной инфекции у взрослых здоровых добровольцев в возрасте от 18 лет и старше <i>Immunogenicity, efficacy, and safety study of the coronavirus vaccine in healthy adult volunteers aged 18 and over</i>	II–III	18106

Примечание. КИ — клинические исследования, РКИ — Государственный реестр разрешений на проведение КИ, ЛП — лекарственный препарат.

Note. CT—clinical trial, CTR—State Register of Clinical Trial Approvals.

Таблица 3. Клинические исследования новых вакцин (незарегистрированных) для профилактики COVID-19 (данные Государственного реестра разрешений на проведение клинических исследований)²⁰

Table 3. Clinical trials (pivotal) of new vaccines for COVID-19 prevention (according to the State Register of Clinical Trial Approvals (CTR))²⁰

№	Номер РКИ CTR No.	Наименование ЛП Vaccine name	Дата окончания КИ CT completion date	Цель КИ CT aim	Фаза КИ CT phase	Количество пациентов Number of subjects
1	399	BCD-250 (вакцина рекомбинантная векторная вирусная на основе AAV5-RBD-S) <i>BCD-250 (recombinant viral vector vaccine based on AAV5-RBD-S)</i>	31.12.2026	Оценка безопасности и иммуногенности <i>Safety and immunogenicity evaluation</i>	I–II	360
2	115	Вакцина VLP-корона (вакцина на основе VLP) <i>VLP-Corona (vaccine based on VLPs)</i>	30.12.2022	Оценка переносимости, безопасности и иммуногенности оптимальной дозы вакцины в сравнении с плацебо на протяжении 21 суток после двукратного внутримышечного введения препаратов <i>Tolerability, safety, and immunogenicity evaluation of the optimum vaccine dose in comparison with placebo for 21 days after two intramuscular injections</i>	I–II	600
3	518	Вакцина VLP-корона (вакцина на основе VLP) <i>VLP-Corona (vaccine based on VLPs)</i>	30.12.2022	Оценка переносимости, безопасности и иммуногенности вакцины при интраназальном введении на добровольцах в возрасте 18–55 лет <i>Tolerability, safety, and immunogenicity evaluation of intranasal administration of the vaccine in volunteers aged 18–55</i>	I–II	600
4	710	Рекомбинантная вакцина на основе гибридного белка SARS-CoV-2 (V-01) <i>Recombinant SARS-CoV-2 fusion protein vaccine (V-01)</i>	30.06.2023	Оценка эффективности, безопасности и иммуногенности вакцины у взрослых в возрасте 18 лет и старше <i>Efficacy, safety, and immunogenicity evaluation of the vaccine in adults aged 18 and over</i>	III	5500

²⁰ Государственный реестр разрешений на проведение клинических исследований. <https://grls.rosminzdrav.ru/CIPermissionReg.aspx>

Продолжение таблицы 3
Table 3 (continued)

№	Номер РКИ CTR No.	Наименование ЛП Vaccine name	Дата окончания КИ CT completion date	Цель КИ CT aim	Фаза КИ CT phase	Количество пациентов Number of subjects
5	581	Бетувакс-КоВ-2 (рекомбинантная вакцина) <i>Betuvax-CoV-2 (recombinant vaccine)</i>	31.08.2022	Исследование безопасности, переносимости и иммуногенности вакцины у взрослых здоровых добровольцев <i>Safety, tolerability, and immunogenicity study of the vaccine in healthy adult volunteers</i>	I–II	170
6	398	AZD1222 и rAd26-S (Спутник Лайт) (ком- понент 1 Гам-КОВИД- Вак) <i>AZD1222 and rAd26-S (Sputnik Light) (component 1 of Gam- COVID-Vac)</i>	31.08.2022	Оценка безопасности и иммуно- генности комбинации препаратов AZD1222 и rAd26-S, вводимых по схеме «гетерологичный прайм- буст» для профилактики новой ко- ронавирусной инфекции COVID-19 у взрослых <i>Safety and immunogenicity evaluation of heterologous prime-boost vaccination with AZD1222 and rAd26-S for COVID-19 prevention in adults</i>	I–II	150
7	177	ReCOV (рекомбинантная двухкомпонентная вакцина) <i>ReCOV (recombinant two- component vaccine)</i>	31.08.2023	Оценка эффективности, безопас- ности и иммуногенности вакцины у взрослых добровольцев в воз- расте 18 лет и старше <i>Efficacy, safety, and immunogenicity study of the vaccine in adult volunteers aged 18 and over</i>	II–III	2500

Примечание. КИ — клинические исследования, РКИ — Государственный реестр разрешений на проведение КИ, ЛП — лекарственный препарат, VLP — вирусоподобные частицы.

Note. CT—clinical trial, CTR—State Register of Clinical Trial Approvals, VLP—virus-like particle.

Comirnaty в других странах. Министерство здравоохранения Израиля заявило о выявлении случаев миокардита, который наблюдался в основном у молодых мужчин. С декабря 2020 по май 2021 г. было зарегистрировано 275 таких случаев среди вакцинированных [35]. Европейское агентство по лекарственным средствам (European Medicines Agency, EMA) проанализировало более 300 случаев развития миокардитов и перикардитов у лиц, привившихся мРНК-вакцинами; на основании результатов анализа данные осложнения были включены в инструкцию по применению [36, 37].

При применении вакцины на основе аденовирусного вектора Vaxzevria (AZD1222, ChAdOx1-S) производства AstraZeneca зарегистрированы побочные реакции, которые ранее не ассоциировались с вакцинацией: тромбоцитопения, лимфаденопатия и синдром тромбоза с тромбоцитопенией. В отчете EMA²¹ указано, что на пе-

риод публикации документа (24.03.2021) было зарегистрировано 269 случаев эмболических и тромботических явлений, из которых 224 случая зарегистрированы в Великобритании. Большинство (60%) случаев побочных реакций выявлено у пациентов женского пола; средний возраст составлял 70 лет. У 45 пациентов осложнения закончились летальным исходом. Частота синдрома тромбоза с тромбоцитопенией и синдрома Гийена–Барре может составлять до 1 случая на 10 тыс. вакцинированных²².

Таким образом, развитие тех или иных побочных реакций при применении вакцин для профилактики COVID-19 может быть обусловлено особенностью вакцины. Учитывая, что вакцины для профилактики COVID-19 разработаны с использованием новых технологических платформ, зарегистрированы на основании результатов неполных клинических исследований безопасности и активно применяются, требуются

²¹ Signal assessment report on embolic and thrombotic events (SMQ) with COVID-19 Vaccine (ChAdOx1-S [recombinant]) – COVID-19 Vaccine AstraZeneca (Other viral vaccines). EMA/PRAC/157045/2021. EMA; 2021. https://www.ema.europa.eu/en/documents/prac-recommendation/signal-assessment-report-embolic-thrombotic-events-smq-covid-19-vaccine-chadox1-s-recombinant-covid_en.pdf

²² Vaxzevria (COVID-19 Vaccine (ChAdOx1-S [recombinant])). EMA/110683/2022. EMEA/H/C/005675. https://www.ema.europa.eu/en/documents/overview/vaxzevria-previously-covid-19-vaccine-astrazeneca-epar-medicine-overview_en.pdf

дальнейшие исследования с целью оценки их безопасности.

2. Эффективность вакцин для профилактики COVID-19

Одной из основных проблем при анализе эффективности вакцин против COVID-19 является отсутствие четких иммунологических критериев оценки. Предполагается, что вакцинация стимулирует выработку специфических антител, которые, взаимодействуя с вирусом, нейтрализуют его. Для оценки связывания специфических антител, которые вырабатываются в ответ на вакцинацию, с мишенями (RBD S-белка, полноразмерный S- или N-белок), в основном используются методы твердофазного иммуноферментного анализа или поверхностного плазмонного резонанса. Однако методы на основе связывания специфических антител с мишенью не позволяют напрямую подтвердить способность вакцинного препарата индуцировать выработку антител, которые могут нейтрализовать вирусную активность [20]. Золотым стандартом для оценки специфической активности вакцины (по определению уровня специфических антител в ответ на вакцинацию) являются методы нейтрализации вируса *in vitro* с использованием вирусов дикого типа (нейтрализация вируса SARS-CoV-2 дикого типа в реакции нейтрализации методом подавления бляшкообразования, реакции нейтрализации цитопатического действия и микронейтрализации)²³. При этом использование данных методик возможно только в специализированных лабораториях, имеющих лицензию для работы с вирусами II группы патогенности. Учитывая это, применяются альтернативные методики с использованием псевдотипированного вируса или вирусоподобных частиц. Однако данные методы оценки специфической активности возможны в случаях, если мишенью специфических антител являются структуры на поверхности вируса (например, RBD-область или S-белок вируса SARS-CoV-2)²⁴.

Учитывая, что N-белок находится внутри вируса SARS-CoV-2, использование методов нейтрализации вируса (как в случае S-белка) не позволит оценить специфическую активность вакцины, которая вызывает выработку специфических антител к N-белку [20].

Для объективной оценки эффективности вакцины очень важной является характеристика

иммуногенности вакцины. В большинстве исследований продемонстрировано, что нейтрализующие антитела, специфичные к S-белку, играют ключевую роль в иммунной защите от COVID-19. На основе данного факта разрабатывались основные вакцины для профилактики COVID-19. При оценке иммуногенности необходимо учитывать не только «силу» (титр) иммунного ответа при вакцинации, но и его динамику во времени. Именно на основе исследования иммуногенности обосновываются оптимальная доза вакцины и схемы вакцинации. Оптимальным результатом изучения иммуногенности вакцины является обоснование так называемого коррелята защиты, то есть уровня (титра) антител, который предотвращает развитие заболевания [38].

Если при проведении доклинических исследований в большинстве случаев была продемонстрирована способность нейтрализующих антител, которые вырабатываются в ответ на введение вакцины, вызывать предотвращение заболевания, то в процессе проведения клинических исследований не было выявлено четкой зависимости эффективности вакцины от уровня нейтрализующих антител [38].

По мнению авторов данной статьи, проблема оценки иммуногенности вакцин лежит в плоскости особенностей иммунного ответа на вирус SARS-CoV-2. Теоретически предполагалось, что эффективность вакцинации должна быть связана с уровнем (титром) специфических антител, которые вырабатываются на введение вакцины. Однако изучение механизмов выработки антител при вакцинации выявило две особенности. Во-первых, разные виды вакцин могут вызывать и разные иммунные ответы на вакцинацию у одного того же человека и, во-вторых, у разных людей (по признакам пола, расы, возраста) могут вырабатываться антитела различной специфичности в ответ на вакцинацию одной вакциной²⁵ [20].

Кроме того, при применении плазмы реконвалесцентов или препаратов на основе моноклональных антител для лечения и профилактики COVID-19 не было выявлено дозозависимого эффекта. В частности, при введении пациентам с легкой и средней степени тяжести COVID-19 трех разных препаратов на основе моноклональных антител в дозах от 0,7 до 8 г дозозависимый эффект не был выявлен. Кроме того, было показано, что введение препаратов

²³ COVID-19: potency assay considerations for monoclonal antibodies and other therapeutic proteins targeting SARS-CoV-2 infectivity. Guidance for Industry. FDA; 2021. <https://www.fda.gov/media/145128/download>

²⁴ Там же.

²⁵ Там же.

плазмы реконвалесцентов больным в критической форме заболевания вызывало ухудшение состояния [38–41].

Следует отметить, что пока еще слабо изучены закономерности выработки специфических антител не только в ответ на вакцинацию, но и после перенесенного COVID-19. В частности, при определении уровня антител у реконвалесцентов для получения плазмы для лечения COVID-19 только у 20% определялись нейтрализующие антитела с уровнем титра 1:1000, а у 10% вообще не определялись [42].

Особого внимания заслуживает феномен, установленный в процессе КИ вакцины Vaxzevria (ChAdOx1-S), в которой был использован в качестве вектора аденовирус шимпанзе. При вакцинации одна группа добровольцев (8,8 тыс. человек моложе 55 лет) получила две полные дозы вакцины, а вторая группа (2,7 тыс. человек) из-за ошибки производителя получила сначала половинную дозу препарата, а потом — полную. Ошибка была обнаружена во время регистрации сообщений о побочных эффектах. У добровольцев, которые получили в два раза меньшую дозу, было зарегистрировано меньше побочных реакций [43]. При анализе результатов эффективности было установлено, что в первой группе эффективность вакцины составляет всего 62%, а во второй группе, получившей при первой вакцинации половину дозы, эффективность составила 90%. Возможно, что низкая доза вакцин более эффективно стимулирует Т-лимфоциты, запуская иммунный ответ на вакцинацию. Также возможно, что при высокой дозе система иммунитета реагирует не только на S-белок коронавируса, но и на отдельные компоненты вирусного вектора.

Таким образом, понимание механизмов формирования иммунного ответа и на вакцинацию, и на инфицирование SARS-CoV-2 является важной задачей, решение которой поможет в разработке ускоренных подходов к оценке потенциальной эффективности вакцин для профилактики COVID-19.

3. Повторная вакцинация и вакцинация переболевших

Вакцины для профилактики COVID-19 разрабатывались как для однократного, так и для двукратного введения. Однако было выявлено, что со временем после вакцинации наблюдается тенденция к снижению уровней специфических антител. В частности,

в сравнительном исследовании вакцин Vaxzevria (ChAdOx1) производства AstraZeneca и BNT162b2 производства Pfizer/BioNTech наблюдалось снижение уровней антител к вакцинам: примерно в пять раз для ChAdOx1 и в два раза для BNT162b2 при определении уровня антител через 70 сут после второй иммунизации по сравнению с определением на 21–41 сут после второй иммунизации [43, 44]. Аналогичная тенденция была установлена при изучении динамики уровня специфических антител среди переболевших. Подобные данные довольно быстро обозначили проблему, связанную с необходимостью повторной (бустерной) вакцинации.

Согласно рекомендациям ЕМА относительно проведения повторной вакцинации иммунокомпromетированной популяции (люди с ослабленным иммунитетом), лица старше 12 лет с серьезными нарушениями иммунного статуса могут получить третью дозу вакцины для профилактики COVID-19, по меньшей мере, через 28 сут после второй дозы²⁶. К указанным лицам относятся следующие категории: получающие активное лечение при злокачественных опухолях или онкогематологических заболеваниях; перенесшие трансплантацию органов или стволовых клеток в течение последних двух лет и принимающие иммуносупрессанты; лица с первичным иммунодефицитом средней тяжести или тяжелой степени; лица с запущенной или нелеченой ВИЧ-инфекцией; при лечении высокими дозами кортикостероидов или иными лекарствами, которые могут привести к иммуносупрессии. Необходимость введения третьей дозы вакцины обсуждается с лечащим врачом.

В то же время отсутствует единое мнение о сроках между первичным и повторным введением вакцины в популяции здоровых лиц. В частности, при проведении КИ вакцины Vaxzevria (ChAdOx1) по показателям иммуногенности, количеству случаев заражения и динамике вирусной нагрузки, включавшем 17178 добровольцев, которым вводили повторно вакцину с различными интервалами (от 4 до 12 недель), было показано, что эффективность вакцины зависит от интервала между первым и вторым введением вакцины [43]. При этом трехмесячный интервал между дозами являлся более эффективным, чем вакцинация с коротким интервалом между первым и вторым введениями. Данное исследование продемонстрировало, что для каждой вакцины существует определенный интервал между первым и вторым введением, который

²⁶ Special considerations in people who are immunocompromised. NIH; 2022. <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/special-populations/immunocompromised/>

позволяет максимально длительно поддерживать эффективность вакцины.

После одобрения Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) применения бивалентных мРНК-вакцин Comirnaty (производства Pfizer/BioNTech) и Spikevax (Moderna) в качестве бустеров рекомендовано проводить бустер-вакцинацию уже через два месяца после первичной вакцинации или введения моновалентного бустера начиная с возраста 5 или 6 лет (для препарата производства Moderna)²⁷. В странах ЕС сроки ревакцинации составляют 3–6 мес. после первичной вакцинации (1–2 мес. после однократной вакцинации препаратом Jcovden производства Janssen) или перенесенной SARS-CoV-2 инфекции для лиц старше 12–18 лет (в Австрии – старше 5 лет)²⁸. В качестве бустеров EMA одобрены модифицированные бивалентные вакцины Comirnaty производства Pfizer/BioNTech и Spikevax производства Moderna, содержащие в своем составе последовательности помимо исходного уханьского штамма субвариантов «омикрон» BA.1 или BA.4/BA.5²⁹. Введение дополнительных бустерных доз адаптированных вакцин рекомендуется, по крайней мере, через 3 мес. после предыдущего бустера (предпочтительно, не менее чем через 4 мес.) у лиц старше 60 лет, иммунокомпрометированных лиц, а также лиц с сопутствующими заболеваниями и беременных женщин³⁰. ВОЗ, ранее осторожно относившаяся к введению бустерных доз, сейчас рекомендует их введение для всех преквалифицированных вакцин в интервале 4–6 мес. после завершения первичной иммунизации, в том числе у подростков³¹. Более того, рекомендуется рассмотреть возможность введения второй бустерной дозы для уязвимых групп населения: пожилых; лиц со средней или тяжелой формой иммунодефицитных состояний; взрослых с сопутствующими

заболеваниями, увеличивающими риск тяжелого течения болезни; беременных; работников здравоохранения³².

Таким образом, для разных вакцин и в разных странах отсутствует единый подход к определению периодов между первичным и повторным введением вакцин. Соответственно, требуется проведение дальнейших исследований с целью научного обоснования периода между первичными и повторными введениями. Для этого, наряду с исследованиями протективных свойств, необходимо в том числе дальнейшее проведение КИ с длительным наблюдением за динамикой антительного иммунного ответа (в течение 6–12 мес.) для установления достижения стабильного уровня антител (плато) или времени до сероконверсии в различных группах вакцинированного населения.

4. Эффективность вакцин против разных вариантов SARS-CoV-2

Вирус SARS-CoV-2 имеет высокий мутагенный потенциал, причем в процессе мутаций появились варианты, которые вызывают тяжелое течение и являются высококонтагиозными. В качестве одной из возможных причин появления новых вариантов указывают длительную циркуляцию вируса в организме лиц с ослабленным иммунитетом или массовую, но с недостаточным охватом населения вакцинацию, оказывающую эволюционное давление на отбор вариантов, способных «ускользнуть» от вакцинного иммунитета. Вакцины для профилактики COVID-19 разрабатывались в основном с целью выработки специфических антител против S-белка (или его RBD-фрагмента) исходного уханьского штамма SARS-CoV-2. Поэтому проблема вакцинации против других вариантов является очень важной.

Опыт применения препаратов на основе моноклональных антител для лечения и профилактики COVID-19 также свидетельствует

²⁷ COVID-19 bivalent vaccine boosters. FDA; 2022. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/coronavirus-disease-2019-covid-19/covid-19-bivalent-vaccine-boosters>

²⁸ Overview of the implementation of COVID-19 vaccination strategies and deployment plans in the EU/EEA. ECDC; 2022. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/overview-implementation-covid-19-vaccination-strategies-and-deployment-plans>

²⁹ Adapted COVID-19 vaccines. COVID-19 vaccines: authorised. <https://www.ema.europa.eu/en/human-regulatory/overview/public-health-threats/coronavirus-disease-covid-19/treatments-vaccines/vaccines-covid-19/covid-19-vaccines-authorised#adapted-covid-19-vaccines-section>

³⁰ ECDC-EMA statement on booster vaccination with Omicron adapted bivalent COVID-19 vaccines. EMA; 2022. <https://www.ema.europa.eu/en/news/ecdc-ema-statement-booster-vaccination-omicron-adapted-bivalent-covid-19-vaccines>

³¹ Дорожная карта СКГЭ ВОЗ по приоритетному порядку использования вакцин против COVID-19: подход к оптимизации глобального воздействия вакцин против COVID-19 на основании целей общественного здравоохранения, глобальной и национальной справедливости, а также сценариев доступа к вакцинам и охвата вакцинацией (первый выпуск: 20 октября 2020 г., обновлено: 13 ноября 2020 г., обновлено: 16 июля 2021 г., последнее обновление: 21 января 2022 г.). <https://apps.who.int/iris/handle/10665/352334>

³² Good practice statement on the use of second booster doses for COVID-19 vaccines. WHO; 2022. <https://www.who.int/publications/i/item/WHO-2019-nCoV-vaccines-SAGE-good-practice-statement-second-booster>

о важности данной проблемы. Препараты на основе моноклональных антител разрабатывались для специфического связывания с S-белком или RBD-фрагментом исходного уханьского штамма SARS-CoV-2. После появления других вариантов практически все моноклональные антитела против исходного штамма SARS-CoV-2 оказались неэффективны против других вариантов.

Информация об эффективности вакцин, разработанных против исходного уханьского штамма SARS-CoV-2, в отношении других вариантов противоречива. При проведении КИ вакцины Vaxzevria (ChAdOx1) производства AstraZeneca в Южно-Африканской Республике (ЮАР) в процессе мутации варианта «альфа» (B.1.1.7) появился новый вариант — «бета» (B.1.1.529). КИ вакцины ChAdOx1 продолжились, однако эффективность вакцины в предотвращении симптоматического COVID-19 легкой и средней тяжести, вызванного вариантом «бета», составила всего 10%. Нейтрализующая активность *in vitro* сывороток от лиц, вакцинированных в отношении этого нового варианта, существенно снизилась в сравнении с таковой активностью для исходного штамма³³ [25]. В связи с полученными результатами южно-африканским правительством было принято решение об остановке массовой иммунизации этой вакциной³⁴.

Эффективность вакцин в отношении различных вариантов SARS-CoV-2 зависит от особенностей вакцины. В частности, было показано, что эффективность после однократного введения вакцины BNT162b2 производства Pfizer/BioNTech против варианта «альфа» составила 48,7%, а после двукратного введения — 93,7%, в то время как против варианта «дельта» — 30,7 и 88,0% соответственно. При исследовании вакцины ChAdOx1 производства AstraZeneca было показано, что эффективность двукратной вакцинации против варианта «альфа» составила 74,5%, а против варианта «дельта» — 67,0% [44].

При оценке протективных свойств вакцин в отношении вариантов «дельта» и «омикрон» в реальных условиях применения в провинции Онтарио, Канада, было показано, что эф-

фективность первичной вакцинации (две дозы, одна или обе из которых — мРНК-вакцина производства Pfizer/BioNTech или Moderna) в отношении варианта «дельта» составила 89% с 7 по 59 сут после введения второй дозы и 80% после 240 сут, при этом показатель эффективности вырос после введения бустерной дозы мРНК-вакцины до 97% (7 сут и позже после иммунизации). Для варианта «омикрон» соответствующие данные составили 36% (7–59 сут), 1% (180 сут и позже) и 61% (7 сут и позже после бустерной дозы). Эффективность в предотвращении тяжелого COVID-19 составила 99% для варианта «дельта» и 95% для варианта «омикрон» (7 сут и позже после введения третьей, бустерной дозы вакцины) [45].

Согласно информации Министерства здравоохранения Израиля общая эффективность вакцины BNT162b2 (Comirnaty) производства Pfizer/BioNTech в отношении COVID-19, вызванного вариантом «дельта», при применении в Израиле снижалась с течением времени. В течение около двух месяцев после второго введения эффективность вакцины была на уровне 79%, а через 6 мес. — 16%. Более активно снижение эффективности наблюдалось в старших возрастных группах, в связи с чем властями Израиля было принято решение о ревакцинации лиц старше 60 лет не позже чем через 5 мес. [46].

Несмотря на имеющиеся данные о перекрестной реактивности и эффективности вакцин против исходного уханьского штамма с другими штаммами, производители Pfizer и AstraZeneca начали разработку и исследования вакцин, содержащих последовательности других вариантов SARS-CoV-2. Для получения вакцины против варианта «бета» в вакцине ChAdOx1 (Vaxzevria), AstraZeneca (на основе аденовирусного вектора), был заменен только ген, кодирующий последовательность S-белка. В КИ вакцины против нового варианта было включено 2250 добровольцев, которых рандомизировали в две группы, в которых добровольцы получали вакцину против исходного и нового вариантов³⁵. Pfizer и BioNTech проводят КИ обновленных вакцин против вариантов «альфа», «бета», «дельта», субвариантов «омикрон», включая бивалентные модифика-

³³ Oxford COVID-19 vaccine trial results. <https://www.wits.ac.za/covid19/covid19-news/latest/oxford-covid-19-vaccine-trial-results.html>

³⁴ Minister Zweli Mkhize briefs parliament on suspension and distribution of AstraZeneca vaccine. <https://www.gov.za/speeches/distribution-astrazeneca-vaccine-12-feb-2021-0000>

³⁵ Trial to enrol approximately 2,250 adults to assess safety and immunogenicity of AZD2816 against the SARS-CoV-2 virus. <https://www.astrazeneca.com/media-centre/press-releases/2021/first-covid-19-variant-vaccine-azd2816-phase-ii-iii-trial-participants-vaccinated.html>

ции³⁶. КИ вариант-модифицированных вакцин проводит и Moderna³⁷.

В отношении вакцин против COVID-19 предложена процедура замены/обновления штаммов по модели смены штаммового состава вакцин для профилактики сезонного гриппа. Основными возражениями для реализации данного подхода служат следующие факторы: инфекция является достаточно новой и полностью не изучены механизмы иммунного ответа на вакцинацию или инфицирование; разработанные вакцины нуждаются в дальнейшем изучении, их клинические исследования продолжаются; до сих пор не установлены иммунные корреляты между содержанием антител в крови и протективным уровнем антител, защищающим от заражения SARS-CoV-2 или тяжелого течения заболевания.

Перспективы эффективного управления эпидемическим процессом

Протективная эффективность вакцин против COVID-19 оценивается в исследованиях III фазы, в которых конечной точкой обычно является снижение случаев лабораторно подтвержденного COVID-19³⁸. Однако сейчас, в условиях распространения мутантных вариантов, на первый план выходит эффективность в отношении предотвращения тяжелых случаев (в том числе случаев госпитализации и смерти, особенно в уязвимых категориях лиц), так как существующие вакцины, согласно международным данным, не дают так называемого стерилизующего иммунитета, то есть не защищают от инфицирования и даже симптоматического течения уже через 1–2 мес. после первичной вакцинации [45, 47–49]. В свою очередь, это ставит вопрос о необходимости регулярных ревакцинаций для «подстегивания» иммунного ответа и/или модификации штаммового состава существующих вакцин с целью актуализации его в соответствии с доминирующим на текущий момент в популяции вариантом. Разработка отечественных научно обоснованных рекомендаций (руководства) по смене штаммового состава вакцин против COVID-19 является важной задачей для эффективного регулиро-

вания и ограничения эпидемического процесса. При этом следует учитывать, что существующие вакцины пока обеспечивают защиту от тяжелого течения болезни, а их эффективность в отношении симптоматического заболевания временно повышается после бустирования (ревакцинации) [45, 47]. Вероятная невозможность индукции стерилизующего иммунитета при применении существующих вакцин для внутримышечного введения, очевидно, не позволит достичь с их помощью коллективного иммунитета в популяции даже в условиях высокого охвата населения вакцинацией. С учетом этого другой стратегией может являться создание назальных вакцин, которые смогут обеспечить прерывание трансмиссии вируса в популяции за счет формирования мукозального иммунитета [48].

Несмотря на то что в последние месяцы наблюдается снижение числа новых случаев COVID-19, ряд экспертов дает пессимистичные прогнозы, связанные с развитием новой и последующих волн пандемии. Учитывая высокую контагиозность и изменчивость вируса SARS-CoV-2, такая вероятность достаточно высока, в том числе и в контексте появления новых штаммов. В этой связи стоит отметить на первый взгляд парадоксальное, но закономерное повышение вероятности появления новых штаммов по мере увеличения иммунной прослойки в обществе, в том числе и в результате массовой вакцинации, так как это приводит к ускорению эволюции вируса, пытающегося «ускользнуть» от иммунного ответа. Не стоит исключать и появления суперштамма SARS-CoV-2, в том числе в результате генетической рекомбинации при коинфекции SARS-CoV-2 из различных вирусных линий [50].

Согласно экспертным оценкам текущий эпидемический процесс может принять характер сезонной инфекции, как и в случае сезонных коронавирусов, циркулирующих круглый год, но пик инфекций которых приходится на зимние месяцы [51, 52]. Оптимистичные прогнозы также основываются на снижении уровня летальности и степени выраженности симптомов последнего варианта SARS-CoV-2 — «омикрон». Кроме

³⁶ Pfizer and BioNTech Provide Update on Omicron Variant. <https://investors.biontech.de/news-releases/news-release-details/pfizer-and-biontech-provide-update-omicron-variant/>
Pfizer and BioNTech initiate study to evaluate omicron-based COVID-19 vaccine in adults 18 to 55 years of age. <https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-and-biontech-initiate-study-evaluate-omicron-based>
Pfizer seeks authorization for updated Covid vaccine, without fresh clinical trial data. <https://www.statnews.com/2022/08/22/pfizer-seeks-authorization-for-updated-covid-vaccine-without-fresh-clinical-trial-data/>

³⁷ <https://investors.modernatx.com/news/news-details/2022/Modernas-Omicron-Containing-Bivalent-Booster-Candidate-mRNA-1273.214-Demonstrates-Significantly-Higher-Neutralizing-Antibody-Response-Against-Omicron-Subvariants-BA.45-Compared-To-Currently-Authorized-Booster/default.aspx>

³⁸ Solidarity Trial Vaccines. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/global-research-on-novel-coronavirus-2019-ncov/solidarity-trial-of-covid-19-vaccines>

того, история предыдущих вирусных пандемий, таких как «испанка» (1918–1920 гг.), «азиатский» грипп (1957–1958 гг.), «гонконгский» грипп (1968–1970 гг.) и последняя пандемия гриппа (2009–2010 гг.), свидетельствует, что они обычно оканчиваются в течение 2–3 лет. Основными факторами, которые могут повлиять на переход COVID-19 к модели сезонного заболевания, являются скорость эволюции вариантов SARS-CoV-2, популяционный иммунитет (в том числе с учетом его возможного ослабления с течением времени, а также учитывая степень охвата населения регулярными ревакцинациями) и возвращение населения к допандемическим паттернам поведения (которое уже в целом произошло в большинстве стран мира, в том числе в Российской Федерации).

Заключение

В результате проведенного анализа был выявлен ряд проблем, с которыми сталкиваются разработчики, экспертные и регуляторные органы в процессе выведения на рынок вакцин против COVID-19 в условиях пандемии, которые

требуют научно обоснованных решений. К выявленным проблемам относятся необходимость адекватной оценки безопасности и эффективности разрабатываемых вакцин в кратчайшие сроки в условиях отсутствия обоснованных иммунных коррелятов защиты; насущная потребность в разработке регуляторных указаний по актуализации штаммового состава зарегистрированных вакцин; трудности в понимании эффективных сроков и режимов ревакцинации и вакцинации переболевших.

Учитывая вышеуказанные риски и прогнозы развития текущей пандемии, дальнейшие исследования для изучения проблем, возникающих в процессе массовой вакцинации новыми вакцинами для профилактики COVID-19, являются необходимыми. Даже в случае реализации оптимистичных сценариев развития текущего инфекционного процесса накопленный опыт борьбы с COVID-19, реагирования на глобальный вызов биологической безопасности является ценным с практической точки зрения и, несомненно, будет учитываться при будущих пандемиях.

Литература/References

1. Chen N, Zhou M, Dong X, Qu J, Gong F, Han Y, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395:507–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)
2. Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1199–207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>
3. Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol*. 2020;5(4):536–44. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
4. Meyerowitz EA, Richterman A, Gandhi RT, Sax PE. Transmission of SARS-CoV-2: a review of viral, host, and environmental factors. *Ann Intern Med*. 2021;174(1):69–79. <https://doi.org/10.7326/M20-5008>
5. Meyerowitz EA, Richterman A. SARS-CoV-2 transmission and prevention in the era of the Delta variant. *Infect Dis Clin North Am*. 2022;36(2):267–93. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2022.01.007>
6. McNeill VF. Airborne transmission of SARS-CoV-2: evidence and implications for engineering controls. *Annu Rev Chem Biomol Eng*. 2022;13:123–40. <https://doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-092220-111631>
7. Lopez A, Srigley J. Transmission of SARS-CoV-2: still up in the air. *Lancet*. 2022;399(10324):519. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02794-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02794-X)
8. Greenhalgh T, Jimenez JL, Prather KA, Tufeki Z, Fisman D, Schooley R. Transmission of SARS-CoV-2: still up in the air — Authors' reply. *Lancet*. 2022;399(10324):519–20. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)02795-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)02795-1)
9. Meister TL, Dreismeier M, Blanco EV, Brüggemann Y, Heinen N, Kampf G, et al. Low risk of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 transmission by fomites: a clinical observational study in highly infectious coronavirus disease 2019 patients. *J Infect Dis*. 2022;226(9):1608–15. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiac170>
10. Butot S, Zuber S, Moser M, Baert L. Data on transfer of human coronavirus SARS-CoV-2 from foods and packaging materials to gloves indicate that fomite transmission is of minor importance. *Appl Environ Microbiol*. 2022;88(7):e0233821. <https://doi.org/10.1128/aem.02338-21>
11. Baig AM, Khaleeq Ar, Ali U, Syeda H. Evidence of the COVID-19 virus targeting the CNS: tissue distribution, host-virus interaction, and proposed neurotropic mechanisms. *ACS Chem Neurosci*. 2020;11(7):995–8. <https://doi.org/10.1021/acschemneuro.0c00122>
12. Bassetti M, Vena A, Giacobbe DR. The novel Chinese coronavirus (2019-nCoV) infections: challenges for fighting the storm. *Eur J Clin Invest*. 2020;50(3):e13209–13. <https://doi.org/10.1111/eci.13209>
13. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *Lancet*. 2020;395(10229):1033–4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30628-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30628-0)
14. Zanza C, Romenskaya T, Manetti AC, Franceschi F, La Russa R, Bertozzi G, et al. Cytokine storm in COVID-19: immunopathogenesis and therapy. *Medici-*

- na (Kaunas). 2022;58(2):144. <https://doi.org/10.3390/medicina58020144>
15. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med*. 2020;26(10):1636–43. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9>
 16. Ahire E, Kshirsagar SJ. Immune responses induced by different vaccine platforms against coronavirus disease-19. *Explor Immunol*. 2021;1:243–57. <https://doi.org/10.37349/ei.2021.00016>
 17. He Q, Mao Q, Zhang J, Bian L, Gao F, Wang J, et al. COVID-19 vaccines: current understanding on immunogenicity, safety, and further considerations. *Front Immunol*. 2021;12:669339. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.669339>
 18. Walsh EE, Frenck RW Jr, Falsey AR, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, et al. Safety and immunogenicity of two RNA-based Covid-19 Vaccine Candidates. *N Engl J Med*. 2020;383(25):2439–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2027906>
 19. Wu A, Peng Y, Huang B, Ding X, Wang X, Niu P, et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020;27(3):325–8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>
 20. Sadarangani M, Marchant A, Kollmann TR. Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(8):475–84. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00578-z>
 21. Baden LR, El Sahly HM, Essink B, Kotloff K, Frey S, Novak R, et al. Efficacy and safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 vaccine. *N Engl J Med*. 2021;384(5):403–16. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035389>
 22. Должикова ИВ, Токарская ЕА, Джаруллаева АШ, Тухватулин АИ, Шебляков ДВ, Воронина ОЛ и др. Векторные вакцины против болезни, вызванной вирусом Эбола. *Acta Naturae*. 2017;9(3):4–12. [Dolzhikova IV, Tokarskaya EA, Dzharullaeva AS, Tukhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Voronina OL, et al. Virus-vectored Ebola vaccines. *Acta Naturae*. 2017;9(3):4–11]
 23. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
 24. Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatulin AI, Dzharullaeva AS, Tukhvatulina NM, Shcheblyakov DV, et al. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: an open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Hum Vaccin Immunother*. 2017;13(3):613–20. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1238535>
 25. Voysey M, Clemens SAC, Madhi SA, Weckx LY, Folegatti PM, Aley PK, et al. Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK. *Lancet*. 2021;397(10269): 99–111. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32661-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32661-1)
 26. Tatsis N, Ertl HC. Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther*. 2004;10(4):616–29. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.07.013>
 27. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021;397(10275):671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
 28. Zhu FC, Guan XH, Li YH, Huang JY, Jiang T, Hou LH, et al. Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet*. 2020;396(10249):479–88. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31605-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31605-6)
 29. Рыжиков АБ, Рыжиков ЕА, Богрянцева МП, Усова СВ, Даниленко ЕД, Нечаева ЕА и др. Простое слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины «ЭпиВакКорона» для профилактики COVID-19 на добровольцах в возрасте 18–60 лет (фаза I–II). *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(2):283–96. [Ryzhikov AB, Ryzyantseva MP, Usova SV, Danilenko ED, Nechaeva EA, et al. A single blind, placebo-controlled randomized study of the safety, reactogenicity and immunogenicity of the “EpiVacCorona” vaccine for the prevention of COVID-19, in volunteers aged 18–60 years (phase I–II). *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(2):283–96 (In Russ.)] <https://doi.org/10.15789/2220-7619-ASB-1699>
 30. Ishmukhametov AA, Siniugina AA, Yagovkina NV, Kuzubov VI, Zakharov KA, Volok VP, et al. Safety and immunogenicity of inactivated whole virion vaccine CoviVac against COVID-19: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled phase I/II clinical trial. *medRxiv*. 2022.02.08.22270658. <https://doi.org/10.1101/2022.02.08.22270658>
 31. Shrestha LB, Foster C, Rawlinson W, Tedla N, Bull RA. Evolution of the SARS-CoV-2 omicron variants BA.1 to BA.5: implications for immune escape and transmission. *Rev Med Virol*. 2022;32(5):e2381. <https://doi.org/10.1002/rmv.2381>
 32. Frenck RW Jr, Klein NP, Kitchin N, Gurtman A, Absalon J, Lockhart S, et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of the BNT162b2 Covid-19 vaccine in adolescents. *N Engl J Med*. 2021;385(3):239–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107456>
 33. Risma KA, Edwards KM, Hummell DS, Little FF, Norton AE, Stallings A, et al. Potential mechanisms of anaphylaxis to COVID-19 mRNA vaccines. *J Allergy Clin Immunol*. 2021;147(6):2075–82. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.04.002>
 34. Montano D. Frequency and associations of adverse reactions of COVID-19 vaccines reported to pharmacovigilance systems in the European Union and

- the United States. *Front Public Health*. 2021;9:756633. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2021.756633>
35. Blumenthal KG, Phadke NA, Bates DW. Safety surveillance of COVID-19 mRNA vaccines through the Vaccine Safety Datalink. *JAMA*. 2021;12;326(14):1375–7. <https://doi.org/10.1001/jama.2021.14808>
 36. Cai C, Peng Y, Shen E, Huang Q, Chen Y, Liu P, Guo C, et al. A comprehensive analysis of the efficacy and safety of COVID-19 vaccines. *Mol Ther*. 2021;29(9):2794–805. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.08.001>
 37. Halpin SJ, McIvor C, Whyatt G, Adams A, Harvey O, McLean L, et al. Postdischarge symptoms and rehabilitation needs in survivors of COVID-19 infection: a cross-sectional evaluation. *J Med Virol*. 2021;93(2):1013–22. <https://doi.org/10.1002/jmv.26368>
 38. Corti D, Purcell LA, Snell G, Velesler D. Tackling COVID-19 with neutralizing monoclonal antibodies. *Cell*. 2021;184:3086–108. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.05.005>
 39. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, Crespo Casal M, Falci DR, Sarkis E, et al. Early treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody Sotrovimab. *N Engl J Med*. 2021;385(21):1941–50. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107934>
 40. Khoury DS, Wheatley AK, Ramuta MD, Reynaldi A, Cromer D, Subbarao K, et al. Measuring immunity to SARS-CoV-2 infection: comparing assays and animal models. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(12):727–38. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00471-1>
 41. Dai L, Gao GF. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2021;21(2):73–82. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>
 42. Баклаушев ВП, Аверьянов АВ, Сотникова АГ, Перкина АС, Иванов АВ, Юсубалиева ГМ и др. Предварительные итоги исследования безопасности и эффективности плазмы реконвалесцентов в терапии COVID-19. *Клиническая практика*. 2020;11(2):38–50. [Baklaushchev VP, Averyanov AV, Sotnikova AG, Perkina AS, Ivanov AV, Yusubalieva GM, et al. Safety and efficacy of convalescent plasma for COVID-19: the preliminary results of a clinical study. *Klinicheskaya praktika = Journal of Clinical Practice*. 2020;11(2):38–50 (In Russ.)] <https://doi.org/10.17816/clinpract35168>
 43. Folegatti PM, Ewer KJ, Aley PK, Angus B, Becker S, Belij-Rammerstorfer S, et al. Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial. *Lancet*. 2020;396(10249):467–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31604-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31604-4)
 44. Andrews N, Stowe J, Kirsebom F, Toffa S, Rieckard T, Gallagher E, et al. Covid-19 vaccine effectiveness against the Omicron (B.1.1.529) variant. *N Engl J Med*. 2022;386(16):1532–46. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2119451>
 45. Buchan SA, Chung H, Brown KA, Austin PC, Fell DB, Gubbay JB, et al. Estimated effectiveness of COVID-19 vaccines against Omicron or Delta symptomatic infection and severe outcomes. *JAMA Netw Open*. 2022;5(9):e2232760. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2022.32760>
 46. Bar-On YM, Goldberg Y, Mandel M, Bodenheimer O, Freedman L, Kalkstein N, et al. Protection of BNT162b2 vaccine booster against Covid-19 in Israel. *N Engl J Med*. 2021;385(15):1393–400. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2114255>
 47. Stowe J, Andrews N, Kirsebom F, Ramsay M, Bernal JL. Effectiveness of COVID-19 vaccines against Omicron and Delta hospitalisation, a test negative case-control study. *Nat Commun*. 2022;13(1):5736. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33378-7>
 48. Topol EJ, Iwasaki A. Operation Nasal Vaccine-Lighting speed to counter COVID-19. *Sci Immunol*. 2022;7(74):eadd9947. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.add9947>
 49. Higdon MM, Baidya A, Walter KK, Patel MK, Issa H, Espi   E, et al. Duration of effectiveness of vaccination against COVID-19 caused by the omicron variant. *Lancet Infect Dis*. 2022;22(8):1114–6. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(22\)00409-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(22)00409-1)
 50. Focosi D, Maggi F. Recombination in coronaviruses, with a focus on SARS-CoV-2. *Viruses*. 2022;14(6):1239. <https://doi.org/10.3390/v14061239>
 51. Nichols GL, Gillingham EL, Macintyre HL, Vardoulakis S, Hajat S, Sarran CE, et al. Coronavirus seasonality, respiratory infections and weather. *BMC Infect Dis*. 2021;21(1):1101. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06785-2>
 52. Wiemken TL, Khan F, Nguyen JL, Jodar L, McLaughlin JM. Is COVID-19 seasonal? A time series modeling approach. *medRxiv*. 2022.06.17.22276570. <https://doi.org/10.1101/2022.06.17.22276570>

Вклад авторов. А.А. Солдатов — концепция работы, обработка и анализ данных литературы, написание текста рукописи; Д.В. Горенков — обработка и анализ данных литературы, редактирование текста рукописи; В.А. Меркулов — критическое обсуждение текста рукописи, окончательное утверждение версии рукописи для публикации; В.П. Бондарев — критическое обсуждение текста рукописи.

Благодарности. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России № 056-00001-22-00 на проведение прикладных научных исследований (номер государственного учета НИР 121022000147-4).

Authors' contributions. A.A. Soldatov—elaboration of the study concept, review and analysis of literature data, drafting of the text of the manuscript; D.V. Gorenkov—review and analysis of literature data, editing of the text of the manuscript; V.A. Merkulov—critical revision of the text of the manuscript and approval of the final version for publication; V.P. Bondarev—critical revision of the text of the manuscript.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded research project No. 056-00001-22-00 and was supported by the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products (R&D public accounting No. 121022000147-4).

Конфликт интересов. В.А. Меркулов является главным редактором, В.П. Бондарев — заместителем главного редактора журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Conflict of interest. V.A. Merkulov is the Editor-in-Chief, and V.P. Bondarev is the Deputy Editor-in-Chief of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Солдатов Александр Алексеевич, д-р мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

Soldatov@expmed.ru

Горенков Дмитрий Витальевич. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

gorenkov@expmed.ru

Меркулов Вадим Анатольевич, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Merkulov@expmed.ru

Бондарев Владимир Петрович, д-р мед. наук, проф.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Bondarev@expmed.ru

Aleksandr A. Soldatov, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6624-2692>

Soldatov@expmed.ru

Dmitry V. Gorenkov. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0940-8080>

gorenkov@expmed.ru

Vadim A. Merkulov, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4891-973X>

Merkulov@expmed.ru

Vladimir P. Bondarev, Dr. Sci. (Med.), Professor.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6472-6386>

Bondarev@expmed.ru

Поступила 04.10.2022

После доработки 29.11.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Received 4 October 2022

Revised 29 November 2022

Accepted 7 December 2022



Опыт масштабирования и интенсификации промышленного производства векторной аденовирусной вакцины Гам-КОВИД-Вак в лимитирующих условиях пандемии

А.Н. Морозов, И.Р. Яхин, Н.В. Стратонова, М.В. Куцкир, Д.А. Потеряев✉, Р.А. Хамитов

Акционерное общество «Генериум», ул. Тестовская, д. 10, Москва, 123112, Российская Федерация

✉ Потеряев Дмитрий Александрович; poteryaev@ibcgenerium.ru

Резюме

Пандемия COVID-19 явилась глобальным вызовом для системы здравоохранения. За более чем 200 лет, прошедших с момента первого массового применения вакцин, эпидемиологи всего мира убедились, что именно эффективные вакцины являются ключевым инструментом в борьбе с опасными инфекционными заболеваниями, особенно эпидемического и пандемического характера. В условиях быстро распространяющейся пандемии нового инфекционного агента не только разработка принципиально новых вакцинных препаратов, но и возможность быстро организовать крупномасштабное производство приобретают решающее значение. В Российской Федерации коллективом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России в 2020 г. была разработана инновационная векторная вакцина Гам-КОВИД-Вак для профилактики коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2. Перед рядом отечественных биофармацевтических предприятий была поставлена задача ее производства. Цель работы — оптимизация технологии производства вакцины Гам-КОВИД-Вак для масштабирования и наращивания объема выпуска. В ходе работы были решены следующие задачи: установлены критические атрибуты качества продукта и оптимизированы аналитические методы для их контроля; выявлены технологические стадии, плохо поддающиеся масштабированию; оптимизирован технологический процесс перед переносом в производство; модифицированы немасштабируемые/нетехнологичные стадии. В результате работы был налажен массовый выпуск субстанции обоих компонентов Гам-КОВИД-Вак, позволивший не только обеспечить высокую потребность в вакцине для иммунопрофилактики COVID-19 в Российской Федерации, но и осуществлять поставки данной вакцины в ряд зарубежных стран.

Ключевые слова: COVID-19; SARS-CoV-2; аденовирус; вакцина; производство; разработка вакцинных препаратов

Для цитирования: Морозов А.Н., Яхин И.Р., Стратонова Н.В., Куцкир М.В., Потеряев Д.А., Хамитов Р.А. Опыт масштабирования и интенсификации промышленного производства векторной аденовирусной вакцины Гам-КОВИД-Вак в лимитирующих условиях пандемии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):382–391. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-382-391>

An experience of scaling and intensifying the industrial production of the Gam-COVID-Vac vector adenovirus vaccine in the limiting conditions of the pandemic

A.N. Morozov, I.R. Yakhin, N.V. Stratonova, M.V. Kutsir, D.A. Poteryaev✉, R.A. Khamitov

Generium JSC, 10 Testovskaya St, Moscow 123112, Russian Federation

✉ Dmitry A. Poteryaev; poteryaev@ibcgenerium.ru

Abstract

The COVID-19 pandemic has presented a global challenge to the health system. More than 200 years of world epidemiological experience since the first mass use of vaccines have convincingly shown that effective vaccines are the key tools in the fight against dangerous infectious diseases, especially epidemic and pandemic ones. In the context of a rapidly spreading pandemic of a new infectious agent, it is crucial not only to develop fundamentally new vaccines, but also to be able to quickly organise their large-scale production. In the Russian Federation, in 2020, a team of the National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya developed an innovative vector vaccine, Gam-COVID-Vac, for the prevention of coronavirus disease caused by the SARS-CoV-2 virus. A number of pharmaceutical companies faced the challenge of producing the vaccine. The aim of the study was to optimise the production technology of Gam-COVID-Vac for scaling and increasing the production capacity. In the course of the work, the authors established critical quality attributes of the product, optimised analytical methods for their control, identified poorly scalable technological stages, streamlined the technological process before its transfer to production, and modified non-scalable and technologically unfeasible stages. The work resulted in the launch of industrial-scale production of active pharmaceutical ingredients for both components of Gam-COVID-Vac, which made it possible not only to meet the critical need for COVID-19 immunoprophylaxis in the Russian Federation, but also to supply this vaccine to a number of foreign countries.

Key words: COVID-19; SARS-CoV-2; adenovirus; vaccine; industrial production; vaccine development

For citation: Morozov A.N., Yakhin I.R., Stratonova N.V., Kutsir M.V., Poteryaev D.A., Khamitov R.A. An experience of scaling and intensifying the industrial production of the Gam-COVID-Vac vector adenovirus vaccine in the limiting conditions of the pandemic. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):382–391. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-382-391>

Введение

Пандемия COVID-19 явилась глобальным вызовом для системы здравоохранения всего мира. В Российской Федерации коллективом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России была разработана инновационная векторная вакцина Гам-КОВИД-Вак для иммунопрофилактики COVID-19. Данная вакцина продемонстрировала свою эффективность и безопасность в ходе клинических исследований [1, 2]. В 2020 г. между АО «Генериум» и ФГБУ «НИЦЭМ им.

Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России был заключен договор на контрактное производство как готовой лекарственной формы (ГЛФ), так и субстанции – раствора Гам-КОВИД-Вак для дальнейшего изготовления ГЛФ на других контрактных площадках Российской Федерации и за рубежом¹. Необходимость масштабирования производства вакцины для обеспечения высокой потребности в ней как в Российской Федерации, так и за рубежом² стала серьезной задачей для коллектива АО «Генериум», от решения ко-

¹ https://www.generium.ru/about/press_center/company_news/generium-zapustil-proizvodstvo-vaktsiny-sputnik-v/

² <https://pharmmedprom.ru/news/v-2021-godu-rossiya-otpravila-za-rubezh-v-20-raz-bolshe-vaktsin-chem-v-2020-i-eto-ne-predel/>

торой зависела возможность проведения массовой вакцинации против COVID-19. Решение данной задачи осложнялось следующими лимитирующими факторами, характерными для пандемии COVID-19:

- отсутствие опыта масштабирования и крупнотоннажного производства векторных вакцин в Российской Федерации;
- отсутствие или недостаток необходимого производственного и аналитического оборудования и материалов, сроки поставки которых значительно увеличились ввиду нарушенных пандемией логистических связей;
- чрезвычайно сжатые сроки для налаживания промышленного выпуска вакцины;
- отсутствие резервных мощностей у компаний-производителей.

За 13 лет своего существования АО «Генериум» накопило большой опыт не только разработки различного рода терапевтических биомолекул, но и масштабирования процесса их производства. АО «Генериум» производит целый ряд сложных рекомбинантных белков по так называемому «полному циклу», от культивирования клеток-продуцентов до готовой лекарственной формы. Примерами являются рекомбинантные ферменты для ферментозаместительной терапии наследственных заболеваний или моноклональные антитела для аутоиммунных заболеваний³. Накопленный опыт работы с культурами эукариотических клеток и масштабирования процессов культивирования и очистки активных фармацевтических ингредиентов был непосредственно применен и к производству векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак.

Цель работы – оптимизация технологии производства вакцины Гам-КОВИД-Вак для масштабирования и наращивания объема выпуска. Для достижения цели были поставлены следующие задачи: определение критических атрибутов качества продукта и оптимизация аналитических методов для их контроля; выявление технологических стадий, плохо поддающихся масштабированию; оптимизация технологического процесса перед переносом в производство путем модификации немасштабируемых или нетехнологичных стадий.

Основная часть

Первым шагом в разработке процесса производства лекарственного средства является выявление критических показателей качества

(critical quality attribute, CQA) согласно Рекомендации Коллегии Евразийской экономической комиссии⁴. Для контроля CQA требуется разработка специфических аналитических методов, которые в дальнейшем будут использоваться на производственной площадке и в подразделениях контроля качества для контроля процесса производства и продукта. Путем определения критических параметров процесса (critical process parameter, CPP), влияющих на CQA, формируется контрольная стратегия производства лекарственного средства [3, 4].

Перенос технологического процесса от лабораторного к промышленному производству

При переносе технологии от лабораторного масштаба к промышленному предстояло решить три принципиальные задачи:

- установить CQA продукта, оптимизировать аналитические методы для контроля CQA;
- оптимизировать технологический процесс перед переносом в производство, модифицировать немасштабируемые/нетехнологичные стадии;
- установить потенциальные CPP процесса и разработать стратегию контроля процесса производства на основе риск-ориентированного подхода.

Гам-КОВИД-Вак – двухкомпонентная вакцина, в которой использованы рекомбинантные аденовирусы 26 (компонент I, Ad26) и 5 (компонент II, Ad5) серотипов [5]. В аденовирусный геном произведена вставка гена, кодирующего целевой антиген – немодифицированный полноразмерный S-белок коронавируса SARS-CoV-2. Для производства аденовирусной вакцины Гам-КОВИД-Вак используется клеточная линия HEK-293, адаптированная к росту в суспензии. Используемые аденовирусы являются репликативно-некомпетентными, поскольку из их генома удалены гены, обеспечивающие размножение вируса и развитие продуктивной вирусной инфекции в нормальных клетках человека. Клетки HEK-293, напротив, по принципу комплементарной экспрессии способны обеспечивать размножение аденовирусов, поскольку стабильно трансформированы недостающим участком генома аденовируса. Полученные аденовирусы могут размножаться только в особой клеточной культуре, в условиях, созданных для этого в биореакторе. После накопления биомассы и многостадийной очистки вирусных

³ <https://www.generium.ru/products/>

⁴ Рекомендация Коллегии Евразийской экономической комиссии от 22.12.2020 № 26 «О Руководстве по разработке и производству активных фармацевтических субстанций».

частиц получают препарат, являющийся эффективной системой для векторной доставки, обеспечивающей последующую экспрессию антигена в антигенпрезентирующих клетках человека и последующую индукцию как клеточного, так и гуморального иммунитета. Вместе с тем такие вирусные векторные вакцины обладают высоким профилем безопасности.

Основными CQA векторной вакцины Гам-КОВИД-Вак являются две категории показателей: параметры эффективности и параметры безопасности. К параметрам эффективности относятся следующие показатели: иммуногенность (проверяется для каждой партии выпущенной вакцины на иммунизированных животных путем определения титра антител, выработанных к S-белку SARS-CoV-2); тканевая цитопатогенная доза (ТЦД₅₀ или инфекционный титр устанавливается на клетках HEK-293); размер микроагрегатов аденовирусных частиц (если таковые образуются); соотношение пустых и полных вирусных капсидов. К параметрам безопасности относятся следующие показатели: присутствие репликативно-компетентных аденовирусов (replication-competent adenovirus, RCA) [6], выявляемых на клетках линии карциномы легкого A549; наличие примесей, связанных с процессом производства, таких как ДНК, остаточные белки клетки-хозяина, эндонуклеаза. Важнейшим параметром безопасности является контроль контаминации посторонними агентами: микопlasма, аэробные и анаэробные бактерии, грибы, возможная перекрестная контаминация культуры продуцента аденовирусами серотипов Ad5 и Ad26 [7].

На рисунке 1 приведен пример определения соотношения пустых и полных вирусных капсидов с помощью аналитического ультрацентрифугирования. Данный метод был предложен разработчиками вакцины и внедрен в систему контроля качества при производстве на площадке АО «Генериум». Кроме того, что соотношение пустых и полных капсидов является качественным параметром, этот метод также использовался для оценки продуктивности культуры в биореакторе.

Масштабирование отдельных этапов технологического процесса

В процессе трансфера технологии от разработчика вакцины при проведении пилотных экспериментов по масштабированию технологии производства на площадке АО «Генериум» в исходной лабораторной технологии были выявлены несколько стадий, которые оказались немасштабируемыми или нетехнологичными

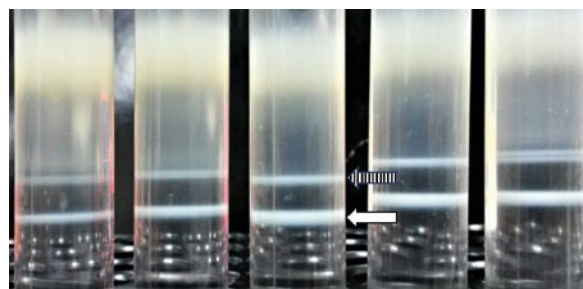


Рис. 1. Результаты аналитического центрифугирования аденовирусных частиц в градиенте хлорида цезия. Верхняя зона (обозначена полосатой стрелкой) – фракция пустых капсидов (не содержащие ДНК аденовирусы), нижняя зона (обозначена белой стрелкой) – фракция полных вирусных частиц. Условия центрифугирования – центрифуга Optima AUC XP (Beckman Coulter) с ротором An-60 Ti (в течение 2,5 ч при 2900 g).

Fig. 1. Results of analytical centrifugation of adenovirus particles in a cesium chloride gradient. The upper disk (striped arrow) consists of empty capsids, i.e. adenoviruses not containing DNA; the lower disk (white arrow) consists of full capsids. Centrifugation was performed for 2.5 hours at 2900 g using an Optima AUC XP centrifuge with an An-60 Ti rotor (Beckman Coulter).

для промышленного производства (табл. 1). Данные стадии необходимо было модифицировать или заменить.

На рисунках 2А и 2В представлена блок-схема процесса культивирования рекомбинантных аденовирусных частиц после оптимизации производственного процесса.

Выбор типа биореактора. Согласно технологии, разработанной ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, процесс накопления вирусных частиц в клетках HEK-293 происходил в волновом биореакторе (Biostat RM 20/50, Sartorius) объемом от 5 до 20 л. Основная проблема данного подхода состояла в том, что вследствие конструктивных особенностей оборудования волновой реактор может быть масштабирован только до рабочего объема 100 л, что, очевидно, недостаточно для крупномасштабного производства. Кроме того, в волновом реакторе с рабочим объемом 100 л гидродинамические характеристики (а стало быть, и продуктивность) значительно хуже, чем в его лабораторной версии, что делает экстенсивный подход к масштабированию в случае волнового реактора фактически невозможным. Таким образом, масштабирование производства путем увеличения количества единиц волновых реакторов не смогло бы обеспечить требуемый уровень выпуска вакцины (до десятков миллионов доз в месяц). По этой причине в АО «Генериум» весь этап адаптации и оптимизации технологии и последующее производство вакцины были выполнены в классических биореакторах с осе-

Таблица 1. Этапы лабораторного технологического процесса производства вакцины Гам-КОВИД-Вак и сложности масштабирования процесса**Table 1.** Scalability of Gam-COVID-Vac production stages from laboratory to industrial process

Этап лабораторного процесса <i>Laboratory process stage</i>	Лимитирующая стадия / Сложность масштабирования <i>Limiting stage / Scalability issues</i>
Культивирование культуры НЕК-293 в колбах и волновом биореакторе объемом 5 л <i>HEK-293 cultivation in flasks and a 5-litre wave bioreactor</i>	Стадия культивирования в волновом реакторе / Волновой реактор может быть масштабирован только до объема 100 л, что недостаточно для промышленного производства <i>Wave-reactor cultivation / Scalability of a wave reactor is limited to 100 L, which is not enough for industrial production</i>
Осаждение и концентрирование клеток НЕК-293, содержащих вирус, путем центрифугирования <i>Precipitation and concentration of virus-containing HEK-293 cells by centrifugation</i>	Стадия высокоскоростного центрифугирования / Стадию невозможно провести в закрытой системе; принципиальная необходимость данной стадии в производственном масштабе отсутствует <i>High-speed centrifugation / This stage cannot be carried out in a closed system; there is no fundamental need for this stage at the industrial scale</i>
Лизис клеток путем замораживания–оттаивания, обработки химическими детергентами, бензоной <i>Cell lysis by freeze–thaw cycles, treatment with chemical detergents and benzonase</i>	Стадия лизиса клеток путем замораживания–оттаивания / Невозможно проведение в больших объемах Включение в технологический процесс коммерческого фермента бензоной / Проблемы с поставкой и высокая стоимость фермента <i>Freeze–thaw cell lysis / It is not possible in large volumes The use of a commercial benzonase enzyme in the technological process / Problems with the supply and high cost of the enzyme</i>
Очистка вируса методами гель-фильтрации, анионообменной и мультимодальной хроматографии; диафильтрация и концентрирование, фильтрация концентрата через фильтр с размером пор 0,2 мкм <i>Purification of the virus by size-exclusion, anion-exchange, and multimodal chromatography; diafiltration and concentration, filtration of the concentrate through a 0.2-µm filter</i>	Стадия очистки вируса методом гель-фильтрации / Невозможно использовать в крупномасштабном процессе очистки вирусных частиц Диафильтрация / Стадия диафильтрации приводит к существенным потерям вирусных частиц <i>Size-exclusion chromatography / The method cannot be used in a large-scale vaccine purification process Diafiltration / Diafiltration results in a substantial loss of virus particles</i>

вым механическим перемешиванием (рис. 2А, стадия ТП.3.5). Культивирование в биореакторе с осевым механическим перемешиванием, по сравнению с волновым биореактором позволяет масштабировать процесс до целевого объема 2000 л, являющегося максимальным на данный момент для одноразовых биореакторов, а также достичь лучшего массообмена и повысить контролируемость параметров процесса культивирования. Оработку культивирования проводили в демасштабированной модели с рабочим объемом 1–2 л, учитывающей основные гидродинамические характеристики промышленных биореакторов (Biostat B-twin, Sartorius). Для культивирования в объемах 100–200 л использовались биореакторы SUB-100 (HyClone) и BIOSTAT Cultibag STR 200L (Sartorius).

Подбор оптимальной множественности заражения культур клеток. Важным фактором при культивировании вируса в культуре клеток НЕК-293 является подбор оптимального количества вносимого вирусного инокулята, т.е. множественности заражения (multiplicity of infection, MOI) [7]. Избыток заражающей дозы может при-

вести к цитотоксичности, ранней гибели клеток и преждевременному завершению процесса, а недостаток — к неполному заражению клеток, перерастанию биомассы и, как следствие, недостатку питательных веществ на этапе накопления вируса, что ведет к существенной потере продуктивности. Нами было отмечено, что оценку эффективности заражения и накопления вирусных частиц можно проводить по графику расхода кислорода в ходе процесса культивирования. Полное заражение клеточной биомассы выражается в резком изменении динамики потребления кислорода через 12–16 ч после заражения, без стадии замедления и плато (рис. 3). В случае оптимально подобранной дозы заражения процесс развивается по сценарию, отображенному на рисунке зеленым цветом, и характеризуется максимальным выходом вирусных частиц.

Оптимизация стадии лизиса клеток. В соответствии с лабораторной технологией после стадии культивирования требовалось отделение клеток, содержащих вирусные частицы, от культуральной жидкости центрифугированием при 5000 g.

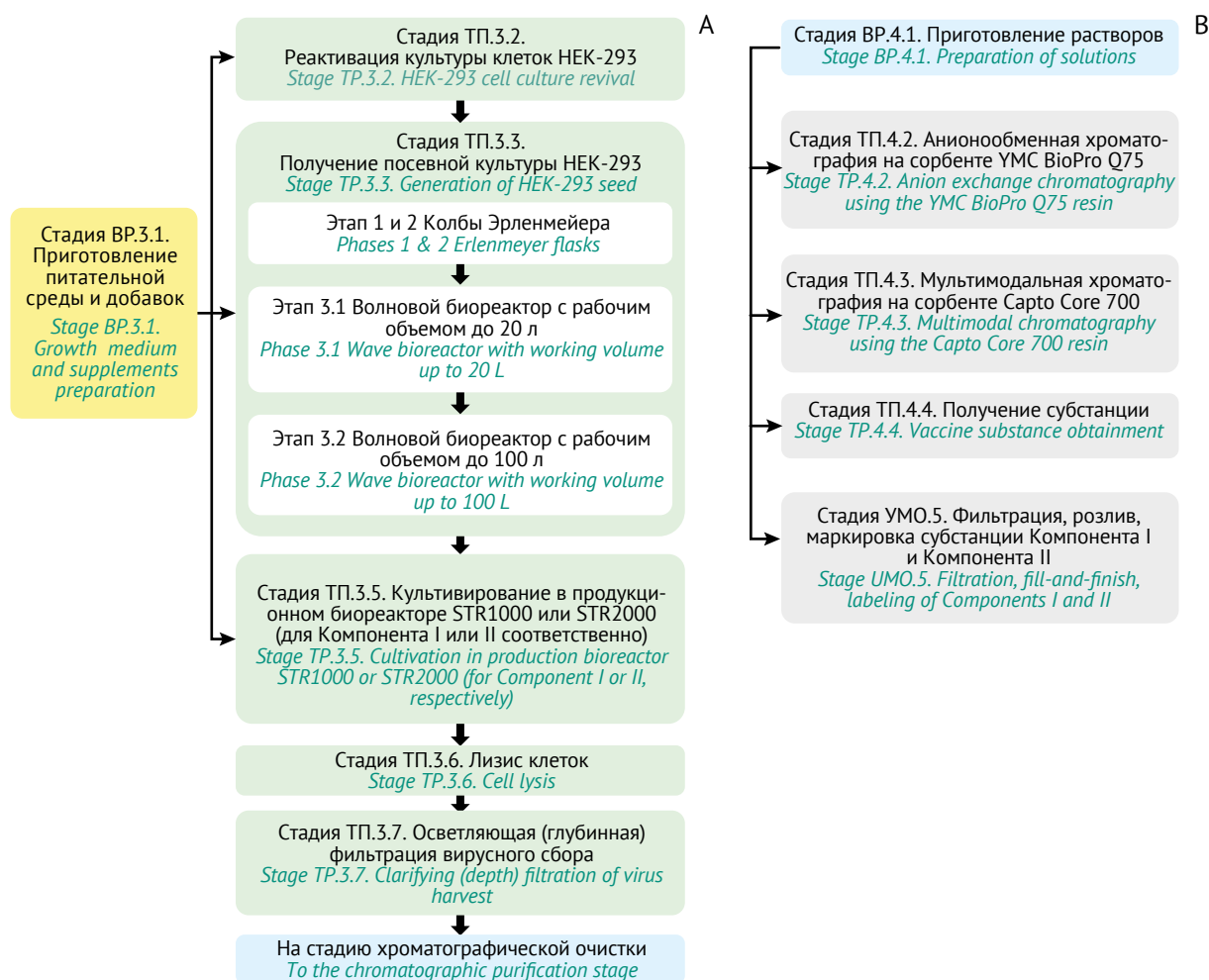


Рис. 2. Краткая блок-схема процесса культивирования рекомбинантных аденовирусных частиц и последующих промежуточных стадий (А) и процесса хроматографической очистки вирусных частиц (В).

Fig. 2. Abbreviated flowcharts of the cultivation of recombinant adenovirus particles with subsequent intermediate stages (A) and the purification of virus particles by chromatography (B).

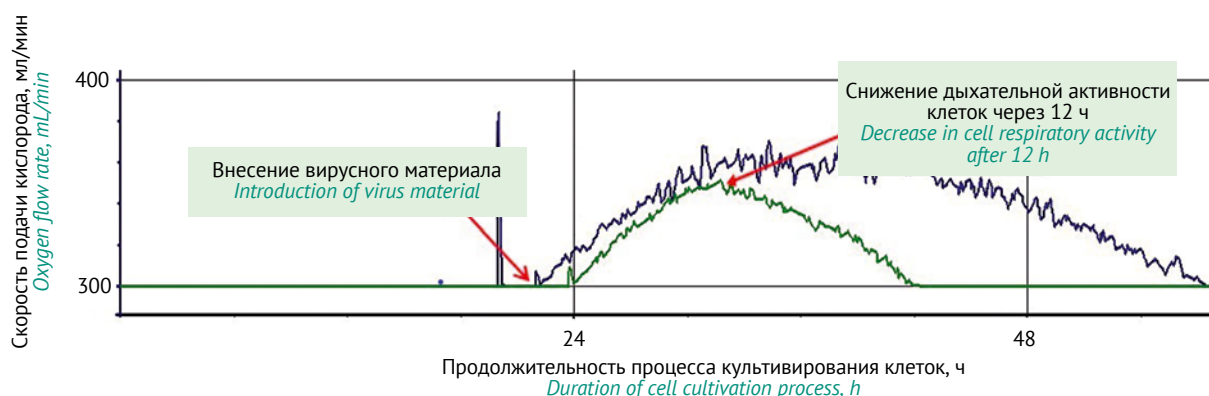


Рис. 3. Скорость подачи кислорода в ходе процесса культивирования на этапе внесения вирусного инокулята. Кривая зеленого цвета — полное заражение клеток вирусным инокулятом, оптимальная продуктивность наработки вируса; кривая синего цвета — неполное заражение клеток вирусным инокулятом, низкая продуктивность наработки вируса.

Fig. 3. Oxygen supply rate during the culture process at the viral inoculum introduction stage. The green curve indicates complete infection of cells by the viral inoculum (optimal productivity and virus harvest); the blue one shows incomplete infection of cells by the viral inoculum (low productivity and virus harvest).

Далее следовало разрушение клеток методом замораживания–оттаивания с последующим разбавлением 0,5 М раствором хлорида натрия и повторным осаждением центрифугированием. Существенным недостатком являлась невозможность проведения стадий в закрытой системе, а также отсутствие принципиальной необходимости и целесообразности в проведении данных стадий в связи с непропорциональным увеличением трудо- и времязатрат при объемах культивирования 100 л и невозможностью проведения данных манипуляций в адекватные сроки при объемах 1000 и более литров [8].

В связи с этим для оптимизации технологии вместо центрифугирования и замораживания–оттаивания клеток проводился химический лизис непосредственно в производственном биореакторе, представляющем собой закрытую систему, после окончания процесса культивирования, путем внесения неионогенного детергента Tween 20 (A4974, Applichem) до концентрации 0,5% в промежуточный продукт (рис. 2А, стадия ТП.3.6). Поскольку аденовирусные частицы не содержат липидов в своей оболочке, использование неионогенных поверхностно-активных веществ, к которым относится Tween 20, не повреждает вирусные капсиды, в то же время эффективно высвобождает их из клеток.

Для снижения содержания высокомолекулярных ДНК и РНК клеток HEK-293, а также уменьшения вязкости лизата требуется внесение фермента бензоназы [9] – эндонуклеазы бактериального происхождения, эффективно разрушающей нуклеиновые кислоты. Использование коммерческого фермента сопряжено с логистическими рисками сбоя поставок, а также высокими финансовыми затратами. По этой причине замена на фермент собственного производства с аналогичной активностью позволяет снизить риски и себестоимость процесса производства. Для этого в АО «Генериум» была проведена разработка технологии собственного производства рекомбинантной эндонуклеазы из бактерии *Serratia marcescens*. Ген эндонуклеазы был клонирован для экспрессии в *E. coli*. Производство эндонуклеазы в биореакторе позволило закрыть потребность в этом ферменте и избавиться от импортозависимости по такому критическому параметру. При проведении лизиса клеток вносили 100 Ед/мл фермента совместно с 2 мМ $MgCl_2$.

Стадия глубокой фильтрации. Поскольку стадия центрифугирования клеточного лизата не является масштабируемой [9], осветление полученного лизата в производственных условиях проводили методом глубокой фильтрации (рис. 2А, стадия ТП.3.7). Данный способ

широко распространен в биофармацевтической промышленности, достаточно легко масштабируется и может быть реализован в закрытых системах. Наиболее доступным материалом для глубокого фильтра является модифицированная целлюлоза с дзета-потенциалом, имеющим слабую анионообменную функцию. Фильтры из этого материала способны задерживать частицы, не только отсекая их по размеру, но и за счет электрокинетической адсорбции. При этом данный материал не оказывает негативного влияния на целевой продукт.

На рисунке 4 показан внешний вид модульной установки таких фильтров. Лизат последовательно проходит через кассеты с глубинными фильтрами с постепенно уменьшающимся размером пор, от 9 до 0,2 мкм, обеспечивая эффективное осветление жидкости.

Оптимизация стадии хроматографической очистки вирусных частиц. Одной из стадий хроматографической очистки вирусосодержащей субстанции в лабораторной технологии была препаративная гель-фильтрационная хроматография. Учитывая, что для данного типа хроматографии необходим объем сорбента,



Рис. 4. Модульная установка двухступенчатой осветляющей фильтрации лизата клеток HEK-293, содержащего аденовирусные частицы (фото АО «Генериум»).

Fig. 4. A modular unit for two-stage clarification filtration of HEK-293 cell lysate containing adenoviral particles (photo Generium JSC).

сопоставимый с объемом стартового материала, данная стадия была признана нетехнологичной. Особенности стартового материала для гель-фильтрационной хроматографии приводили к быстрому выходу из строя сорбента и невозможности его регенерации. В результате оптимизации стадии хроматографической очистки при масштабировании технологии производства были введены анионообменная и мультимодальная хроматографии (рис. 2В, ТП.4.2 и ТП.4.3). Стадии гель-фильтрации и диафильтрации были исключены из процесса производства. Диафильтрация несмотря на то что, в принципе, является масштабируемой стадией, была исключена по причине существенных и неконтролируемых потерь вирусных частиц (доходящих до 50%). Исключение диафильтрации не имело негативного эффекта, поскольку две хроматографические стадии (захватывающая анионообменная хроматография и мультимодальная хроматография с эффектом гель-фильтрации) обеспечивают чистоту целевого продукта. Помимо повышения технологичности процесса, условия хроматографической очистки были оптимизированы для предотвращения агрегации вирусных частиц. Образование агрегатов вирусных частиц размером выше определенного размера приводит к потерям продукта при стерилизующей фильтрации; дальнейшее увеличение размеров агрегатов снижает стабильность продукта при хранении и потенциально может негативно сказаться на иммуногенности препарата. Для рутинного контроля в промышленном производстве были установлены следующие нормы для средних размеров вирусных частиц и их агрегатов: Ad26 – не более 140 нм, Ad5 – не более 200 нм. Вирусные частицы Ad5 имеют большую склонность к агрегации, поэтому для него порог был установлен ниже, чем для Ad26. Выпускающий контроль предприятия подтверждает, что оптимизированный промышленный процесс хроматографической очистки позволяет получать субстанцию, соответствующую установленным нормам по содержанию примесей, связанных с процессом производства, такими как остаточная ДНК, остаточные белки клетки-хозяина и эндонуклеаза.

Предотвращение перекрестной контаминации

Производство вакцины в промышленных объемах предъявляло жесткие требования к предотвращению контаминации посторонними микроорганизмами и кросс-контаминации разными серотипами аденовируса.

Проблемы предотвращения контаминации при масштабировании и производстве вакци-

ны были решены в результате комплексных мероприятий. Была организована новая производственная площадка с разделением потоков материалов и персонала и строгим зонированием стадий технологических процессов и независимых компонентов вакцины. Для предотвращения случайной контаминации культуры HEK-293 проводился рутинный контроль клеточной культуры и продукта методом ПЦР.

Организация новой производственной площадки базировалась на нескольких основополагающих принципах:

- разделение зон производства на чистую (культура HEK-293) и осуществляющую работу с вирусом (накопление и очистка вирусных частиц);
- разделение производства компонентов вакцины (Ad5 и Ad26) на этапе культивирования и хроматографии;
- культивирование HEK-293 в одноразовых биореакторах объемом 1000 и 2000 л;
- хранение осветленного лизата в одноразовых миксерах объемом 1500–2500 л;
- хроматографическая очистка с использованием хроматографов производительностью до 2000 л/ч.

Предотвращение контаминации кроме уже упомянутого рутинного контроля клеточных культур и продукта с помощью ПЦР достигалось следующими мерами:

- разделением площадки производства вакцины на три зоны: чистую, производство компонента Ad5 и производство компонента Ad26. Персонал, работающий на производстве Ad5, не допускался в помещения производства Ad26 и наоборот;
- максимальным использованием одноразовых материалов, закрытых систем, одноразовой одежды;
- все материалы, которые выходят из «заразной» зоны, должны пройти обеззараживание путем автоклавирования;
- использованием перекиси водорода в виде мелкодисперсного аэрозоля для дезинфекции при подготовке помещений и, при необходимости, после окончания цикла работ. Для ежедневной обработки использовался раствор 3% H_2O_2 , для генеральной уборки – 6% H_2O_2 ;
- использованием вентиляции помещений, обеспечивающим полную смену воздуха, без частичной рециркуляции.

Промышленное производство и инспекция ВОЗ

Краткие схемы технологических процессов биосинтеза и очистки рекомбинантных аденовирусных частиц приведены на рисунке 2. Дан-

ные схемы характеризуют стандартный процесс производства вакцины Гам-КОВИД-Вак на производственной площадке АО «Генериум».

В июне 2021 г. в рамках предварительной квалификации вакцины ВОЗ на производственной площадке АО «Генериум» прошел аудит ВОЗ. Принципиальная схема новой производственной площадки (поток, зонирование, организация производства) и предложенная контрольная стратегия процесса были одобрены инспекцией. В 2021 г. в АО «Генериум» было запущено две площадки для производства субстанции Гам-КОВИД-Вак с общим объемом биореакторов 8 т.

Заключение

Проведено успешное промышленное масштабирование производства вакцины Гам-КОВИД-Вак на площадке АО «Генериум». Достигнуто увеличение объема культивирования клеток —

производителей вирусных частиц с 1 до 2000 л, с приемлемым выходом и соблюдением атрибутов качества продукта. В ходе работы установлены критические атрибуты качества продукта и оптимизированы аналитические методы для их контроля; выявлены технологические стадии, плохо поддающиеся масштабированию; оптимизирован технологический процесс перед переносом в производство; модифицированы немасштабируемые/нетехнологичные стадии. В результате налажен массовый выпуск субстанций обоих компонентов Гам-КОВИД-Вак, позволивший не только обеспечить высокую потребность в вакцине для иммунопрофилактики COVID-19 в Российской Федерации, но и осуществлять поставки данной вакцины в ряд зарубежных стран. В октябре 2021 г. был обеспечен выпуск субстанции-раствора Гам-КОВИД-Вак для производства 100 миллионов доз вакцины.

Литература/References

1. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatulin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
2. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021;397(10275):671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
3. Mohammed AQ, Sunkari PK, Srinivas P, Roy AK. Quality by design in action 1: controlling critical quality attributes of an active pharmaceutical ingredient. *Org Process Res Dev*. 2015;19(11):1634–44. <https://doi.org/10.1021/OP500295A>
4. Стратонова НВ, Лисов АС, Морозов АН, Тюпа ДВ, Хамитов РА. Методические подходы к валидации технологических процессов получения терапевтических рекомбинантных белков на основе концепции «Quality by Design». *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2018;18(3):175–83. [Stratonova NV, Lisov AS, Morozov AN, Tyupa DV, Khamitov RA. Methodological approaches to validation of therapeutic recombinant proteins production based on the Quality by Design Concept. *BIOPreparaty*.
5. *Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2018;18(3):175–83. (In Russ.) <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2018-18-3-175-183>
6. Zubkova OV, Ozharovskaia TA, Dolzhnikova IV, Popova O, Shcherbakov DV, Grousova DM, et al. Immunobiological agent for inducing specific immunity against severe acute respiratory syndrome virus SARS-CoV-2. WO2021002776A1; 2021.
7. Wissing S, Faust N, Scheer N. Overview: manufacturing adenoviral vectors at large scale: how to select the best process and cell line to avoid RCA formation. *Gen Eng Biotech News*. 2021;41(10):35. <https://doi.org/10.1089/gen.41.10.12>
8. Joe CCD, Jiang J, Linke T, Li Y, Fedosyuk S, Gupta G, et al. Manufacturing a chimpanzee adenovirus-vectored SARS-CoV-2 vaccine to meet global needs. *Biotechnol Bioeng*. 2022;119(1):48–58. <https://doi.org/10.1002/bit.27945>
9. Srivastava A, Mallela KMG, Deorkar N, Brophy G. Manufacturing challenges and rational formulation development for AAV viral vectors. *J Pharm Sci*. 2021;110(7):2609–24. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2021.03.024>
10. Kawka K, Wilton AN, Madadkar P, Medina MFC, Lichty BD, Ghosh R, Latulippe DR. Integrated development of enzymatic DNA digestion and membrane chromatography processes for the purification of therapeutic adenoviruses. *Sep Purif Technol*. 2021;254(1):117503. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2020.117503>

Вклад авторов. А.Н. Морозов — разработка процессов производства, написание текста рукописи; И.Р. Яхин — разработка апстрим-процессов производства, написание текста рукописи; Н.В. Стратонова — масштабирование процессов производства; М.В. Куцкир — разработка даунстрим-процессов производства;

Authors' contributions. A.N. Morozov—development of the manufacturing processes, writing of the manuscript; I.R. Yakhin—development of the upstream manufacturing processes, writing of the manuscript; N.V. Stratonova—scaling up of the manufacturing processes; M.V. Kutsir—development of the downstream

Д.А. Потеряев — критическое обсуждение, написание, доработка текста рукописи; **Р.А. Хамитов** — разработка концепции масштабирования производства, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Благодарности. Авторы благодарны сотрудникам компании АО «Генериум», непосредственно участвовавшим в масштабировании и производстве вакцины Гам-КОВИД-Вак, а также сотрудникам административно-хозяйственных подразделений компании, обеспечивших бесперебойную поставку сырья и оборудования в сложных логистических условиях пандемии.

Конфликт интересов. Р.А. Хамитов является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

manufacturing processes; **D.A. Poteryaev**—critical revision, writing, and finalisation of the manuscript; **R.A. Khamitov**—development of the scale-up concept, approval of the final version of the manuscript for publication.

Acknowledgements. The authors express gratitude to the employees of Generium JSC, who were directly involved in the scaling and production of the Gam-COVID-Vac vaccine, as well as to the employees of the administrative and economic divisions of the company, who ensured the uninterrupted supply of raw materials and equipment in the challenging logistical conditions of the pandemic.

Conflict of interest. R.A. Khamitov is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Морозов Антон Николаевич, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6960-6148>
morozov@ibcgenerium.ru

Яхин Ильдар Ряшитович, канд. биол. наук.
yakhin@ibcgenerium.ru

Стратонова Наталья Валерьевна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9555-1950>
Stratonova@ibcgenerium.ru

Куцкир Максим Валерьевич, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3603-0004>
m.kutskir@generium.ru

Потеряев Дмитрий Александрович, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2695-8869>
poteryaev@ibcgenerium.ru

Хамитов Равиль Авгатович, д-р мед. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>
Khamitov@ibcgenerium.ru

Anton N. Morozov, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6960-6148>
morozov@ibcgenerium.ru

Ildar R. Yakhin, Cand. Sci. (Biol.).
yakhin@ibcgenerium.ru

Natalya V. Stratonova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9555-1950>
Stratonova@ibcgenerium.ru

Maksim V. Kutsir, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3603-0004>
m.kutskir@generium.ru

Dmitry A. Poteryaev, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2695-8869>
poteryaev@ibcgenerium.ru

Ravil A. Khamitov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1314-894X>
Khamitov@ibcgenerium.ru

Поступила 07.07.2022

После доработки 19.09.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Received 7 July 2022

Revised 19 September 2022

Accepted 7 December 2022



Выбор метода и разработка стандартного образца для количественного определения антител к SARS-CoV-2 методом ИФА в препаратах иммуноглобулинов

Т.И. Смолянова^{1,✉}, А.М. Николаева², Т.В. Вязникова², А.В. Иванов², О.В. Белякова², Е.И. Саканян²

¹ Акционерное общество «Нацимбио», 2-й Волконский переулок, д. 10, Москва, 127473, Российская Федерация

² Акционерное общество «Научно-производственное объединение по медицинским иммунобиологическим препаратам «Микроген», 2-й Волконский переулок, д. 10, Москва, 127473, Российская Федерация

✉ Смолянова Татьяна Ивановна; tatianasmolyanova@gmail.com

Резюме

В процессе разработки препарата специфического иммуноглобулина человека против COVID-19 (КОВИД-глобулин) одной из задач являлся выбор метода определения содержания антител к SARS-CoV-2. Определение титра антител в реакции нейтрализации (РН) является трудоемким и не позволяет применять метод массово. Наиболее доступным методом для рутинного использования представляется метод иммуноферментного анализа (ИФА). В связи с отсутствием международных и отраслевых стандартных образцов (СО) возникла необходимость в получении и аттестации СО для контроля специфической активности КОВИД-глобулина. **Цель работы:** изучение возможности замены реакции нейтрализации на метод ИФА для количественного определения антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулинов и разработка стандартного образца количественного определения антител к SARS-CoV-2. **Материалы и методы:** в исследовании использовали коммерческие наборы реагентов для ИФА различных производителей, препарат КОВИД-глобулин (48 серий) производства АО «НПО «Микроген», образцы плазмы крови человека (1499 образцов) различных производителей. В работе применяли РН, ИФА, хемилюминесцентный иммуноанализ на микрочастицах. **Результаты:** применение наборов реагентов для ИФА производства ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России и Euroimmun AG и валидация методики количественного определения антител к SARS-CoV-2 с помощью ИФА с использованием выбранных наборов реагентов показали возможность использования метода ИФА взамен РН (коэффициент корреляции более 0,9). Разработан и охарактеризован СО содержания антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулина человека. Разработанный СО аттестован в установленных нами впервые антиковидных единицах (АКЕ) и единицах связывания антител (BAU) с использованием международной референс-панели ВОЗ (код NIBSC 20/268). Специфическая активность приготовленного СО предприятия охарактеризована по нейтрализующей активности в антиковидных единицах — АКЕ (активность СО составила 320 АКЕ/мл), а также в единицах BAU, используемых ВОЗ (активность СО составила 2234,8 BAU/мл). Установлено соотношение единиц АКЕ с единицами BAU. Коэффициент пересчета составил 6,4 для набора реагентов ИФА производства ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России и 7,0 — для набора реагентов ИФА производства Euroimmun AG. **Выводы:** метод ИФА для количественного определения антител к SARS-CoV-2 и разработанный СО содержания антител к SARS-CoV-2 могут быть использованы для определения специфической активности препаратов иммуноглобулина человека против COVID-19.

Ключевые слова: реакция нейтрализации; иммуноферментный анализ; стандартный образец; иммуноглобулин; антитела к SARS-CoV-2

Для цитирования: Смолянова Т.И., Николаева А.М., Вязникова Т.В., Иванов А.В., Белякова О.В., Саканян Е.И. Выбор метода и разработка стандартного образца для количественного определения антител к SARS-CoV-2 методом ИФА в препаратах иммуноглобулинов. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):392–404. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-392-404>

Selection of a SARS-CoV-2 antibody quantification method and development of an antibody reference standard for ELISA to test immunoglobulin preparations

T.I. Smolyanova^{1,✉}, A.M. Nikolaeva², T.V. Vyaznikova², A.V. Ivanov², O.V. Belyakova², E.I. Sakanyan²

¹ Nacimbio, 10 2nd Volkonsky Ln., Moscow 127473, Russian Federation

² Microgen Scientific Industrial Company for Immunological Medicines, 10 2nd Volkonsky Ln., Moscow 127473, Russian Federation

✉ Tatiana I. Smolyanova; tatianasmolyanova@gmail.com

Abstract

The development of COVID-globulin, a COVID-19-specific human immunoglobulin preparation, involved choosing a method to quantify antibodies to SARS-CoV-2. Antibody titre determination by virus neutralisation (VN) is labour-intensive and unsuitable for large-scale application. To enable routine testing, it was necessary to develop a less demanding method; the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was the most appropriate of solutions. The lack of international and industry reference standards (RS) prompted the preparation and certification of an RS for COVID-globulin potency control. **The aim of the study** was to examine the possibility of substituting ELISA for VN and to develop an RS for SARS-CoV-2 antibody quantification in immunoglobulin preparations. **Materials and methods:** the authors used commercial ELISA kits by several manufacturers, COVID-globulin by Microgen (48 batches), and human plasma samples from multiple sources (1499 samples). The tests were performed by VN, ELISA, and chemiluminescent microparticle immunoassay. **Results:** the authors validated an ELISA method for SARS-CoV-2 antibody quantification with the selected reagent kits by the National Medical Research Center for Hematology (NMRC for Hematology) and Euroimmun AG. The authors demonstrated the possibility of using ELISA instead of VN (with a correlation coefficient of more than 0.9). They developed and characterised an in-house RS for SARS-CoV-2 antibody content in human immunoglobulin preparations. The RS was certified in newly introduced anti-COVID units (ACU) and in international binding antibody units (BAU) using the World Health Organisation (WHO) international reference panel (NIBSC code: 20/268). The RS's potency was measured in terms of its neutralising activity in ACU (320 ACU/mL) and BAU (2234.8 BAU/mL). The authors established the relationship between ACU and BAU units. For the selected ELISA reagent kits, the conversion factors were 6.4 (NMRC for Hematology) and 7.0 (Euroimmun AG). **Conclusions:** the ELISA method for SARS-CoV-2 antibody quantification and the RS for SARS-CoV-2 antibody content can be applied to determine the potency of human anti-COVID-19 immunoglobulins.

Key words: virus neutralisation test; ELISA; reference standard; immunoglobulin; SARS-CoV-2 antibodies

For citation: Smolyanova T.I., Nikolaeva A.M., Vyaznikova T.V., Ivanov A.V., Belyakova O.V., Sakanyan E.I. Selection of a SARS-CoV-2 antibody quantification method and development of an antibody reference standard for ELISA to test immunoglobulin preparations. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):392–404. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-392-404>

Введение

COVID-19 — инфекционное заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2. Одним из методов лечения является применение плазмы крови доноров, содержащей специфические антитела. В настоящее время использование антиковидной плазмы включено во временные методические рекомендации Минздрава России «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)»¹. В то же время переливание плазмы крови всегда сопряжено с риском посттрансфузионных осложнений различного характера, в том числе заражением гемотрансмиссивными инфекциями и тромбообразованием. В связи с этим применение препарата иммуноглобулина человека (ИГЧ), содержащего антитела к SARS-CoV-2, представляется более безопасным для пациентов.

В 2020–2021 гг. в АО «Нацимбио» был разработан препарат КОВИД-глобулин, иммуноглобулин человека против COVID-19, раствор для инфузий [1]. Действующим веществом препарата КОВИД-глобулин являются иммуноглобулины класса G (IgG), содержащие нейтрализующие SARS-CoV-2 антитела.

Высокоочищенный препарат иммуноглобулина класса G выделяют из плазмы крови доноров, содержащей антитела к SARS-CoV-2, протестированной на наличие маркеров инфекций, передающихся с кровью, и соответствующей показателям качества ФС.3.3.2.0001.18 Плазма человека для фракционирования².

Одним из важнейших показателей, определяющих качество препаратов специфических противовирусных иммуноглобулинов, является содержание антител, нейтрализующих вирус, — показатель специфической активности. Для определения специфической активности используют ограниченный набор методов. Одним из традиционных методов определения титра нейтрализующих антител (ВНА) является реакция нейтрализации (РН) [2]. Применительно к SARS-CoV-2, использование РН является достаточно трудоемким и сложным методом, требующим наличия специальной лаборатории, обладающей соответствующей лицензией на работу с патогенами II группы и, конкретно, с вирусом SARS-CoV-2. Это не позволяет применять РН массово, поэтому целесообразно оценить возмож-

ность использования другого, более доступного метода. Наиболее подходящим для этих целей представляется метод иммуноферментного анализа (ИФА), обладающий достаточной чувствительностью и специфичностью.

В связи с этим возникла необходимость выбора унифицированного метода ИФА для количественного определения антител, характеризующегося информативностью и приемлемой корреляцией с РН, простотой, минимальными затратами времени и удовлетворительной прецизионностью. Для анализа специфической активности представляется целесообразным использование коммерчески доступных наборов реагентов для ИФА. Для обеспечения возможности сравнения результатов, полученных разными наборами реагентов, необходим стандартный образец (СО), аттестованный в обоснованных единицах в соответствии с рекомендациями Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ)³.

Для стандартизации методики определения действующего вещества лекарственных препаратов используют СО, идентичные исследуемым образцам. Согласно рекомендациям ВОЗ основной задачей получения СО является обеспечение постоянства содержания основного компонента СО в процессе хранения, транспортирования и использования, так как изменение этого показателя СО может снижать точность количественного определения IgG к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулинов человека. В настоящее время отсутствуют международные СО специфической активности для препаратов иммуноглобулина человека против COVID-19. В связи с этим очевидно, что получение и аттестация СО необходимы для стандартизации количественного определения антител к SARS-CoV-2.

ВОЗ утвердила международную референс-панель для оценки и разработки методик определения антител к SARS-CoV-2, охарактеризованную дополнительно в единицах связывания антител (binding antibody units, BAU) [3, 4]. Международные стандарты ВОЗ предназначены для калибровки диагностических тест-систем. Аттестация разработанного СО относительно международной референс-панели Национального института биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological

¹ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 16; 18.08.2022» (утв. Министерством здравоохранения Российской Федерации).

² Фармакопейная статья 3.3.2.0001.18 Плазма человека для фракционирования. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

³ Recommendation for the preparation, characterization, and establishment of international and other biological reference standards. Annex 2. WHO Technical Report Series, No. 932; 2006.

Standards and Control, NIBSC) — NIBSC 20/268⁴ позволит изучить возможность оценки специфической активности препарата иммуноглобулина в предложенных ВОЗ единицах связывания антител — ВАУ/мл.

Цель работы — изучение возможности замены реакции нейтрализации на метод ИФА для количественного определения антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулинов и разработка стандартного образца количественного определения антител к SARS-CoV-2.

Основными задачами работы являлись следующие:

- изучение возможности замены метода РН на ИФА с применением коммерческих наборов реагентов для ИФА при оценке показателя специфической активности препаратов противовирусных иммуноглобулинов;
- разработка и характеристика СО содержания IgG человека к вирусу SARS-CoV-2, идентичного анализируемому материалу — препаратам иммуноглобулинов человека против COVID-19;
- аттестация разработанного СО относительно международной референс-панели NIBSC 20/268, охарактеризованной в принятых ВОЗ единицах связывания антител (ВАУ/мл);
- исследование предполагаемого срока годности СО методом «ускоренного старения».

Материалы и методы

Материалы

Использовали коммерчески доступные ИФА тест-системы различной специфичности к конкретной антигенной детерминанте:

- набор реагентов для иммуноферментного определения IgG антител к антигену SARS-CoV-2 в сыворотке (плазме) крови «SARS-CoV-2-IgG-ИФА», производства ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России, Россия (ИФА «НМИЦ гематологии»); используемый в наборе антиген — рекомбинантный RBD домен S-белка SARS-CoV-2;
- набор реагентов для определения антител IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 «Anti-SARS-Cov-2 ELISA (IgG)», производства Euroimmun AG, Германия (ИФА Euroimmun кач); используемый в наборе антиген — рекомбинантный S1 домен S-белка SARS-CoV-2;
- набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-IgG-ИФА-БЕСТ», производства АО «Вектор-Бест», Россия (ИФА «Вектор-Бест»); используемый в наборе анти-

ген — рекомбинантный S-белок SARS-CoV-2;

- набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи», производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Россия (ИФА «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»); используемый в наборе антиген — рекомбинантный RBD домен S-белка SARS-CoV-2;
- набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к коронавирусу SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2 IgG ELISA Kit», производства Creative Diagnostics, США (ИФА Creative Diagnostics); используемые в наборе антигены — рекомбинантные белки вирусной частицы SARS-CoV-2;
- набор реагентов для количественного определения антител IgG к коронавирусу SARS-CoV-2 (Anti-SARS-Cov-2 QuantiVac ELISA (IgG)), производства Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG, Германия (ИФА Euroimmun кол); используемый в наборе антиген — S1 домен S-белка SARS-CoV-2;
- набор реагентов для качественного и количественного определения антител класса IgG к вирусу SARS-CoV-2 иммунохемилюминесцентным методом (chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA) в сыворотке и плазме крови человека на иммунохимических анализаторах Architect «SARS-CoV-2 IgG II реагент для количественного анализа для Architect (Architect SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit)», производства Abbott Laboratories, Ирландия (ИХЛ Эбботт); используемый в наборе антиген — рекомбинантный RBD домен S белка SARS-CoV-2.

В работе использовали следующие материалы:

- образцы серий препарата КОВИД-глобулин (Иммуноглобулин человека против COVID-19, раствор для инфузий); АО «НПО «Микроген» — 48 серий;
- образцы плазмы крови человека — 1499 образцов: 490 образцов плазмы реконвалесcentов (150 образцов были предоставлены ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и 340 образцов были предоставлены Департаментом здравоохранения г. Москвы) и 1009 образцов плазмы здоровых доноров (образцы заготовлены организациями службы крови Российской Федерации и являлись собственностью АО «НПО «Микроген»);

⁴ WHO Reference Panel. First WHO International Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin. NIBSC code: 20/268. <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-268.pdf>

– международная референс-панель NIBSC 20/268⁵ (NIBSC 20/150 (High), NIBSC 20/148 (Mid), NIBSC 20/144 (Low S, high N), NIBSC 20/140 (Low), NIBSC 20/142 (negative human plasma)), представляющая собой пулированные образцы плазмы реконвалесцентов, содержащие антитела к вирусу SARS-CoV-2, и отрицательный контроль, полученный из плазмы крови здоровых доноров, собранной до 2019 г. (табл. 1).

Методы

Для определения количества антител к SARS-CoV-2 в образцах плазмы крови человека и препаратах иммуноглобулинов использовали следующие методы анализа.

Реакция нейтрализации. Использовали постоянную дозу вируса SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/Moscow_PMV-1/2020), полученного из Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и различные разведения тестируемого образца (плазмы крови человека и препаратов иммуноглобулинов). Готовили разведения образца в культуральной среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, HyClone, США) с 2% инактивированной фетальной бычьей сывороткой (HyClone, США), далее вносили вирус SARS-CoV-2 (100 бляшкообразующих единиц, БОЕ), инкубировали 1 ч при 37 °C и добавляли к культуре клеток Vero E6 (клетки эпителия почки африканской зеле-

ной мартышки) в полистироловых 96-луночных планшетах. Конечные разведения образца составили 1:20–1:1280. Анализ проводили в трех повторностях. Клетки инкубировали при 37 °C и 5% CO₂. Через 96 ч проводили учет развития цитопатического действия вируса на культуру клеток визуально по оценке нарушения монослоя клеток. За титр ВНА исследуемого образца принимали наибольшее его разведение, при котором происходит подавление цитопатического действия (ЦПД) вируса в двух из трех лунок [5].

Метод иммуноферментного анализа. Исследование взаимодействия антител к SARS-CoV-2, содержащихся в тестируемых образцах (плазме крови человека и препаратах иммуноглобулинов), с антигеном SARS-CoV-2, иммобилизованным на полистироловом планшете, проводили методом ИФА с применением коммерческих наборов реагентов для ИФА в соответствии с инструкциями фирм-производителей. Образовавшийся комплекс антиген–антитело выявляли с помощью меченных пероксидазой хрена антител против IgG человека, которые обуславливают расщепление пероксида водорода, регистрируемое по изменению окраски индикатора тетраметилбензидина. Интенсивность окраски прямо пропорциональна содержанию антител в образцах.

Количественное определение концентрации специфических антител в исследуемом образце проводили по сравнению с СО

Таблица 1. Характеристика международной референс-панели ВОЗ (NIBSC 20/268⁶)

Table 1. Characteristics of the First WHO International Reference Panel (NIBSC 20/268⁶)

Наименование антител <i>Antibodies</i>	Специфическая активность образцов референс-панели NIBSC 20/268 <i>Potency of Reference Panel samples (NIBSC 20/268)</i>					Единицы измерения <i>Units of measurement</i>
	NIBSC 20/150	NIBSC 20/148	NIBSC 20/144	NIBSC 20/140	NIBSC 20/142	
Нейтрализующие антитела <i>Neutralising antibodies</i>	1473	210	95	44	Отриц <i>Neg</i>	МЕ/мл <i>IU/mL</i>
Анти-RBD IgG <i>Anti-RBD IgG</i>	817	205	66	45	Отриц <i>Neg</i>	BAU/мл <i>BAU/mL</i>
Анти-S1 IgG <i>Anti-S1 IgG</i>	766	246	50	46	Отриц <i>Neg</i>	BAU/мл <i>BAU/mL</i>
Анти-S IgG <i>Anti-S IgG</i>	832	241	86	53	Отриц <i>Neg</i>	BAU/мл <i>BAU/mL</i>
Анти-N IgG <i>Anti-N IgG</i>	713	295	146	12	Отриц <i>Neg</i>	BAU/мл <i>BAU/mL</i>

Примечание. Отриц – отрицательный контроль, не содержащий антитела к вирусу SARS-CoV-2; МЕ – международные единицы; BAU – единицы связывания антител; RBD – рецепторсвязывающий домен; S – шиповидный белок; S1 – субъединица S-белка.

Note. Neg – negative control (no SARS-CoV-2 antibodies); IU – international units; BAU – binding antibody units; RBD – receptor-binding domain; S – spike protein; S1 – S-protein subunit.

⁵ Там же.

⁶ Там же.

по калибровочному графику, построенному в двойных логарифмических координатах по результатам измерения оптической плотности (ось Y — $\lg$ оптической плотности СО, ось X — $\log_2$ кратности разведения СО). В качестве калибратора использовали разработанный СО, который титровали от 0,4 до 0,006 в антиковидных единицах (АКЕ/мл) в буфере для образцов соответствующего набора реагентов. Постановку ИФА для полуколичественного определения и расчет индексов позитивности проводили согласно инструкциям фирм-производителей.

Хемилюминесцентный иммуноанализ на микрочастицах. Тест предназначен для качественного и количественного определения антител IgG к SARS-CoV-2 в образцах на анализаторе ARCHITECT (Abbott Laboratories, Ирландия). Тест проводили его в соответствии с инструкцией производителя. При постановке анализа смешивали тестируемый образец (плазма крови человека и препараты иммуноглобулинов), парамагнитные микрочастицы, покрытые антигеном SARS-CoV-2, и разбавитель для образцов теста. Далее проводили инкубацию, промывку и добавление акридин-меченого конъюгата антител к IgG человека. После цикла промывки к реакционной смеси добавляли претриггерный и триггерный растворы. Результат хемилюминесцентной реакции измеряли в относительных световых единицах (relative light unit, RLU), которые напрямую связаны с количеством детектируемых антител IgG к SARS-CoV-2, присутствующих в образце. Панель положительных контрольных образцов, входящая в состав набо-

ра реагентов, аттестована относительно первого международного СО ВОЗ для иммуноглобулинов к SARS-CoV-2 (код NIBSC 20/136)⁷.

Статистический анализ проводили с использованием программы Microsoft Excel. Для выявления взаимосвязей между результатами исследования, полученными в ИФА и РН, использовали метод корреляционного анализа по Спирмену. При оценке валидационных показателей были изучены калибровочный диапазон, прецизионность внутри и между циклами (определениями, постановками), линейность разведения, стабильность образцов, параллелизм разведений исследуемых образцов и калибратора.

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы были проведены исследования по изучению возможности замены метода РН на ИФА при оценке показателя специфической активности препаратов противовирусных иммуноглобулинов. Исходя из рекомендаций ВОЗ, такая замена возможна только при наличии коэффициента корреляции между сравниваемыми методами не менее 0,9. Было проанализировано на наличие специфических антител 1499 образцов плазмы крови человека в РН и с использованием наборов ИФА (ИФА «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», ИФА «НМИЦ гематологии», ИФА Euroimmun кач, ИФА «Вектор-Бест», ИФА Creative Diagnostics) (табл. 2).

Установлено, что значение коэффициента корреляции r Спирмена для различных тест-систем составляло 0,77–0,83. Выбранные тест-системы отличались антигенной специфичностью

Таблица 2. Результаты корреляционного анализа данных, полученных с применением реакции нейтрализации и метода ИФА с использованием тест-систем различных производителей

Table 2. Results of correlation analysis of the data obtained by virus neutralisation and ELISA using test kits by several manufacturers

Наименование показателя <i>Test name</i>	ИФА «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» <i>Kit A</i>	ИФА «НМИЦ гематологии» <i>Kit B</i>	ИФА Euroimmun кач <i>Kit C</i>	ИФА «Вектор-Бест» <i>Kit D</i>	ИФА Creative Diagnostics <i>Kit E</i>
КК Спирмена, r <i>Spearman CC, r</i>	0,8080	0,8269	0,8204	0,7697	0,7751
95% доверительный интервал <i>95% confidence interval</i>	0,7474–0,8553	0,7957–0,8537	0,7882–0,8481	0,7297–0,8044	0,7360–0,8091
Уровень значимости, p <i>Level of significance, p</i>	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Количество пар сравнения <i>Number of pairs compared</i>	325	490	490	490	490

Примечание. КК — коэффициент корреляции, ИФА — иммуноферментный анализ.

Note. CC—correlation coefficient, ELISA—enzyme-linked immunosorbent assay, Kit A—SARS-CoV-2-RBD-ELISA-Gamaleya by the N.F. Gamaleya National Research Centre for Epidemiology and Microbiology, Kit B—SARS-CoV-2-IgG-ELISA by the National Medical Research Center for Hematology, Kit C—Anti-SARS-Cov-2 ELISA IgG by Euroimmun AG, Kit D—SARS-CoV-2-IgG-EIA-BEST by Vector-Best AO, Kit E—SARS-CoV-2 IgG ELISA Kit by Creative Diagnostics.

⁷ WHO International Standard. First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human). NIBSC code: 20/136. <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>

и, соответственно, специфичностью определяемых антител к SARS-CoV-2. Тест-системы, использующие полноразмерный S-белок (ИФА «Вектор-Бест») или смесь всех белков SARS-CoV-2 (ИФА Creative Diagnostics), показали более низкие результаты корреляции.

Максимально высокие коэффициенты корреляции в анализе индивидуальных образцов плазмы крови человека были получены для тест-систем ИФА «НМИЦ гематологии» и ИФА Euroimmun кач (0,83 и 0,82 соответственно), использующих в качестве антигена RBD домен и S1 субъединицу S-белка соответственно. Такой уровень значений соответствует средней корреляции, что не является достаточным для замены РН на метод ИФА.

Относительно низкая степень корреляции между результатами ИФА и РН в индивидуальных образцах плазмы крови человека может быть связана с тем, что не все антитела, специфичные к RBD домену, обладают вируснейтрализующим действием, и содержание ВНА может отличаться в индивидуальных образцах. Следует отметить, что при производстве препарата ИГЧ используют крупные пулы плазмы крови доноров, состоящие из более чем 500 образцов, в связи с чем индивидуальные различия усредняются.

При анализе корреляции между сравниваемыми методами с использованием пулов плазмы крови (смесь 10 индивидуальных образцов с одинаковым титром ВНА, определенным в РН) было установлено, что коэффициенты корреляции для методов РН и ИФА в тест-системах ИФА «НМИЦ гематологии» и ИФА Euroimmun кач составили 0,91–0,95 (табл. 3).

Уровни корреляции выше 0,9 свидетельствуют о возможности использования количественной оценки содержания антител методом ИФА с указанными тест-системами взамен реакции РН.

На следующем этапе работ был приготовлен СО содержания антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулина человека для количественного определения антител в препаратах иммуноглобулинов.

Основой для получения СО являлась производственная серия КОВИД-глобулина, по всем показателям качества соответствующая нормативной документации и требованиям Европейской фармакопеи на препараты внутривенных иммуноглобулинов⁸. Высокую стабильность физико-химических и биологических свойств СО обеспечивали следующие факторы: использование сахарозы в конечной концентрации 8%,

Таблица 3. Величины, обратные разведению, полученные с применением РН, и индексы позитивности, полученные методом ИФА с использованием тест-систем ИФА «НМИЦ гематологии» и ИФА Euroimmun кач ($n=37$ минипулов)

Table 3. Reciprocals of sample dilutions in VN tests and positive reactivity indices obtained by ELISA with kits B and C ($n=37$ minipools)

Величина, обратная разведению образца пула плазмы крови человека в РН <i>Reciprocals of sample dilutions in VN tests with pooled human plasma</i>	Индекс позитивности для тест-систем ИФА <i>Positive reactivity index for ELISA kits</i>	
	ИФА «НМИЦ гематологии» <i>Kit B</i>	ИФА Euroimmun кач <i>Kit C</i>
0	0,8	0,2
20	3,7	1,8
40	10,1	3,6
80	17,8	7,0
160	36,3	12,6
320	69,8	35,2
640	56,0	25,2
1280	102,4	70,4
Коэффициент корреляции ИФА с РН <i>Correlation coefficients for ELISA and VN tests</i>	0,91	0,95

Примечание. РН — реакция нейтрализации; ИФА — иммуноферментный анализ.

Note. VN—virus neutralisation; ELISA—enzyme-linked immunosorbent assay, Kit B—SARS-CoV-2-IgG-ELISA by the National Medical Research Center for Hematology, Kit C—Anti-SARS-CoV-2 ELISA by Euroimmun AG.

стерильный розлив по 0,1 мл во флаконы, лиофильное высушивание, герметизация флаконов.

Полученный СО был протестирован в РН и охарактеризован в установленных нами впервые единицах — антиковидных единицах (АКЕ). За 1 единицу АКЕ образца была принята величина, обратная его разведению, при котором в РН регистрируется ингибирование ЦПД вируса SARS-CoV-2 (100 БОЕ) на культуре клеток Vero в двух из трех лунок. Титр ВНА составил 1:320; соответственно, образцу была присвоена активность 320 АКЕ/мл.

При проведении оценки качества разработанного СО содержания антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулина человека (табл. 4) было установлено, что значения показателей качества разработанного СО соответствуют требованиям к соответствующим показателям качества препарата КОВИД-глобулин.

Проведена валидация методики количественного определения антител к SARS-CoV-2 методом

⁸ Human normal immunoglobulin for intravenous administration 01/2012:0918. European Pharmacopoeia 10th ed. Vol. 2; 2022.

Таблица 4. Основные характеристики качества разработанного СО содержания антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулина человека

Table 4. The main quality characteristics of the developed RS for SARS-CoV-2 antibody content in human immunoglobulin preparations

Наименование показателя <i>Test/parameter</i>	Требования нормативной документации <i>Acceptance criteria</i>	Результаты испытаний <i>Test result</i>
Внешний вид <i>Appearance</i>	Таблетка или аморфная масса белого цвета <i>White tablet or solid friable mass</i>	Таблетка белого цвета <i>White tablet</i>
Потеря в массе при высушивании, % <i>Loss on drying, %</i>	Не более 5 <i>No more than 5</i>	1,1
Время восстановления препарата <i>Reconstitution time</i>	Содержимое флакона должно растворяться в 0,1 мл очищенной воды в течение не более 15 мин при периодическом встряхивании <i>With periodic shaking, vial contents dissolve in 0.1 mL of water within no more than 15 min</i>	Растворяется в течение 5 мин <i>Vial contents dissolve within 5 min</i>
Прозрачность и цветность раствора <i>Clarity and degree of colouration</i>	В растворенном виде — прозрачный или слегка опалесцирующий, бесцветный или светло-желтый раствор <i>Upon reconstitution, the solution is clear or slightly opalescent and colourless or light-yellow</i>	Прозрачный бесцветный раствор <i>Clear colourless solution</i>
Подлинность: – видовая специфичность – наличие антител к SARS-CoV-2 <i>Identification:</i> – <i>species specificity</i> – <i>presence of antibodies to SARS-CoV-2</i>	– должна выявляться линия преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека – должны выявляться антитела к SARS-CoV-2 <i>– only an antiserum to human serum proteins gives a precipitation arc</i> <i>– antibodies to SARS-CoV-2 are detected</i>	– выявляется линия преципитации только с сывороткой против белков сыворотки крови человека – выявляются антитела к SARS-CoV-2 <i>– only an antiserum to human serum proteins gives a precipitation arc</i> <i>– antibodies to SARS-CoV-2 are detected</i>
Белок <i>Protein</i>	От 8,0 до 12,0% (от 80 до 120 мг/мл) <i>8.0 to 12.0% (80 to 120 mg/mL)</i>	8,45% (84,5 мг/мл) <i>8.45% (84.5 mg/mL)</i>
Электрофоретическая однородность <i>Protein composition (electrophoresis)</i>	Основная фракция IgG должна составлять не менее 95% от общего содержания белка <i>The main IgG fraction comprises at least 95% of the total protein content</i>	Основная фракция IgG составляет 97,53% от общего содержания белка <i>The main fraction of IgG comprises 97.53% of the total protein content</i>
Молекулярные параметры <i>Molecular size distribution</i>	Содержание мономера и димера IgG должно быть не менее 90,0%, полимеров и агрегатов — не более 3,0% <i>The content of IgG monomer and dimer is not less than 90.0%; the content of polymers and aggregates is not more than 3.0%</i>	Содержание мономера и димера IgG — 99,83%, полимеров и агрегатов — 0,17% <i>The content of IgG monomer and dimer is 99.83%; the content of polymers and aggregates is 0.17%</i>
Фракционный состав <i>Fractional profile</i>	Должна выявляться интенсивная линия преципитации IgG и не более четырех дополнительных линий <i>One strong IgG precipitation arc and no more than four additional arcs</i>	Выявляется интенсивная линия преципитации IgG и одна дополнительная линия <i>One strong IgG precipitation arc and one additional arc</i>
Содержание иммуноглобулина А, мг/мл <i>IgA content, mg/mL</i>	Не более 1,0 <i>No more than 1.0</i>	Менее 1,0 <i>Less than 1.0</i>
Вирусная безопасность: – поверхностный антиген вируса гепатита В; – антитела к вирусу гепатита С; – антитела к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1 <i>Viral safety:</i> – <i>hepatitis B surface antigen (HBsAg);</i> – <i>antibodies to hepatitis C;</i> – <i>antibodies to human immunodeficiency virus (HIV-1 and HIV-2) and HIV-1 p24 antigen</i>	– препарат не должен содержать поверхностного антигена вируса гепатита В; – антитела к вирусу гепатита С должны отсутствовать; – препарат не должен содержать антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1 <i>The preparation is free from</i> <i>– hepatitis B surface antigen;</i> <i>– antibodies to hepatitis C;</i> <i>– antibodies to human immunodeficiency virus (HIV-1 and HIV-2) and HIV-1 p24 antigen</i>	– препарат не содержит поверхностного антигена вируса гепатита В; – антитела к вирусу гепатита С отсутствуют; – препарат не содержит антител к вирусу иммунодефицита человека (ВИЧ-1 и ВИЧ-2) и антиген р24 ВИЧ-1 <i>The preparation is free from</i> <i>– hepatitis B surface antigen;</i> <i>– antibodies to hepatitis C;</i> <i>– antibodies to human immunodeficiency virus (HIV-1 and HIV-2) and HIV-1 p24 antigen</i>

Продолжение таблицы 4

Table 4 (continued)

Наименование показателя <i>Test/parameter</i>	Требования нормативной документации <i>Acceptance criteria</i>	Результаты испытаний <i>Test result</i>
Специфическая активность, АКЕ/флакон <i>Potency, ACU/vial</i>	Содержание специфических антител во флаконе, установленное в реакции иммуноферментного анализа, должно быть не ниже 16 <i>The content of specific antibodies in a vial is not less than 16 (ELISA)</i>	Содержание специфических антител во флаконе, установленное в реакции иммуноферментного анализа, — 32 <i>The content of specific antibodies in a vial is 32 (ELISA)</i>

Примечание. СО — стандартный образец; АКЕ — антиковидные единицы.

Note. RS—reference standard; ACU—anti-COVID units.

ИФА указанными выше тест-системами (ИФА «НМИЦ гематологии» и ИФА Euroimmun кач) в соответствии с требованиями Комитета по лекарственным средствам для медицинского применения (Committee for Medicinal Products for Human Use) Европейского агентства по лекарственным средствам (European Medicines Agency)⁹. Работы проводились двумя операторами в течение двух дней в двух повторностях с использованием разработанного СО и трех серий препарата КОВИД-глобулин, Иммуноглобулин человека против COVID-19, раствор для инфузий (табл. 5).

Таким образом, установленные валидационные характеристики методики количественного определения антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулина методом ИФА с использованием наборов реагентов двух производителей (ИФА «НМИЦ гематологии» и ИФА Euroimmun кач) позволяют сделать заключение о том, что данную методику можно применять для количественного определения антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулинов.

На следующем этапе работ была проведена аттестация разработанного СО относительно международной референс-панели NIBSC 20/268, охарактеризованной в принятых ВОЗ единицах связывания антител (BAU/мл), с использованием наборов реагентов ИФА «НМИЦ гематологии» (48 проб), ИФА Euroimmun кач (48 проб), ИФА Euroimmun кол (24 пробы) — работы проводились двумя операторами в течение двух дней в двух повторностях, а также с использованием набора реагентов ИХЛ Эбботт (72 пробы) — работы проводились тремя операторами в течение двух дней в двух повторностях (табл. 6).

По результатам статической обработки специфическая активность разработанного СО, охарактеризованного по содержанию антител

к SARS-CoV-2, была принята за 2234,8 BAU/мл антител к SARS-CoV-2. Однако следует учесть, что международную референс-панель NIBSC 20/268 предлагается использовать для оценки и разработки тест-систем для обнаружения и количественного определения антител против SARS-CoV-2, панель состоит из 5 пулов плазмы (смесь 10 индивидуальных образцов), охарактеризованных в международных единицах (МЕ/мл) и единицах связывания антител (BAU/мл). Поэтому на следующем этапе работ была проведена оценка соотношения антиковидных единиц (АКЕ) и единиц связывания антител (BAU). Были использованы 48 серий препарата КОВИД-глобулин, протестированных относительно международной панели NIBSC 20/268, охарактеризованной в единицах связывания антител (BAU/мл), и разработанного СО, аттестованного в антиковидных единицах (АКЕ/мл), с использованием метода ИФА (наборы реагентов ИФА «НМИЦ гематологии» и ИФА Euroimmun кач). Средние значения полученных результатов представлены в таблице 7.

Таким образом, коэффициент пересчета антиковидных единиц (АКЕ/мл) в международные единицы связывания (BAU/мл) составил 6,4 для набора реагентов ИФА «НМИЦ гематологии» и 7,0 — для набора реагентов ИФА Euroimmun кач.

Проведено исследование предполагаемого срока годности разработанного СО методом «ускоренного старения» согласно методике, изложенной в ОФС.1.1.0009.15 Сроки годности лекарственных средств¹⁰, которая в настоящее время исключена из ГФ РФ XIV. Предполагаемый срок хранения СО составил 5,7 года. Наблюдения в режиме реального времени и реального температурного режима хранения продолжаются.

⁹ Guideline on bioanalytical method validation (EMA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2**). Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP); 2011. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-bioanalytical-method-validation_en.pdf

¹⁰ Общая фармакопейная статья ОФС.1.1.0009.15 Сроки годности лекарственных средств. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

Таблица 5. Основные валидационные характеристики методики количественного определения антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулина методом ИФА

Table 5. The main validation characteristics of the ELISA method for anti-SARS-CoV-2 antibody quantification in immunoglobulin preparations

Валидационная характеристика <i>Validation characteristics</i>	Результаты, полученные с использованием набора реагентов <i>Results obtained using the reagent kit</i>		Критерии приемлемости <i>Acceptance criteria</i>
	ИФА «НМИЦ гематологии» <i>Kit B</i>	ИФА Euroimmun кач <i>Kit C</i>	
Определение калибровочного диапазона (14 образцов) <i>Calibration range (14 samples)</i>	Калибровочный диапазон от 0,006 до 0,4 АКЕ/мл <i>RSD от 1,9 до 19,1%</i> <i>Calibration range: 0.4–0.006 ACU/mL</i> <i>RSD: 1.9–19.1%</i>	Калибровочный диапазон от 0,006 до 0,4 АКЕ/мл <i>RSD от 3,6 до 18,3%</i> <i>Calibration range: 0.4–0.006 ACU/mL</i> <i>RSD: 3.6–18.3%</i>	<i>RSD не более 25%</i> <i>RSD is not more than 25%</i>
Прецизионность внутри цикла (48 образцов) <i>Intra-run precision (48 samples)</i>	<i>RSD от 4,2 до 13,6%</i> <i>RSD: 4.2–13.6%</i>	<i>RSD от 3,3 до 13,4%</i> <i>RSD: 3.3–13.4%</i>	<i>RSD не более 20%</i> <i>RSD is not more than 20%</i>
Прецизионность между циклами (48 образцов) <i>Inter-run precision (48 samples)</i>	<i>RSD от 5,7 до 14,7%</i> <i>RSD: 5.7–14.7%</i>	<i>RSD от 6,6 до 14,6%</i> <i>RSD: 6.6–14.6%</i>	<i>RSD не более 20%</i> <i>RSD is not more than 20%</i>
Линейность (40 образцов) <i>Linearity (40 samples)</i>	ε от –9,8 до +11,5% $r > 0,99$ <i>ε ranged from –9.8 to +11.5%</i>	ε от –8,3 до +6,5% $r > 0,99$ <i>ε ranged from –8.3 to +6.5%</i>	ε не более 20% r не менее 0,99 <i>ε is not more than 20%</i> <i>r is not less than 0.99</i>
Стабильность (30 образцов) <i>Stability (30 samples)</i>	ε от –8,1 до +10,1% <i>ε ranged from –8.1 to +10.1%</i>	ε от –13,3 до +3,7% <i>ε ranged from –13.3 to +3.7%</i>	ε не более 20% <i>ε is not more than 20%</i>
Параллелизм (40 образцов) <i>Parallelism (40 samples)</i>	$F_{\text{теор}} = 3,1$ $F_{\text{эксп}} = 0,2$ $F_{\text{теор}} = 3,1$ $F_{\text{эксп}} = 0,2$	$F_{\text{теор}} = 3,1$ $F_{\text{эксп}} = 0,2$ $F_{\text{теор}} = 3,1$ $F_{\text{эксп}} = 0,2$	$F_{\text{теор}} > F_{\text{эксп}}$ $F_{\text{теор}} > F_{\text{эксп}}$

Примечание. АКЕ – антиковидные единицы; ИФА – иммуноферментный анализ; *RSD* – относительное стандартное отклонение; ε – относительная погрешность; r – коэффициент корреляции; $F_{\text{теор}}$ – F теоретическое; $F_{\text{эксп}}$ – F экспериментальное.
а Образцы разведений препарата КОВИД-глобулин, раствор для инфузий.

Note. ACU—anti-COVID units; *RSD*—relative standard deviation; ε —relative error; r —correlation coefficient; ELISA—enzyme-linked immunosorbent assay; $F_{\text{теор}}$ —theoretical F value; $F_{\text{эксп}}$ —experimental F value; Kit B—SARS-CoV-2-IgG-ELISA by the National Medical Research Center for Hematology, Kit C—Anti-SARS-CoV-2 ELISA by Euroimmun AG.

а Dilutions of COVID-globulin, solution for infusion.

Заключение

Полученные в результате выполненных исследований коэффициенты корреляции для сравниваемых методов РН и ИФА с использованием тест-систем ИФА «НМИЦ гематологии» и ИФА Euroimmun кач составили 0,91–0,95 в пулах плазмы крови человека, что свидетельствует о возможности использования метода ИФА с указанными тест-системами взамен РН.

Валидационные характеристики методики количественного определения антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулина методом ИФА с использованием наборов реагентов двух производителей (ИФА «НМИЦ гематологии» и ИФА Euroimmun кач), установленные в соответ-

ствии с требованиями Комитета по лекарственным средствам для медицинского применения Европейского агентства по лекарственным средствам к валидации биоаналитической методики, позволяют сделать заключение о том, что данную методику можно применять при определении антител к SARS-CoV-2.

Значения показателей качества разработанного СО содержания антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулина человека соответствуют требованиям к показателям качества препарата КОВИД-глобулин.

Специфическая активность разработанного СО, охарактеризованного по содержанию антител к SARS-CoV-2, была принята за 320 АКЕ/мл

Таблица 6. Оценка аттестованного значения специфической активности разработанного СО содержания антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулина человека**Table 6.** Evaluation of the certified potency of the developed RS for SARS-CoV-2 antibody content in human immunoglobulin preparations

Наименование тест-системы <i>Reagent kits</i>	Концентрация специфических антител в исследуемом образце (среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение), BAU/мл <i>Concentration of specific antibodies in the test sample (arithmetic mean $\pm$ standard deviation), BAU/mL</i>	Среднее значение, BAU/мл <i>Mean value, BAU/mL</i>	Стандартное отклонение, BAU/мл <i>Standard deviation, BAU/mL</i>	RSD, %	Значение доверительного интервала (при $P=95\%$, $\alpha=0,05$) <i>Confidence interval value ($P=95\%$, $\alpha=0,05$)</i>
ИФА «НМИЦ гематологии» <i>Kit B</i>	2363,1 $\pm$ 222,7	2234,8	329,5	14,7	158,8
ИФА Euroimmun кач <i>Kit C</i>	2179,3 $\pm$ 411,1				
ИФА Euroimmun кол <i>Kit F</i>	2433,5 $\pm$ 425,2				
ИХЛ Эбботт <i>Kit G</i>	2020,7 $\pm$ 103,0				

Примечание. СО — стандартный образец; ИФА — иммуноферментный анализ; ИХЛ — иммунохемилюминесцентный анализ; BAU — единицы связывания антител; RSD — относительное стандартное отклонение.

Note. RS—reference standard; BAU—binding antibody units; RSD—relative standard deviation; Kit B—SARS-CoV-2-IgG-ELISA by the National Medical Research Center for Hematology; Kit C—Anti-SARS-CoV-2 ELISA by Euroimmun AG; Kit F—Anti-SARS-CoV-2 QuantiVac ELISA (IgG) by Euroimmun AG; Kit G—Architect SARS-CoV-2 IgG II Quant Reagent Kit by Abbott Laboratories.

Таблица 7. Определение специфической активности препаратов иммуноглобулинов, содержащих антитела к SARS-CoV-2 ($n=48$)**Table 7.** Determination of potency of anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin preparations ($n=48$)

Наименование тест-системы <i>Reagent kits</i>	Специфическая активность препаратов иммуноглобулинов, определенная с использованием <i>Potency of immunoglobulin preparations determined using</i>						Коэффициент пересчета <i>Conversion factor</i>
	стандарты NIBSC ^a <i>NIBSC standards^a</i>					CO ^b <i>RS^b</i>	
	20/140	20/144	20/148	20/150	Среднее значение <i>Mean</i>		
ИФА «НМИЦ гематологии» <i>Kit B</i>	2402,9± 1001,1	2722,9± 1188,7	2291,8± 1118,5	3186,0± 1795,6	2650,9± 1272,4	411,9± 238,7	6,4
ИФА Euroimmun кач <i>Kit C</i>	3452,3± 1793,1	3271,2± 1739,7	2782,3± 1513,9	2493,9± 1445,9	2999,9± 1622,3	428,5± 244,0	7,0

Примечание. ИФА — иммуноферментный анализ; АКЕ — антиковидные единицы; BAU — единицы связывания антител; СО — стандартный образец содержания антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулина человека.

^a Показатель специфической активности, полученный с использованием стандартов NIBSC (среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение), BAU/мл.

^b Показатель специфической активности, полученный с использованием СО (среднее арифметическое $\pm$ стандартное отклонение), АКЕ/мл.

Note. ACU—anti-COVID units; BAU—binding antibody units; RS—reference standard for SARS-CoV-2 antibody content in human immunoglobulin preparations; Kit B—SARS-CoV-2-IgG-ELISA by the National Medical Research Center for Hematology, Kit C—Anti-SARS-CoV-2 ELISA by Euroimmun AG.

^a Potency values obtained with NIBSC standards (arithmetic mean $\pm$ standard deviation), BAU/mL.

^b Potency values obtained with the RS (arithmetic mean $\pm$ standard deviation), ACU/mL.

или 2234,8 БАУ/мл антител к SARS-CoV-2. Разработанный СО можно использовать для определения содержания антител к SARS-CoV-2 в препаратах иммуноглобулинов как в антиковидных единицах (АКЕ/мл), так и в единицах связывания антител (БАУ/мл).

Коэффициент пересчета антиковидных единиц (АКЕ/мл) в единицы связывания (БАУ/мл)

составил 6,4 для набора реагентов ИФА «НМИЦ гематологии» и 7,0 – для набора реагентов ИФА Euroimmun кач (по результатам определения специфической активности в 48 сериях препарата КОВИД-глобулин).

Предполагаемый срок хранения СО, установленный методом «ускоренного старения», составил 5,7 года.

Литература/References

1. Арутюнов АГ, Авдеев СН, Батюшин ММ, Боярков АВ, Буланов АЮ, Быкова ЕА и др. Применение КОВИД-глобулина в терапии COVID-19. *Экспериментальная и клиническая фармакология*. 2022;85(3):13–20. [Arutyunov AG, Avdeev SN, Batyushin MM, Boyarkov AV, Bulahov AYU, Bykova EA, et al. Using COVID-globulin in COVID-19 treatment. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya*. 2022;85(3);13–20 (In Russ.)] <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2022-85-3-13-20>
2. Перельгина ОВ, Комаровская ЕИ. Сравнительный анализ требований к качеству гетерологичных сывороточных препаратов в фармакопеех ведущих стран – производителей лекарственных средств. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(1):32–40. [Perelygina OV, Komarovskaya EI. Comparative analysis of leading pharmacopoeias requirements for the quality of heterologous serum products. *Biopreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie* = *BIOpreparations*. 2017;17(1):32–40. (In Russ.)]
3. Knezevic I, Mattiuzzo G, Page M, Minor P, Griffiths E, Nuebling M, Moorthy V. WHO International Standard for evaluation of the antibody response to COVID-19 vaccines: call for urgent action by the scientific community. *Lancet Microbe*. 2022;3(3):e235–40. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00266-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00266-4)
4. Infantino M, Pieri M, Nuccetelli M, Grossi V, Lari B, Tomassetti F, et al. The WHO International Standard for COVID-19 serological tests: towards harmonization of anti-spike assays. *Int Immunopharmacol*. 2021;100:108095. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2021.108095>
5. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)

Вклад авторов. **Т.И. Смолянова** – обоснование концепции исследования; разработка дизайна экспериментального исследования; сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; обобщение и интерпретация результатов исследования; оформление текста рукописи; **А.М. Николаева** – обоснование концепции исследования; обобщение и интерпретация результатов исследования; формулировка выводов; оформление рукописи; редактирование и переработка текста рукописи; **Т.В. Вязникова** – проведение инструментальных исследований, сбор, анализ и систематизация экспериментальных данных; обобщение и интерпретация результатов исследования; оформление текста рукописи; **А.В. Иванов, О.В. Белякова** – подготовка серий препарата для исследований; **Е.И. Саканян** – редактирование и переработка текста рукописи.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. **T.I. Smolyanova**—substantiation of the study concept; development of the experimental study design; collection, analysis and systematisation of experimental data; consolidation and interpretation of the study results; formatting of the text of the manuscript; **A.M. Nikolaeva**—substantiation of the study concept; consolidation and interpretation of the study results; formulation of the conclusions; formatting, editing and revision of the text of the manuscript; **T.V. Vyaznikova**—performance of tests and investigations; collection, analysis and systematisation of experimental data; consolidation and interpretation of the study results; formatting of the text of the manuscript; **A.V. Ivanov, O.V. Belyakova**—preparation of batches of the medicinal product for the study; **E.I. Sakanyan**—editing and revision of the text of the manuscript.

Acknowledgements. The study was conducted without sponsorship.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Смолянова Татьяна Ивановна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2934-3002>
tatianasmolyanova@gmail.com

Николаева Алевтина Максимовна, д-р биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>
a.m.nikolaeva@microgen.ru

Вязникова Татьяна Владимировна, канд. биол. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0497-9757>
t.v.vyaznikova@microgen.ru

Иванов Александр Викторович, канд. фарм. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-1914>
ivanoffal@yandex.ru

Белякова Ольга Валерьевна, канд. фарм. наук.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6352-9380>
o.v.beliakova@yandex.ru

Саканян Елена Ивановна, д-р фарм. наук, проф.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>
e.i.sakanjan@microgen.ru

Поступила 26.04.2022

После доработки 27.09.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Tatiana I. Smolyanova, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2934-3002>
tatianasmolyanova@gmail.com

Alevtina M. Nikolaeva, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3160-518X>
a.m.nikolaeva@microgen.ru

Tatyana V. Vyaznikova, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0497-9757>
t.v.vyaznikova@microgen.ru

Alexander V. Ivanov, Cand. Sci. (Pharm.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7608-1914>
ivanoffal@yandex.ru

Olga V. Belyakova, Cand. Sci. (Pharm.).
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6352-9380>
o.v.beliakova@yandex.ru

Elena I. Sakanyan, Dr. Sci. (Pharm.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1693-2422>
e.i.sakanjan@microgen.ru

Received 26 April 2022

Revised 27 September 2022

Accepted 7 December 2022



Применение количественного иммуноферментного анализа для определения концентрации S-антигена в цельновирионных инактивированных адсорбированных коронавирусных вакцинах

А.С. Оксанич¹✉, А.Г. Красько², Т.Г. Самарцева¹, Е.Л. Гасич², Г.М. Игнатьев¹

¹ Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Малый Казенный переулок, д. 5А, Москва, 105064, Российская Федерация

² Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, ул. Филимонова, д. 23, г. Минск, 220114, Республика Беларусь

✉ Оксанич Алексей Сергеевич; oksanich@yahoo.com

Резюме

Тяжелые последствия заболевания, вызываемые вирусом SARS-CoV-2, а также большое количество случаев заболевания с летальным исходом обусловили разработку целого ряда профилактических вакцин. Первые вакцины, об испытаниях которых было заявлено, были разработаны в Китае и представляли собой инактивированный вирус SARS-CoV-2, адсорбированный на гидроокиси алюминия. Для инактивированных адсорбированных вакцин одним из показателей качества является полнота сорбции. Определение этого параметра позволяет не только контролировать количество несорбированного антигена, но и количество специфического антигена в дозе. **Цель работы:** изучение возможности проведения десорбции антигена вируса SARS-CoV-2 в готовых лекарственных формах адсорбированных вакцин и определение концентрации антигена вируса с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)» для количественного определения S-белка вируса SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа (ИФА). **Материалы и методы:** в работе были использованы образцы четырех серий вакцины BBIBP-CorV (CNBG, Sinopharm, Китай) и трех серий вакцины CoronaVac (Sinovac Biotech, Китай). Десорбцию антигена проводили в соответствии с ФС.3.3.1.0029.15 Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV), а количественное определение S-антигена вируса SARS-CoV-2 — с использованием набора реагентов для ИФА «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)» (АО БТК «Биосервис», Россия). **Результаты:** в исследованных образцах четырех серий вакцины BBIBP-CorV концентрация S-антигена в десорбированных образцах варьировала в среднем от 61 до 129 нг/мл, а в образцах трех серий вакцины CoronaVac — от 461 до 533 нг/мл. **Выводы:** была показана возможность десорбции специфического антигена вируса SARS-CoV-2 с гидроокиси алюминия по методике ФС.3.3.1.0029.15 ГФ РФ XIV. Показана возможность количественной оценки содержания S-антигена в десорбированном препарате и в супернатанте с использованием набора реагентов для ИФА «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)». Разница в концентрациях S-антигена в десорбированных препаратах между двумя разными производителями составляла от 3,6 до 8,7 раза.

Ключевые слова: вакцина инактивированная цельновирионная адсорбированная; коронавирус SARS-CoV-2; S-антиген; иммуноферментный анализ; концентрация антигена; десорбция антигена

Для цитирования: Оксанич А.С., Красько А.Г., Самарцева Т.Г., Гасич Е.Л., Игнатъев Г.М. Применение количественного иммуноферментного анализа для определения концентрации S-антигена в цельновирионных инактивированных адсорбированных коронавирусных вакцинах. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):405–413. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-405-413>

The use of quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of S-antigen concentration in whole-virion inactivated adsorbed coronavirus vaccines

A.S. Oksanich^{1,✉}, A.G. Krasko², T.G. Samartseva¹, E.L. Gasich², G.M. Ignatyev¹

¹ I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 5A Maly Kazenny Ln., Moscow 105064, Russian Federation

² Republican Research and Practical Center for Epidemiology and Microbiology, 23 Filimonov St., Minsk 220114, Republic of Belarus

✉ Aleksey S. Oksanich; oksanich@yahoo.com

Abstract

The severe consequences and high mortality of COVID-19 prompted the development of a wide range of preventive vaccines. The first vaccines to be tested were developed in China and formulated as inactivated SARS-CoV-2 adsorbed on aluminium hydroxide. One of the quality indicators for inactivated adsorbed vaccines is the degree of adsorption, which can be used to control the content not only of non-adsorbed antigen, but also of specific antigen in one dose of a vaccine. **The aim of the study** was to investigate the possibility of desorbing SARS-CoV-2 antigen from formulated adsorbed vaccines and the possibility of measuring its concentration using the BioScan-SARS-CoV-2 (S) ELISA kit for SARS-CoV-2 S-protein content determination. **Materials and methods:** the study used four batches of BBIBP-CorV by CNBG, Sinopharm (China) and three batches of CoronaVac by Sinovac Biotech (China). The authors desorbed SARS-CoV-2 S antigen in accordance with monograph FS.3.3.1.0029.15 of the State Pharmacopoeia of the Russian Federation edition XIV (Ph. Rus.), and quantified it using the BioScan-SARS-CoV-2 (S) ELISA kit by Bioservice Biotechnology Co. Ltd. (Russia). **Results:** mean S-antigen concentrations in the desorbed samples ranged from 61 to 129 ng/mL for BBIBP-CorV and from 461 to 533 ng/mL for CoronaVac. **Conclusions:** the study demonstrated the possibility of specific SARS-CoV-2 antigen desorption from the surface of aluminium hydroxide using the Ph. Rus. method, as well as the possibility of S-antigen quantification in desorbed medicinal products and supernatants using the BioScan-SARS-CoV-2 (S) ELISA kit. The authors observed 3.6- to 8.7-fold difference between the S-antigen concentrations of the desorbed preparations by the two manufacturers.

Key words: whole-virion inactivated adsorbed vaccine; SARS-CoV-2 coronavirus; S antigen; ELISA; antigen concentration; antigen desorption

For citation: Oksanich A.S., Krasko A.G., Samartseva T.G., Gasich E.L., Ignatyev G.M. The use of quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of S-antigen concentration in whole-virion inactivated adsorbed coronavirus vaccines. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):405–413. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-405-413>

Введение

С декабря 2019 г. возбудитель новой коронавирусной инфекции, SARS-CoV-2, вызываю-

щий тяжелый острый респираторный синдром, распространился по всему миру, что привело к объявлению Всемирной организацией

здравоохранения (ВОЗ) 11 марта 2020 г. пандемии¹. Развитие пандемии обусловило разработку, производство, доклинические и клинические исследования, а потом и применение целого ряда профилактических препаратов. Первые вакцины, об испытаниях которых было заявлено, были инактивированные вакцины, разработанные в Китае [1, 2]. Основой этих вакцин, как и индийской вакцины Covaxin (Bharat Biotech, Индия), являлся инактивированный вирус SARS-CoV-2, адсорбированный на гидроксиде алюминия [1–7]. В состав российской вакцины КовиВак (ФГБНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов имени М.П. Чумакова РАН», Россия) также входят инактивированный вирус и гидроксид алюминия, но вакцина не характеризуется как адсорбированная, так как этот параметр не контролируется производителем [8].

Для инактивированных адсорбированных вакцин одним из основных показателей качества является полнота сорбции, что отражено в общей фармакопейной статье (ОФС) ОФС.1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины, представленной в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ XIV) и в Европейской фармакопее². Показатель полноты сорбции, характеризующий качество инактивированных адсорбированных вакцин, позволяет не только контролировать количество несорбированного на гидроксиде алюминия антигена, но и определить количество специфического антигена в дозе вакцины. В ГФ РФ XIV представлена ФС.3.3.1.0029.15 Вакцина для профилактики гепатита А культуральная, очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая, в которой описан метод контроля полноты сорбции препарата³.

Поскольку метод контроля полноты сорбции и определения содержания антигена применяется при контроле вакцины для профилактики вирусного гепатита А Альгавак®М (АО «Вектор-БиАльгам», Россия), его можно использовать и при контроле полноты сорбции антигена и концентрации антигена в вакцинах

коронавирусных адсорбированных. Таковыми являются вакцины BBIBP-CorV (CNBG, Sinopharm, Китай), CoronaVac (Sinovac Biotech, Китай), Covaxin (Bharat Biotech, Индия).

Цель работы – изучение возможности проведения десорбции антигена вируса SARS-CoV-2 в готовых лекарственных формах адсорбированных вакцин и определение концентрации антигена вируса с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)» для количественного определения S-белка вируса SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа.

Материалы и методы

Вакцины:

- BBIBP-CorV (Sinopharm COVID-19 Vaccine) – вакцина против COVID-19 производства CNBG (Sinopharm), Китай; четыре серии. Одобрена в Китае, Бахрейне, Объединенных Арабских Эмиратах;
- CoronaVac – вакцина против COVID-19 производства Sinovac Biotech, Китай; три серии. Вакцина одобрена ВОЗ;
- Альгавак®М – вакцина для профилактики вирусного гепатита А, производства АО «Вектор-БиАльгам», Россия. Разрешена к применению в Российской Федерации⁴;
- Флю-М Тетра – вакцина гриппозная четырехвалентная инактивированная расщепленная производства ФГУП СПбНИИВС ФМБА России. Разрешена к применению в Российской Федерации⁵.

Наборы реагентов для иммуноферментного анализа:

- набор реагентов для иммуноферментного выявления антигена вируса гепатита А «ВГА-антиген-ИФА-БЕСТ» (D-0356), серия 8, производства АО «Вектор-Бест», Россия;
- набор реагентов для количественного выявления S-антигена нового коронавируса человека SARS-CoV-2 в культуральных образцах методом иммуноферментного анализа «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)» (E-2455), производства АО БТК «Биосервис», Россия.

¹ Rolling updates on coronavirus disease (COVID-19). WHO. www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/events-as-they-happen

² Общая фармакопейная статья 1.7.1.0004.15 Вакцины и анатоксины. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 2; 2018. Monograph 01/2008:20513 Aluminium in adsorbed vaccines. European Pharmacopoeia. 10th ed. Strasbourg; 2021.

³ Фармакопейная статья 3.3.1.0029.15 Вакцина для профилактики гепатита А культуральная, очищенная концентрированная адсорбированная инактивированная жидкая. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 4; 2018.

⁴ <https://grls.rosminzdrav.ru>

⁵ Там же.

Проведение десорбции вирусного антигена с гидрооксида алюминия

Приготовление раствора для проведения десорбции. Раствор десорбции (РД) готовили в соответствии с ФС.3.3.1.0029.15 ГФ РФ XIV. В мерный стакан из термостойкого стекла объемом 250 мл вносили 150 мл воды очищенной и подогревали до температуры 40 °С. В подогретую воду вносили 200 мг желатина и на магнитной мешалке размешивали до полного его растворения. Затем добавляли 28,64 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich, США) и 220 мг трилона Б (Sigma-Aldrich, США). После полного растворения к полученному раствору добавляли 200 мкл твин-20 (Sigma-Aldrich, США). Доводили pH раствора до 8,5. Полученный раствор переливали в мерную колбу объемом 200 мл и доводили объем до метки водой очищенной. Для длительного хранения в полученный раствор в качестве консерванта добавляли мертиолят в количестве 0,02 г и переливали в емкость с притертой стеклянной пробкой. Раствор хранили при комнатной температуре не более 6 месяцев.

Подготовка исследуемого образца. Суспензию исследуемого препарата объемом 0,5 мл (доза) помещали в микропробирку объемом 1,5 мл и в течение 5 мин центрифугировали на центрифуге ELMi CM-50 (Elmi, Латвия) при 6000 g при комнатной температуре. Отбирали 450 мкл надосадочной жидкости в чистую пробирку и оставляли на 18 ч в холодильнике при температуре 2–8 °С для последующего анализа, а к осадку добавляли 450 мкл РД. Пробирку встряхивали на вортексе и оставляли на 18 ч при комнатной температуре (18–24 °С). Спустя 18 ч пробирку центрифугировали в течение 10 с при 6000 g и надосадочную жидкость перенесли в чистую пробирку для проведения иммуноферментного анализа. Таким образом было получено по 2 образца для анализа каждого из исследованных образцов вакцин: надосадочная жидкость и десорбированный образец.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Для количественного определения S-антигена нового коронавируса человека SARS-CoV-2 в исследуемых образцах применяли набор реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)», основанный на одностадийном «сэндвич»-варианте метода ИФА. На поверхности лунок 96-луночного полистиролового планшета иммобилизованы специфические моноклональные антитела (MAT) к рецептор-связывающему домену (receptor-binding domain, RBD) Spike-белка (S-антиген) вируса SARS-CoV-2. В лунки планшета вносили калибратор в соответствии

с инструкцией производителя, положительный (K^+) и отрицательный (K^-) контрольные образцы, исследуемые образцы, а также конъюгат, представляющий собой MAT к другому эпитопу RBD Spike-белка, меченные пероксидазой хрена. Если в исследуемом образце присутствовал S-антиген, то при инкубации происходило его связывание с MAT на поверхности планшета и с конъюгатом. После отмыывания несвязанных молекул в лунки планшета добавляли индикаторный раствор, включающий субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин с перекисью водорода. Ферментативная реакция пероксидазы с субстратом в присутствии перекиси водорода приводила к его окислению и образованию окрашенного продукта, интенсивность окрашивания которого пропорциональна концентрации антигена в образце. После остановки реакции стоп-реагентом интенсивность окрашивания раствора измеряли на планшетном спектрофотометре (LisaScan EM, Erba Mannheim, Чехия) по оптическому поглощению при длине волны 450 нм (длина волны сравнения 620–650 нм). При построении калибровочной прямой использовали программное обеспечение спектрофотометра согласно инструкции производителя и программное обеспечение Microsoft Office Excel (Microsoft, США).

Результаты и обсуждение**Количественное определение S-антигена SARS-CoV-2 методом иммуноферментного анализа и построение калибровочного графика**

Количественное определение S-антигена SARS-CoV-2 в исследуемых образцах проводили методом ИФА (одностадийный «сэндвич»-вариант ИФА) с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)». Калибратор, используемый в наборе реагентов, представлял собой высокоочищенный рекомбинантный коммерческий S-антиген (MyBioSource MBS2563881, США), полученный в эукариотической системе экспрессии. Для количественной оценки содержания S-белка на основании полученных в результате ИФА оптических плотностей (ОП) для калибровочных образцов строили график зависимости ОП_{450} от концентрации S-белка в исследуемом препарате (рис. 1). График описывается формулой (1):

$$y = ax - b, \quad (1)$$

где y — ОП образца, x — концентрация белка, a и b — постоянные коэффициенты.

Для расчета концентрации использовали формулу (2):

$$x = (y + b)/a \times 10, \quad (2)$$

где 10 — коэффициент, учитывающий 10-кратное разведение исследуемого образца в лунке планшета.

Поскольку на поверхности каждого вириона SARS-CoV-2 располагается в среднем 90 пепломеров (тримеров S-белка), то есть 270 молекул S-антигена (молекулярная масса каждого 180 кДа), а масса 1 вириона составляет примерно 1 фг, то S-белок составляет около 8% от массы вириона вируса SARS-CoV-2 [9]. Таким образом, можно считать, что коэффициент пересчета массы S-антигена в массу цельновирионного препарата составляет 12,5 ($100/8 = 12,5$).

Для перевода количества S-антигена в общее количество вирусного белка в вакцине (мкг/мл) необходимо воспользоваться формулой (3):

$$C = 12,5 \times x, \quad (3)$$

где C — расчетная концентрация специфического белка в вакцине (мкг/мл), x — концентрация S-антигена (мкг/мл) в цельновирионной вакцине.

Доза специфического антигена в вакцинах CoronaVac и BBIBP-CorV оценивается в условных единицах — 600 SU и 6,5 U соответственно. Производитель не указывает, чему соответствует каждая из единиц. При проведении доклинических и клинических исследований фаз I–II производители указывали концентрации антигена в микрограммах — от 1,5 до 10 [1–4]. Однако в публикациях о результатах клинических исследований III фазы доза вакцины указывается уже в условных единицах активности [10].

В вакцине КовиВак содержание антигена нормируется как не менее 3 мкг на дозу. В доклинических исследованиях было показано, что именно доза от 3 мкг обеспечивает

формирование специфического гуморального и клеточного иммунитета [8]. На этом основании можно предположить, что содержание S-антигена для вакцины КовиВак должно составлять на дозу не менее 240 нг ($3 \text{ мкг}/12,5 = 0,24 \text{ мкг} = 240 \text{ нг}$) или 480 нг/мл.

Исследование чувствительности и специфичности набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)»

Оценка аналитической чувствительности набора реагентов. Для оценки чувствительности набора реагентов были исследованы коммерческие рекомбинантные белки SARS-CoV-2: S-антиген и RBD (MyBioSource, США), с известной концентрацией аффинно-очищенного белка. Аналитическая чувствительность тест-системы составила: по S-антигену — 2 нг/мл, по RBD — 100 пг/мл, что согласуется с особенностями строения вируса и молекулярными массами белков [9]. S-белок в нативном состоянии представляет собой пепломер, состоящий из трех молекул S-белка, то есть его молекулярная масса составляет примерно 540 кДа ($180 \text{ кДа} \times 3$). Рекомбинантный антиген RBD имеет молекулярную массу около 26 кДа, и, в отличие от S-белка, он не собирается в тримеры и в растворе представлен в виде мономеров. Исходя из соотношения молекулярных масс S-антигена и MAT, с одним пепломером, вероятно, может взаимодействовать только одна пара антител (MAT на твердой фазе и MAT конъюгата), так же как и с RBD. Расчетное соотношение молекулярных масс пепломера и RBD составляет 20,8 ($540 \text{ кДа}/26 \text{ кДа} = 20,8$), что согласуется с аналитической чувствительностью, полученной при ее оценке набором реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)» — 2 нг/мл и 100 пг/мл для S-антигена и RBD соответственно, соотношение также составляет 20 раз ($2 \text{ нг}/0,1 \text{ нг} = 20$).

Оценка специфичности набора реагентов в отношении сорбированных вакцин. На первом этапе исследования использовали набор реагентов «ВГА-антиген-ИФА-БЕСТ», который применялся авторами при оценке полноты сорбции антигена в вакцине Альгавак®М. Для исследования использовали образцы вакцин Альгавак®М, CoronaVac и BBIBP-CorV после десорбции антигена (как описано в подразделе «Подготовка исследуемого образца» раздела «Материалы и методы»). Подготовку образца вакцины Флю-М, не содержащей гидроокись алюминия, проводили путем центрифугирования, отбора супернатанта и последующей подготовки «осадка», как описано в подразделе «Подготовка исследуемого образца» раздела «Материалы

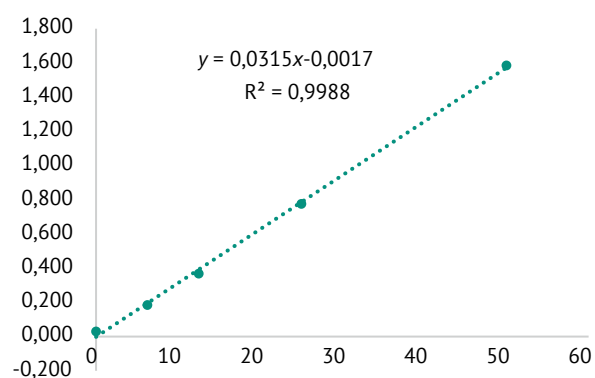


Рис. 1. Калибровочный график, полученный с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)». Ось ординат — оптическая плотность при 450 нм, ось абсцисс — концентрация S-антигена, нг/мл.

Fig. 1. Calibration curve obtained with the BioScan-SARS-CoV-2 (S) reagent kit. The Y axis shows absorbance values at 450 nm; the X axis shows S-antigen concentrations, ng/mL.

и методы». Полученные исследуемые образцы вакцин (надосадочная жидкость и десорбированный материал) были проанализированы на наличие антигена вируса гепатита А методом ИФА с использованием набора реагентов «ВГА-антиген-ИФА-БЕСТ». Результаты качественного определения антигена в исследуемых образцах представлены в таблице 1.

Было показано, что вакцина Альгавак®М содержит специфический антиген вируса гепатита А только в десорбированном образце. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в готовом препарате вакцины антиген сорбирован. Во всех остальных вакцинах антиген гепатита А не детектировался, что свидетельствует об отсутствии ложноположительных результатов. Поскольку авторы не располагали информацией о количестве антигена гепатита А, использованного для сорбции на гидроокиси алюминия при получении исследуемой серии вакцины Альгавак®М, невозможно было провести исследование на полноту сорбции, но производитель Альгавак®М такое исследование проводит в соответствии с нормативной документацией, оценивая концентрацию антигена до сорбции и после десорбции.

В дальнейших исследованиях вакцины Альгавак®М и Флю-М были использованы для контроля специфичности набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)» при определении содержания антигена SARS-CoV-2 в препаратах вакцин.

На втором этапе работы проводили качественное определение антигена SARS-CoV-2 в исследуемых вакцинах. Для этого десорбировали антиген согласно методике, после чего определяли содержание специфического антигена вируса SARS-CoV-2 методом ИФА с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)» (табл. 2).

Из представленных данных следует, что антиген вируса SARS-CoV-2 отсутствовал как в надосадочной жидкости (до десорбции), так и в десорбированных образцах вакцин Альгавак®М и Флю-М, что может свидетельствовать о специфичности набора реагентов. В десорбированных образцах инактивированных вакцин против COVID-19 специфический антиген определялся, а в надосадочной жидкости — нет. Это подтверждает, что в вакцинах BBIBP-CorV и CoronaVac антиген сорбирован на гидроокиси алюминия полностью.

Количественное определение антигена SARS-CoV-2 в вакцинах CoronaVac и BBIBP-CorV с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)»

Вакцины CoronaVac и BBIBP-CorV являются адсорбированными — на гидроокиси алюминия сорбирован инактивированный антиген вируса SARS-CoV-2. Доза антигена в вакцине CoronaVac составляет 600 SU, а в вакцине BBIBP-CorV — 6,5 U. Нет никаких указаний на то, какому количеству антигена соответствуют условные единицы в каждой из вакцин. На этапе доклинических и клинических исследований фаз I–II указывались дозы вакцин в микрограммах. Было отмечено, что доза должна быть не менее 2 мкг для вакцины BBIBP-CorV и 3 мкг для вакцины CoronaVac [1–4, 10]. Эти результаты согласуются с данными о вакцине КовиВак, где доза определена как не менее 3 мкг [8].

Далее в работе определяли концентрацию специфического антигена в образцах исследуемых вакцин с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)» и проводили расчет соответствия условных единиц дозы вакцин

Таблица 1. Определение наличия антигена вируса гепатита А в образцах исследованных вакцин с помощью набора реагентов «ВГА-антиген-ИФА-БЕСТ»

Table 1. Detection of hepatitis A antigen in the studied vaccine samples using the HAV-antigen-EIA-BEST ELISA kit

Вакцина <i>Vaccine</i>	Наличие антигена вируса гепатита А <i>Presence of hepatitis A antigen</i>	
	надосадочная жидкость <i>supernatant</i>	десорбированный образец <i>desorbed sample</i>
Альгавак®М <i>Algavac®M</i>	Нет <i>Negative</i>	Есть <i>Positive</i>
CoronaVac	Нет <i>Negative</i>	Нет <i>Negative</i>
BBIBP-CorV	Нет <i>Negative</i>	Нет <i>Negative</i>
Флю-М <i>Flu-M</i>	Нет <i>Negative</i>	Нет <i>Negative</i>

Примечание. Нет — антиген не выявлен. Есть — подтверждено наличие антигена.

Note. Negative—no antigen detected. Positive—antigen detected.

Таблица 2. Определение наличия S-антигена вируса SARS-CoV-2 в образцах исследованных вакцин с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)»**Table 2.** Detection of SARS-CoV-2 S-antigen in the studied vaccine samples using the BioScan-SARS-CoV-2 (S) ELISA kit

Вакцина <i>Vaccine</i>	Наличие S-антигена вируса SARS-CoV-2 <i>Presence of SARS-CoV-2 S-antigen</i>	
	надосадочная жидкость <i>supernatant</i>	десорбированный образец <i>desorbed sample</i>
Альгавак®М <i>Algavac®M</i>	Нет <i>Negative</i>	Нет <i>Negative</i>
CoronaVac	Нет <i>Negative</i>	Есть <i>Positive</i>
BBIBP-CorV	Нет <i>Negative</i>	Есть <i>Positive</i>
Флю-М <i>Flu-M</i>	Нет <i>Negative</i>	Нет <i>Negative</i>

Примечание. Нет — антиген не выявлен. Есть — подтверждено наличие антигена.*Note.* Negative—no antigen detected. Positive—antigen detected.

CoronaVac и BBIBP-CorV весовым значениям содержания антигена в вакцинах.

Для определения количества S-антигена, адсорбированного на гидроокиси алюминия, использовали образцы четырех серий вакцины BBIBP-CorV и трех серий вакцины CoronaVac. При определении концентраций S-антигена использовали калибровочную прямую (рис. 1), полученную с использованием калибраторов, входящих в состав набора. Калибратор представляет собой рекомбинантный полноразмерный S-антиген. При оценке содержания специфического S-антигена каждый образец исследовали в трех повторях, определяя среднее значение и стандартное отклонение показателя. Результаты представлены в таблице 3.

Во всех исследуемых сериях вакцинных препаратов (табл. 3) антиген адсорбирован на поверхности гидроокиси алюминия, поскольку в супернатанте антиген не был обнаружен. После десорбции S-антиген определялся во всех образцах, но его концентрация зависела от производителя и лота вакцины. В исследованных сериях вакцины BBIBP-CorV концентрация S-антигена в десорбированных образцах варьировала в среднем от 61 до 129 нг/мл. Полученные результаты свидетельствуют либо о неполной десорбции антигена с гидроокиси алюминия, либо об определении концентрации специфического антигена производителем не по S-белку, а, например, по содержанию общего белка. Также большой разброс концентраций S-антигена в разных лотах вакцины может свидетельствовать о проблемах логистики и хранения, из-за чего часть специфического белка могла разрушиться. Средняя расчетная концентрация специфического антигена (C) в четырех сериях вакцины BBIBP-CorV составила $1,25 \pm 0,20$ мкг/мл

(0,625 мкг на дозу), что не совпадает с заявленной производителем на этапах доклинического исследования и I–II фазы клинического исследования минимальной дозой 2,0 мкг [2, 4].

В исследованных сериях вакцины CoronaVac концентрация S-антигена в десорбированных образцах варьировала в среднем от 461 до 533 нг/мл. Среднее значение концентрации специфического S-антигена в трех сериях составило $504,20 \pm 24,33$ нг/мл. Таким образом, значение расчетной концентрации специфического антигена составило $6,30 \pm 0,30$ мкг/мл (3,15 мкг на дозу), что совпадает с заявленной производителем на этапах доклинического исследования и клинического исследования I–II фазы дозой не менее 3 мкг [1, 3, 10]. Таким образом, можно предположить, что производитель вакцины BBIBP-CorV использует для определения содержания антигена показатель общего белка, а производитель CoronaVac — концентрацию специфического антигена (вероятно, S1 или RBD).

Заключение

Предложенный в ГФ РФ XIV метод оценки полноты сорбции антигена на гидроокиси алюминия является достаточно универсальным и может быть использован для контроля качества адсорбированных вакцин против COVID-19. Для определения специфического S-антигена вируса SARS-CoV-2 в десорбированных образцах вакцин может применяться количественный иммуоферментный метод с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)», а предложенный метод расчета позволяет определить концентрацию специфического антигена исходя из концентрации S-антигена. Такой подход может применяться на разных этапах производственного цикла при изготовлении

Таблица 3. Результаты количественного определения содержания S-антигена в образцах вакцин с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)»**Table 3.** Results of S-antigen quantification in the studied vaccine samples using the BioScan-SARS-CoV-2 (S) ELISA kit

№	Вакцина <i>Vaccine</i>	Надосадочная жидкость <i>Supernatant</i>	Десорбированный образец <i>Desorbed sample</i>	
		Концентрация S-антигена, нг/мл <i>S-antigen concentration, ng/mL</i>	Концентрация S-антигена, нг/мл, $M \pm m$ <i>S-antigen concentration, ng/mL, $M \pm m$</i>	Расчетная концентрация специфического белка в вакцине (C), мкг/мл <i>Estimated specific protein concentration in the vaccine (C), $\mu\text{g/mL}$</i>
1	BBIBP-CorV	Н.о. <i>N.d.</i>	60,55±1,85	0,76
2	BBIBP-CorV	Н.о. <i>N.d.</i>	128,95±5,43	1,61
3	BBIBP-CorV	Н.о. <i>N.d.</i>	90,67±8,05	1,13
4	BBIBP-CorV	Н.о. <i>N.d.</i>	121,50±2,31	1,52
Среднее значение по четырем сериям вакцины <i>Average value for four vaccine batches</i>			100,25±16,5	1,25±0,20
5	CoronaVac	Н.о. <i>N.d.</i>	532,87±9,18	6,66
6	CoronaVac	Н.о. <i>N.d.</i>	518,37±47,52	6,48
7	CoronaVac	Н.о. <i>N.d.</i>	461,57±24,55	5,77
Среднее значение по трем сериям вакцины <i>Average value for three vaccine batches</i>			504,20 ±24,33	6,30±0,30

Примечание. Н.о. — результат ниже предела обнаружения.

Note. N.d.—not detected (below the limit of detection).

цельновирионных вакцин для более точной оценки специфического антигена в полуфабрикатах, так как при наработке вируса в вируссо-державшей жидкости присутствует много других клеточных белков, и оценка общего белка не может в полной мере характеризовать качество и количество специфического антигена.

Показано, что разница в концентрациях S-антигена в десорбированных препаратах вакцин в разных сериях варьировала между двумя производителями (CNBG, Sinopharm и Sinovac Biotech) в диапазоне от 3,6 раза (129 и 461 нг/мл) до 8,7 раза (61 и 533 нг/мл) у BBIBP-CorV

и CoronaVac соответственно, при этом в вакцине BBIBP-CorV значения концентраций S-антигена в двух разных лотах могли различаться более чем в 2 раза (61 и 129 нг/мл), что можно объяснить тем, что под условными единицами дозировки в вакцине BBIBP-CorV подразумевается показатель общего белка. В то же время разброс значений концентрации S-антигена между лотами вакцины CoronaVac не превышал 15% — это может свидетельствовать об оценке содержания антигена в вакцине по концентрации специфического антигена при изготовлении готовой лекарственной формы.

Литература/References

- Zhang Y, Zeng G, Pan H, Li C, Hu Y, Chu K, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(2):181–92. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30843-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30843-4)
- Wang H, Zhang Y, Huang B, Deng W, Quan Y, Wang W, et al. Development of an inactivated vaccine candidate, BBIBP-CorV, with potent protection against SARS-CoV-2. *Cell.* 2020;182(3):713–21.e9. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.06.008>
- Han B, Song Y, Li C, Yang W, Ma Q, Jiang Z, et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy children and adolescents: a double-blind, randomised, controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis.* 2021;21(12):1645–53. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(21\)00319-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(21)00319-4)

4. Xia S, Duan K, Zhang Y, Zhao D, Zhang H, Xie Z, et al. Effect of an inactivated vaccine against SARS-CoV-2 on safety and immunogenicity outcomes: Interim Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA*. 2020;324(10):951–60. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.15543>
5. Doroftei B, Ciobica A, Ilie OD, Maftai R, Ilea C. Mini-review discussing the reliability and efficiency of COVID-19 Vaccines. *Diagnostics (Basel)*. 2021;11(4):579. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11040579>
6. Sharma R, Tiwari S, Dixit A. Covaxin: an overview of its immunogenicity and safety trials in India. *Bioinformation*. 2021;17(10):840–5. <https://doi.org/10.6026/97320630017840>
7. Ella R, Vadrevu KM, Jogdand H, Prasad S, Reddy S, Sarangi V, et al. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: a double-blind, randomised, phase 1 trial. *Lancet Infect Dis*. 2021;21(5):637–46. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30942-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30942-7)
8. Kozlovskaya LI, Piniaeva AN, Ignatyev GM, Gordyuchuk IV, Volok VP, Rogova YV, et al. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. *Emerg Microbes Infect*. 2021;10(1):1790–806. <https://doi.org/10.1080/22221751.2021.1971569>
9. Bar-On YM, Flamholz A, Phillips R, Milo R. Science Forum: SARS-CoV-2 (COVID-19) by the numbers. *Elife*. 2020;9:e57309. <https://doi.org/10.7554/eLife.57309>
10. Benjamanukul S, Traian S, Yorsaeng R, Vichaiwattana P, Sudhinaraset N, Wanlapakorn N, Poovorawan Y. Safety and immunogenicity of inactivated COVID-19 vaccine in health care workers. *J Med Virol*. 2022;94(4):1442–9. <https://doi.org/10.1002/jmv.27458>

Вклад авторов. А.С. Оксанич — разработка дизайна исследования, проведение исследований, обработка полученных результатов, обсуждение результатов исследований, написание и критическое обсуждение текста рукописи; А.Г. Краско — формулирование идеи исследования, обсуждение результатов; Т.Г. Самарцева — проведение исследований, обработка полученных результатов; Е.Л. Гасич — обсуждение дизайна исследования, обсуждение результатов исследования; Г.М. Игнатьев — разработка дизайна исследования, проведение исследований, обсуждение результатов исследования, критическое обсуждение текста рукописи.

Благодарности. Исследование проводилось без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Г.М. Игнатьев является членом редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

Authors' contributions. A.S. Oksanich—elaboration of the study design, execution of the experimental study, processing and discussion of the results, writing and critical revision of the text of the manuscript; A.G. Krasko—formulation of the study idea, discussion of the results; T.G. Samartseva—execution of the experimental study, processing of the results; E.L. Gasich—discussion of the study design and results; G.M. Ignatyev—elaboration of the study design, execution of the experimental study, discussion of the results, critical revision of the text of the manuscript.

Acknowledgements. This study was carried out with no external funding.

Conflict of interest. G.M. Ignatyev is a member of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Оксанич Алексей Сергеевич, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>
oksanich@yahoo.com

Краско Анатолий Геннадиевич, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2765-3525>
kraskoa@gmail.com

Самарцева Татьяна Геннадьевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>
samartseva08020@mail.ru

Гасич Елена Леонидовна, д-р биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3662-3045>
elena.gasich@gmail.com

Игнатьев Георгий Михайлович, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>
marburgman@mail.ru

Aleksey S. Oksanich, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8600-7347>
oksanich@yahoo.com

Anatoly G. Krasko, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2765-3525>
kraskoa@gmail.com

Tatiana G. Samartseva. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>
samartseva08020@mail.ru

Elena L. Gasich, Dr. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3662-3045>
elena.gasich@gmail.com

Georgy M. Ignatyev, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9731-3681>
marburgman@mail.ru

Поступила 11.08.2022

После доработки 07.11.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Received 11 August 2022

Revised 7 November 2022

Accepted 7 December 2022



Доклинические исследования противовирусной активности гибридного белка RPH-137 и молнупиравира в отношении COVID-19

Е.В. Шипаева^{1,✉}, О.В. Филон¹, А.В. Зинченко¹, Г.А. Шипунов¹, А.А. Дмитриева¹, М.С. Лемак¹, С.А. Гришин¹, Е.И. Трофимец², К.Л. Крышень², Л.И. Козловская³, А.С. Лунин³, В.Д. Аполохов³, С.Ф. Барбашов⁴, Я.В. Лавровский⁴, М.Ю. Самсонов¹

¹ Акционерное общество «Р-Фарм», Ленинский проспект, д. 111/1, Москва, 119421, Российская Федерация

² Акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ», Заводская ул., д. 3-245, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, п. Кузьмолковский, 188663, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное научное учреждение «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), поселение Московский, поселок Института полиомиелита, вл. 8, к. 1, Москва, 108819, Российская Федерация

⁴ Р-Фарм Оверсиз инк, ул. Кост-Бульвар-Саус, д. 505, офис 102, Ла-Хойя, г. Сан-Диего, штат Калифорния, 92037, Соединенные Штаты Америки

✉ Шипаева Елена Владимировна; shipaeva@rpharm.ru

Резюме

Поиск эффективных и безопасных лекарственных средств для борьбы с коронавирусной инфекцией, вызванной вирусом SARS-CoV-2, является актуальной задачей. RPH-137 — оригинальный гибридный белок-ловушка вируса SARS-CoV-2, состоящий из внеклеточного домена ангиотензинпревращающего фермента 2 типа и Fc-фрагмента IgG1 человека. **Цель работы:** доклиническая оценка эффективности RPH-137 и молнупиравира в отношении инфекции, вызванной SARS-CoV-2. **Материалы и методы:** RPH-137 получали в стабильной линии клеток китайского хомячка. В работе использовали субстанцию молнупиравира. Изучение ингибирования вирус-индуцированной цитотоксичности проводили в культуре клеток Vero. В исследовании эффективности *in vivo* сирийских хомячков заражали интраназально SARS-CoV-2 (вариант ПИК35) в дозе 5 lg ТЦД₅₀. Оценивали массу тела, массовый коэффициент и гистологическую картину легких. В орофарингеальных мазках измеряли содержание вирусной РНК методом ОТ-ПЦР по показателю порогового цикла амплификации Ct. Статистическая обработка: однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA), t-тест Стьюдента, критерий Манна-Уитни. **Результаты:** RPH-137 и молнупиравир ингибировали цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero: для RPH-137 EC₅₀=4,69 мкг/мл (21,3 нМ) и 16,24 мкг/мл (73,8 нМ) для доз 50 ТЦД₅₀ и 200 ТЦД₅₀ соответственно, для молнупиравира EC₅₀=0,63 мкг/мл (1900 нМ) для обеих доз вируса. RPH-137 при внутримышечном введении в дозах 30 и 80 мг/кг не оказывал влияния на развитие инфекции у сирийских хомячков. RPH-137 при внутрибрюшинном введении в дозе 100 мг/кг показал статистически значимый эффект по ряду параметров по сравнению с животными контрольной группы (контроль заражения), в том числе вызывая снижение воспалительного процесса и общей площади поражения легких на 7 сут на 27 и 30% соответственно. Молнупиравир при пероральном введении в дозе 300 мг/кг 2 раза в сут значимо подавлял развитие инфекции, вызванной SARS-CoV-2. **Выводы:** RPH-

137 и молнупиравир ингибируют цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero. У сирийских хомячков введение молнупиравира демонстрировало более выраженное подавление инфекции, вызванной SARS-CoV-2, по сравнению с RPH-137. Однако RPH-137 проявлял статистически значимое действие по ряду параметров, что открывает перспективы для его дальнейшего изучения.

Ключевые слова: SARS-CoV-2; молнупиравир; RPH-137; культура клеток Vero; сирийские хомячки; эффективность; ОТ-ПЦР

Для цитирования: Шипаева Е.В., Филон О.В., Зинченко А.В., Шипунов Г.А., Дмитриева А.А., Лемак М.С., Гришин С.А., Трофимец Е.И., Крышень К.Л., Козловская Л.И., Лунин А.С., Аполухов В.Д., Барбашов С.Ф., Лавровский Я.В., Самсонов М.Ю. Доклинические исследования противовирусной активности гибридного белка RPH-137 и молнупиравира в отношении COVID-19. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):414–434. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-414-434>

Preclinical studies of antiviral activity of the RPH-137 fusion protein and molnupiravir against COVID-19

E.V. Shipaeva^{1,✉}, O.V. Filon¹, A.V. Zintchenko¹, G.A. Shipunov¹, A.A. Dmitrieva¹, M.S. Lemak¹, S.A. Grishin¹, E.I. Trofimets², K.L. Kryshen², L.I. Kozlovskaya³, A.S. Lunin³, V.D. Apolokhov³, S.F. Barbashov⁴, Ya.V. Lavrovsky⁴, M.Yu. Samsonov¹

¹ R-Pharm JSC, 111/1 Leninsky Ave, Moscow 119421, Russian Federation

² Research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY", 3/245 Zavodskaya St., Kuzmolovsky urban-type settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation

³ Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences (Institute of Poliomyelitis), 8/1 Village of the Institute of Poliomyelitis, Moskovsky settlement, Moscow 108819, Russian Federation

⁴ R-Pharm Overseas, Inc., 505 Coast Boulevard South, Suite 102, La Jolla, CA 92037, USA

✉ Elena V. Shipaeva; shipaeva@rpharm.ru

Abstract

Finding effective and safe medicines to fight SARS-CoV-2 infection is an urgent task. RPH-137 is an original trap fusion protein against SARS-CoV-2 virus. It comprises the angiotensin-converting enzyme type 2 extracellular domain and the human IgG1 Fc fragment. **The aim of the study** was to carry out a preclinical evaluation of the efficacy of RPH-137 and molnupiravir against SARS-CoV-2 infection. **Materials and methods:** the authors analysed RPH-137 expressed in a stable CHO cell line and molnupiravir used as an active pharmaceutical ingredient. Drug-mediated inhibition of virus-induced cytotoxicity was assessed in Vero cell culture. *In vivo* efficacy assessments were performed in Syrian hamsters. The animals were infected intranasally with SARS-CoV-2 (PIK35 clinical isolate) in the dose of 5 log TCID₅₀. The authors evaluated body weight measurements, lung-body weight ratios, and lung histopathology findings and determined viral RNA levels in oropharyngeal swabs by RT-PCR using the amplification cycle threshold (Ct). The statistical analyses involved one- and two-way ANOVA, Student's *t*-test, and Mann-Whitney test. **Results:** RPH-137 and molnupiravir inhibited the cytopathic effect of SARS-CoV-2 in Vero cells; the EC₅₀ values of RPH-137 amounted to 4.69 µg/mL (21.3 nM) and 16.24 µg/mL (73.8 nM) for 50 TCID₅₀ and 200 TCID₅₀, respectively, whereas the EC₅₀ values of molnupiravir were 0.63 µg/mL (1900 nM) for both doses. Intramuscular RPH-137 (30 and 80 mg/kg) had no effect on the infection process in Syrian hamsters. The comparison with the challenge control group showed that intraperitoneal RPH-137 (100 mg/kg) had statistically significant effects

on a number of parameters, including a 27% reduction in inflammation and a 30% reduction in the total lesion area of the lungs by Day 7. Intragastric molnupiravir (300 mg/kg twice daily) significantly inhibited SARS-CoV-2 infection. **Conclusions:** both RPH-137 and molnupiravir inhibited the cytopathic effect of SARS-CoV-2 in Vero cells. In Syrian hamsters, molnupiravir demonstrated a more pronounced inhibition of SARS-CoV-2 than RPH-137. However, RPH-137 had statistically significant effects on a range of parameters. This offers additional perspectives for further research.

Key words: SARS-CoV-2; molnupiravir; RPH-137; Vero cell culture; Syrian hamsters; efficacy; RT-PCR

For citation: Shipaeva E.V., Filon O.V., Zintchenko A.V., Shipunov G.A., Dmitrieva A.A., Lemak M.S., Grishin S.A., Trofimets E.I., Kryshen K.L., Kozlovskaya L.I., Lunin A.S., Apolokhov V.D., Barbashov S.F., Lavrovsky Ya.V., Samsonov M.Yu. Preclinical studies of antiviral activity of the RPH-137 fusion protein and molnupiravir against COVID-19. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):414–434. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-414-434>

Введение

В декабре 2019 г. в Китае в городе Ухань произошла крупная вспышка инфекционного заболевания COVID-19, вызванного коронавирусом типа 2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) [1, 2]. Многочисленные клинические случаи, ассоциированные с SARS-CoV-2, зарегистрированы в большинстве стран мира, и на начало октября 2022 г. количество случаев заражения в мире превышает 615 млн¹. Высокая изменчивость SARS-CoV-2 приводит к появлению новых вариантов вируса, способных уклоняться от ранее приобретенной иммунной защиты и изменять чувствительность к различным видам терапии, вызывая периодические подъемы заболеваемости COVID-19. В связи с этим поиск эффективных и безопасных лекарственных средств для борьбы с инфекцией, вызванной SARS-CoV-2, остается актуальной задачей фармацевтической отрасли.

RPH-137 — оригинальный гибридный белок, который состоит из внеклеточного домена человеческого ангиотензинпревращающего фермента 2 типа (АПФ2) и Fc-фрагмента человеческого IgG1. Известно, что рецептор АПФ2 используется SARS-CoV-2 для проникновения вируса в клетку [3]. Присутствие в гибридной молекуле RPH-137 внеклеточного домена АПФ2 способствует тому, что молекула RPH-137 может выступать в роли «ловушки», нейтрализующей вирус. Подобный подход специфической нейтрализации вируса SARS-CoV-2 описан в литературе [3–5] и имеет перспективу для лечения и профилактики COVID-19.

Молнупиравир — противовирусный препарат с известной активностью против SARS-CoV-2 [6]. Препарат представляет собой пролекарство, ме-

таболизирующееся до аналога рибонуклеозида N-гидроксицитидина (ННС). ННС распределяется в клетке и фосфорилируется с образованием фармакологически активного рибонуклеозидтрифосфата (ННС-ТР). ННС-ТР встраивается в вирусную РНК с помощью вирусной РНК-полимеразы, создавая ошибки в вирусном геноме путем включения гуанозина или аденозина в цепь РНК. С каждым циклом репликации вируса мутации накапливаются, что в итоге делает дочерний вирус SARS-CoV-2 неинфекционным и неспособным к репликации. Эффективность молнупиравира была показана ранее в доклинических и клинических исследованиях, что позволяет использовать его в качестве препарата сравнения при проведении исследований новых соединений [6–10].

Появление и стремительное распространение вируса SARS-CoV-2 способствовало разработке подходов для оценки эффективности противовирусных лекарственных средств на этапе доклинической разработки, включающих исследования *in vitro* и *in vivo*.

Исследования *in vitro* лекарственных средств для лечения инфекции SARS-CoV-2 предполагают изучение ингибирования вирус-индуцированной цитотоксичности в культурах клеток. Наиболее широко с этой целью используется культура клеток Vero (эпителий почки зеленой мартышки). Эта клеточная линия является традиционно используемой в вирусологии для работы с различными типами вирусов, в том числе вирусом гриппа и коронавирусами [11]. Особенностью этих клеток является выраженная экспрессия рецептора АПФ2, а также отсутствие выработки собственного интерферона [11, 12]

¹ <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>

в ответ на заражение вирусами. Несмотря на то что культура клеток Vero является удобной скрининговой моделью для оценки эффективности различных соединений для подавления репликации вируса SARS-CoV-2, метод имеет ряд серьезных ограничений, типичных для *in vitro* моделей, таких как отсутствие сложных межклеточных взаимодействий, характерных для дыхательных путей человека, и невозможность воспроизведения иммунного ответа на вирусную инфекцию.

Потенциальная противовирусная активность исследуемого лекарственного средства, продемонстрированная *in vitro*, должна быть подкреплена данными, полученными на животных моделях. Применение *in vivo* модели позволяет подтвердить эффективность при выбранном пути введения и концепцию клинического использования препарата, установить эффективные дозы, а также режим введения.

Вирус SARS-CoV-2 поражает разные виды млекопитающих, включая хомячков, хорьков, кошек, собак, приматов и др. [13]. Ни одна из известных на сегодняшний день животных моделей не отражает в полной мере клиническую картину COVID-19, наблюдаемую у человека [14]. Наиболее распространенной является модель инфекции SARS-CoV-2 легкой и умеренной степени тяжести на сирийских хомячках. Высокое сродство рецептора АПФ2 к SARS-CoV-2 у сирийских хомячков обеспечивает их восприимчивость к инфекции [15]. Было показано, что у этого вида животных вирус реплицируется как в нижних, так и верхних дыхательных путях с максимумом накопления на 2–3 сут после заражения. Интраназальное введение вируса SARS-CoV-2 приводит к поражению легких с развитием пневмонии, выраженному воспалительному и иммунному ответу. Инфекция характеризуется снижением активности и потерей массы тела животных на протяжении 5–7 сут после заражения. Кроме того, на данной модели была обнаружена связь тяжести течения заболевания с возрастом, аналогичная наблюдаемой у человека. Ограничения данной модели связаны с самостоятельной элиминацией вируса в течение 7–14 сут без развития тяжелых форм заболевания. В литературе описано использование хомячков для оценки эффективности вакцин и противовирусных препаратов разных классов [16].

Цель работы — доклиническая оценка эффективности RPH-137 и молнупиравира в отношении инфекции, вызванной SARS-CoV-2.

Материалы и методы

Материалы:

- RPH-137 (R-Pharm Overseas, Inc., США);
- субстанция молнупиравира (предоставлена АО «Р-Фарм Прогресс», Россия);
- препарат положительного контроля — β -d-N⁴-гидроксцитидин (β -d-N⁴-hydroxycytidine, NHC, BioVision, Inc., США; предоставлен ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»);
- ДМСО (Sigma Aldrich, США) (использовали в качестве препарата отрицательного контроля для *in vitro* исследований);
- среда ДМЕМ (Dulbecco's modified Eagle's medium) (ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия);
- вирус SARS-CoV-2, паспортизированный вариант ПИК35 (GISAID ID EPI_ISL_428852, клад GR, линия B.1.1, Европейский) из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», выделенный из культуры клеток Vero, зараженной материалом назофарингеального мазка пациента с COVID-19, в 2020 г. [17];
- культура клеток Vero (RCB 10-87, ВОЗ, Швейцария) из коллекции ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН».

В работе были использованы половозрелые сирийские хомячки *Mesocricetus auratus*: 80 самцов сирийских хомячков (получены из питомника ООО «Институт доклинических исследований», Россия) и 38 самок сирийских хомячков (получены из НПП «Питомник лабораторных животных» ИБХ РАН).

Методы

Получение гибридного белка RPH-137. Исследуемый гибридный белок RPH-137 (оригинальная молекула, разработка группы компаний «Р-Фарм», Россия) получали в стабильной линии клеток китайского хомячка [18]. Белок выделяли из осветленной культуральной жидкости, используя три этапа хроматографической очистки, включая хроматографию на сорбенте, содержащем иммобилизованный белок А. Для концентрации и перевода RPH-137 в буфер для приготовления доз применяли ультрафильтрацию и диалфильтрацию на кассете для тангенциальной фильтрации площадью 200 см². Чистота препарата (>99%) была подтверждена аналитической эксклюзионной хроматографией² и электрофорезом в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в восстанавливающих

² Общая фармакопейная статья 1.2.1.2.0007.18 Эксклюзионная хроматография. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

и невосстанавливающих условиях³. Прочное связывание RPH-137 с рекомбинантным S-белком вируса SARS-CoV-2 было подтверждено с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса [19].

Изучение эффективности молниупиравира и RPH-137 в отношении вируса SARS-CoV-2 в эксперименте in vitro. Исследование проводили с использованием вируса SARS-CoV-2 на клеточной линии Vero. В качестве положительного контроля использовали ННС, обладающий известной противовирусной активностью [20], в виде 5 мМ раствора в ДМСО. В качестве отрицательного контроля использовали серию разведений ДМСО в культуральной среде, соответствующих разведениям исследуемого препарата.

Для приготовления доз препарата RPH-137 готовили 50-кратный маточный раствор с концентрацией 1250 мкг/мл. Для препарата молниупиравира готовили 50 мМ раствор в ДМСО, который перед постановкой эксперимента разводили в 10 раз сывороткой крови человека, не содержащей нейтрализующих антител к SARS-CoV-2, до рабочей концентрации 5 мМ и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч.

Изучение противовирусной активности [21] исследуемых препаратов было проведено в реакции нейтрализации, где ингибирующее действие оценивали по способности препаратов подавлять индуцированную вирусом гибель клеток, регистрируемую как цитопатическое действие. Серию восьми последовательных двукратных разведений готовили из маточных растворов исследуемых препаратов и субстанции положительного контроля (ННС), начиная с разведения 1:25 в среде DMEM. Затем готовили 2 рабочих разведения вируса – 50 и 200 ТЦД₅₀ (50% тканевая цитопатическая доза) и смешивали с разведениями исследуемых препаратов 1:1 (конечная серия разведений 1:50). Смеси разведений исследуемых препаратов с вирусом инкубировали не менее 1 ч при 37 °C в CO₂-инкубаторе (5% CO₂). Далее смеси добавляли к монослою клеток Vero в 4 повторностях, и клетки инкубировали при 37 °C в CO₂-инкубаторе на протяжении 5 сут. После этого гибель клеток оценивали микроскопированием.

По графикам зависимости цитопатического действия вируса (%) от концентрации препара-

та находили значение показателя EC₅₀ (эффективная концентрация, подавляющая рост клеток на 50%). Расчет дозы вируса (ТЦД₅₀) и показателя EC₅₀ проводили по формуле Кербера [22]. Эксперимент для каждого исследуемого препарата повторяли два раза для расчета среднего значения EC₅₀. Расчеты и построение кривых были проведены с использованием программного обеспечения OriginPro 8 («OriginLab Corp.», США).

Оценка эффективности RPH-137 и молниупиравира на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков. Исследование с использованием лабораторных животных было одобрено на заседаниях биоэтической комиссии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» № 2.31/21 от 12.07.2021 и № 3.57/21 от 17.11.2021. Исследование проводили на половозрелых сирийских хомячках (*Mesocricetus auratus*) возрастом 6–8 недель на начало введения исследуемых препаратов. Эффективность RPH-137 изучали на самцах хомячков, молниупиравира – на самках. Животных содержали на базе испытательной площадки ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» в стандартных условиях⁴ в соответствии с Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза⁵. Животные получали гранулированный корм и питьевую воду *ad libitum*. Для исключения влияния предпочтений исследователя на формирование экспериментальных групп отбор животных проводили при помощи метода модифицированной блочной рандомизации [23].

В таблице 1 представлены характеристики экспериментальных групп.

При проведении исследований эффективности RPH-137 и молниупиравира в дизайн эксперимента была включена группа патологии без лечения, получавшая носитель (буферный раствор для приготовления доз) и являвшаяся контролем заражения. В эксперименте по оценке эффективности препарата молниупиравира дополнительно была включена группа интактных животных.

Заражение животных осуществляли под действием золотил-ксилазинового наркоза, путем однократного интраназального введения вирусосодержащего материала в объеме 25 мкл в каждый носовой ход (суммарно 50 мкл на одно животное), содержащего дозу 5 lg ТЦД₅₀ вируса SARS-CoV-2. На протяжении эксперимента

³ Общая фармакопейная статья 1.2.1.0023.15 Электрофорез в полиакриламидном геле. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIV изд. Т. 1; 2018.

⁴ ГОСТ 33216-2014. Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами.

⁵ Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. <http://data.europa.eu/eli/dir/2010/63/oj>

Таблица 1. Характеристика экспериментальных групп
Table 1. Characteristics of study groups

Описание группы Group description	Количество животных Number of animals	Доза исследуемого препарата (разовая), мг/кг Test item dose (single), mg/kg	Путь и курс введения Dosing regimen and route of administration	Сроки эвтаназии Euthanasia timepoints
Постановка эксперимента с RPH-137 RPH-137 experiment setup				
Контроль заражения Challenge control group	16	–	–	50% животных на 3 сут после заражения, оставшиеся 50% — на 7 сут после заражения Days 3 and 7 after infection (50% of the group at each timepoint)
	16	30	2 раза — за 1 сут до заражения и через 2 ч после заражения, в/м 2 times: 1 day before and 2 h after infection, i.m.	
	16	80		
	16	50	2 раза — за 1 сут до заражения и через 2 ч после заражения, в/б 2 times: 1 day before and 2 h after infection, i.p.	
	16	100		
Постановка эксперимента с молнупиравиром Molnupiravir experiment setup				
Группа интактных животных Intact group	3	–	–	На 3 сут после заражения Day 3 after infection
	3	–	–	На 7 сут после заражения Day 7 after infection
Группа животных с патологией без лечения (введение буферного раствора для приготовления доз) Untreated infected group (buffer solution administration)	8		2 раза в сут (первое введение за 30 мин до заражения), 3 сут, в/ж 2 times a day for 3 days (first dose 30 min before infection), i.g.	На 3 сут после заражения Day 3 after infection
	8	0	В/ж, 2 раза в сут (первое введение за 30 мин до заражения), 7 сут 2 times a day for 7 days (first dose 30 min before infection), i.g.	На 7 сут после заражения Day 7 after infection
Опытная группа (профилактическое применение молнупиравира) Experimental group (prophylactic treatment with molnupiravir)	8		В/ж, 2 раза в сут (первое введение за 30 минут до заражения), 3 сут 2 times a day for 3 days (first dose 30 min before infection), i.g.	На 3 сут после заражения Day 3 after infection
	8	300	В/ж, 2 раза в сут (первое введение за 30 мин до заражения), 7 сут 2 times a day for 7 days (first dose 30 min before infection), i.g.	На 7 сут после заражения Day 7 after infection

Примечание. «–» – неприменимо; в/м – внутримышечно; в/б – внутривенно; в/ж – внутривенно. Intragastric administration.
Note. – not applicable; i.m. – intramuscular administration; i.p. – intraperitoneal administration; i.g. – intragastric administration.

у животных контролировали общее состояние и массу тела. У животных отбирали орофарингеальные мазки для оценки содержания вирусной РНК методом ОТ-ПЦР по показателю St (пороговый цикл флуоресценции); положительным аналитическим сигналом являлось пересечение кривых накопления флуоресцентного сигнала с пороговой линией (согласно инструкции производителя: набор реагентов «ПОЛИВИР SARS-CoV-2 Express», Литех, Россия, серия 180/660е/21). Орофарингеальные мазки отбирали ежедневно в ходе эксперимента по оценке эффективности RPH-137 и трехкратно на 1, 3 и 5 сут после заражения в эксперименте по оценке эффективности молнупиравира. Схема проведения эксперимента приведена в таблице 2.

Эвтаназию животных проводили на третьи и седьмые сут после заражения путем передозировки комбинации препаратов ксилазина и золептила с последующим отбором крови. Животных подвергали некропии, легкие фотографировали и взвешивали для дальнейшей оценки массового коэффициента. При патоморфологическом обследовании проводили макроскопическую оценку легких по 5-балльной шкале, разработанной исследовательским центром, которая учитывает выраженность и объем поражения ткани. Доли правого легкого использовали для анализа наличия РНК вируса методом ОТ-ПЦР и инфекционного титра вируса методом титрования гомогената легочной ткани на клетках Vero (показатель Ig ТЦД₅₀/г ткани легкого). Левое легкое использовали для микроскопической оценки изменений. Гистологический анализ включал в себя оценку четырех показателей (выраженность патологии, признаки воспаления легких, клеточная инфильтрация и отек) и суммирование баллов; анализ проводили с использованием методики, описанной в работе N. Osterrieder с соавт. [24]. С помощью программного обеспечения «ВидеоТест-Размер 5.0» (ООО «Микроскоп Сервис», Россия) проводили оценку площади повреждения легких, согласно инструкции к программе, выраженную в процентах от общей площади среза.

Статистическая обработка данных. Для анализа данных применяли описательную статистику [25]. Данные были проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро–Уилка. Для оценки данных с признаками нормального распределения ис-

пользовали однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим сравнением с контрольной группой методом Даннета или критерием Тьюки. Для сравнения двух групп использовали *t*-тест Стьюдента. Для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, применяли критерий Манна–Уитни. Различия определяли при уровне значимости $p < 0,05$. Статистический анализ выполняли с помощью лицензионного программного обеспечения GraphPad Prism 9.0.0 («GraphPad Software», США).

Результаты и обсуждение

Изучение эффективности RPH-137 и молнупиравира in vitro по оценке ингибирования цитопатического действия вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero

По результатам проведенного эксперимента была продемонстрирована ингибирующая активность исследуемых препаратов RPH-137 и молнупиравира по отношению к вирусу SARS-CoV-2 в системе *in vitro* при двух заражающих дозах вируса 50 и 200 ТЦД₅₀. Значение показателя ингибирования цитопатического действия вируса (EC₅₀) для RPH-137 составило около 21,3 нМ (4,69±1,56 мкг/мл) для дозы вируса 50 ТЦД₅₀ и повысилось до 73,8 нМ (16,24±1,36 мкг/мл) с увеличением дозы вируса до 200 ТЦД₅₀ (табл. 3). Ингибирующая активность RPH-137 была ниже по сравнению с ранее изучавшимися моноклональными антителами⁶ [26]. Для аналогичных по механизму действия препаратов, являющихся «ловушками» для вируса SARS-CoV-2, также продемонстрировавших эффективность на животных моделях, значение показателя EC₅₀ составляло от 0,10 до 0,13 мкг/мл [27, 28]. Высокая противовирусная активность была показана для моноклональных антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, одобренных для клинического применения у пациентов с легким течением COVID-19: значение показателя EC₅₀ для бептеловимаба, бамланивиимаба и «коктейля» из моноклональных антител REGEN-COV2 (казиривимаб/имдевивимаб) составляло 0,044 нМ (6,4 нг/мл), 0,20–0,34 нМ (30–50 нг/мл) и 31 пМ (5 нг/мл) соответственно⁷ [29]. Более высокий уровень противовирусной активности этих препаратов может объясняться большей аффинностью и селективностью

⁶ Bepbelovimab Original Authorization 02112022. FDA. <https://www.fda.gov/media/156396>
Emergency Use Authorization (EUA) for bamlanivimab 700 mg IV: CDER Review Document. FDA. <https://www.fda.gov/media/144118>

⁷ Там же.

Таблица 2. Схема проведения экспериментов *in vivo* на сирийских хомячках
Table 2. Designs of *in vivo* experiments in Syrian hamsters

Описание группы <i>Group description</i>	Сутки эксперимента <i>Days of the experiment</i>								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Контроль заражения <i>Challenge control group</i>	К В <i>CA</i>	К М Э <i>CSI</i>	К М <i>CS</i>	К М <i>CS</i>	К М Э <i>CSE</i>	К М <i>CS</i>	К М <i>CS</i>	К М <i>CS</i>	К М Э <i>CSE</i>
Опытная группа (профилактическое применение RPH-137) <i>Experimental group (prophylactic treatment with RPH-137)</i>	К В <i>CA</i>	К М Э В <i>CSIA</i>	К М <i>CS</i>	К М <i>CS</i>	К М Э <i>CSE</i>	К М <i>CS</i>	К М <i>CS</i>	К М <i>CS</i>	К М Э <i>CSE</i>
Группа интактных животных <i>Intact group</i>	К <i>C</i>	К М <i>CS</i>	К <i>C</i>	К М Э <i>CSE</i>	К <i>C</i>	К М <i>CS</i>	К <i>C</i>	К Э <i>CE</i>	-
Группа животных с патологией без лечения (введение буферного раствора для приготовления доз) <i>Untreated infected group (buffer solution administration)</i>	К Э В <i>CIA</i>	К М В <i>CSA</i>	К В <i>CA</i>	К М В Э <i>CSAE</i>	К В <i>CA</i>	К М В <i>CSA</i>	К В <i>CA</i>	К Э <i>CE</i>	-
Опытная группа (профилактическое применение молнупиравира) <i>Experimental group (prophylactic treatment with molnupiravir)</i>	К Э В <i>CIA</i>	К М В <i>CSA</i>	К В <i>CA</i>	К М В Э <i>CSAE</i>	К В <i>CA</i>	К М В <i>CSA</i>	К В <i>CA</i>	К Э <i>CE</i>	-

Примечание. К – клинический осмотр, включая регистрацию массы тела; Э – заражение (выделено синим); В – введение препарата; М – взятие мазка из ротоглотки для оценки вирусной нагрузки методом ОТ-ПЦР; Э – эвтаназия 50% животных группы (выделено красным); "-" – неприменимо.

Note. C—clinical examination, including body weight recording; I—infection (highlighted in blue); A—administration of a test preparation; S—oropharyngeal swabs to evaluate virus shedding by RT-PCR; E—euthanasia of 50% of animals of the group (highlighted in red). - not applicable.

связывания вирусных частиц. Однако из-за быстрого накопления мутаций, в первую очередь в рецептор-связывающем домене S-белка SARS-CoV-2, для моноклональных антител, в отличие от вирусных «ловушек», существует высокий риск потери эффективности при появлении новых вариантов. Так, в настоящее время для лечения COVID-19 применяется только одно антитело из четырех, ранее продемонстрировавших эффективность против различных вариантов SARS-CoV-2 в клинических исследованиях⁸.

Выраженную активность наблюдали при изучении молниупиравира. Значение показателя EC_{50} при двух дозах вируса составило 1900 ± 460 нМ, что выше активности препарата позитивного контроля NHC (табл. 3). Разница между значениями показателя EC_{50} для молниупиравира и NHC не является значимой для вирусологического теста и количества повторов в описанном исследовании. Очевидно, небольшое различие может быть обусловлено такими факторами, как разная эффективность проникновения и накопления соединения в клетках, разная устойчивость (сохранность) соединений вне клеток и при хранении после приготовления разведений. Полученные результаты в целом соответствуют данным литературы⁹.

В обоих экспериментах субстанция положительного контроля NHC ожидаемо ингибировала цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2, что свидетельствует о корректности поставленных экспериментов (табл. 3).

Таким образом, при оценке активности гибридного белка RPH-137 и молниупиравира было показано, что оба препарата ингибируют цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 в клетках Vero, однако активность RPH-137 была выше, что, по-видимому, объясняется различиями в механизмах действия препаратов.

Исследование фармакологической активности RPH-137 и молниупиравира на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков

При моделировании инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков зарегистрированы типичные изменения, характеризовавшиеся снижением массы тела животных (рис. 1), угнетением общего состояния, увеличением массового коэффициента легких по мере развития инфекции (рис. 2), появлением вируса в легких и орофарингеальных мазках, которое детектировалось по вирусной нагрузке (рис. 3,

4), макро- и микроскопическими изменениями легких, характерными для пневмонии, в том числе вирусной (рис. 5, 6). Воспроизведенная экспериментальная модель SARS-CoV-2 инфекции у сирийских хомячков полностью соответствовала описанному в литературе данным [13, 16, 26]. За весь период наблюдения во всех группах не было зарегистрировано смертности животных.

В таблицах 4 и 5 представлена сводная информация по полученным результатам.

Двукратное внутримышечное введение RPH-137 по лечебно-профилактической схеме (за сут до заражения и через 2 ч после заражения) в дозах 30 и 80 мг/кг не оказало значимого влияния на развитие инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков. Отмечена незначительная тенденция к снижению микроскопических признаков пневмонии и площади поражения легких. Использование RPH-137 при внутрибрюшинном введении оказало более выраженный терапевтический эффект с достижением статистически значимых изменений по ряду показателей. Так, в дозе 100 мг/кг наблюдали отчетливую тенденцию к нормализации массы тела животных в период заражения. При гистологическом исследовании наблюдали статистически значимое снижение признаков воспалительного процесса и общей площади поражения легких на 7 сут на 27 и 30% соответственно относительно группы контроля заражения, не получавшей препарат (рис. 6). С 1 по 3 сут после заражения наблюдали снижение количества вируса в орофарингеальных мазках с достижением статистической значимости только на 2 сут (рис. 3). Тем не менее на такие показатели, как количество и инфекционный титр вируса в легких, введение RPH-137 не оказало ожидаемого воздействия. Возможным объяснением может быть недостаточная дозировка препарата — как было показано в исследованиях *in vitro*, доза, необходимая для нейтрализации вируса, возрастает с увеличением количества вирусных частиц.

Фармакологический эффект был выявлен при внутрижелудочном введении молниупиравира. Введение препарата по лечебно-профилактической схеме в дозе 300 мг/кг оказало значимое влияние на развитие SARS-CoV-2 инфекции у сирийских хомячков. Обнаруженные терапевтические эффекты регистрировали в виде снижения частоты проявления клинических признаков

⁸ Emergency Use Authorization. FDA. <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and-policy-framework/emergency-use-authorization>

⁹ FDA EUA Review Memo 000108 23.12.21. FDA. <https://www.fda.gov/media/155241>

Таблица 3. Значение показателя ингибирования цитопатического действия (EC_{50}) вируса SARS-CoV-2 (вариант ПИК35) препаратами RPH-137 и молнупиравир в культуре клеток Vero

Table 3. EC_{50} values for inhibition of the cytopathic effect of SARS-CoV-2 (PIK35 clinical isolate) by RPH-137 and molnupiravir in Vero cell culture

Исследуемый препарат <i>Test item</i>	Доза вируса, ТЦД ₅₀ <i>Virus dose, TCID₅₀</i>	EC_{50} , $M \pm SEM$, нМ (мкг/мл) <i>EC_{50}, $M \pm SEM$, nM (μg/mL)</i>
RPH-137	50	21,30 $\pm$ 7,10 (4,69 $\pm$ 1,56)
	200	73,80 $\pm$ 6,20 (16,24 $\pm$ 1,36)
ННС (контроль для RPH-137) <i>NHC (control for RPH-137)</i>	50	4070,0 $\pm$ 500,0 (1,05 $\pm$ 0,13)
	200	4840,0 $\pm$ 420,0 (1,25 $\pm$ 0,11)
Молнупиравир <i>Molnupiravir</i>	50	1900,0 $\pm$ 460,0 (0,63 $\pm$ 0,15)
	200	1900,0 $\pm$ 460,0 (0,63 $\pm$ 0,15)
ННС (контроль для молнупиравира) <i>NHC (control for molnupiravir)</i>	50	4100,0 $\pm$ 500,0 (1,06 $\pm$ 0,13)
	200	6600,0 $\pm$ 310,0 (1,71 $\pm$ 0,08)

Примечание. ННС (β -d-N⁴-гидроксцитидин) – препарат положительного контроля; ТЦД₅₀ – 50% тканевая цитопатическая доза; EC_{50} – 50% эффективная концентрация.

Note. NHC (β -d-N⁴-hydroxycytidine) – positive control; TCID₅₀ – virus dose that induces a cytopathic effect in 50% of infected tissue culture; EC_{50} – 50% effective concentration.

инфекции вплоть до их полного исчезновения к концу эксперимента. Не выявлено фармакологического влияния на динамику массы тела (рис. 1). Отмечено статистически значимое снижение массового коэффициента легких на 3 сут после заражения и снижение данного показателя на уровне тенденции на 7 сут по сравнению с группой контроля заражения (рис. 2). Наблюдали тенденцию к снижению макроскопических признаков поражения легких на 3 и 7 сут. Введение молнупиравира привело к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в орофарингеальных мазках на 5 сут после заражения (рис. 3) и снижению количества РНК вируса в легких на 3 и 7 сут после заражения по показателю Ct, достигшее статистической значимости на 3 сут после заражения (рис. 4). По полученным результатам гистологического исследования и оценки площади поражения легких установлено, что введение тестируемых препаратов приводит к значимому снижению патоморфологических изменений в легочной ткани с максимальным развитием положительных эффектов на 7 сут после заражения (рис. 5).

Полученные в данной работе результаты по оценке эффективности молнупиравира на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков согласуются с данными литературы [30]. Так, в статье K. Rosenke [8] было показано, что при пероральном введении молнупиравира в дозе 250 мг/кг за 12 и 2 ч до заражения или после заражения сирийских хомячков, которых интраназально инфициро-

вали SARS-CoV-2, не было выявлено статистической значимости снижения выделения вируса в мазках из ротовой полости между группами, получавшими молнупиравир и носитель в качестве контроля, но была выявлена значимая разница в вирусной нагрузке в легких (с помощью ОТ-ПЦР) между группой, получавшей молнупиравир до заражения, по сравнению с контролем, получавшим носитель. Инфекционные титры вируса в легких (ТЦД₅₀; 50% тканевая цитопатическая доза) значимо отличались как в группах, получавших препарат до заражения, так и после заражения по сравнению с контрольной группой, получавшей носитель. Однако следует отметить, что полученные нами результаты и данные литературы демонстрируют не столь выраженную эффективность молнупиравира по ряду параметров, которую стоило бы ожидать. Это может быть связано с достаточно быстрой элиминацией метаболита молнупиравира – ННС у животных. Согласно данным литературы, время полувыведения ННС у мышей составляло около 2 ч [31]. Согласно нашим собственным неопубликованным данным исследования фармакокинетики молнупиравира у крыс, концентрация ННС в плазме крови падала ниже предела определения через 6 ч после перорального введения. Таким образом, при в терапевтическом режиме введения молнупиравира хомячкам каждые 12 ч концентрация ННС в крови падает ниже IC_{90} (концентрация, которая снижает вирус-индуцированную гибель клеток в 90% тест-объектах), что снижает эффективность. Вероятно,

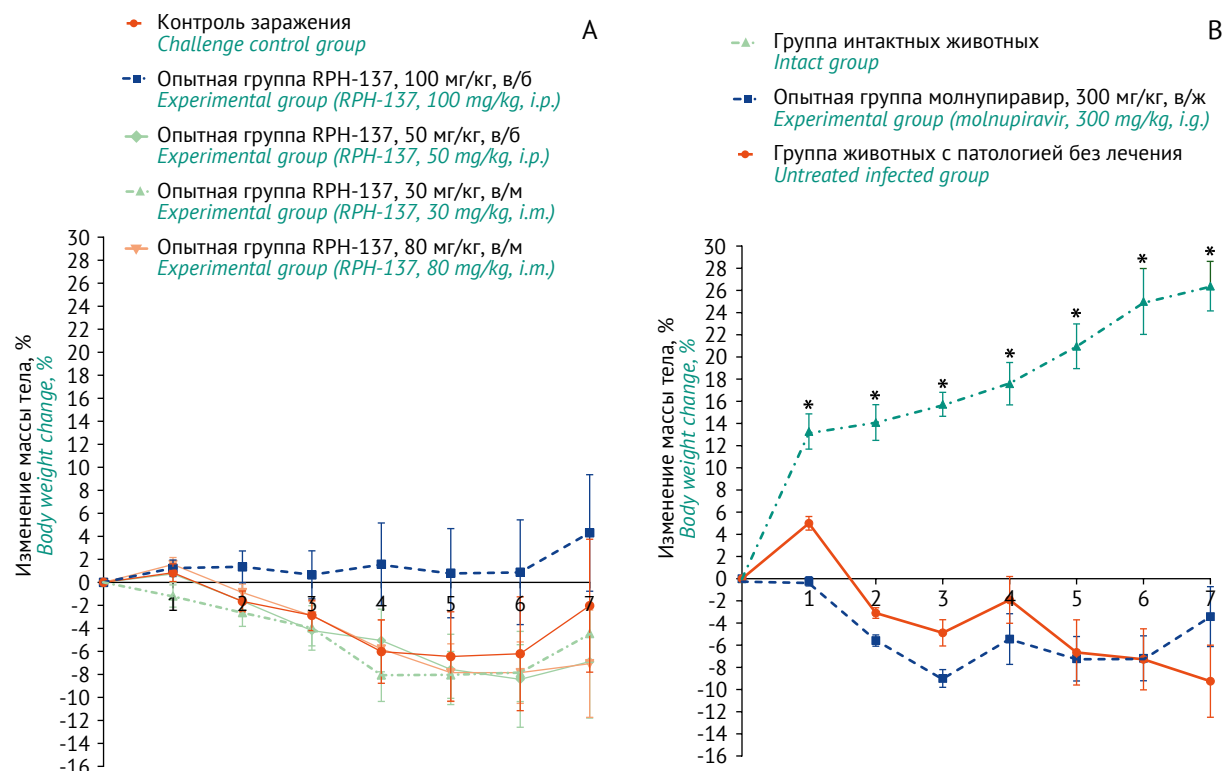


Рис. 1. Изменение массы тела животных от момента заражения при проведении экспериментов с введением RPH-137 (А) и молнупиравира (В). Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). По оси X обозначены сут от момента заражения. Количество животных в интактной группе: $n=6$ (с 0 по 3 сут) и $n=3$ (с 4 по 7 сут); в опытных и контрольных группах: $n=16$ (с 0 по 3 сут) и $n=8$ (с 4 по 7 сут). * — отличия статистически значимы с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (two-way ANOVA, критерий Даннета). В легенде представлены группы животных, дозы исследуемых препаратов и способ их введения (в/б — внутривенно; в/м — внутримышечно; в/ж — внутривенно).

Fig. 1. Changes in animal body weight starting from the infection day in experiments with RPH-137 (A) and molnupiravir (B). All data are presented as means and standard errors of the mean ($M \pm SEM$). The X-axis indicates days after infection. Intact animals: $n=6$ (days 0–3) and $n=3$ (days 4–7). Experimental and control groups: $n=16$ (days 0–3) and $n=8$ (days 4–7). Asterisks (*) mark statistically significant differences from the corresponding control group, $p < 0.05$ (two-way ANOVA, Dunnett's test). The legend shows animal groups, test item doses, and administration routes (i.p.—intraperitoneal; i.m.—intramuscular; i.g.—intragastric).

необходимо увеличивать кратность введения препарата для демонстрации более выраженно-го эффекта терапии.

Данные, полученные для RPH-137, выявили, что при используемых путях введения (в/м и в/б) препарат обладает эффективностью на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков только при использовании в дозе 100 мг/кг (в/б), что характеризуется уменьшением снижения массы тела животных после заражения и выраженным снижением воспалительного процесса в легких по сравнению с контролем заражения и молнупиравиром, а также заметным снижением вирусного титра в орофарингеальных мазках на начальном этапе терапии (1–3 сут). При разработке препаратов-ловушек SARS-CoV-2 была продемонстрирована эффективность ряда препаратов на основе моноклональных антител на модели заражения хомячков [28, 32–34]. При этом введение препа-

ратов восстанавливало массу тела, уменьшало вирусную нагрузку в тканях легких и улучшало гистологическую картину легких хомячков.

В настоящее время существует множество моделей инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у различных видов животных, отражающих различные аспекты течения заболевания у человека. Для моделирования эффективности в рамках фармацевтической разработки зарегистрированных для лечения и профилактики COVID-19 невакцированных препаратов наиболее часто использовали сирийских хомячков, макак резус и зеленых мартышек. Полученные результаты у различных видов животных в целом были схожими: наблюдалось статистически значимое снижение вирусной нагрузки в носовых ходах и легких, уменьшение распространенности и выраженности пневмонии, снижение клинических симптомов. Животные модели инфекции, однако, обладают некоторыми недостатками:

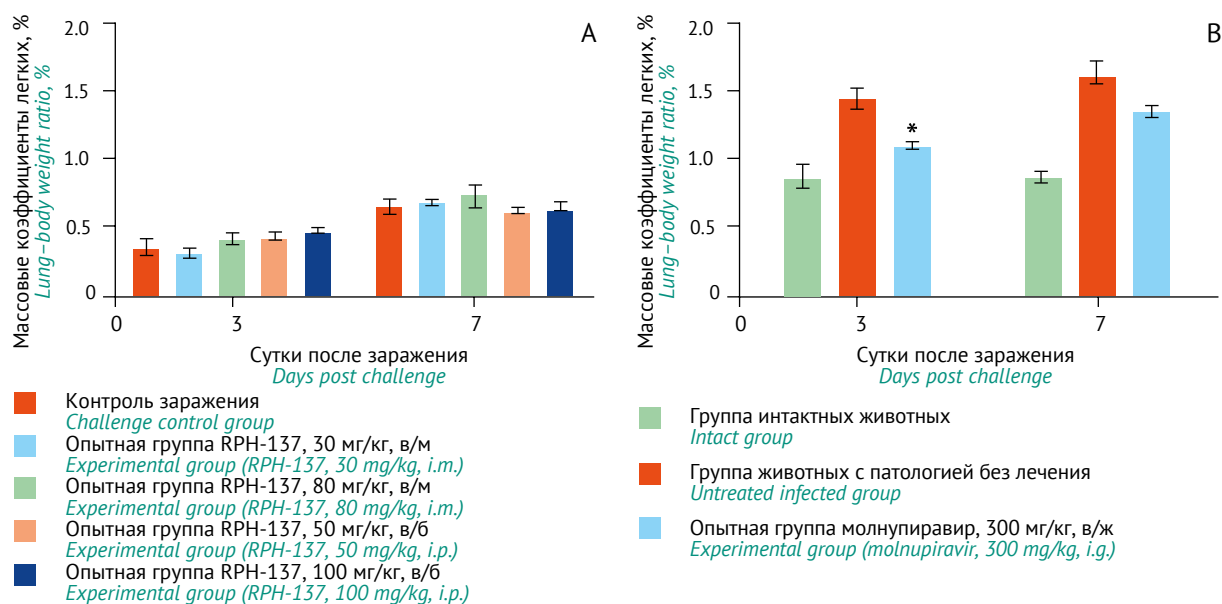


Рис. 2. Массовые коэффициенты легких на 3 и 7 сут после заражения при постановке экспериментов с введением RPH-137 (А) и молнупиравира (В). Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Количество животных в интактной группе: $n=6$ (с 0 по 3 сут) и $n=3$ (с 4 по 7 сут); в опытных и контрольных группах: $n=16$ (с 0 по 3 сут) и $n=8$ (с 4 по 7 сут). * — отличия статистически значимы с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (one-way ANOVA, критерий Тьюки). В легенде представлены группы животных, дозы исследуемых препаратов и способ их введения (в/б — внутрибрюшинно; в/м — внутримышечно; в/ж — внутривенно).

Fig. 2. Lung-body weight ratios on days 3 and 7 after infection in experiments with RPH-137 (A) and molnupiravir (B). All data are presented as means and standard errors of the mean ($M \pm SEM$). Intact animals: $n=6$ (days 0–3) and $n=3$ (days 4–7). Experimental and control groups: $n=16$ (days 0–3) and $n=8$ (days 4–7). The asterisk (*) marks a statistically significant difference from the corresponding control group, $p < 0.05$ (one-way ANOVA, Tukey's test). The legend shows animal groups, test item doses, and administration routes (i.p.—intraperitoneal; i.m.—intramuscular; i.g.—intra-gastric).

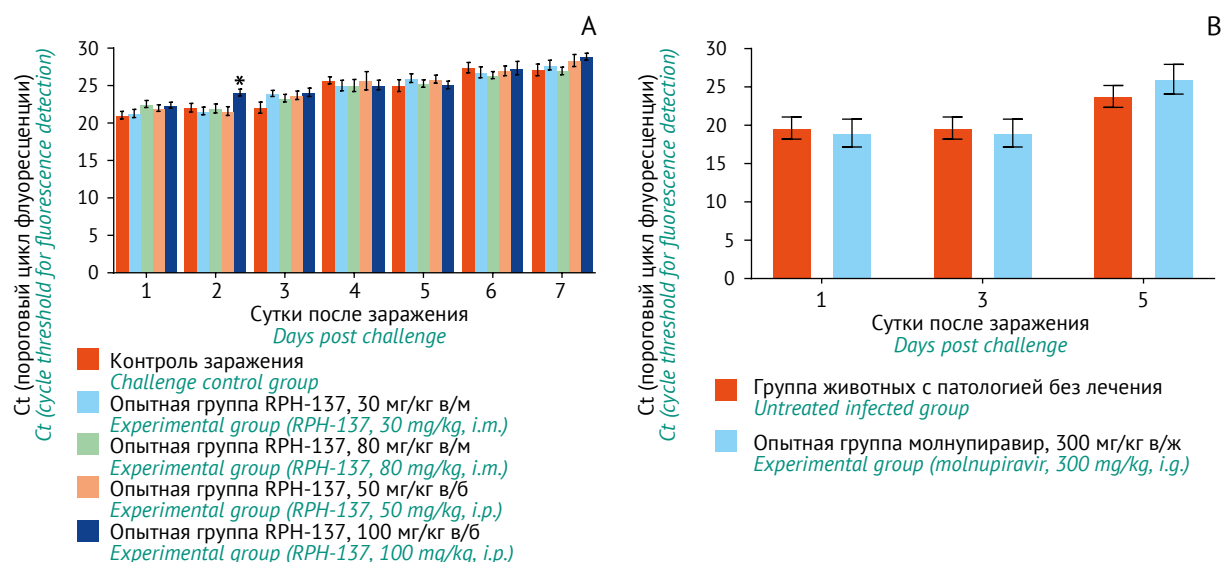


Рис. 3. Вирусная нагрузка в орофарингеальных мазках на указанные сут после заражения, определенная методом ОТ-ПЦР по пороговому циклу Ct при постановке экспериментов с введением RPH-137 (А) и молнупиравира (В). Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего $M \pm SEM$. Количество животных в опытных и контрольных группах: $n=16$ (с 0 по 3 сут) и $n=8$ (с 4 по 7 сут). * — отличия статистически значимы по сравнению с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (one-way ANOVA, критерий Даннета). В легенде представлены группы животных, дозы исследуемых препаратов и способ их введения (в/б — внутрибрюшинно; в/м — внутримышечно; в/ж — внутривенно).

Fig. 3. Viral load values for oropharyngeal swabs collected on indicated post-challenge days and tested by RT-PCR using the amplification cycle threshold (Ct) in experiments with RPH-137 (A) and molnupiravir (B). All data are presented as means and standard errors of the mean ($M \pm SEM$). Experimental and control groups: $n=16$ (days 0–3) and $n=8$ (days 4–7). The asterisk (*) marks a statistically significant difference from the corresponding control group, $p < 0.05$ (one-way ANOVA, Dunnett's test). The legend shows animal groups, test item doses, and administration routes (i.p.—intraperitoneal; i.m.—intramuscular; i.g.—intra-gastric).

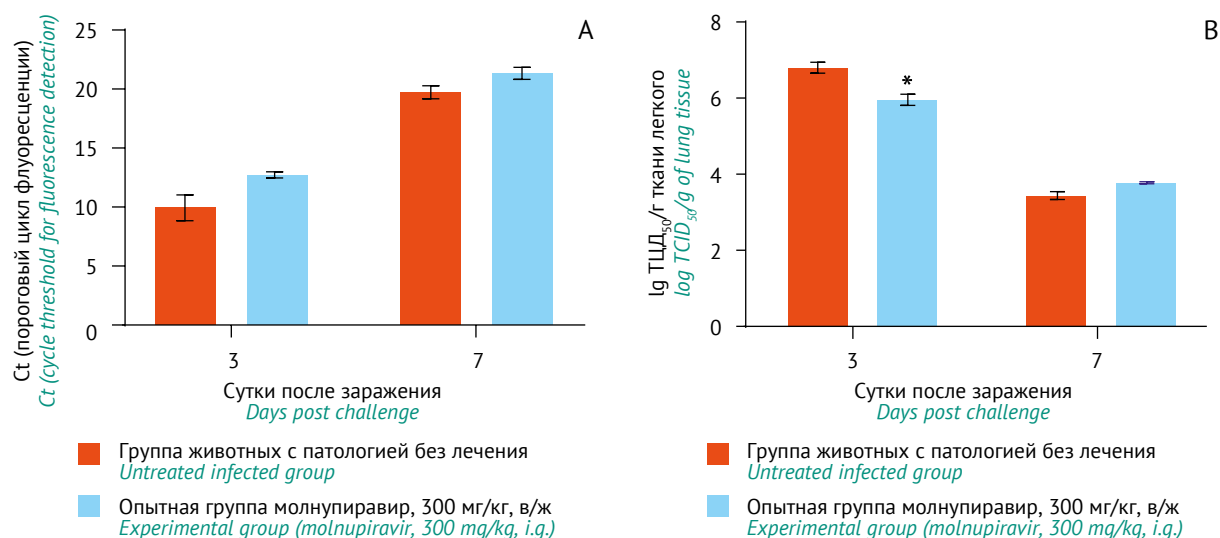


Рис. 4. Количество РНК вируса в легких, определяемое методом ОТ-ПЦР по показателю порогового цикла флуоресценции Ct (А), и активность вируса, определяемая методом титрования гомогената легочной ткани на клетках Vero по показателю lg ТЦД₅₀/г ткани легкого (В), на указанные сут после заражения. Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). Количество животных в опытных и контрольных группах: $n=8$ на 3 сут и $n=8$ на 7 сут. * – отличия статистически значимы с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (t -критерий Стьюдента). В легенде представлены группы животных, доза исследуемого препарата и способ введения (в/ж – внутривенно).

Fig. 4. Lung levels of viral RNA (A) measured by RT-PCR using the cycle threshold for fluorescence detection (Ct) and viral activity (B) determined in Vero cells by titration of lung tissue homogenate samples using log TCID₅₀/g of tissue, on indicated post-challenge days. All data are presented as means and standard errors of the mean ($M \pm SEM$). Experimental and control groups: $n=8$ on day 3 and $n=8$ on day 7. The asterisk (*) marks a statistically significant difference from the corresponding control group, $p < 0.05$ (Student's t -test). The legend shows animal groups, test item doses, and the administration route (i.g.–intragastric).

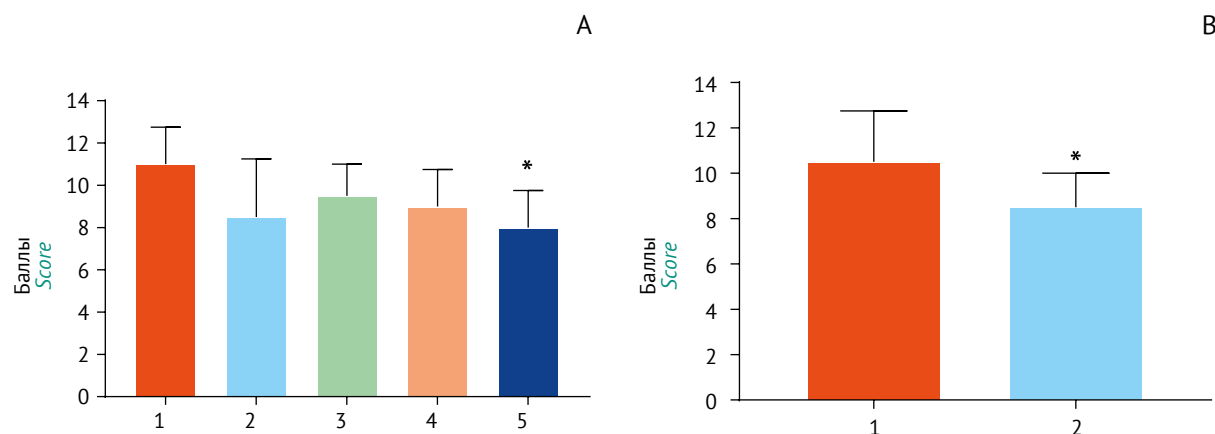


Рис. 5. Степень воспаления легких на 7 сут после заражения при постановке экспериментов с введением RPH-137 (А) и молниупиравира (В). Данные представлены в виде баллов (в виде медианы Me и квартилей Q1, Q3). По оси X представлены экспериментальные группы. А: 1 – контроль заражения; 2 – опытная группа, RPH-137, 30 мг/кг, внутримышечно (в/м); 3 – опытная группа, RPH-137, 80 мг/кг, в/м; 4 – опытная группа, RPH-137, 50 мг/кг, внутривенно (в/в); 5 – опытная группа, RPH-137, 100 мг/кг, в/в. В: 1 – группа животных с патологией без лечения, 2 – опытная группа, молниупиравир, 300 мг/кг, внутривенно (в/ж). Количество животных в опытных и контрольных группах: $n=8$. * – отличия статистически значимы с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни).

Fig. 5. Pneumonia extent on day 7 after infection in experiments with of RPH-137 (A) and molnupiravir (B). All data are presented as scores (median (Me), lower (Q1) and upper (Q3) quartiles). The X-axis indicates experimental groups A: 1–challenge control group; 2–experimental group treated with intramuscular RPH-137, 30 mg/kg; 3–experimental group treated with intramuscular RPH-137, 80 mg/kg; 4–experimental group treated with intraperitoneal RPH-137, 50 mg/kg; 5–experimental group treated with intraperitoneal RPH-137, 100 mg/kg; B: 1–untreated infected group; 2–experimental group treated with intragastric molnupiravir, 300 mg/kg. Experimental and control groups: $n=8$. Asterisks (*) mark statistically significant differences from the corresponding control group, $p < 0.05$ (Mann–Whitney test).

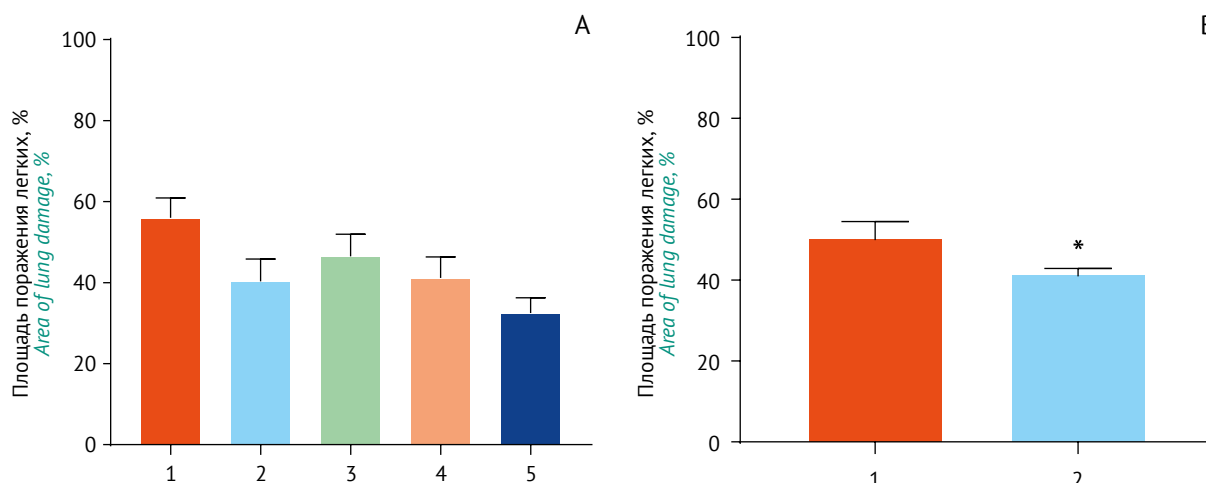


Рис. 6. Площадь поражения легких на 7 сут после заражения при постановке эксперимента с введением RPH-137 (A) и молнупиравира (B). Данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего ($M \pm SEM$). По оси X представлены экспериментальные группы: A: 1 – контроль заражения; 2 – опытная группа, RPH-137, 30 мг/кг, внутримышечно (в/м); 3 – опытная группа, RPH-137, 80 мг/кг, в/м; 4 – опытная группа, RPH-137, 50 мг/кг, внутривбрюшинно (в/б); 5 – опытная группа, RPH-137, 100 мг/кг, в/б. B: 1 – группа животных с патологией без лечения, 2 – опытная группа, молнупиравир, 300 мг/кг, внутривбрюшинно (в/ж). Количество животных в опытных и контрольных группах: $n=8$. * – отличия статистически значимы с группой контроля заражения, $p < 0,05$ (t-критерий Стьюдента).

Fig. 6. Lung lesion area on day 7 after infection in experiments with RPH-137 (A) and molnupiravir (B). All data are presented as means and standard errors of the mean ($M \pm SEM$). The X-axis indicates experimental groups: 2 – experimental group treated with intramuscular RPH-137, 30 mg/kg; 3 – experimental group treated with intramuscular RPH-137, 80 mg/kg; 4 – experimental group treated with intraperitoneal RPH-137, 50 mg/kg; 5 – experimental group treated with intraperitoneal RPH-137, 100 mg/kg; B: 1 – untreated infected group; 2 – experimental group treated with intragastric molnupiravir, 300 mg/kg. Experimental and control groups: $n=8$. The asterisk (*) marks a statistically significant difference from the corresponding control group, $p < 0.05$ (Student's *t*-test).

ограничениями при моделировании острого респираторного дистресс-синдрома; влияния на сосудистую стенку, опосредованного связыванием вируса с рецептором АПФ2; аносмии; паросмии и коинфекции [29, 35]. В разных лабораториях используют различные варианты вируса, что снижает воспроизводимость результатов. Также не исключена вероятность заражения экспериментальных животных от персонала питомника, при этом животные могут поступить в эксперимент уже переболевшими, что требует тщательного контроля наличия у животных антител перед началом исследования.

В отношении использования крупных животных существуют ограничения как с точки зрения этических принципов, так и по причине высокой стоимости исследований, трудности проведения экспериментальной работы и доступности животных. На сегодня имеется большой объем экспериментальных работ, описывающих воспроизведение инфекции, вызванной SARS-CoV-2, на мелких грызунах – сирийских хомячках и трансгенных мышах [16, 26, 36–41]. Исследования репликации вируса SARS-CoV-2 у мышей лабораторных линий не привели к успеху [42]. Их резистентность к возбудителю, по-видимому, связана с различиями в строении человеческого и мышинного рецептора АПФ2 [43]. Именно по-

этому в экспериментальных моделях инфекции, вызванной SARS-CoV-2, используют трансгенных мышей с экспрессией человеческого АПФ2. Однородность и воспроизводимость экспериментальных данных, полученных на инбредных линиях мышей, является одновременно преимуществом и недостатком. Особи конкретной инбредной линии генетически идентичны, и маловероятно, что в пределах одной линии могут быть смоделированы все комплексные патогенетические механизмы болезни. Кроме того, тканевой и клеточный тропизм вируса может не отражать поведение вируса в организме человека, поскольку экспрессия человеческого АПФ2 у мышей обусловлена молекулярной модификацией [44].

Несомненными плюсами модели на сирийских хомячках является их доступность, простота работы, воспроизводимость и валидность результатов. Однако есть и ограничения использования этой модели, поскольку заболевание характеризуется легким течением и животные самопроизвольно выздоравливают к 7–14 сут после инфицирования [45]. Из-за легкого течения имеются трудности в регистрации прижизненных клинических показателей и, как следствие, требуется увеличение количества животных в группе для усиления статистической мощности

Таблица 4. Фармакологические эффекты RPH-137 и молниупиравира на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков по показателям: масса тела, клинические признаки инфекции, относительное количество РНК вируса по показателю порогового цикла амплификации (Ct) в орофарингеальных мазках и массовые коэффициенты легких **Table 4.** Pharmacological effects of RPH-137 and molnupiravir in the Syrian hamster model of SARS-CoV-2 infection in terms of body weight, clinical signs of infection, relative viral RNA levels measured in oropharyngeal swabs using the amplification cycle threshold (Ct), and lung-body weight ratios

Описание группы <i>Group description</i>	Доза (разовая, мг/кг); путь введения <i>Dose (single, mg/kg); route of administration</i>	Оцениваемые показатели <i>Evaluated parameters</i>				Массовые коэффициенты легких <i>Lung-body weight ratios</i>
		Масса тела <i>Body weight</i>	Клинические признаки инфекции <i>Clinical signs of infection</i>	Показатель порогового цикла флуоресценции Ct в орофарингеальных мазках <i>Cycle threshold for fluorescence detection (Ct) in oropharyngeal swabs</i>		
Контроль заражения <i>Challenge control group</i>	0	Снижение до 7–9% (по среднему значению) с максимумом на 6 и 7 сут после заражения <i>Average decrease of up to 7–9% with maximum weight loss on days 6 and 7 after infection</i>	Угнетение поведения 100% животных в группе от момента заражения вплоть до окончания эксперимента <i>Inhibited behaviour in 100% of the group from the moment of infection to the end of the experiment</i>	Постепенное снижение вирусной нагрузки к 7 сут после заражения <i>Gradual decrease in viral load by day 7 after infection</i>	Увеличение по мере развития патологии, в среднем на 10% к 7 сут после заражения по сравнению с 3 сут и на 50–60% в сравнении с интактной группой <i>Average increase with the pathology progress by day 7 after infection, amounting to 10% compared with the ratios on day 3 and 50–60% compared with those in intact animals</i>	
Опытная группа (профилактическое применение молниупиравира) <i>Experimental group (prophylactic treatment with molnupiravir)</i>	300; в/ж 300; i.g.	Отсутствие фармакологического влияния на данный показатель. Динамика массы тела схожа с группой контроля заражения <i>No pharmacological effect on this parameter; similar weight changes in challenge control animals</i>	Снижение частоты проявления клинического признака инфекции с 4 сут после заражения (62% животных). С 5 по 7 сут после заражения угнетение поведения отмечали только у одного животного в группе (13%) <i>Decrease in clinical signs from day 4 after infection (in 62% of animals); only one animal (13%) of the group with inhibited behaviour on days 5–7 after infection</i>	Статистически значимое снижение относительного количества РНК вируса на 5 сут после заражения по сравнению с группой контроля заражения <i>Statistically significant decrease in relative viral RNA levels on day 5 after infection compared with those in challenge control animals</i>	Статистически значимое снижение массовых коэффициентов легких на 3 сут после заражения по сравнению с группой контроля заражения. На 7 сут после заражения отмечено снижение данного показателя относительно контроля заражения, не достигшее статистической значимости <i>Statistically significant decrease in relative lung weight on day 3 after infection compared with that of challenge control animals, becoming statistically insignificant (~16%) on day 7 after infection</i>	
Опытная группа (профилактическое применение RPH-137) <i>Experimental group (prophylactic treatment with RPH-137)</i>	30 и 80; в/м 50; в/б 30 и 80; i.m. 50; i.p.	Клинические и статистически значимых эффектов на основные показатели модели патологии (динамика массы тела, общее состояние животных, макро- и микроскопические признаки инфекции, относительное количество РНК вируса и активность вируса в легких и орофарингеальных мазках) не выявлено <i>No observed clinical and statistically significant effects on main pathology model parameters (body weight changes, general condition, macro- and microscopic infection signs, relative viral RNA levels and viral activity in the lungs and oropharyngeal swabs)</i>	Отсутствие фармакологического влияния на данный показатель <i>No pharmacological effect on this parameter</i>	С 1 по 3 сут после заражения снижение (на ~8%) относительного количества РНК вируса в орофарингеальных мазках с достижением статистической значимости на 2 сут <i>Decrease (by ~8%) in relative viral RNA levels in oropharyngeal swabs from day 1 to day 3 after infection, reaching statistical significance from day 2</i>	Отсутствие фармакологического влияния на данный показатель <i>No pharmacological effect on this parameter</i>	
	100; в/б 100; i.p.	Тенденция к нормализации массы тела животных, не достигшая статистической значимости <i>Statistically insignificant trend towards body weight normalisation</i>				

Примечание. в/м – внутримышечно; в/б – внутривенно; в/ж – внутривенно; в/ж – внутривенно.

Note. i.m. – intramuscular administration; i.p. – intraperitoneal administration; i.g. – intragastric administration.

Таблица 5. Фармакологические эффекты RPH-137 и молнипиравира на модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, у сирийских хомячков по показателям: макроскопия легких, относительное количество РНК вируса и активность вируса в легких, гистологический анализ легких
Table 5. Pharmacological effects of RPH-137 and molnupiravir in the Syrian hamster model of SARS-CoV-2 infection in terms of lung macroscopy findings, relative viral RNA levels and viral activity in the lungs, and lung histopathology findings

Описание группы <i>Group description</i>	Доза (разовая, мг/кг); путь введения <i>Dose (single, mg/kg); route of administration</i>	Оцениваемые показатели <i>Evaluated parameters</i>									
		Макроскопические изменения в легких <i>Macroscopic changes in the lungs</i>	Относительное количество РНК вируса по показателю Ct <i>Relative viral RNA levels by the Ct value</i>	Активность вируса в ткани ТЛД ₅₀ /г ткани легкого <i>Viral activity in the lung tissue by TCID₅₀/g of lung tissue</i>	Результаты гистологического анализа легких <i>Lung histopathology findings</i>						
					Признаки выраженности патологии <i>Severity of pathology</i>	Признаки воспаления легких <i>Pneumonia signs</i>	Признаки клеточной инфильтрации <i>Cell infiltration</i>	Признаки отека легких <i>Pulmonary oedema</i>			
					3	7	3	7	3	7	3
Контроль заражения <i>Challenge control group</i>	0	Выраженность макроскопических изменений увеличивалась к 7 сут после заражения, картина характерна для пневмонии <i>Increase in severity of macroscopic changes by day 7 after infection; macroscopic features typical of pneumonia</i>	Постепенное снижение количества РНК вируса и вирусной активности в легких к 7 сут после заражения <i>Gradual decrease in viral RNA levels and activity in the lungs by day 7 after infection</i>	Выраженные патоморфологические изменения легочной ткани, усиливающиеся по мере развития инфекционно-воспалительного процесса <i>Pronounced pathomorphological changes in lung tissue, intensifying with the development of infection and inflammation</i>							
Заражение + введение молнипиравира <i>Infection + molnupiravir administration</i>	300; в/ж 300; i.g.	Статистически значимое снижение выраженности макроскопических изменений на 3 сут после заражения по сравнению с группой контроля заражения <i>Statistically significant decrease in macroscopic changes on day 3 after infection compared with those in challenge control animals</i>	Снижение количества РНК вируса на 3 (~21%) и 7 (~7%) сут после заражения, не достигшее статистической значимости <i>Statistically insignificant decrease in viral RNA levels on days 3 (~21%) and 7 (~7%) after infection reaching statistical significance from day 3</i>	Снижение активности вируса на 3 и 7 сут после заражения, достигшее статистической значимости на 3 сут после заражения <i>Decrease in viral activity on days 3 and 7 after infection, reaching statistical significance from day 3</i>	+	+	+	++	+	+	+
	30 и 80; в/м 50; в/б 30 and 80; i.m. 50; i.p.	Статистически значимых эффектов не выявлено <i>No observed statistically significant effects on main pathology model parameters</i>	Снижение количества РНК вируса на 3 (~21%) и 7 (~7%) сут после заражения, не достигшее статистической значимости <i>Statistically insignificant decrease in viral RNA levels on days 3 (~21%) and 7 (~7%) after infection reaching statistical significance from day 3</i>	Снижение активности вируса на 3 и 7 сут после заражения, достигшее статистической значимости на 3 сут после заражения <i>Decrease in viral activity on days 3 and 7 after infection, reaching statistical significance from day 3</i>	-	-	-	+	-	-	-
Заражение + введение RPH-137 <i>Infection + RPH-137 administration</i>	30 и 80; в/м 50; в/б 30 and 80; i.m. 50; i.p.	Статистически значимых эффектов не выявлено <i>No observed statistically significant effects on main pathology model parameters</i>	Снижение количества РНК вируса на 3 (~21%) и 7 (~7%) сут после заражения, не достигшее статистической значимости <i>Statistically insignificant decrease in viral RNA levels on days 3 (~21%) and 7 (~7%) after infection reaching statistical significance from day 3</i>	Снижение активности вируса на 3 и 7 сут после заражения, достигшее статистической значимости на 3 сут после заражения <i>Decrease in viral activity on days 3 and 7 after infection, reaching statistical significance from day 3</i>	-	-	-	+	-	-	-
	100; в/б 100; i.p.	Отсутствие изменений данных показателей <i>No changes of these parameters</i>	Отсутствие изменений данных показателей <i>No changes of these parameters</i>	Отсутствие изменений данных показателей <i>No changes of these parameters</i>	-	-	-	++	-	-	-

Примечание. «+» — наличие фармакологических эффектов в виде тенденции по сравнению с контролем заражения; «++» — наличие статистически значимых фармакологических эффектов по сравнению с контролем заражения; «-» — отсутствие фармакологических эффектов. ТЛД₅₀ — 50% тканевая цитопатическая доза; Ct — пороговый цикл флуоресценции; в/м — внутримышечно; в/б — внутривенно; в/ж — внутримышечно; в/ж — внутримышечно.

Note. + pharmacological effects observed as trends in comparison with the challenge control group; ++ statistically significant pharmacological effects in comparison with the challenge control group; - no pharmacological effects. TCID₅₀ — 50% tissue culture infective dose; Ct—cycle threshold for fluorescence detection; i.m.—intramuscular administration; i.p.—intraperitoneal administration; i.g.—intragastric administration.

выборки, что не всегда возможно по причине трудоемкости работы в «красной» зоне вивария.

Несмотря на ряд перечисленных недостатков, модель заражения хомячков SARS-CoV-2 широко применяется в доклинических исследованиях для скрининга и исследования эффективности новых препаратов для профилактики и лечения SARS-CoV-2, поскольку является одной из самых простых, быстрых и относительно малозатратных.

Ранее данная модель использовалась в рамках разработки и доклинических исследований молниупиравира [8, 9]. Молниупирабир показал высокую эффективность в терапии инфекции SARS-CoV-2 в рамках доклинических и клинических исследований, после чего был зарегистрирован для применения у пациентов с COVID-19 легкого и среднетяжелого течения в различных странах. Препарат в 2021 г. внесен во Временные методические рекомендации Министерства здравоохранения Российской Федерации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)»¹⁰. Доказанная эффективность препарата обосновывает возможность использования его в качестве препарата сравнения в исследованиях эффективности новых лекарственных препаратов для терапии инфекции SARS-CoV-2.

В работе С. Muñoz-Fontela с соавт. [46], в которой проанализированы имеющиеся сейчас животные модели инфекции, вызванной SARS-CoV-2, показано, что эти модели обычно демонстрируют ограниченную продолжительность репликации вируса и, следовательно, не могут являться в полной мере подходящими для оценки субоптимальных доз исследуемых препаратов моноклональных антител или низкомолекулярных противовирусных препаратов при появлении вариантов вируса, устойчивых к терапии. Поэтому важной дальнейшей задачей является разработка моделей инфекции SARS-CoV-2, в которых вирус интенсивно реплицируется в течение длительных периодов времени, не вызывая тяжелой патологии, которая потребовала бы ранней эвтаназии животных. Вероят-

но, перспективным направлением для будущих исследований являются линии животных с иммунодефицитом или с экспериментально индуцированным иммунодефицитом, а также использование генетически модифицированных животных [39, 47, 48]. Не исключено, что будут разработаны эффективные подходы *in silico*, позволяющие с высокой точностью прогнозировать эффективность молекул.

Заключение

При оценке эффективности гибридного белка RPH-137 и молниупиравира в отношении SARS-CoV-2 было установлено, что оба препарата ингибируют цитопатическое действие вируса SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero. При этом значение показателя ингибирования (EC_{50}) для RPH-137 составило 4,69 мкг/мл (21,3 нМ) и 16,24 мкг/мл (73,8 нМ) для доз 50 ТЦД₅₀ и 200 ТЦД₅₀ соответственно. Для молниупиравира этот показатель составил 1900 нМ для обеих доз вируса.

При пероральном введении субстанции молниупиравира в дозе 300 мг/кг 2 раза в сут с использованием лечебно-профилактической схемы было продемонстрировано значимое влияние на развитие SARS-CoV-2 инфекции у сирийских хомячков. При внутримышечном и внутрибрюшинном введении RPH-137 с использованием профилактической и лечебной схем не было показано отчетливого действия на развитие SARS-CoV-2 инфекции (клинические признаки инфекции, массовые коэффициенты легких и макроскопические изменения в легких, относительное количество РНК вируса и активность вируса в ткани легких), хотя по ряду параметров были выявлены статистически значимые отличия и тенденция к восстановлению ряда показателей (снижение относительного количества РНК вируса в орофарингеальных мазках, тенденция к нормализации массы тела, снижение признаков воспаления и общей площади поражения легких) по сравнению с контролем, что открывает перспективы для дальнейшего изучения препарата.

Литература/References

1. Zhou F, Yu T, Du R, Fan G, Liu Y, Liu Z, et al. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet*. 2020;395(10229):1054–62. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30566-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30566-3)
2. Cheng ZJ, Shan J. 2019 novel coronavirus: where we are and what we know. *Infection*. 2020;48(2):155–63. <https://doi.org/10.1007/s15010-020-01401-y>
3. Glasgow A, Glasgow J, Limonta D, Solomon P, Lui I, Zhang Y, et al. Engineered ACE2 receptor traps potentially neutralize SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci USA*.

¹⁰ Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», версия 14 от 27.12.2021 (утв. Министерством здравоохранения Российской Федерации).

- 2020;117(45):28046–55. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016093117>
4. Wysocki J, Ye M, Hassler L, Gupta AK, Wang Y, Nicoleas V, et al. A novel soluble ACE2 variant with prolonged duration of action neutralizes SARS-CoV-2 infection in human kidney organoids. *J Am Soc Nephrol*. 2021;32(4):795–803. <https://doi.org/10.1681/asn.2020101537>
5. Tanaka S, Nelson G, Olson CA, Buzko O, Higashide W, Shin A, et al. An ACE2 triple decoy that neutralizes SARS-CoV-2 shows enhanced affinity for virus variants. *Sci Rep*. 2021;11(1):12740. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91809-9>
6. Bernal AJ, Gomes da Silva MM, Musungaie DB, Kovalchuk E, Gonzalez A, Reyes VD, et al. Molnupiravir for oral treatment of Covid-19 in nonhospitalized patients. *N Engl J Med*. 2022;386(6):509–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2116044>
7. Fischer WA, Eron Jr JJ, Holman W, Cohen MS, Fang L, Szweczyk LJ, et al. A phase 2a clinical trial of molnupiravir in patients with COVID-19 shows accelerated SARS-CoV-2 RNA clearance and elimination of infectious virus. *Sci Transl Med*. 2022;14(628):eabl7430. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abl7430>
8. Rosenke K, Hansen F, Schwarz B, Feldmann F, Haddock E, Rosenke R, et al. Orally delivered MK-4482 inhibits SARS-CoV-2 replication in the Syrian hamster model. *Nat Commun*. 2021;12(1):2295. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-22580-8>
9. Abdelnabi R, Foo CS, Kaptein SJF, Zhang X, Dan Do TN, Langendries L, et al. The combined treatment of Molnupiravir and Favipiravir results in a potentiation of antiviral efficacy in a SARS-CoV-2 hamster infection model. *eBioMedicine*. 2021;72:103595. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2021.103595>
10. Bai Y, Shen M, Zhang L. Antiviral efficacy of Molnupiravir for COVID-19 treatment. *Viruses*. 2022;14(4):763. <https://doi.org/10.3390/v14040763>
11. Desmyter J, Melnick JL, Rawls WE. Defectiveness of interferon production and of rubella virus interference in a line of African green monkey kidney cells (Vero). *J Virol*. 1968;2(10):955–61. <https://doi.org/10.1128/jvi.2.10.955-961.1968>
12. Emeny JM, Morgan MJ. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J Gen Virol*. 1979;43(1):247–52. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-43-1-247>
13. Johansen MD, Irving A, Montagutelli X, Tate MD, Rudloff I, Nold MF, et al. Animal and translational models of SARS-CoV-2 infection and COVID-19. *Mucosal Immunol*. 2020;13(6):877–91. <https://doi.org/10.1038/s41385-020-00340-z>
14. Da Costa CBP, De Menezes Cruz AC, Penha JCQ, Castro HC, Da Cunha LER, Ratcliffe NA, et al. Using *in vivo* animal models for studying SARS-CoV-2. *Expert Opin Drug Discov*. 2022;17(2):121–37. <https://doi.org/10.1080/17460441.2022.1995352>
15. Cao Y, Sun Y, Tian X, Bai Z, Gong Y, Qi J, et al. Analysis of ACE2 gene-encoded proteins across mammalian species. *Front Vet Sci*. 2020;7:457. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00457>
16. Imai M, Iwatsuki-Horimoto K, Hatta M, Loeber S, Halfmann PJ, Nakajima N, et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020;117(28):16587–95. <https://doi.org/10.1073/pnas.2009799117>
17. Kozlovskaya L, Piniaeva A, Ignatyev G, Selivanov A, Shishova A, Kovpak A, et al. Isolation and phylogenetic analysis of SARS-CoV-2 variants collected in Russia during the COVID-19 outbreak. *Int J Infect Dis*. 2020;99:40–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.07.024>
18. Lavrovsky Y, Chestukhin A, Barbashov S, Repik A, Samsonov M, Ignatiev V. ACE2-derived composition and use thereof. WO 2021/202427 A2; 2021.
19. Englebienne P, Van Hoonacker A, Verhas M. Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. *J Spectrosc*. 2003;17:ID 372913. <https://doi.org/10.1155/2003/372913>
20. Sheahan TP, Sims AC, Zhou S, Graham RL, Pruijssers AJ, Agostini ML, et al. An orally bioavailable broad-spectrum antiviral inhibits SARS-CoV-2 in human airway epithelial cell cultures and multiple coronaviruses in mice. *Sci Transl Med*. 2020;12(541):eabb5883. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb5883>
21. Kozlovskaya LI, Volok VP, Shtro AA, Nikolaeva YV, Chistov AA, Matyugina ES, et al. Phenoxazine nucleoside derivatives with a multiple activity against RNA and DNA viruses. *Eur J Med Chem*. 2021;220:113467. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113467>
22. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Exp Pathol. Pharmacol*. 1931;162(4):480–3. <https://doi.org/10.1007/BF01863914>
23. Altman DG, Bland JM. How to randomise. *BMJ*. 1999;319(7211):703–4. <https://doi.org/10.1136/bmj.319.7211.703>
24. Osterrieder N, Bertzbach LD, Dietert K, Abdelgawad A, Vladimirova D, Kunec D, et al. Age-dependent progression of SARS-CoV-2 infection in Syrian hamsters. *Viruses*. 2020;12(7):779. <https://doi.org/10.3390/v12070779>
25. Montgomery DC. *Design and analysis of experiments*. 8th ed. Hoboken: John Wiley & Sons; 2017.
26. Sia SF, Yan L-M, Chin AWH, Fung K, Choy K-T, Wong AYL, et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters. *Nature*. 2020;583(7818):834–8. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2342-5>
27. Ferrari M, Mekkaoui L, Ilca FT, Akbar Z, Bughda R, Lamb K, et al. Characterization of a novel ACE2-based therapeutic with enhanced rather than reduced activity against SARS-CoV-2 variants. *J Virol*. 2021;95(19):e0068521. <https://doi.org/10.1128/JVI.00685-21>
28. Cao X, Maruyama J, Zhou H, Kerwin L, Sattler R, Manning JT, et al. Discovery and development of human SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using an unbiased phage display library approach. *bioRxiv*. 2020. <http://doi.org/10.1101/2020.09.27.316174>

29. Saravanan UB, Namachivayam M, Jeewon R, Huang JD, Durairajan SSK. Animal models for SARS-CoV-2 and SARS-CoV-1 pathogenesis, transmission and therapeutic evaluation. *World J Virol.* 2022;11(1):40–56. <https://doi.org/10.5501/wjv.v11.i1.40>
30. Tian L, Pang Z, Li M, Lou F, An X, Zhu S, et al. Molnupiravir and its antiviral activity against COVID-19. *Front Immunol.* 2022;13:855496. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.855496>
31. Yoon J-J, Toots M, Lee S, Lee M-E, Ludeke B, Luczo JM, et al. Orally efficacious broad-spectrum ribonucleoside analog inhibitor of influenza and respiratory syncytial viruses. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(8):e00766-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00766-18>
32. Baum A, Ajithdoss D, Copin R, Zhou A, Lanza K, Negrón N, et al. REGN-COV2 antibodies prevent and treat SARS-CoV-2 infection in rhesus macaques and hamsters. *Science.* 2020;370(6520):1110–5. <https://doi.org/10.1126/science.abe2402>
33. Higuchi Y, Suzuki T, Arimori T, Ikemura N, Mihara E, Kirita Y, et al. High affinity modified ACE2 receptors protect from SARS-CoV-2 infection in hamsters. *bioRxiv.* 2020. 09.16.299891. <https://doi.org/10.1101/2020.09.16.299891>
34. Rogers TF, Zhao F, Huang D, Beutler N, Burns A, He W-T, et al. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model. *Science.* 2020;369(6506):956–63. <https://doi.org/10.1126/science.abc7520>
35. Bi Z, Hong W, Yang J, Lu S, Peng X. Animal models for SARS-CoV-2 infection and pathology. *MedComm.* 2021;2(4):548–68. <https://doi.org/10.1002/mco2.98>
36. Kim Y-I, Kim S-G, Kim S-M, Kim E-H, Park S-J, Yu K-M, et al. Infection and rapid transmission of SARS-CoV-2 in ferrets. *Cell Host Microbe.* 2020;27(5):704–9.e2. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.03.023>
37. Bao L, Deng W, Huang B, Gao H, Liu J, Ren L, et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature.* 2020;583(7818):830–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y>
38. Sun SH, Chen Q, Gu HJ, Yang G, Wang YX, Huang XY, et al. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2020;28(1):124–33.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.05.020>
39. Soldatov VO, Kubekina MV, Silaeva YY, Bruter AV, Deykin AV. On the way from SARS-CoV-sensitive mice to murine COVID-19 model. *Res Results Pharmacol.* 2020;6(2):1–7. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.6.53633>
40. Shi J, Wen Z, Zhong G, Yang H, Wang C, Huang B, et al. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science.* 2020;368(6494):1016–20. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
41. Richard M, Kok A, de Meulder D, Bestebroer TM, Lamers MM, Okba NMA, et al. SARS-CoV-2 is transmitted via contact and via the air between ferrets. *Nat Commun.* 2020;11(1):3496. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17367-2>
42. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270–3. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>
43. Li W, Greenough TC, Moore MJ, Vasilieva N, Somasundaran M, Sullivan JL, et al. Efficient replication of severe acute respiratory syndrome coronavirus in mouse cells is limited by murine angiotensin-converting enzyme 2. *J Virol.* 2004;78(20):11429–33. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.20.11429-11433.2004>
44. Clever S, Volz A. Mouse models in COVID-19 research: analyzing the adaptive immune response. *Med Microbiol Immunol.* 2022;1–19. <https://doi.org/10.1007/s00430-022-00735-8>
45. Chan JF, Zhang AJ, Yuan S, Poon VK, Chan CC, Lee AC, et al. Simulation of the clinical and pathological manifestations of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in a golden Syrian hamster model: implications for disease pathogenesis and transmissibility. *Clin Infect Dis.* 2020;71(9):2428–46. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa325>
46. Muñoz-Fontela C, Widerspich L, Albrecht RA, Beer M, Carroll MW, de Wit E, et al. Advances and gaps in SARS-CoV-2 infection models. *PLoS Pathog.* 2022;18(1):e1010161. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010161>
47. Deykin AV, Shcheblykina OV, Povetka EE, Golubinskaya PA, Pokrovsky VM, Korokina LV, et al. Genetically modified animals for use in biopharmacology: from research to production. *Res Results Pharmacol.* 2021;7(4):11–27. <https://doi.org/10.3897/rrpharmacology.7.76685>
48. Winkler ES, Bailey AL, Kafai NM, Nair S, McCune BT, Yu J, et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nat Immunol.* 2020;21(11):1327–35. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0778-2>

Вклад авторов. **Е.В. Шипаева** — организация исследования, написание и редактирование текста рукописи; **О.В. Филон, А.В. Зинченко** — анализ данных литературы и планирование исследований, редактирование текста рукописи; **Г.А. Шипунов** — организация исследования, редактирование текста рукописи; **А.А. Дмитриева** — редактирование текста рукописи; **М.С. Лемак** — анализ данных литературы, дизайн эксперимента, анализ результатов, редактирование текста рукописи; **С.А. Гришин** — руководство, анализ результатов, редактирование текста рукописи;

Authors' contributions. **E.V. Shipaeva**—management of the studies, writing and editing of the text of the manuscript; **O.V. Filon, A.V. Zintchenko**—analysis of literature data, planning of the studies, editing of the text of the manuscript; **G.A. Shipunov**—management of the study, editing of the text of the manuscript; **A.A. Dmitrieva**—editing of the text of the manuscript; **M.S. Lemak**—analysis of literature data, elaboration of the experimental design, analysis of the results, editing of the text of the manuscript; **S.A. Grishin**—supervision of the studies, analysis of the results, editing of the text of the

Е.И. Трофимец — проведение исследования, написание и редактирование текста рукописи; **К.Л. Крышень** — проведение экспериментальной части исследования, написание и редактирование текста рукописи; **Л.И. Козловская** — планирование, руководство и проведение экспериментов, анализ результатов, редактирование текста рукописи; **А.С. Лунин** — руководство и проведение экспериментов, сбор экспериментальных данных; **В.Д. Аполухов** — проведение экспериментов, сбор экспериментальных данных; **С.Ф. Барбашов** — разработка и осуществление очистки и формуляции гибридного белка RPH-137, редактирование текста рукописи; **Я.В. Лавровский** — дизайн молекулы и вектора RPH-137; **М.Ю. Самсонов** — анализ данных литературы и планирование исследований, редактирование текста рукописи.

Соответствие принципам этики. Исследование с использованием лабораторных животных было одобрено на заседаниях биоэтической комиссии АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» № 2.31/21 от 12.07.2022 и № 3.57/21 от 17.11.2021.

Благодарности. Исследование проведено при финансовой поддержке группы компаний «Р-Фарм».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

manuscript; **Е.И. Трофимец**—conducting of the study, writing and editing of the text of the manuscript; **К.Л. Kryshen**—conducting of experiments, writing and editing of the text of the manuscript; **Л.И. Kozlovskaya**—planning, supervision and conducting of experiments, editing of the text of the manuscript; **А.С. Lunin**—supervision and conducting of experiments, collection of experimental data; **В.Д. Apolokhov**—conducting of experiments, collection of experimental data; **С.Ф. Barbashov**—development, purification and formulation of RPH-137, editing of the text of the manuscript; **Ya.V. Lavrovsky**—design of the RPH-137 vector and molecule; **M.Yu. Samsonov**—analysis of literature data and planning of the studies, editing of the text of the manuscript.

Ethics approval. The studies involving laboratory animals were approved at meetings of the bioethics committee of the research-and-manufacturing company "HOME OF PHARMACY" No.2.31/21 of 12.07.2021 and No.3.57/21 of 17.11.2021.

Acknowledgements. This study was sponsored by R-Pharm Group.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Шипаева Елена Владимировна, канд. мед. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5953-984X>
shipaeva@rpharm.ru

Филон Ольга Владимировна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8735-7429>
ov.filon@rpharm.ru

Зинченко Аркадий Владимирович, Ph. D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8148-5086>
a.zinchenko@rpharm.ru

Шипунов Георгий Александрович. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4495-7050>
shipunov@rpharm.ru

Дмитриева Анастасия Андреевна, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4743-6189>
aa.dmitrieva@rpharm.ru

Лемак Мария Степановна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4793-7477>
lemak@rpharm.ru

Гришин Сергей Александрович, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7299-660X>
sa.grishin@rpharm.ru

Трофимец Екатерина Игоревна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3246-6457>
trofimets.ei@doclinika.ru

Крышень Кирилл Леонидович, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Козловская Любовь Игоревна, канд. биол. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3029-1035>
kozlovskaya_li@chumakovs.su

Лунин Александр Сергеевич. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4624-2593>
lunin_as@chumakovs.su

Elena V. Shipaeva, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5953-984X>
shipaeva@rpharm.ru

Olga V. Filon. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8735-7429>
ov.filon@rpharm.ru

Arkadi V. Zintchenko, Ph. D. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8148-5086>
a.zinchenko@rpharm.ru

Georgy A. Shipunov. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4495-7050>
shipunov@rpharm.ru

Anastasia A. Dmitrieva. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4743-6189>
aa.dmitrieva@rpharm.ru

Maria S. Lemak, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4793-7477>
lemak@rpharm.ru

Sergey A. Grishin, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7299-660X>
sa.grishin@rpharm.ru

Ekaterina I. Trofimets. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3246-6457>
trofimets.ei@doclinika.ru

Kirill L. Kryshen, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1451-7716>
kryshen.kl@doclinika.ru

Liubov I. Kozlovskaya, Cand. Sci. (Biol.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3029-1035>
kozlovskaya_li@chumakovs.su

Aleksandr S. Lunin. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4624-2593>
lunin_as@chumakovs.su

Аполохов Василий Данилович. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9978-222X>

apolohov_vd@chumakovs.su

Барбашов Сергей Федорович, канд. биол. наук.

barbashov@r-pharm.com

Лавровский Ян Вадимович, канд. биол. наук.

lavrovsky@r-pharm.com

Самсонов Михаил Юрьевич, канд. мед. наук. ORCID:

<https://orcid.org/0000-0001-7721-5059>

samsonov@rpharm.ru

Vasiliy D. Apolokhov. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9978-222X>

apolohov_vd@chumakovs.su

Sergey F. Barbashov, Cand. Sci. (Biol.).

barbashov@r-pharm.com

Yan V. Lavrovsky, Cand. Sci. (Biol.).

lavrovsky@r-pharm.com

Mikhail Yu. Samsonov, Cand. Sci. (Med.). ORCID: [https://](https://orcid.org/0000-0001-7721-5059)

orcid.org/0000-0001-7721-5059

samsonov@rpharm.ru

Поступила 21.06.2022

После доработки 21.10.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Received 21 June 2022

Revised 21 October 2022

Accepted 7 December 2022



Изучение иммуногенности вакцины Гам-КОВИД-Вак

И.А. Кириллов¹, А.П. Пирожков^{2,✉}, В.В. Рубцов², С.Я. Логинова², Н.А. Сайфулина², Т.М. Плеханова², М.А. Тимофеев¹, Д.А. Кутаев², Д.Ю. Логунов³, А.Л. Гинцбург³, С.В. Борисевич²

¹ Управление войск радиационной, химической и биологической защиты Вооруженных Сил Российской Федерации, Фрунзенская наб., д. 22/2, Москва, 119160, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, ул. Октябрьская, д. 11, г. Сергиев Посад-6, Московская область, 141306, Российская Федерация

³ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

✉ Пирожков Алексей Петрович; 48cnii@mil.ru

Резюме

В начале массовой иммунизации личного состава Вооруженных Сил Российской Федерации в ноябре 2020 г. первой в России вакциной Гам-КОВИД-Вак против новой коронавирусной инфекции COVID-19 необходимо было оценить уровень антител у вакцинированных лиц, длительность и напряженность гуморального иммунитета против COVID-19. **Цель работы:** изучение иммуногенной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак у сотрудников военных лечебных учреждений после вакцинации. **Материалы и методы:** наличие специфических антител в сыворотке крови лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак (477 добровольцев), и переболевших COVID-19 (73 пациента) определяли в реакции нейтрализации, методами иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов различных производителей и иммуноблоттинга. Статистическую обработку результатов исследования проводили методами вариационной статистики. **Результаты:** установлено, что у 90,7% вакцинированных выявляются вируснейтрализующие антитела в реакции нейтрализации и у 95,4% — в ИФА. Отмечено снижение уровня антител, выявляемых в реакции нейтрализации и ИФА, у вакцинированных старше 50 лет. Концентрация иммуноглобулина класса G к S-белку вируса SARS-CoV-2, определяемая в ИФА у группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, достоверно выше, чем в группе переболевших COVID-19. Наибольший уровень корреляции результатов определения антител в ИФА и реакции нейтрализации получен при использовании экспериментального набора реагентов для количественного выявления вируснейтрализующих антител методом конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого ангиотензинпревращающего фермента (ACE2). Изучение динамики изменений уровня вируснейтрализующих антител показало, что через три месяца после введения второго компонента вакцины отмечается достоверное снижение уровня антител более чем в два раза. **Выводы:** у лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, формируется эффективный гуморальный иммунитет к возбудителю COVID-19. Снижение среднего геометрического значения титров антител в два раза через три месяца после введения второго компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак свидетельствует о необходимости проведения ревакцинации через 6 месяцев после введения второго компонента вакцины.

Ключевые слова: гуморальный иммунитет; вируснейтрализующие антитела; вакцина; Спутник V; Гам-КОВИД-Вак; COVID-19; SARS-CoV-2; ИФА; иммуноглобулин класса G

Для цитирования: Кириллов И.А., Пирожков А.П., Рубцов В.В., Логинова С.Я., Сайфулина Н.А., Плеханова Т.М., Тимофеев М.А., Кутаев Д.А., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л., Борисевич С.В. Изучение иммуногенности вакцины Гам-КОВИД-Вак. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(4):435–445. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-435-445>

Immunogenicity evaluation of Gam-COVID-Vac (Sputnik V)

I.A. Kirillov¹, A.P. Pirozhkov^{2,✉}, V.V. Rubtsov², S.Ya. Loginova², N.A. Saifulina², T.M. Plekhanova², M.A. Timofeev¹, D.A. Kutaev², D.Y. Logunov³, A.L. Gintsburg³, S.V. Borisevich²

¹ Directorate of Nuclear, Chemical and Biological Protection Troops of the Armed Forces of the Russian Federation, 22/2 Frunzenskaya Emb., Moscow 119160, Russian Federation

² 48 Central Scientific Research Institute, 11 Oktyabrskaya St., Sergiev Posad-6, Moscow Region 141306, Russian Federation

³ N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, 18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

✉ Alexey P. Pirozhkov; 48cnii@mail.ru

Abstract

In November 2020, the Armed Forces of the Russian Federation began mass immunisation of the personnel with Gam-COVID-Vac (Sputnik V), the first Russia vaccine against the new coronavirus infection (COVID-19). Thus, it became necessary to assess post-vaccination antibody levels and the duration and intensity of humoral immunity to COVID-19. **The aim of the study** was to investigate the immunogenicity and efficacy of Gam-COVID-Vac in military medical staff after vaccination. **Materials and methods:** the authors determined the presence of specific antibodies in the serum of individuals immunised with Gam-COVID-Vac (477 volunteers) and COVID-19 convalescents (73 patients), using virus neutralisation (VN), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) with reagent kits by several manufacturers, and immunoblotting. The results of the study were evaluated using analysis of variance. **Results:** VN detected virus neutralising antibodies in 90.7% of vaccinated subjects; ELISA, in 95.4%. Both VN and ELISA showed lower antibody levels in the vaccinated over 50 years of age. ELISA demonstrated a significantly higher concentration of anti-SARS-CoV-2 spike IgG in the Gam-COVID-Vac group than in the COVID-19 convalescent group. The correlation between antibody detection results by VN and ELISA was the strongest when the authors used their experimental reagent kit for quantitative detection of virus neutralising antibodies by competitive ELISA with the recombinant human ACE2 receptor. Having analysed the time course of neutralising antibody titres, the authors noted a significant, more than two-fold decrease in geometric means of the titres three months after administration of the second vaccine component. **Conclusions:** the subjects vaccinated with Gam-COVID-Vac gain effective humoral immunity to COVID-19. The decrease in titres indicates the need for revaccination in 6 months.

Key words: humoral immunity; virus neutralising antibodies; vaccine; Sputnik V; Gam-COVID-Vac; COVID-19; SARS-CoV-2; ELISA; immunoglobulin G

For citation: Kirillov I.A., Pirozhkov A.P., Rubtsov V.V., Loginova S.Ya., Saifulina N.A., Plekhanova T.M., Timofeev M.A., Kutaev D.A., Logunov D.Y., Gintsburg A.L., Borisevich S.V. Immunogenicity evaluation of Gam-COVID-Vac (Sputnik V). *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):435–445. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-435-445>

Введение

В августе 2020 г. была внедрена в практику отечественного здравоохранения первая вакцина Гам-КОВИД-Вак (Спутник V), разработанная специалистами ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, против новой коронавирусной инфекции COVID-19 на основе аденовирусного вектора со встроенным фрагментом генетического материала, кодирующим шиповидный гликопротеин (spike protein, или S-белок) вируса SARS-CoV-2.

В ходе проведения I–II и III фаз клинических исследований указанной вакцины получены результаты изучения ее иммуногенности [1, 2]. Масовая иммунизация вакциной Гам-КОВИД-Вак в Вооруженных силах Российской Федерации проведена в ноябре 2020 г. Ранее было вакцинировано около 2,5 тыс. военнослужащих, большая часть которых являлась сотрудниками лечебных учреждений Главного военно-медицинского управления. По поручению Министра обороны Российской Федерации в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России во взаимодействии с Главным военно-медицинским управлением было организовано проведение исследования по количественной оценке гуморального иммунитета у личного состава военных лечебных учреждений, иммунизированного вакциной Гам-КОВИД-Вак, с целью определения уровня антител, длительности и напряженности иммунитета против новой коронавирусной инфекции COVID-19.

Известно, что эффективность вакцинации против вирусных инфекций главным образом определяется наличием вируснейтрализующих антител (ВНА), которые выявляются в реакции нейтрализации [3]. Однако постановка реакции нейтрализации является длительной и трудоемкой процедурой, которая проводится с использованием живого вируса SARS-CoV-2 в условиях лабораторий, предназначенных для работы с возбудителями II группы патогенности. Поэтому для массовой оценки гуморального иммунитета у лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, используют общепринятый и доступный в обычной лаборатории метод определения/выявления иммуноглобулинов класса G (IgG) к рецептор-связывающему домену (receptor-binding domain, RBD) S-белка или полноразмерному S-белку вируса SARS-CoV-2 с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) [4, 5]. Однако коэффициент корреляции между уровнем антител в реакции нейтрализации и уровнем IgG, выявляемых в ИФА с помощью различных наборов реагентов, может значительно отличаться в зависимости от варианта анализа и используемых рекомбинантных антигенов. Поэтому для полу-

чения достоверных результатов оценки гуморального иммунитета у вакцинированных лиц необходимо было экспериментально обосновать выбор оптимального варианта проведения ИФА и соответствующего набора реагентов.

Цель работы — изучение иммуногенной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак у сотрудников военных лечебных учреждений после вакцинации.

Материалы и методы

Пациенты и добровольцы. Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности. Взятие крови у пациентов и добровольцев для исследований проводили после получения информированного согласия на включение результатов их обследования в данное исследование, которое было одобрено на заседании биоэтической комиссии ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, протокол заседания № 6(924) от 04.05.2022.

В исследование были включены пробы крови, полученные от 477 добровольцев (группа иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак) из числа медицинского персонала в возрасте от 23 до 72 лет, из них 267 (55,9%) мужчин и 210 (44,0%) женщин, и 93 пациентов с подтвержденным диагнозом COVID-19 (группа пациентов, переболевших COVID-19 (реконвалесцентов)) в возрасте от 26 до 63 лет, из них 49 (52,6%) мужчин и 44 (47,3%) женщины. Средний возраст в группе добровольцев составил 40,2 года, в группе пациентов — 37,5. Критериями включения в исследование служили возраст добровольца или пациента старше 18 лет, отсутствие в анамнезе сведений о перенесенном ранее COVID-19 и наличие информированного согласия. Определение наличия антител в сыворотках крови добровольцев к вирусу SARS-CoV-2 перед проведением вакцинации не проводили.

Реакция нейтрализации. Определение уровня вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 проводили в реакции нейтрализации *in vitro* классическим методом. Для постановки реакции нейтрализации готовили ряд последовательных разведений испытуемых сывороток крови в среде 199 (НПП «ПанЭко», Россия) в одинаковых объемах. Ко всем разведениям сыворотки добавляли вирус SARS-CoV-2 в дозе 50 БОЕ. Смесь вируса и сыворотки крови выдерживали при температуре 37 °С в течение 60 мин. Далее проводили заражение однослойной культуры клеток Vero B (постоянная культура клеток почки африканской зеленой мартышки, полученная из Института вирусологии Д.И. Ивановского). В качестве контроля

использовали нормальную сыворотку крови человека и образцы испытуемых сывороток в разведении 1:2 в среде 199. Инфицированный монослой клеток термостатировали в течение 60 мин при 37 °С, удаляли инокулят и на монослой наносили питательное агаровое покрытие, под которым монослой инкубировали в течение 2 сут, после чего окрашивали витальным красителем (нейтральный красный) и через сутки учитывали результаты по методу, предложенному Н.Н. Гинсбургом с соавт. [6].

Вирусы. В работе использовали вирус SARS-CoV-2, исходного варианта В.1 (вариант В), соответствующий референсной последовательности NC_045512.2 (Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome), а также варианты «альфа» В.1.1.7 (британский), «бета» В.1.351 (южно-африканский), «гамма» Р.1 (бразильский) и «дельта» В.1.617 (индийский), хранившиеся в Специализированной коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Определение биологической активности вариантов SARS-CoV-2 проводили на флаконах с однослойной монослойной культурой клеток Vero В методом негативных колоний под агаровым покрытием [7].

Иммуноферментный анализ. ИФА проводили с использованием наборов реагентов для иммуноферментного выявления IgG к SARS-CoV-2:

- набор реагентов для иммуноферментного количественного определения IgG к SARS-CoV-2 в сыворотке (плазме) крови «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» производства АО «Вектор-Бест», Россия (ПУ № РЗН 2021/14458);
- набор реагентов для иммуноферментного выявления IgG к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-CoV-2 «SARS-COV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» производства ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (ПУ № РЗН 2020/10393);
- экспериментальный набор реагентов «SARS-CoV-2-ВНА-ИФА-РХБЗ», изготовленный в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, для количественного выявления ВНА методом конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого ангиотензинпревращающего фермента 2 (рецептор ангиотензина 2, ACE2) [8].

Количественное определение ВНА с помощью конкурентного ИФА проводили с использованием рекомбинантного внеклеточного до-

мена человеческого рецептора ангиотензина ACE2 (ООО «Хайтест», Россия), иммобилизованного на поверхности лунок полистиролового планшета. Изучаемые образцы сывороток крови и калибровочные пробы с известной концентрацией ВНА в международных единицах IU (относительно Международного стандарта ВОЗ – WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin NIBSC code: 20/136¹) предварительно разводили в 10 раз на отдельном планшете с помощью рабочего раствора рекомбинантного S-белка вируса SARS-CoV-2 (ООО «Хайтест», Россия), конъюгированного с пероксидазой хрена. Планшет помещали в термостат и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С с интенсивностью перемешивания 300 об/мин. Затем полученные разведения сыворотки крови с конъюгатом S-белка вируса SARS-CoV-2 переносили в лунки планшета с иммобилизованным рецептором ACE2. Планшет помещали в термостат и инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С с интенсивностью перемешивания 300 об/мин. После промывки в лунки планшета вносили раствор тетраметилбензидина, через 25 мин реакцию останавливали внесением раствора серной кислоты и проводили учет результатов на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Электрофорез и иммуноблоттинг. Электрофорез рекомбинантного RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2 и последующий иммуноблоттинг с использованием образцов сыворотки крови группы пациентов, переболевших COVID-19, и группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, проводили в соответствии со стандартной методикой [9, 10].

Статистическую обработку результатов проводили с использованием методик, описанных в руководствах И.П. Ашмарина, А.А. Воробьева [11] и В.С. Генеса [12]. Для характеристики полученных вариационных рядов были использованы: среднее геометрическое значение, среднее квадратическое отклонение, доверительный интервал, коэффициент корреляции. Достоверность различий коэффициента корреляции определяли по методике В.Ю. Урбаха [13].

Результаты и обсуждение

На первом этапе работы было проведено исследование специфичности антител к S-белку вируса SARS-CoV-2, содержащихся в исследованных образцах сывороток, методом иммуноблоттинга. Для этого был проведен

¹ WHO International Standard. First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human). NIBSC code: 20/136. <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>

электрофорез рекомбинантного RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2 и последующий иммуноблоттинг с использованием исследуемых образцов сыворотки. Проводили сравнительный анализ образцов сывороток крови группы пациентов, переболевших COVID-19, и группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак. Для исследований были использованы объединенные образцы сывороток крови исследуемых групп, в которых содержание IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2 было одинаковым (титр в ИФА 1:12800). В результате исследования было установлено, что при одинаковом уровне IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2 в группах сравнения более выраженное взаимодействие антител с рекомбинантным RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 наблюдается в группе вакцинированных лиц (рис. 1).

Для изучения концентрации IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотках крови участников исследования из групп лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак и переболевших COVID-19, были проведены исследования с помощью набора реагентов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ». Исследовали образцы

сывороток крови, полученные от 93 пациентов, переболевших в первую волну пандемии, вызванную уханьским вариантом вируса SARS-CoV-2, на 18–30 сут от начала заболевания, которые имели подтвержденный диагноз и прошли стационарное лечение, а также от 93 добровольцев из числа медицинского персонала, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, через 21–40 сут после введения второго компонента вакцины. Результаты сравнения двух групп представлены на рисунке 2.

В группе лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак (рис. 2), уровень IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2, выявляемый в ИФА, достоверно выше ($p < 0,05$), чем в группе переболевших инфекцией COVID-19, вызванной исходным вариантом B.1 вируса SARS-CoV-2. Учитывая, что образцы сыворотки крови в группе переболевших COVID-19 были получены от лиц, прошедших стационарное лечение и, следовательно, имевших выраженную клиническую картину, и так как в выборку исследования не были включены образцы сыворотки крови от пациентов с легким течением и с атипичными формами

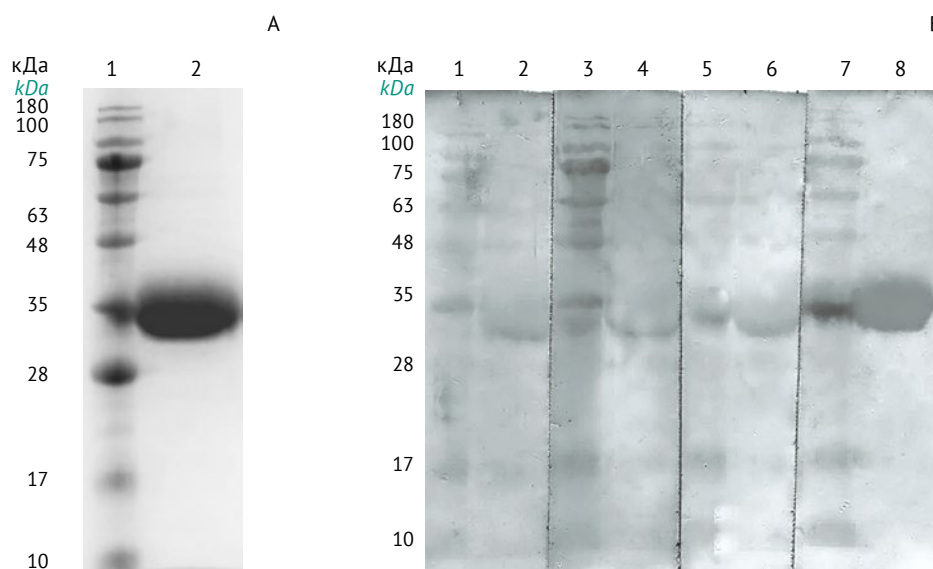


Рис. 1. Электрофореграмма рекомбинантного RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2 (А) и иммуноблоттинг с образцами сыворотки крови группы реконвалесцентов и группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак (В). Дорожки на электрофореграмме (А): 1 – стандарт молекулярной массы белков (Абсам, США, кат. № ab116027); 2 – рекомбинантный RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2. Данные иммуноблоттинга (В): дорожки 1, 3, 5, 7 – стандарт молекулярной массы белков (Абсам, США, кат. № ab116027); дорожка 2 – объединенный образец сывороток крови группы реконвалесцентов; дорожки 4 и 6 – моноклональные антитела к RBD S-белка SARS-CoV-2 (положительный контроль); дорожка 8 – объединенный образец сывороток крови группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак.

Fig. 1. Electropherogram of the recombinant SARS-CoV-2 RBD (A) and immunoblot with serum samples of the convalescent group and the Gam-COVID-Vac group (B). Electropherogram lanes (A): 1—protein molecular weight standard (Abcam, USA, Cat. No. ab116027); 2—recombinant SARS-CoV-2 RBD. Immunoblot lanes (B): 1, 3, 5, 7—protein molecular weight standard (Abcam, USA, Cat. No. ab116027); 2—pooled serum sample of the convalescent group; 4, 6—monoclonal antibodies to SARS-CoV-2 RBD (positive control); 8—pooled serum sample of the Gam-COVID-Vac group.

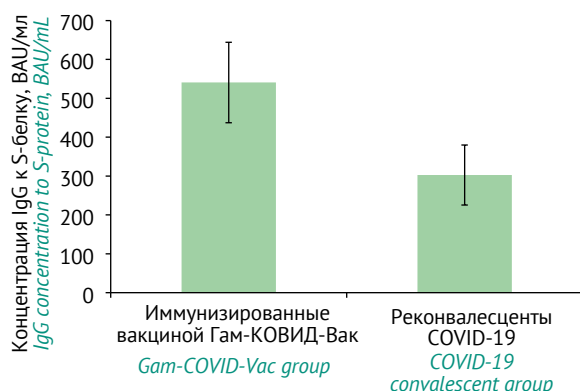


Рис. 2. Результаты сравнения уровня IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2 в сыворотках крови группы иммунизированных и группы реконвалесцентов. Погрешность среднего геометрического значения уровня антител по оси ординат представлена доверительным интервалом I_{95} .

Fig. 2. Comparison results for serum levels of anti-SARS-CoV-2 spike IgG in vaccinated subjects and convalescents. Error bars along the Y axis show confidence intervals, I_{95} , for geometric means of antibody levels.

заболевания, можно ожидать, что при расширении выборки в группе переболевших различие между группами возрастет.

На втором этапе исследований было проведено сравнительное изучение в реакции нейтрализации и ИФА уровня специфических антител в образцах сыворотки крови от 477 добровольцев (потенциальных доноров иммунной плазмы), иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, взятых на 21–28 сут после введения второго компонента вакцины. С этой целью использовали набор реагентов «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи», в котором для сенсibilизации лунок планшета и связывания антител использовали рекомбинантный RBD S-белка вируса SARS-CoV-2. Полуколичественное определение уровня антител с помощью данного набора реагентов проводили путем титрования сывороток крови двукратным шагом начиная с разведения 1:200. Был продемонстрирован средний уровень корреляции ($r=0,67$) между титром ВНА, определяемым в реакции нейтрализации, и титром IgG к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, выявляемым в ИФА (рис. 3). Ранее в проведенных работах [14, 15] была получена различная степень корреляции результатов определения антител к вирусу SARS-CoV-2 с помощью иммунохимических методов с результатами определения ВНА в реакции нейтрализации. По результатам данного исследования было показано, что выявленное в реакции нейтрализации среднее геометрическое

значение титров ВНА составило 1:27. Значение титра ВНА, установленное в реакции нейтрализации, в 75% образцов сыворотки крови составило от 1:10 до 1:80. Максимальное значение титра ВНА (1:5120) было выявлено у одного вакцинированного, что было связано с наличием у данного лица иммунитета после перенесенной инфекции COVID-19 в течение 6 месяцев, предшествующих вакцинации, при этом среднее геометрическое значение титров составило 1:2840 (142 BAU/мл).

Важно отметить, что в группе, состоящей из 477 иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, положительный результат в реакции нейтрализации, свидетельствующий о наличии ВНА, был выявлен у 90,1%, а в ИФА положительными были 95,4%. Оценка иммуногенной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак в зависимости от возраста вакцинированных показала, что у иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак лиц старше 50 лет отмечается снижение уровня антител в реакции нейтрализации и в ИФА (табл. 1), что подтверждается ранее полученными данными клинических исследований [1, 16].

С целью выбора оптимального варианта проведения ИФА, позволяющего определять уровень антител с высоким значением коэффициента корреляции с результатами их оценки в реакции нейтрализации, нами были проведены сравнительные исследования концентрации ВНА и IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2, выявляемых в ИФА с помощью наборов реагентов для их количественного определения. Для этого использовали набор реагентов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» на основе рекомбинантного полноразмерного S-белка вируса SARS-CoV-2, набор реагентов «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» на основе RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 и экспериментальный набор реагентов для конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого рецептора ACE-2 «SARS-CoV-2-ВНА-ИФА-РХБЗ».

Данные наборы предназначены для количественного определения уровня антител, в которых для построения калибровочной кривой использованы калибровочные пробы с известной концентрацией антител, выраженной в международных единицах относительно Международного стандарта ВОЗ². Образцы сыворотки крови от 97 лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, группировали в соответствии с уровнем титра IgG к вирусу SARS-CoV-2, определенным ранее в ИФА. Более высокие средние геометрические значения титров антител были

² WHO International Standard. First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin (human). NIBSC code: 20/136. <https://www.nibsc.org/documents/ifu/20-136.pdf>

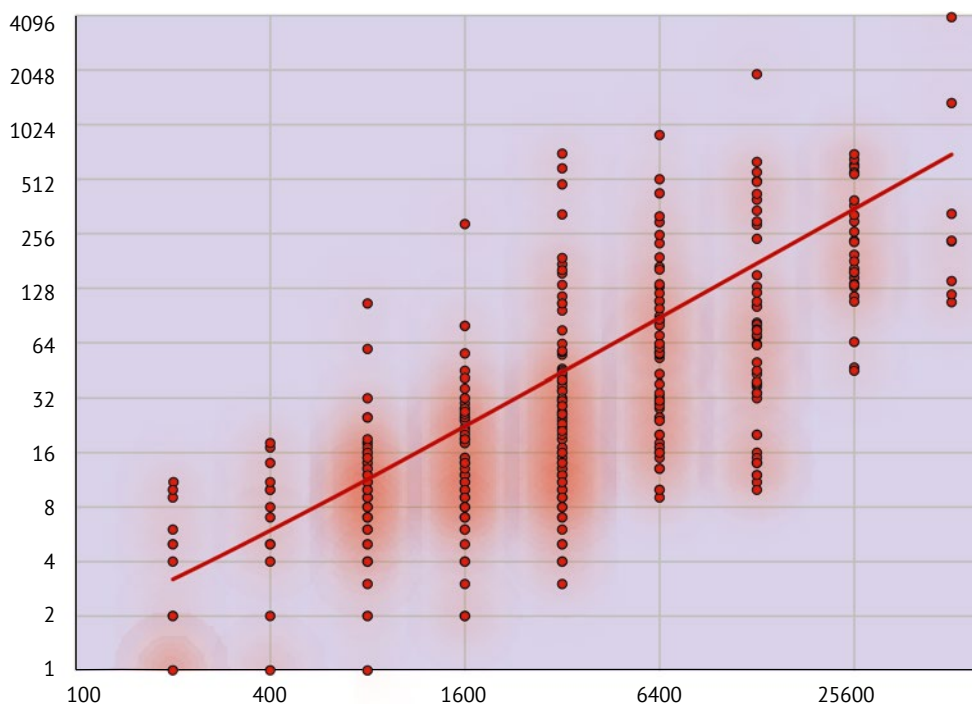


Рис. 3. Распределение уровней вируснейтрализующих антител (ВНА) в реакции нейтрализации в зависимости от уровней IgG к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, выявляемых в ИФА, в группе лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак. По оси абсцисс — обратная величина титра IgG в ИФА, по оси ординат — обратная величина титра ВНА в реакции нейтрализации.

Fig. 3. Distribution of neutralising antibody levels detected by virus neutralisation versus anti-SARS-CoV-2 RBD IgG levels detected by ELISA in the subjects immunised with Gam-COVID-Vac. The X axis shows reciprocal IgG titres determined by ELISA; the Y-axis shows reciprocal neutralising antibody titres determined by virus neutralisation.

Таблица 1. Оценка гуморального иммунитета в различных возрастных группах после иммунизации вакциной Гам-КОВИД-Вак
Table 1. Assessment of humoral immunity after vaccination with Gam-COVID-Vac in different age groups

Метод оценки <i>Assessment method</i>	Показатель оценки гуморального иммунитета в возрастной группе <i>Humoral immunity statistics for the age group of</i>			
	≤50 лет <i>≤50 years</i>		>50 лет <i>>50 years</i>	
	Среднее геометрическое значение титров антител <i>Geometric mean of the antibody titre</i>	Доверительный интервал $I_{95}(X_{min}-X_{max})$ <i>Confidence interval, $I_{95}(X_{min}-X_{max})$</i>	Среднее геометрическое значение титров антител <i>Geometric mean of the antibody titre</i>	Доверительный интервал $I_{95}(X_{min}-X_{max})$ <i>Confidence interval, $I_{95}(X_{min}-X_{max})$</i>
ИФА <i>ELISA</i>	1:3210	(1:2080–1:5470)	1:1820	(1:770–1:3920)
Реакция нейтрализации <i>Virus neutralisation</i>	1:38	(1:32–1:50)	1:23	(1:16–1:37)

получены при использовании набора реагентов «SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ». В то же время наибольшая степень корреляции ($r=0,84$) между результатами определения уровня антител в ИФА и в реакции нейтрализации была установлена при использовании набора реагентов «SARS-CoV-2-ВНА-ИФА-РХБЗ» (табл. 2).

В дальнейшем оценку динамики уровня гуморального иммунитета после вакцинации исследовали с помощью набора реагентов на основе

конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого рецептора ACE2 «SARS-CoV-2-ВНА-ИФА-РХБЗ». С этой целью провели сравнительное исследование образцов сывороток крови в группе иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак на наличие ВНА через 1, 2, 3 и 4 мес. после введения второго компонента вакцины. В результате проведенного исследования установлено, что снижение уровня ВНА отмечается уже на 2 мес. после введения второго компонента,

Таблица 2. Данные корреляционного анализа между результатами определения уровня антител, полученными при использовании ИФА с помощью различных наборов реагентов и реакции нейтрализации, $n=97$

Table 2. Correlation analysis results for antibody levels obtained by ELISA with different reagent kits and by virus neutralisation, $n=97$

Метод оценки (набор реагентов) <i>Test method (reagent kit)</i>	Единица измерения уровня антител <i>Unit of measurement for antibody levels</i>	Среднее геометрическое значение уровня антител <i>Geometric mean of antibody titres</i>	Коэффициент корреляции между уровнем антител, выявляемых с помощью ... <i>Correlation coefficient between antibody levels detected by</i>			
			Реакция нейтрализации <i>Virus neutralisation</i>	«SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» <i>Kit 1</i>	«SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ» <i>Kit 2</i>	«SARS-CoV-2-VNA-ИФА-РХБЗ» <i>Kit 3</i>
Реакция нейтрализации <i>Virus neutralisation</i>	Титр <i>Titre</i>	1:23	–	0,67 ^А	0,72 ^В	0,84 ^С
ИФА («SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи») <i>Kit 1</i>	Титр <i>Titre</i>	1:2026	0,67 ^А	–	0,91	0,82
ИФА («SARS-CoV-2-IgG количественный-ИФА-БЕСТ») <i>Kit 2</i>	BAU/мл <i>BAU/mL</i>	460	0,72 ^В	0,91	–	0,88
ИФА («SARS-CoV-2-VNA-ИФА-РХБЗ») <i>Kit 3</i>	IU/мл <i>IU/mL</i>	204	0,84 ^С	0,82	0,88	–

Примечание. Различия между значениями А и С и между значениями В и С статистически достоверны при уровне значимости $p<0,05$. IU – международные единицы; BAU – единицы связывания антител; «–» – неприменимо.

Note. The differences between A and C and between B and C are statistically significant ($p<0.05$). IU—international units; BAU—binding antibody units; – not applicable; Kit 1—SARS-CoV-2-RBD-ELISA-Gamaleya by the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology; Kit 2—SARS-CoV-2-IgG quantitative-EIA-BEST by Vector-Best, AO; Kit 3—SARS-CoV-2-VNA-ELISA-NCBS by the 48 Central Scientific Research Institute (experimental kit).

а через три месяца отмечается достоверное снижение среднего геометрического значения уровня антител более чем в 2 раза (рис. 4).

С появлением различных вариантов SARS-CoV-2 встал вопрос об изучении напряженности гуморального иммунитета к ним у лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак. С этой целью была проведена оценка эффективности гуморального иммунитета в реакции нейтрализации с образцами сывороток крови в группе лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, со значениями титра антител в ИФА после вакцинации от 1:800 до 1:25600 к наиболее актуальным на момент исследования вариантам SARS-CoV-2 (табл. 3).

Сравнительный анализ результатов оценки напряженности гуморального иммунитета методом ИФА и в реакции нейтрализации в отношении всех пяти значимых вариантов SARS-CoV-2 свидетельствует о том, что показатели ВНА иммунных сывороток крови, включая индийский вариант «дельта», подтверждают эпидемиологическую эффективность вакцины Гам-КОВИД-Вак. При этом отмечается, что для нейтрализации данного варианта вируса необходим в три раза более высокий уровень ВНА по сравнению с исходным (уханьским) вариантом, что под-

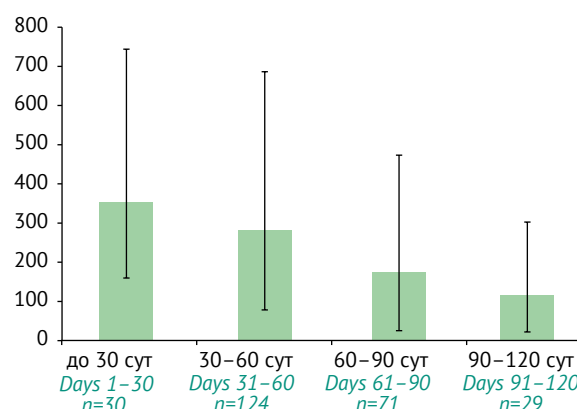


Рис. 4. Динамика изменения уровня антител к вирусу SARS-CoV-2 в группе иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак. По оси абсцисс – сутки после введения второго компонента вакцины. По оси ординат – уровень антител, Международные единицы (IU/мл) вируснейтрализующих антител относительно стандарта WHO 20/136. Погрешность среднего геометрического значения уровня антител по оси ординат представлена доверительным интервалом I_{95} .

Fig. 4. Time course of anti-SARS-CoV-2 antibody levels after immunisation with Gam-COVID-Vac. The X axis represents days after administration of the second vaccine component; the Y axis indicates virus neutralising antibody levels expressed in international units (IU/mL) using WHO standard 20/136. Error bars along the Y axis show confidence intervals, I_{95} for geometric means of antibody levels.

Таблица 3. Результаты оценки значений титра вируснейтрализующих антител (ВНА) в образцах сыворотки крови в группе лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, в отношении пяти вариантов вируса SARS-CoV-2, $n=30$

Table 3. Evaluation results for serum neutralising antibody (NA) titres in the Gam-COVID-Vac group with reference to five SARS-CoV-2 variants, $n=30$

Вариант вируса SARS-CoV-2 <i>SARS-CoV-2 variant</i>	Количество уникальных мутаций в S-белке (общее количество) ^a <i>Unique spike protein mutations (total number)</i>	Обратная величина среднего геометрического значения титров ВНА <i>Reciprocal geometric mean of NA titres</i>	Кратность снижения вируснейтрализующей активности сыворотки ^a , $X_{cp} \pm \sigma$ <i>Serum neutralising activity reduction^a factor, $X_{mean} \pm \sigma$</i>
Исходный вариант B.1 (вариант В) <i>Original variant B.1 (variant B)</i>	–	125,5	–
Вариант «альфа» B.1.1.7 (британский) <i>Alpha, B.1.1.7 (UK)</i>	4 (11)	88,8	1,4 $\pm$ 0,8
Вариант «бета» B.1.351 (южно-африканский) <i>Beta, B.1.351 (South Africa)</i>	6 (10)	28,2	4,5 $\pm$ 4,2
Вариант «гамма» P.1 (бразильский) <i>Gamma, P.1 (Brazil)</i>	8 (12)	41,4	3,0 $\pm$ 2,9
Вариант «дельта» B.1.617 (индийский) <i>Delta, B.1.617 (India)</i>	7 (10)	45,9	2,7 $\pm$ 2,3

Примечание. «–» — неприменимо.

^a Относительно исходного варианта B.1 (вариант В) вируса SARS-CoV-2.

Note. — not applicable.

^a Compared to original SARS-CoV-2 variant B.1 (variant B).

тверждается подъемом заболеваемости в период распространения в популяции индийского варианта, в том числе и среди лиц, вакцинированных более шести месяцев назад.

Анализ иммунного ответа у ряда ранее вакцинированных лиц, поступивших в стационар с манифестной формой COVID-19, вызванной индийским вариантом вируса SARS-CoV-2, показал, что даже в случае критического снижения уровня специфических антител после иммунизации вакциной Гам-КОВИД-Вак, которое может отмечаться на 6 месяц после введения второго компонента, происходит быстрый и значительно более высокий прирост уровня антител. Титр IgG к S-белку SARS-CoV-2, выявляемый в ИФА, в ряде таких случаев достигал значений 1:102400, что превышало максимальный уровень 1:51200, отмечаемый ранее у некоторых вакцинированных после перенесенного COVID-19. Полученные результаты позволяют предположить длительное сохранение у лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, популяции В-клеток памяти, ответственных за выработку антител при повторном инфицировании.

Выводы

1. Оценка иммуногенной эффективности вакцины Гам-КОВИД-Вак показала, что среди привитых положительный результат в реакции нейтрализации был выявлен у 90,1%, среднее геометрическое значение титров вируснейтрализующих антител в реакции нейтрализации на 21–28-е сутки после введения второго компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак составило 1:27. С помощью ИФА IgG к RBD S-белка

вируса SARS-CoV-2 выявлены у 95,4% вакцинированных лиц со средним геометрическим значением титров 1:2840. У иммунизированных лиц в возрасте старше 50 лет отмечается снижение уровня специфических антител, выявляемых в реакции нейтрализации и в ИФА.

2. Концентрация IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2, определяемая в ИФА у группы лиц, иммунизированных вакциной Гам-КОВИД-Вак, достоверно выше, чем в группе пациентов, переболевших новой коронавирусной инфекцией COVID-19, вызванной исходным вариантом B.1 вируса SARS-CoV-2, с уровнем значимости $p<0,05$.

3. Коэффициент корреляции между значениями титров антител в реакции нейтрализации и уровнем IgG к S-белку вируса SARS-CoV-2, выявляемых в ИФА с помощью различных наборов реагентов, составил от 0,67 до 0,84. Наибольший уровень корреляции выявлен при использовании экспериментального набора реагентов для количественного выявления вируснейтрализующих антител методом конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого рецептора ACE2.

4. Изучение динамики уровня вируснейтрализующих антител показало, что через три месяца после введения второго компонента вакцины Гам-КОВИД-Вак отмечается снижение среднего геометрического значения титров антител в два раза, что свидетельствует о необходимости проведения ревакцинации через 6 месяцев после введения второго компонента вакцины.

Литература/References

1. Logunov DY, Dolzhikova IV, Shcheblyakov DV, Tukhvatulin AI, Zubkova OV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*. 2021;397(10275):671–81. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00234-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00234-8)
2. Logunov DY, Dolzhikova IV, Zubkova OV, Tukhvatullin AI, Shcheblyakov DV, Dzharullaeva AS, et al. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia. *Lancet*. 2020;396(10255):887–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31866-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31866-3)
3. Львов ДК, ред. *Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: Медицинское информационное агентство; 2013. [Lvov DK, ed. *Guide to Virology: Viruses and Viral Infections of Humans and Animals*. Moscow: Medicinskoe Informatsionnoe Agentstvo; 2013 (In Russ.)]
4. Bundschuh C, Egger M, Wiesinger K, Gabriel C, Clo-di M, Mueller T, Dieplinger B. Evaluation of the EDI enzyme linked immunosorbent assays for the detection of SARS-CoV-2 IgM and IgG antibodies in human plasma. *Clin Chim Acta*. 2020;509:79–82. <https://doi.org/10.1016/j.ccca.2020.05.047>
5. Xiang F, Wang X, He X, Peng Z, Yang B, Zhang J, et al. Antibody detection and dynamic characteristics in patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis*. 2020;71(8):1930–4. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa461>
6. Гинсбург НН, Касымов КТ, Альтштейн АД. Сравнительное изучение различных методов титрования вируснейтрализующих антител к вирусу полиомиелита в культуре ткани. *Вопросы вирусологии*. 1960;(1):20–5. [Ginsburg NN, Kasy-mov KT, Altshtein AD. Comparative study of various methods of titration of virus-neutralising antibodies to poliomyelitis virus in tissue culture. *Voprosy Virologii = Problems of Virology*. 1960;5:20–5 (In Russ.)]
7. Пшеничников ВА, Семенов БФ, Зезеров ЕГ, ред. *Стандартизация методов вирусологических исследований*. М.: Медицина; 1974. [Pshenichnov VA, Semenov BF, Zezerov EG, eds. *Standardization of Virological Research Methods*. Moscow: Meditsina; 1974 (In Russ.)]
8. Case JB, Rothlauf PW, Chen RE, Liu Z, Zhao H, Kim AS, et al. Neutralizing antibody and soluble ACE2 inhibition of a replication-competent VSV-SARS-CoV-2 and a clinical isolate of SARS-CoV-2. *Cell Host Microbe*. 2020;28(3):475–85. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.06.021>
9. Kim B. Western blot techniques. *Methods Mol Biol*. 2017;1606:133–9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6990-6_9
10. Towbin H, Gordon J. Immunoblotting and dot immunobinding – current status and outlook. *J Immunol Methods*. 1984;72(2):313–40. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(84\)90001-2](https://doi.org/10.1016/0022-1759(84)90001-2)
11. Ашмарин ИП, Воробьев АА. *Статистические методы в микробиологических исследованиях*. Л.: Гос. изд. мед. лит.; 1962. [Ashmarin IP, Vorobyov AA. *Statistical Methods in Microbiological Research*. Leningrad: Gosudarstvennoe Izdanie Meditsinskoy Literatury; 1962 (In Russ.)]
12. Генес ВС. *Некоторые простые методы кибернетической обработки данных диагностических и физиологических исследований*. М.; 1967. [Genes VS. *Some Simple Methods for Cybernetic Processing of Data from Diagnostic and Physiological Studies*. Moscow; 1967 (In Russ.)]
13. Урбах ВЮ. *Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях*. М.: Медицина; 1975. [Urbakh VYu. *Statistical Analysis in Biological and Medical Research*. Moscow: Meditsina; 1975 (In Russ.)]
14. Nam M, Seo JD, Moon HW, Kim H, Hur M, Yun YM. Evaluation of humoral immune response after SARS-CoV-2 vaccination using two binding antibody assays and a neutralizing antibody assay. *Microbiol Spectr*. 2021;9(3):e0120221. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.01202-21>
15. Mahmoud SA, Ganesan S, Naik S, Bissar S, Zamel IA, Warren KN, et al. Serological assays for assessing postvaccination SARS-CoV-2 antibody response. *Microbiol Spectr*. 2021;9(2):e0073321. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00733-21>
16. Hoshida S, Koeda N, Hattori H, Tanaka M, Tanaka I, Fukui H, et al. Age- and sex-based changes in spike protein antibody status after SARS-CoV-2 vaccination and effect of past-infection in healthcare workers in Osaka. *BMC Infect Dis*. 2022;22(1):709. <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07695-7>

Вклад авторов. И.А. Кириллов — обоснование актуальности исследования и организация исследований; А.П. Пирожков — дизайн исследования, сбор, анализ и интерпретация результатов работы, написание текста рукописи статьи; В.В. Рубцов — проведение реакции нейтрализации и анализ результатов; С.Я. Логинова — проведение реакции нейтрализации с вариантами вируса SARS-CoV-2 и анализ результатов; Н.А. Сайфулина — проведение иммуноферментного анализа; Т.М. Плеханова — проведение иммуноблоттинга; М.А. Тимофеев — оценка достоверности результатов

Authors' contributions. I.A. Kirillov—substantiation of the study concept, initiation and coordination of the study; A.P. Pirozhkov—elaboration of the study design, collection, analysis and interpretation of the study results, writing of the text of the manuscript; V.V. Rubtsov—performance of virus neutralisation tests and analysis of their results; S.Ya. Loginova—performance of virus neutralisation tests with SARS-CoV-2 variants and analysis of the results; N.A. Saifulina—performance of enzyme immunoassays; T.M. Plekhanova—performance of immunoblotting; M.A. Timofeev—evaluation of the

исследования; **Д.А. Кутаев** — анализ и интерпретация результатов исследования; **Д.Ю. Логунов** — существенный вклад в концепцию работы; **А.Л. Гинцбург** — критический пересмотр содержания текста рукописи; **С.В. Борисевич** — дизайн исследования, утверждение окончательного варианта статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено на заседании биоэтической комиссии ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России, протокол заседания № 6(924) от 04.05.2022.

Согласие пациентов. Получено информированное добровольное согласие пациентов на обработку персональных данных и их использование с научной и образовательной целью, в том числе на публикацию персональной медицинской информации в обезличенной форме.

Благодарности. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. С.В. Борисевич и А.Л. Гинцбург являются членами редколлегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение».

reliability of the study results; **D.A. Kutaev**—analysis and interpretation of the study results; **D.Y. Logunov**—substantial contribution to the study concept, **A.L. Gintsburg**—critical revision of the text of the manuscript; **S.V. Borisevich**—elaboration of the study design, approval of the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved by the Bioethics Committee at the 48th Central Scientific Research Institute of the Russian Ministry of Defense under meeting minutes No. 6(924) of 04.05.2022.

Informed consent. The patients gave informed consent for the processing of their protected personal and health information, as well as for its use and anonymised publication for scientific and educational purposes.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. S.V. Borisevich and A.L. Gintsburg are members of the Editorial Board of the *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

Об авторах / Authors

Кириллов Игорь Анатольевич, канд. воен. наук.

Пирожков Алексей Петрович, канд. мед. наук. SPIN-code РИНЦ: 7202-3827.

48cnii@mil.ru

Рубцов Владимир Васильевич, канд. биол. наук.

48cnii@mil.ru

Логина Светлана Яковлевна, д-р биол. наук. SPIN-code РИНЦ: 8764-7946.

48cnii@mil.ru

Сайфулина Наталья Александровна.

48cnii@mil.ru

Плекханова Тамара Михайловна, канд. биол. наук.

48cnii@mil.ru

Тимофеев Михаил Анатольевич.

Кутаев Дмитрий Анатольевич, канд. биол. наук.

48cnii@mil.ru

Логунов Денис Юрьевич, д-р биол. наук, член-корр. РАН. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>
info@gamaleya.org

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, проф., академик РАН. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

info@gamaleya.org

Борисевич Сергей Владимирович, д-р биол. наук, проф., академик РАН. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

48cnii@mil.ru

Igor A. Kirillov, Cand. Sci. (Military).

Aleksey P. Pirozhkov, Cand. Sci. (Med.). SPIN-code: 7202-3827.

48cnii@mil.ru

Vladimir V. Rubtsov, Cand. Sci. (Biol.).

48cnii@mil.ru

Svetlana Ya. Loginova, Dr. Sci. (Biol.).

SPIN-code: 8764-7946.

48cnii@mil.ru

Natalya A. Saifulina.

48cnii@mil.ru

Tamara M. Plekhanova, Cand. Sci. (Biol.).

48cnii@mil.ru

Mikhail A. Timofeev.

Dmitry A. Kutaev, Cand. Sci. (Biol.).

48cnii@mil.ru

Denis Y. Logunov, Dr. Sci. (Biol.), Corr. Member of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>
info@gamaleya.org

Aleksandr L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Academician of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

info@gamaleya.org

Sergey V. Borisevich, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Academician of RAS. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6742-3919>

48cnii@mil.ru

Поступила 23.06.2022

После доработки 31.10.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Received 23 June 2022

Revised 31 October 2022

Accepted 7 December 2022



Клиническая эффективность ингибирования рецептора интерлейкина-6 при COVID-19 левелимабом и перспективы его применения при синдроме высвобождения цитокинов другой ЭТИОЛОГИИ

Н.В. Ломакин¹, Б.А. Бакиров², Г.Х. Мусаев³, В.В. Попов^{4,5}, Е.А. Смолярчук⁶, Ю.Н. Линькова⁷, Д.В. Богдан⁷, А.В. Еремеева⁷, П.С. Пухтинская⁷, М.А. Морозова⁷, А.В. Зинкина-Орихан⁷, А.А. Луцкий^{7,✉}

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центральная клиническая больница с поликлиникой» Управления делами Президента Российской Федерации, ул. Маршала Тимошенко, д. 15, Москва, 121359, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Ленина, д. 3, г. Уфа, Республика Башкортостан, 450008, Российская Федерация

³ Государственное бюджетное учреждение Республики Дагестан «Республиканская клиническая больница им. А.В. Вишневского», ул. Ляхова, д. 47, Махачкала, Республика Дагестан, 367026, Российская Федерация

⁴ Медицинский институт непрерывного образования федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Российский биотехнологический университет (РОСБИОТЕХ)», Волоколамское шоссе, д. 11, Москва, 125080, Российская Федерация

⁵ Частное учреждение здравоохранения «Клиническая больница «РЖД-Медицина» им. Н.А. Семашко», ул. Ставропольская, д. 23, корп. 1, Москва, 109386, Российская Федерация

⁶ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

⁷ Акционерное общество «БИОКАД», ул. Связи, д. 38, стр. 1, помещ. 89, п. Стрельна, Санкт-Петербург, 198515, Российская Федерация

✉ Антон Александрович Луцкий; lustkii@biocad.ru

Резюме

Смертность при COVID-19 ассоциирована с повышением уровня интерлейкина-6 (ИЛ-6). Левелимаб — моноклональное антитело к рецептору ИЛ-6 с доказанной клинической эффективностью у пациентов с тяжелым течением COVID-19. **Цель работы:** уточнить ассоциацию тяжести клинических проявлений COVID-19 и эффективности левелимаба с уровнем ИЛ-6 и определить возможность применения левелимаба при других состояниях, сопровождающихся синдромом высвобождения цитокинов. **Материалы и методы:** для подгруппового анализа использованы данные пациентов с COVID-19, участников клинического исследования CORONA, у которых был определен исходный уровень ИЛ-6. Подгруппы были

сформированы на основании исходных значений уровня ИЛ-6: ≤ 5 пг/мл (нормальный уровень) и >5 пг/мл (повышенный уровень). Подгрупповой анализ включал описательную статистику и динамику клинико-лабораторных параметров пациентов изучаемых подгрупп на этапе скрининга, в день введения исследуемого препарата и далее до 14 суток. Сравнение долей пациентов, которым потребовалось назначение терапии спасения, было выполнено точным тестом Фишера. **Результаты:** в анализ включили 91 пациента (47 из группы пациентов, получивших левилимаб, и 44 из группы пациентов, получивших плацебо). Исходно повышенный уровень ИЛ-6 наблюдался у 31 (66%) из 47 в группе пациентов, получивших левилимаб, и 29 (48,4%) из 44 в группе пациентов, получивших плацебо. У пациентов с высоким уровнем ИЛ-6 наблюдались более выраженные клинические проявления пневмонии и отклонения показателей маркеров воспаления. Высокий уровень ИЛ-6 был ассоциирован с необходимостью назначения терапии спасения (ОШ=3,714; 95% ДИ 1,317–9,747; $p=0,0183$), в большей степени в группе пациентов, получивших плацебо (ОШ=8,889; 95% ДИ 2,098–33,31; $p=0,0036$), в которой также наблюдались длительно сохраняющиеся отклонения клинико-лабораторных параметров. **Выводы:** ИЛ-6 является одним из важнейших элементов патогенеза синдрома высвобождения цитокинов при COVID-19 и других состояниях. Повышенный уровень ИЛ-6 ассоциирован с более тяжелым течением COVID-19. Ингибирование рецепторов ИЛ-6 левилимабом приводит к клиническому улучшению у пациентов с тяжелым течением COVID-19, что позволяет предположить эффективность левилимаба в качестве патогенетической терапии синдрома высвобождения цитокинов различной этиологии.

Ключевые слова: левилимаб; COVID-19; интерлейкин-6; синдром высвобождения цитокинов; острый респираторный дистресс-синдром; синдром гипервоспаления; патогенетическая терапия

Для цитирования: Ломакин Н.В., Бакиров Б.А., Мусаев Г.Х., Попов В.В., Смолярчук Е.А., Линькова Ю.Н., Богдан Д.В., Еремеева А.В., Пухтинская П.С., Морозова М.А., Зинкина-Орихан А.В., Луцкий А.А. Клиническая эффективность ингибирования рецептора интерлейкина-6 при COVID-19 левилимабом и перспективы его применения при синдроме высвобождения цитокинов другой этиологии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2022;22(4):446–459. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-446-459>

Levilimab clinical efficacy for interleukin-6 receptor inhibition in COVID-19 and its potential for treating cytokine release syndrome of other aetiologies

N.V. Lomakin¹, B.A. Bakirov², G.H. Musaev³, V.V. Popov^{4,5}, E.A. Smolyarchuk⁶, Yu.N. Linkova⁷, D.V. Bogdan⁷, A.V. Ereemeeva⁷, P.S. Pukhtinskaia⁷, M.A. Morozova⁷, A.V. Zinkina-Orikhan⁷, A.A. Lutckii⁷✉

¹ Central Clinical Hospital of the Administrative Directorate of the President of the Russian Federation, 15 Marshala Timoshenko St., Moscow 121359, Russian Federation

² Bashkir State Medical University, 3 Lenina St., Ufa, Republic of Bashkortostan 450008, Russian Federation

³ A.V. Vishnevsky Republican Clinical Hospital, 47 Lyakhova St., Makhachkala, Republic of Dagestan 367026, Russian Federation

⁴ Medical Institute of Continuing Education, Russian Biotechnological University (BIOTECH University), 11 Volokolamskoye Hwy, Moscow 125080, Russian Federation

⁵ N.A. Semashko Railroad Clinical Hospital, 23/1 Stavropolskaya St., Moscow 109386, Russian Federation

⁶ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), 8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

⁷ BIOCAD JSC, room 89, 38/1 Svyazi St., Strelina, St. Petersburg 198515, Russian Federation

✉ Anton A. Lutskii; lutskii@biocad.ru

Abstract

The COVID-19 mortality is associated with an increase in interleukin-6 (IL-6) levels. Levilimab is an anti-IL-6 receptor antibody with proven clinical efficacy in patients with severe COVID-19. **The aim of the study** was to assess the association of COVID-19 severity and levilimab effectiveness with IL-6 levels and to explore the potential for using levilimab in other conditions accompanied by cytokine release syndrome. **Materials and methods:** the subgroup analysis was based on the data of COVID patients with known baseline IL-6 levels from the CORONA clinical study. Subgroups were formed according to baseline IL-6 levels: ≤ 5 pg/mL (normal) and > 5 pg/mL (elevated). The subgroup analysis included descriptive statistics of the patients and time courses of their clinical and laboratory findings (at screening, on the day of investigational product administration, and further until day 14). In order to compare the percentages of patients who had required rescue therapy, the authors used Fisher's exact test. **Results:** the subgroup analysis included 91 patients (47 from the levilimab group and 44 from the placebo group). At baseline, the authors observed elevated levels of IL-6 in 31/47 (66%) subjects in the levilimab group and 29/44 (48.4%) subjects in the placebo group. The subjects with elevated IL-6 demonstrated more pronounced clinical signs of pneumonia and abnormalities in inflammatory markers. Elevated baseline IL-6 levels were associated with the need for rescue therapy (OR=3.714; 95% CI: 1.317–9.747; $p=0.0183$); this association was stronger in the placebo group (OR=8.889; 95% CI: 2.098–33.31; $p=0.0036$). Also, the placebo group showed long-term abnormalities in the clinical and laboratory findings. **Conclusions:** IL-6 is one of the key elements in the pathogenesis of cytokine release syndrome related to COVID-19 and other conditions. Elevated IL-6 levels are associated with the severity of COVID-19. Inhibition of IL-6 receptors by levilimab leads to clinical improvement in patients with severe COVID-19, suggesting the effectiveness of levilimab in pathogenesis-oriented therapy for cytokine release syndrome of other aetiologies.

Key words: levilimab; COVID-19; interleukin-6; cytokine release syndrome; acute respiratory distress syndrome; hyperinflammatory syndrome; pathogenesis-oriented therapy

For citation: Lomakin N.V., Bakirov B.A., Musaev G.H., Popov V.V., Smolyarchuk E.A., Linkova Yu.N., Bogdan D.V., Eremeeva A.V., Pukhtinskaia P.S., Morozova M.A., Zinkina-Orikhan A.V., Lutskii A.A. Levilimab clinical efficacy for interleukin-6 receptor inhibition in COVID-19 and its potential for treating cytokine release syndrome of other aetiologies. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(4):446–459. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-4-446-459>

Введение

Появление и быстрое глобальное распространение коронавируса 2 типа, вызывающего тяжелый острый респираторный синдром (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2), возбудителя новой коронавирусной инфекции (coronavirus disease 2019, COVID-19), привело к беспрецедентному кризису здравоохранения во всем мире. 11 марта 2020 г. распространение COVID-19 было классифицировано Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как пандемия¹.

Основная причина смерти при COVID-19 – острый респираторный дистресс-синдром

(ОРДС), причиной которого является избыточный ответ иммунной системы на инфицирование коронавирусом, проявляющийся в развитии гиперцитокинемии («цитокиновый шторм»). Первые исследования (2019–2020 гг.) показали, что тяжесть течения COVID-19 ассоциирована с повышенным уровнем интерлейкина-6 (ИЛ-6) и других провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли- α (ФНО- α), ИЛ-1, ИЛ-8 и хемокинов [1–3].

Известно [4], что применение моноклональных антител к рецептору ИЛ-6 (ИЛ-6Р) эффективно подавляет синдром высвобождения цитокинов (СВЦ), который развивается

¹ WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

при использовании CAR-T терапии в онкологии. Однократное введение ингибитора ИЛ-6Р позволяет купировать СВЦ у 69% пациентов.

Левелимаб является рекомбинантным моноклональным антителом к ИЛ-6Р. В ходе доклинических и клинических исследований было установлено, что препарат высокоэффективно блокирует ИЛ-6Р. Это проявляется изменением концентрации фармакодинамических маркеров — нарастанием концентрации растворимого ИЛ-6Р и непосредственно ИЛ-6, а также снижением уровня С-реактивного белка. Кроме того, продемонстрировано эффективное подавление левелимабом выраженности воспаления при активном ревматоидном артрите, для лечения которого препарат разрабатывался до начала пандемии [5].

Расширение представлений о патогенезе новой коронавирусной инфекции послужило основанием для пересмотра потенциальных показаний к применению левелимаба и проведения клинического исследования CORONA, которое подтвердило его эффективность у пациентов с тяжелым течением COVID-19 [6, 7].

В настоящей статье приводятся результаты подгруппового анализа, проведенного с целью уточнения ассоциации тяжести клинических проявлений COVID-19 с уровнем ИЛ-6, а также определения эффективности терапии левелимабом в подгруппах пациентов с нормальным и высоким уровнем ИЛ-6. Кроме этого, представлен краткий обзор литературы с целью сопоставления результатов подгруппового анализа с результатами других исследований и определения потенциала применения левелимаба при состояниях, сопровождающихся гипервоспалением, в основе патогенеза которых лежит СВЦ.

Цель работы — уточнить ассоциацию тяжести клинических проявлений COVID-19 и эффективности левелимаба с уровнем интерлейкина-6 и определить возможность применения левелимаба при других состояниях, сопровождающихся синдромом высвобождения цитокинов. Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- провести подгрупповой анализ характеристик клинического течения COVID-19 и эффективности левелимаба у пациентов с нормальным и высоким уровнем ИЛ-6;

- провести оценку вовлеченности ИЛ-6 в патогенез СВЦ различной этиологии (на основании данных литературы) и определить возможность применения левелимаба при других состояниях, сопровождающихся синдромом высвобождения цитокинов.

Материалы и методы

Для дизайна настоящего исследования и проведения подгруппового анализа использованы данные участников клинического исследования CORONA [6].

Исследование CORONA представляло собой многоцентровое сравнительное рандомизированное двойное слепое плацебо-контролируемое клиническое исследование с адаптивным дизайном (ClinicalTrials.gov: NCT04397562)². Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (World Medical Association, WMA)³ и требованиями надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice, GCP)⁴. Исследование было одобрено Советом по этике Министерства здравоохранения Российской Федерации (выписка из протокола № 216, от 21 апреля 2020 г.) и локальными этическими комитетами исследовательских центров. Включение пациентов в исследование осуществлялось после получения письменного информированного согласия или по решению консилиума независимых врачей, если на момент включения в исследование пациент не мог самостоятельно принять решение из-за текущего состояния здоровья или проводимой лечебной терапии. При этом пациент или его законный представитель в кратчайшие сроки ставились в известность об исследовании. В случае если в дальнейшем состояние пациента улучшалось, у него запрашивалось согласие на продолжение участия в исследовании.

Исследование проводили с апреля по август 2020 г. в 12 исследовательских центрах на территории Российской Федерации. В исследовании приняли участие 206 пациентов, из них 204 вводили исследуемый препарат (ИП): 103 человека получили левелимаб и 101 — плацебо. В исследовании принимали участие женщины и мужчины в возрасте 18 лет и старше, госпитализированные с тяжелой формой COVID-19. Пациентов, соответствующих критериям отбора в исследо-

² A Clinical Trial of the efficacy and safety of levilimab (BCD-089) in patients with severe COVID-19 (CORONA). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04397562>

³ WMA Declaration of Helsinki — ethical principles for medical research involving human subjects. <https://www.wma.net/policies-post/wma-declaration-of-helsinki-ethical-principles-for-medical-research-involving-human-subjects/>

⁴ ICH harmonised guideline. Integrated addendum to ICH E6(R1): guideline for good clinical practice E6(R2), dated 9 November 2016. https://database.ich.org/sites/default/files/E6_R2_Addendum.pdf

вание, случайным образом распределяли (1:1) в одну из двух групп, и они получали в сочетании со стандартной терапией левилимаб в дозе 324 мг подкожно (группа пациентов, получивших левилимаб) или плацебо (группа пациентов, получивших плацебо). Пациенты, клиническое состояние которых ухудшалось, по решению врача-исследователя получали однократное открытое введение левилимаба в дозе 324 мг подкожно в качестве терапии спасения.

Первичной конечной точкой эффективности являлась оценка показателя «Доля пациентов с устойчивым клиническим улучшением по 7-категориальной порядковой шкале (7-category ordinal scale⁵) на 14 сут после введения исследуемого препарата». Достижими устойчивого клинического улучшения считались пациенты с улучшением на ≥ 2 балла по 7-категориальной порядковой шкале и/или достигшие категории 1 («Выписан») или категории 2 («Госпитализирован, не требует оксигенотерапии и не требует другой медицинской помощи»).

Ранее проведенное исследование [6] показало, что эффект левилимаба в сочетании со стандартной терапией превосходит действие плацебо в сочетании со стандартной терапией в отношении достижения устойчивого клинического улучшения, предотвращения нарастания тяжести течения заболевания и, как следствие, необходимости перевода пациентов в отделение реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ), а также сокращает длительность госпитализации, что свидетельствует об эффективности исследуемой терапии. Разница в частоте достижения устойчивого клинического улучшения между группами пациентов, получавшими левилимаб и плацебо, составила 20,39% с 97,5% доверительным интервалом (ДИ) (7,04–100,0); $p=0,0017$ (односторонний критерий хи-квадрат Пирсона).

Оценка динамики отдельных ключевых фармакодинамических маркеров (скорость оседания эритроцитов – СОЭ, С-реактивный белок – СРБ, ИЛ-6) продемонстрировала эффективность применяемой терапии левилимабом в отношении снижения активности воспалительного процесса. Анализ данных по безопасности применения левилимаба у пациентов с тяжелым течением COVID-19 показал, что препарат обладает благоприятным профилем безопасности, который соответствует известным данным о препаратах группы ингибиторов ИЛ-6Р. Таким образом, в совокупности результаты исследо-

вания [6] показали, что ингибирование ИЛ-6Р с помощью левилимаба является эффективным методом лечения у пациентов с коронавирусной инфекцией.

В подгрупповой анализ, лежащий в основе настоящей работы, включены пациенты, у которых был определен уровень ИЛ-6 до введения исследуемого препарата (левилимаб/плацебо). Анализируемые подгруппы были сформированы на основании исходных значений уровня ИЛ-6: ≤ 5 пг/мл и >5 пг/мл. Пороговое значение 5 пг/мл было выбрано по результатам метаанализа, отражающего уровень ИЛ-6 у здоровых людей [8, 9].

Подгрупповой анализ включал описательную статистику и динамику клинико-лабораторных показателей. По эпидемическим причинам, в том числе в связи со сложностью доставки образцов из «красных» зон инфекционных стационаров, все лабораторные исследования в соответствии с протоколом выполнялись в локальных лабораториях исследовательских центров.

Оценка эффективности левилимаба проведена по дополнительной конечной точке – доле пациентов, потребовавших назначения терапии спасения. Сравнение долей в подгруппах пациентов с нормальным и повышенным уровнем ИЛ-6 выполнено точным тестом Фишера [10], также рассчитывали отношение шансов (ОШ) и 95% доверительный интервал (ДИ). Частотные показатели представлены в виде процентов. Непрерывные данные представлены в виде среднего значения и стандартного отклонения.

Обработка и анализ данных, подготовка рисунков были выполнены с использованием программ Microsoft Excel 365 и GraphPad Prism 9.4.

Результаты и обсуждение

Подгрупповой анализ характеристик клинического течения COVID-19 и эффективности левилимаба у пациентов с нормальным и высоким уровнем ИЛ-6

Исследование уровня ИЛ-6 выполнялось в 5 исследовательских центрах. Всего исходный уровень ИЛ-6 был определен у 91 пациента (47 в группе пациентов, получивших левилимаб, и 44 в группе пациентов, получивших плацебо). Повышенный уровень ИЛ-6 (>5 пг/мл) наблюдался у 60 из 91 пациента (65,5%): у 31 из 47 пациентов, получивших левилимаб (66%), и у 29 из 44 пациентов, получивших плацебо (48,4%). Исходные характеристики пациентов в подгруппах представлены в таблице 1.

⁵ A Clinical Trial of the efficacy and safety of levilimab (BCD-089) in patients with severe COVID-19 (CORONA). <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04397562>

В подгруппе пациентов с нормальным уровнем ИЛ-6 женщин было больше, чем в подгруппе с высокими концентрациями цитокина. Средние значения возраста и индекса массы тела были сопоставимы между подгруппами.

У пациентов с повышенным уровнем ИЛ-6 наблюдались исходно более высокие значения лабораторных показателей, отражающих активность воспаления (СОЭ, СРБ и ИЛ-6), а также более выраженные клинические проявления пневмонии: выше значения температуры тела и ниже показатель сатурации, 24 (40%) из 60 пациентов требовали проведения оксигенотерапии (табл. 1).

Как следствие, пациентам с высоким уровнем ИЛ-6 терапия спасения (однократное открытое введение левилимаба пациентам с клиническим ухудшением) назначалась значимо чаще по сравнению с пациентами, у которых уровень ИЛ-6 был нормальным – 25 (41,7%) из 60 и 5 (16,1%) из 31 соответственно (ОШ=3,714; 95% ДИ 1,317–9,747; $p=0,0183$; рис. 1). Максимальная выраженность этих различий наблюдалась у пациентов, изначально получивших плацебо в сочетании со стандартной терапией. В этой группе потребовали назначения терапии спасения 20 (69%) из 29 пациентов с высоким уровнем ИЛ-6 и 3 (20%) из 15 пациентов с нормальным

уровнем ИЛ-6 (ОШ=8,889; 95% ДИ 2,098–33,31; $p=0,0036$; рис. 1). Пациенты, которые получили левилимаб в сочетании со стандартной терапией, нуждались в назначении терапии спасения в целом реже, и в этой группе различия в частоте назначения терапии спасения между подгруппами пациентов с высоким и нормальным уровнем ИЛ-6 были минимальными (ОШ=1,346; 95% ДИ 0,2238–7,409; $p>0,05$; рис. 1).

Отсутствие различий в частоте назначения терапии спасения между подгруппами в группе пациентов, получивших левилимаб, вероятно, обусловлено тем, что первоначальное введение левилимаба вызывало подавление воспаления у большинства пациентов в данной группе. При этом у небольшого числа пациентов, которым потребовалось назначение терапии спасения, тяжесть COVID-19 могла быть обусловлена как изначально более высоким уровнем ИЛ-6, так и другими причинами. Пациенты, получившие плацебо, изначально не получали левилимаб, в связи с чем наблюдавшаяся у них тяжесть состояния (и потребность в терапии спасения) была ассоциирована с повышенным уровнем ИЛ-6.

Анализ динамики клинико-лабораторных параметров выявил более выраженные и длительно сохраняющиеся отклонения (лихорадка,

Таблица 1. Исходные характеристики пациентов

Table 1. Baseline patient characteristics

Параметр <i>Parameters</i>	Подгруппа с уровнем ИЛ-6 <i>Subgroup IL-6 levels</i>	Общая группа <i>Total group</i>	Группа пациентов, получавших <i>Patient groups</i>	
			левилимаб <i>levilimab</i>	плацебо <i>placebo</i>
Число включенных в анализ пациентов, n (%) <i>Number of patients analysed, n (%)</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	60 (65,9)	31 (66)	29 (65,9)
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	31 (34,1)	16 (34)	15 (34,1)
Женщины, n (%) <i>Females, n (%)</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	27 (45)	11 (35,5)	16 (55,2)
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	20 (64,5)	10 (62,5)	10 (66,7)
Мужчины, n (%) <i>Males, n (%)</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	33 (55)	20 (64,5)	13 (44,8)
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	11 (35,5)	6 (37,5)	5 (33,3)
Возраст, лет <i>Age, years</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	60,1±12,6	61,9±14,1	58,2±10,6
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	58,1±9,0	55,9±11,2	60,5±5,5
ИМТ <i>BMI</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	28,9±6,1	28,9±6,8	28,9±5,4
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	30,2±3,9	30,3±4,4	30,0±3,5

Продолжение таблицы 1

Table 1 (continued)

Параметр <i>Parameters</i>	Подгруппа с уровнем ИЛ-6 <i>Subgroup IL-6 levels</i>	Общая группа <i>Total group</i>	Группа пациентов, получавших <i>Patient groups</i>	
			левелимаб <i>levilimab</i>	плацебо <i>placebo</i>
Время от начала лихорадки до госпитализации, сут <i>Time from fever onset to hospitalisation, days</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	5,6±3,2	5,7±3,7	5,6±2,7
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	5,6±3,0	5,6±3,0	5,7±3,1
Время от госпитализации до введения ИП, сут <i>Time from hospitalisation to IP administration, days</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	5,1±4,8	5,7±4,8	4,5±4,7
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	5,7±4,3	5,9±4,6	5,5±4,1
Температура тела, °C <i>Body temperature, °C</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	37,8±0,9	37,6±1,0	37,9±0,8
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	37,3±0,7	37,2±0,7	37,3±0,6
Сатурация кислородом, % <i>Oxygen saturation, %</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	90,8±4,0	90,3±4,4	91,3±3,5
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	92,5±2,1	92,5±2,4	92,5±1,8
Количество лимфоцитов, ×10 ⁹ /л <i>Lymphocyte count, ×10⁹/L</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	1,3±0,6	1,2±0,7	1,4±0,4
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	1,4±0,7	1,5±0,8	1,2±0,4
Скорость оседания эритроцитов, мм/ч <i>Erythrocyte sedimentation rate, mm/h</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	46,6±27,0	48,4±28,7	44,7±25,4
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	31,7±19,7	27,2±19,3	36,5±19,7
Уровень С-реактивного белка, мг/л <i>C-reactive protein level, mg/L</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	63,7±54,5	50,7±40,8	77,5±64,0
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	16,0±18,0	18,4±21,8	13,6±13,1
Уровень ИЛ-6, пг/мл <i>IL-6 level, pg/mL</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	30,1±27,1	23,0±22,1	37,6±30,1
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	1,8±1,4	2,0±1,5	1,6±1,2
Клинический статус пациентов по 7-категориальной порядковой шкале <i>Patients' profile according to 7-Category Ordinal Scale of Clinical Status</i>				
Госпитализирован, не требует оксигенотерапии, требует другой медицинской помощи, n (%) <i>Hospitalised, not requiring supplemental oxygen, but requiring other medical care, n (%)</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	36 (60)	20 (64,5)	16 (55,2)
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	28 (90,3)	13 (81,3)	15 (100)
Госпитализирован, требует оксигенотерапии, n (%) <i>Hospitalised, requiring supplemental oxygen, n (%)</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	23 (38,3)	11 (35,5)	12 (41,4)
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	3 (9,7)	3 (18,8)	0 (0)
Госпитализирован, требует высокопоточной оксигенации или неинвазивной ИВЛ, n (%) <i>Hospitalised, requiring non-invasive ventilation or high-flow oxygen devices, n (%)</i>	>5 пг/мл <i>>5 pg/mL</i>	1 (1,7)	0 (0)	1 (3,4)
	≤5 пг/мл <i>≤5 pg/mL</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)

Примечание. Представлены средние значения ± стандартное отклонение, если не указано иного. ИЛ-6 — интерлейкин-6; ИМТ — индекс массы тела; ИП — исследуемый препарат; ИВЛ — искусственная вентиляция легких.

Note. If not indicated otherwise, the table shows means ± standard deviations. IL-6—interleukin-6; BMI—body mass index; IP—investigational product.

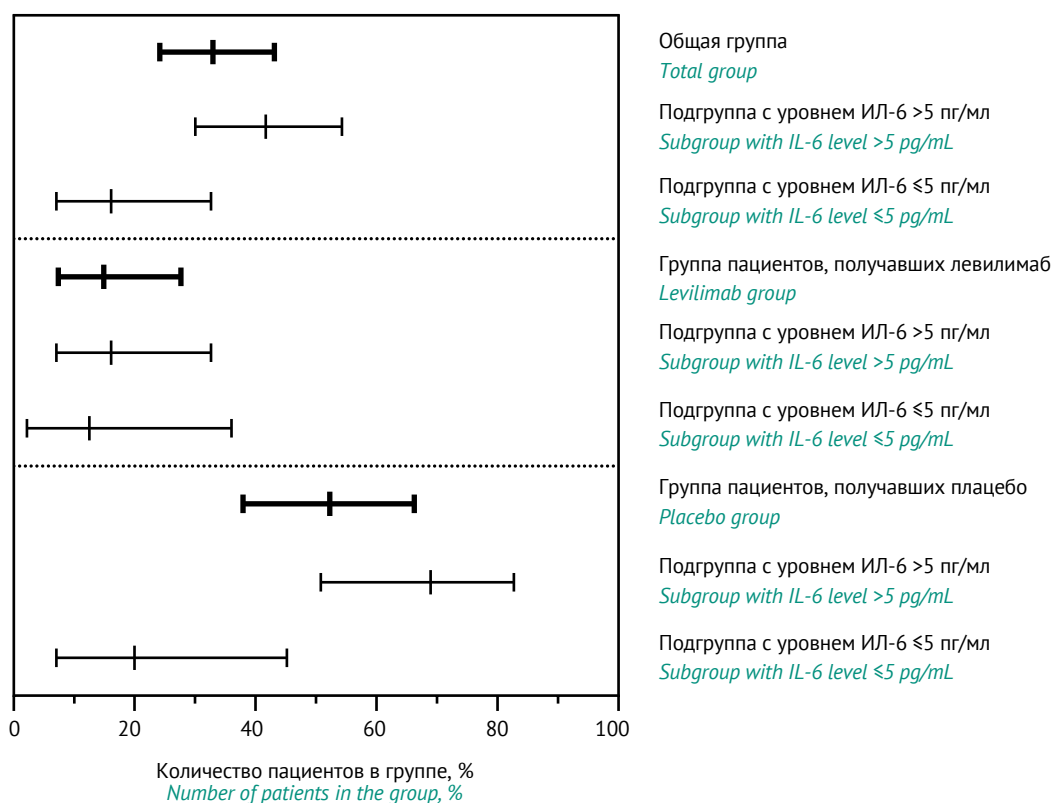


Рис. 1. Доля (%) пациентов, которым потребовалось назначение терапии спасения в подгруппах пациентов с повышенным (>5 пг/мл) и нормальным (≤5 пг/мл) уровнем интерлейкина-6 (ИЛ-6). На графике представлены 95% доверительные интервалы (ДИ).

Fig. 1. Percentages of patients (%) who required rescue therapy in the subgroups with elevated (>5 pg/mL) and normal (≤5 pg/mL) interleukin-6 (IL-6) levels. The figure shows 95% confidence intervals (CI).

сатурация, СО₂ и уровень СРБ) в подгруппе с высоким уровнем ИЛ-6, наиболее выраженные в группе пациентов, получивших плацебо (рис. 2). Обращают на себя внимание более низкие значения сатурации в подгруппе с высоким уровнем ИЛ-6, сохраняющиеся до 14 сут наблюдения (рис. 2В).

Рост уровня ИЛ-6 после введения моноклональных антител против ИЛ-6Р (рис. 2F) является фармакодинамическим маркером и обусловлен блокадой рецептора. При нарушении процесса связывания цитокина с заблокированным рецептором уровень его в циркуляции повышается [11, 12]. Проведенный анализ показал, что у пациентов подгруппы с исходно высоким ИЛ-6 наблюдается более выраженный рост уровня цитокина в крови после ингибирования его рецептора, что связано с механизмом действия препарата [11, 12].

Выявленная ассоциация между повышенным уровнем ИЛ-6 и более высокими значениями температуры тела, СО₂, уровня СРБ, меньшими значениями сатурации и большей частотой потребности в оксигенотерапии и в терапии спасения позволяет заключить, что в популяции

пациентов, принимавших участие в исследовании, высокий уровень ИЛ-6 связан с выраженностью воспаления и тяжестью клинических проявлений COVID-19, что согласуется с данными литературы [13, 14]. Известно, что гиперпродукция ИЛ-6 является ключевым элементом патогенеза при тяжелом и критическом течении COVID-19 [15], ассоциирована с уровнем вирусемии [16] и риском клинического ухудшения состояния пациентов [17, 18].

Оценка вовлеченности ИЛ-6 в патогенез синдрома высвобождения цитокинов различной этиологии

Ассоциированный с COVID-19 СВЦ имеет сходную клиническую картину и ряд общих патогенетических аспектов с другими состояниями, сопровождающимися гипервоспалением, такими как: вторичный гемофагоцитарный лимфогистиоцитоз, синдром активации макрофагов (САМ), САМ-подобный синдром при сепсисе и другими. Проведенное B.J. Webb с соавт. [19] когортное исследование, дополненное анализом опубликованных между 1990 и 2022 гг. данных литературы, отражающих клиническую картину таких

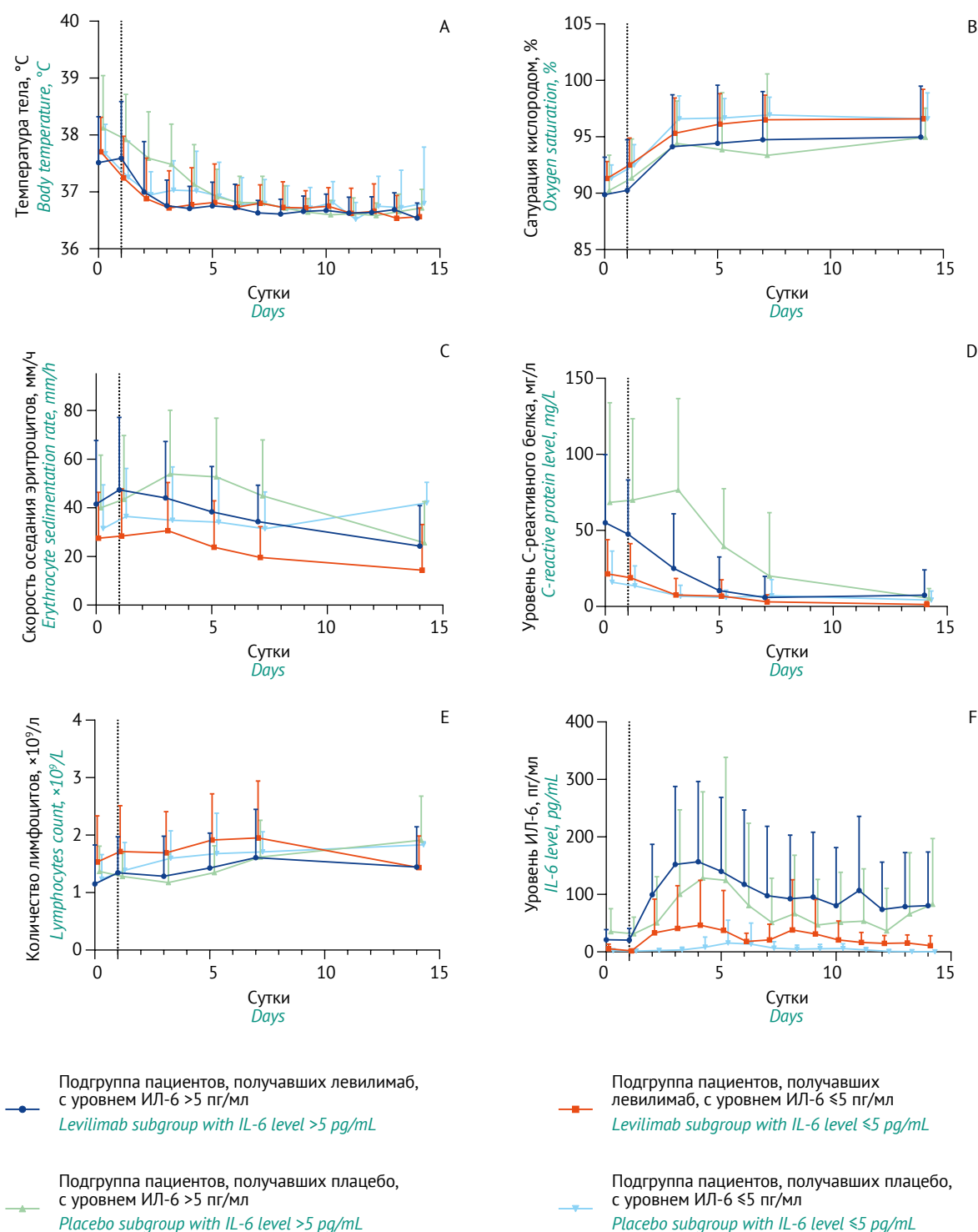


Рис. 2. Динамика клинико-лабораторных параметров пациентов изучаемых подгрупп на этапе скрининга (0 сут), в день введения исследуемого препарата (1 сут) и далее до 14 сут. А – температура тела, В – сатурация крови, С – скорость оседания эритроцитов, D – концентрация С-реактивного белка в крови, E – количество лимфоцитов крови, F – концентрация ИЛ-6 в крови. Показаны средние значения и стандартные отклонения. Вертикальная пунктирная линия обозначает день введения препарата.

Fig. 2. Time courses of clinical and laboratory findings of subgroup patients at screening (day 0), on the day of investigational product (IP) administration (day 1), and until day 14. A—body temperature, B—blood oxygen saturation, C—erythrocyte sedimentation rate, D—C-reactive protein level, E—lymphocyte count, F—IL-6 level. The figure shows means and standard deviations; vertical dotted lines indicate the day of IP administration.

состояний, показало, что характерными проявлениями гипервоспаления являются лихорадка, активация макрофагов (определяемая как повышение концентрации ферритина), цитопения и гематологические нарушения (снижение отношения числа нейтрофилов к числу лимфоцитов, снижение гемоглобина и тромбоцитов), коагулопатия (рост концентрации D-димера), синдром цитолиза (повышение лактатдегидрогеназы и аспаратаминотрансферазы), гиперцитокинемия (повышение уровня ИЛ-6), гепатоспленомегалия, энцефалопатия, гемофагоцитоз, из которых первые шесть являются специфическими проявлениями осложненного течения COVID-19. При этом для ОРДС, не связанного с COVID-19, вторичного гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза, CAM и CAM-подобного синдрома при сепсисе, а также СВЦ при CAR-T терапии характерны существенно более высокие уровни ИЛ-6 по сравнению с тяжелым и критическим течением COVID-19 [13, 19–23]. Высокий уровень ИЛ-6 также наблюдается при тяжелых формах острого респираторного синдрома, вызванного коронавирусом (SARS-CoV), и ближневосточного респираторного синдрома, вызванного коронавирусом (MERS-CoV) [24].

Несмотря на неудачу отдельных исследований [25, 26], эффективность применения ингибиторов ИЛ-6Р при COVID-19 в настоящее время доказана в целом ряде рандомизированных клинических исследований и метаанализов [6, 27–32]. При этом уровень доказательств эффективности варьирует для препаратов группы, и сравнительные исследования между различными препаратами данной группы не проводились [25, 26]. Противоречия в результатах исследований, вероятно, обусловлены различиями в дизайне: временем назначения исследуемых препаратов, тяжестью течения COVID-19 и используемой сопутствующей терапией. Наилучшая эффективность ингибиторов ИЛ-6Р наблюдается при их раннем назначении [33].

Известно, что ингибиторы ИЛ-6Р успешно используются для терапии СВЦ при CAR-T терапии [4, 34], терапии анти-CD3/CD19 биспецифическими антителами [35], при развитии иммуноопосредованных нежелательных явлений на фоне терапии моноклональными антителами – ингибиторами контрольных точек иммунного ответа (ниволумаб, ипилимумаб, пембролизумаб и др.) [36, 37], а также при синдроме Стилла [38].

Полученные в данной работе результаты в сочетании с доказанной клинической эффективностью левилимаба у пациентов с COVID-19 [6] и у пациентов с активным ревматоидным артритом [5, 39] свидетельствуют об эффектив-

ном блокировании рецептора ИЛ-6 препаратом левилимаб. Принимая во внимание важнейшую роль гиперпродукции ИЛ-6 в патогенезе цитокинового шторма различной этиологии и эффективности его купирования путем ингибирования ИЛ-6Р, представляется целесообразным рассматривать препарат левилимаб в качестве потенциальной терапевтической опции при заболеваниях различной этиологии, сопровождающихся СВЦ.

Следует отметить, что использование уровня ИЛ-6 в качестве биомаркера для диагностики СВЦ и определения показаний к назначению терапии ингибиторами ИЛ-6Р ограничивается существенной вариабельностью продукции цитокина, связанной с циркадным ритмом и возрастом, сопутствующей патологией и терапией, а также чувствительностью к техникам преаналитического и аналитического этапа измерения [9, 40]. Уровень ИЛ-6 может быть ассоциирован с объемом жировой ткани, и пациенты с ожирением имеют более высокую концентрацию этого цитокина [41, 42]. Наличие ожирения существенно увеличивает и риски тяжелого течения COVID-19 [43, 44]. В нашем исследовании средние значения ИМТ не различались между группами и свидетельствовали об избыточной массе тела (предожирении) у большинства участников (табл. 1).

В данном исследовании среди пациентов, включенных в подгрупповой анализ, 75 (82,4%) из 91 были рандомизированы в одном исследовательском центре, что обеспечивает гомогенность и сопоставимость результатов измерения уровня ИЛ-6.

К ограничениям данного исследования можно отнести отсутствие данных об уровне других цитокинов и хемокинов, а также прокальцитонина, которые могут быть также ассоциированы с тяжестью течения заболевания, риском развития ОРДС, полиорганной недостаточности и смерти [45, 46].

Использование левилимаба в качестве терапии спасения было обусловлено неэтичностью оставления пациентов, получивших плацебо, без потенциально эффективной терапии, особенно при нарастании тяжести заболевания. Однако это ограничивало возможности использования группы пациентов, получивших плацебо, для сравнительного анализа, поскольку многие из них получили терапию спасения в первые 3–5 сут после введения плацебо. Проведенный анализ подтвердил, что пациенты, получившие терапию спасения, имели более тяжелое течение COVID-19 [6]. В настоящем исследовании наиболее репрезентативные результаты, отра-

жающие различия в тяжести клинического течения COVID-19 у пациентов с высоким и нормальным уровнем ИЛ-6, были получены в группе пациентов, получивших плацебо, в рамках которой было возможно проведение сравнительного подгруппового анализа.

Заключение

Проведенный анализ клинико-лабораторных показателей, отражающих тяжесть течения COVID-19 в подгруппах пациентов с нормальным и повышенным уровнем ИЛ-6, позволяет заключить, что повышенный уровень ИЛ-6 ассоциирован с более выраженными клиническими симптомами COVID-19 (лихорадка, снижение сатурации, потребность в оксигенотерапии, повышение скорости оседания эритроцитов и уровня С-реактивного белка), а ингибирование рецеп-

тора ИЛ-6 левилимабом приводит к клиническому улучшению, о чем свидетельствуют значимые различия по доле пациентов, которым потребовалось назначение терапии спасения, в подгруппах пациентов с высоким и нормальным уровнем ИЛ-6 в группе плацебо, но не в группе, получившей терапию левилимабом.

Оценка вовлеченности ИЛ-6 в патогенез синдрома высвобождения цитокинов различной этиологии подтверждает важнейшую роль ИЛ-6 в патогенезе данного синдрома как при COVID-19, так и при других состояниях, сопровождающихся гипервоспалением, что в сочетании с данными по эффективности ингибирования ИЛ-6Р позволяет предположить, что левилимаб будет эффективен в качестве патогенетической терапии синдрома высвобождения цитокинов различной этиологии.

Литература/References

1. Ruan Q, Yang K, Wang W, Jiang L, Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China. *Intensive Care Med.* 2020;46(5):846–8. <https://doi.org/10.1007/s00134-020-05991-x>
2. Karakike E, Giamarellos-Bourboulis EJ. Macrophage activation-like syndrome: a distinct entity leading to early death in sepsis. *Front Immunol.* 2019;10:55. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00055>
3. Qin C, Zhou L, Hu Z, Zhang S, Yang S, Tao Y, et al. Dysregulation of immune response in patients with Coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. *Clin Infect Dis.* 2020;71(15):762–8. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa248>
4. Kotch C, Barrett D, Teachey DT. Tocilizumab for the treatment of chimeric antigen receptor T cell-induced cytokine release syndrome. *Expert Rev Clin Immunol.* 2019;15(8):813–22. <https://doi.org/10.1080/17446666.2019.1629904>
5. Мазуров ВИ, Зоткин ЕГ, Гайдукова ИЗ, Иливанова ЕП, Кропотина ТВ, Плаксина ТВ и др. Эффективность и безопасность применения левилимаба в комбинации с метотрексатом у пациентов с ревматоидным артритом: результаты II фазы исследования AURORA. *Научно-практическая ревматология.* 2021;59(2):141–51. [Mazurov VI, Zotkin EG, Gaydukova IZ, Ilivanova EP, Kropotina TV, Plaksina TV, et al. Efficacy and safety of levilimab in combination with methotrexate in subjects with rheumatoid arthritis: Results of phase II AURORA study. *Nauchno-prakticheskaya revmatologia = Rheumatology Science and Practice.* 2021;59(2):141–51 (In Russ.)] <https://doi.org/10.47360/1995-4484-2021-141-151>
6. Lomakin NV, Bakirov BA, Protsenko DN, Mazurov VI, Musaev GH, Moiseeva OM, et al. The efficacy and safety of levilimab in severely ill COVID-19 patients not requiring mechanical ventilation: results of a multicenter randomized double-blind placebo-controlled phase III CORONA clinical study. *Inflamm Res.* 2021;70(10-12):1233–46. <https://doi.org/10.1007/s00011-021-01507-5>
7. Kaplon H, Reichert JM. Antibodies to watch in 2021. *mAbs.* 2021;13(1):1860476. <https://doi.org/10.1080/19420862.2020.1860476>
8. Said EA, Al-Reesi I, Al-Shizawi N, Jaju S, Al-Balushi MS, Koh CY, et al. Defining IL-6 levels in healthy individuals: a meta-analysis. *J Med Virol.* 2021;93(6):3915–24. <https://doi.org/10.1002/jmv.26654>
9. McElvaney OJ, Curley GF, Rose-John S, McElvaney NG. Interleukin-6: obstacles to targeting a complex cytokine in critical illness. *Lancet Respir Med.* 2021;9(6):643–54. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00103-X)
10. Fisher RA. Statistical methods for research workers. In: Kotz S, Johnson NL, eds. *Breakthroughs in Statistics.* Springer Series in Statistics. New York: Springer; 1992. P. 66–70. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-4380-9_6
11. Uchiyama Y, Yoshida H, Koike N, Hayakawa N, Sugita A, Nishimura T, Mihara M. Anti-IL-6 receptor antibody increases blood IL-6 level via the blockade of IL-6 clearance, but not via the induction of IL-6 production. *Int Immunopharmacol.* 2008;8(11):1595–601. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.07.002>
12. Nishimoto N, Terao K, Mima T, Nakahara H, Takagi N, Takeuchi T. Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease. *Blood.* 2008;112(10):3959–64. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-05-155846>
13. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, Taylor MD, Sinha P, Calfee CS, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory

- syndromes. *Lancet Respir Med.* 2020;8(12):1233–44. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30404-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30404-5)
14. Del Valle DM, Kim-Schulze S, Huang HH, Beckmann ND, Nirenberg S, Wang B, Lavin Y, et al. An inflammatory cytokine signature predicts COVID-19 severity and survival. *Nat Med.* 2020;26(10):1636–43. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1051-9>
15. Moore JB, June CH. Cytokine release syndrome in severe COVID-19. *Science.* 2020;368(6490):473–4. <https://doi.org/10.1126/science.abb8925>
16. Chen X, Zhao B, Qu Y, Chen Y, Xiong J, Feng Y, et al. Detectable serum severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 viral load (RNAemia) is closely correlated with drastically elevated Interleukin 6 level in critically ill patients with Coronavirus Disease 2019. *Clin Infect Dis.* 2020;71(8):1937–42. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa449>
17. Laing AG, Lorenc A, Del Molino Del Barrio I, Das A, Fish M, Monin L, et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nat Med.* 2020;26(10):1623–35. <https://doi.org/10.1038/s41591-020-1038-6>
18. McElvaney OJ, Hobbs BD, Qiao D, McElvaney OF, Moll M, McEvoy NL, et al. A linear prognostic score based on the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts outcomes in COVID-19. *eBioMedicine.* 2020;61(1):103026. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.103026>
19. Webb BJ, Peltan ID, Jensen P, Hoda D, Hunter B, Silver A, et al. Clinical criteria for COVID-19-associated hyperinflammatory syndrome: a cohort study. *Lancet Rheumatol.* 2020;2(12):e754–63. [https://doi.org/10.1016/S2665-9913\(20\)30343-X](https://doi.org/10.1016/S2665-9913(20)30343-X)
20. Molano Franco D, Arevalo-Rodriguez I, Roqué IFM, Montero Oleas NG, Nuvials X, Zamora J. Plasma interleukin-6 concentration for the diagnosis of sepsis in critically ill adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2019;(4):CD011811. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD011811.pub2>
21. Klinger M, Brandl C, Zugmaier G, Hijazi Y, Bargou RC, Topp MS, et al. Immunopharmacologic response of patients with B-lineage acute lymphoblastic leukemia to continuous infusion of T cell-engaging CD19/CD3-bispecific BiTE antibody blinatumomab. *Blood.* 2012;119(26):6226–33. <https://doi.org/10.1182/blood-2012-01-400515>
22. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. *N Engl J Med.* 2011;365(8):725–33. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1103849>
23. Tay SH, Toh MMX, Thian YL, Vellayappan BA, Fairhurst A-M, Chan YH, et al. Cytokine release syndrome in cancer patients receiving immune checkpoint inhibitors: a case series of 25 patients and review of the literature. *Front Immunol.* 2022;13:807050. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.807050>
24. Osuchowski MF, Winkler MS, Skirecki T, Cajander S, Shankar-Hari M, Lachmann G, et al. The COVID-19 puzzle: deciphering pathophysiology and phenotypes of a new disease entity. *Lancet Respir Med.* 2021;9(6):622–42. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00218-6](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00218-6)
25. Ghosn L, Chaimani A, Evrenoglou T, Davidson M, Graña C, Schmucker C, et al. Interleukin-6 blocking agents for treating COVID-19: a living systematic review. *Cochrane Database Syst Rev.* 2021;(3):CD013881. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD013881>
26. Khan FA, Stewart I, Fabbri L, Moss S, Robinson K, Smyth AR, Jenkins G. Systematic review and meta-analysis of anakinra, sarilumab, siltuximab and tocilizumab for COVID-19. *Thorax.* 2021;76(9):907–19. <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2020-215266>
27. REMAP-CAP Investigators, Gordon AC, Mouncey PR, Al-Beidh F, Rowan KM, Nichol AD, Arabi YM, et al. Interleukin-6 receptor antagonists in critically ill patients with Covid-19. *N Engl J Med.* 2021;384(16):1491–502. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2100433>
28. Group RC. Tocilizumab in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised, controlled, open-label, platform trial. *Lancet.* 2021;397(10285):1637–45. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00676-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00676-0)
29. Kyriakopoulos C, Ntritsos G, Gogali A, Milionis H, Evangelou E, Kostikas K. Tocilizumab administration for the treatment of hospitalized patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Respirology.* 2021;26(11):1027–40. <https://doi.org/10.1111/resp.14152>
30. Vela D, Vela-Gaxha Z, Rexhepi M, Olloni R, Hyseni V, Nallbani R. Efficacy and safety of tocilizumab versus standard care/placebo in patients with COVID-19; a systematic review and meta-analysis of randomized clinical trials. *Br J Clin Pharmacol.* 2022;88(5):1955–63. <https://doi.org/10.1111/bcp.15124>
31. Rubio-Rivas M, Forero CG, Mora-Luján JM, Montero A, Formiga F, Homs NA, et al. Beneficial and harmful outcomes of tocilizumab in severe COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Pharmacotherapy.* 2021;41(11):884–906. <https://doi.org/10.1002/phar.2627>
32. Belletti A, Campochiaro C, Marmiere M, Likhvantsev V, Yavorovskiy A, Dagna L, et al. Efficacy and safety of IL-6 inhibitors in patients with COVID-19 pneumonia: a systematic review and meta-analysis of multicentre, randomized trials. *Ann Intensive Care.* 2021;11(1):152. <https://doi.org/10.1186/s13613-021-00941-2>
33. Angriman F, Ferreyro BL, Burry L, Fan E, Ferguson ND, Husain S, et al. Interleukin-6 receptor blockade in patients with COVID-19: placing clinical trials into context. *Lancet Respir Med.* 2021;9(6):655–64. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(21\)00139-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(21)00139-9)
34. Le RQ, Li L, Yuan W, Shord SS, Nie L, Habtemariam BA, et al. FDA approval summary: tocilizumab for treatment of chimeric antigen receptor T cell-induced severe or life-threatening cytokine release syndrome. *Oncologist.* 2018;23(8):943–7. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2018-0028>
35. Teachey DT, Rheingold SR, Maude SL, Zugmaier G, Barrett DM, Seif AE, et al. Cytokine release syndrome after blinatumomab treatment related to abnormal macrophage activation and ameliorated with cytokine-directed therapy. *Blood.* 2013;121(26):5154–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2013-02-485623>

36. Campochiaro C, Farina N, Tomelleri A, Ferrara R, Lazari C, De Luca G, et al. Tocilizumab for the treatment of immune-related adverse events: a systematic literature review and a multicentre case series. *Eur J Intern Med.* 2021;93:87–94. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2021.07.016>
37. Doms J, Prior JO, Peters S, Obeid M. Tocilizumab for refractory severe immune checkpoint inhibitor-associated myocarditis. *Ann Oncol.* 2020;31(9):1273–5. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.05.005>
38. Masui-Ito A, Okamoto R, Ikejiri K, Fujimoto M, Tanimura M, Nakamori S, et al. Tocilizumab for uncontrollable systemic inflammatory response syndrome complicating adult-onset Still disease: case report and review of literature. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(29):e7596. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000007596>
39. Мазуров ВИ, Королев МА, Пристром АМ, Кундер ЕВ, Сорока НФ, Кастанаян АА и др. Эффективность и безопасность левелимаба в сочетании с метотрексатом при лечении пациентов с активным ревматоидным артритом, устойчивым к монотерапии метотрексатом (двойное слепое рандомизированное плацебо-контролируемое исследование III фазы, SOLAR). *Современная ревматология.* 2021;15(4):13–23. [Mazurov VI, Korolev MA, Prystrom AM, Kunder EV, Soroka NF, Kastanayan AA, et al. Effectiveness and safety of levilimab in combination with methotrexate in treatment of patients with active rheumatoid arthritis resistant to methotrexate monotherapy (double-blinded randomized placebo controlled phase III clinical study SOLAR). *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology Journal.* 2021;15(4):13–23 (In Russ.)] <https://doi.org/10.14412/1996-7012-2021-4-13-23>
40. Nilsson G, Lekander M, Akerstedt T, Axelsson J, Ingre M. Diurnal variation of circulating Interleukin-6 in humans: a meta-analysis. *PLoS One.* 2016;11(11):e0165799. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165799>
41. Pou KM, Massaro JM, Hoffmann U, Vasan RS, Maurovich-Horvat P, Larson MG, et al. Visceral and subcutaneous adipose tissue volumes are cross-sectionally related to markers of inflammation and oxidative stress: the Framingham Heart Study. *Circulation.* 2007;116(11):1234–41. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.107.710509>
42. Roytblat L, Rachinsky M, Fisher A, Greemberg L, Shapira Y, Douvdevani A, et al. Raised interleukin-6 levels in obese patients. *Obes Res.* 2000;8(9):673–5. <https://doi.org/10.1038/oby.2000.86>
43. Popkin BM, Du S, Green WD, Beck MA, Algaith T, Herbst CH, et al. Individuals with obesity and COVID-19: a global perspective on the epidemiology and biological relationships. *Obes Rev.* 2020;21(11):e13128. <https://doi.org/10.1111/obr.13128>
44. Hamer M, Gale CR, Kivimäki M, Batty GD. Overweight, obesity, and risk of hospitalization for COVID-19: a community-based cohort study of adults in the United Kingdom. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020;117(35):21011–3. <https://doi.org/10.1073/pnas.2011086117>
45. Velavan TP, Meyer CG. Mild versus severe COVID-19: laboratory markers. *Int J Infect Dis.* 2020;95:304–7. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.061>
46. Mazaheri T, Ranasinghe R, Al-Hasani W, Luxton J, Kearney J, Manning A, et al. A cytokine panel and procalcitonin in COVID-19, a comparison between intensive care and non-intensive care patients. *PLoS One.* 2022;17(5):e0266652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266652>

Вклад авторов. Н.В. Ломакин, Б.А. Бакиров, Г.Х. Мусаев, В.В. Попов, Е.А. Смолярчук – существенный вклад в концепцию и дизайн работы, сбор, анализ и интерпретация результатов работы, написание текста рукописи и критический пересмотр ее содержания, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации; А.В. Еремеева, П.С. Пухтинская, М.А. Морозова – сбор, анализ и интерпретация результатов работы, написание текста рукописи и критический пересмотр ее содержания; Д.В. Богдан, Ю.Н. Линькова, А.В. Зинкина-Орихан, А.А. Луцкий – существенный вклад в концепцию и дизайн работы, сбор, анализ и интерпретация результатов работы, написание текста рукописи и критический пересмотр ее содержания, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Исследование проведено в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации и требованиями надлежащей клинической практики (Good Clinical Practice). Одобрено Советом по этике Минздрава России (выписка из протокола № 216 от 21.04.2020) и локальными этическими комитетами исследовательских центров.

Authors' contribution. N.V. Lomakin, B.A. Bakirov, G.H. Musaev, V.V. Popov, E.A. Smolyarchuk—significant contributions to the study concept and design, collection, analysis and interpretation of the study results, drafting and critical revision of the text of the manuscript, approval of the final version of the manuscript for publication; A.V. Eremeeva, P.S. Pukhtinskaia, M.A. Morozova—collection, analysis and interpretation of the study results, drafting and critical revision of the text of the manuscript; D.V. Bogdan, Y.N. Linkova, A.V. Zinkina-Orikhan, A.A. Lutckii—significant contributions to the study concept and design, collection, analysis and interpretation of the study results, drafting and critical revision of the text of the manuscript, approval of the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was conducted in full compliance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki by the World Medical Association and the requirements of Good Clinical Practice. The study was approved by the Ethics Council of the Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol No. 216, dated April 21, 2020) and local ethics committees of research centers.

Informed consent. The patients gave informed consent for the processing of their protected personal and health

Согласие пациентов. Получено информированное добровольное согласие пациентов на обработку данных, полученных в ходе исследования, включая сведения медицинского характера, их хранение в обезличенной форме и использование при анализе результатов исследования, в том числе в научных публикациях.

Благодарности. Исследование проведено при поддержке компании АО «БИОКАД». Авторы выражают благодарность всем, кто принимал участие в проведении исследования CORONA.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

information obtained in the study, as well as for its storage, use, and anonymised publication for scientific and educational purposes.

Acknowledgements. The study was conducted with the financial support of BIOCAD JSC. The authors thank all contributors to the CORONA clinical trial.

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Ломакин Никита Валерьевич, д-р мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8830-7231>
lomakinnikita@gmail.com

Бакиров Булат Ахатович, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3297-1608>
bakirovb@gmail.com

Мусаев Газиявдибир Хадисович, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6550-7975>
gasiyav@mail.ru

Попов Владимир Васильевич, д-р мед. наук, проф. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1570-2748>
clinpharmcb6@mail.ru

Смолярчук Елена Анатольевна, канд. мед. наук, доц. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2615-7167>
smolyarchuk@mail.ru

Линькова Юлия Николаевна, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5463-1022>
linkova@biocad.ru

Богдан Дмитрий Владимирович. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3334-3531>
bogdan@biocad.ru

Еремеева Анна Викторовна, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5196-6911>
eremeevaav@biocad.ru

Пухтинская Полина Сергеевна, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9790-8207>
puhtinskaya@biocad.ru

Морозова Мария Андреевна, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7755-7526>
morozovama@biocad.ru

Зинкина-Орихан Арина Валерьевна. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8499-2232>
zinkina@biocad.ru

Луцкий Антон Александрович, канд. мед. наук. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2884-1568>
lutskii@biocad.ru

Nikita V. Lomakin, Dr. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8830-7231>
lomakinnikita@gmail.com

Bulat A. Bakirov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3297-1608>
bakirovb@gmail.com

Gaziyavdibir H. Musaev, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6550-7975>
gasiyav@mail.ru

Vladimir V. Popov, Dr. Sci. (Med.), Professor. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1570-2748>
clinpharmcb6@mail.ru

Elena A. Smolyarchuk, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2615-7167>
smolyarchuk@mail.ru

Yulia N. Linkova, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5463-1022>
linkova@biocad.ru

Dmitrii V. Bogdan. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3334-3531>
bogdan@biocad.ru

Anna V. Ereemeeva, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5196-6911>
eremeevaav@biocad.ru

Polina S. Pukhtinskaia, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9790-8207>
puhtinskaya@biocad.ru

Maria A. Morozova, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7755-7526>
morozovama@biocad.ru

Arina V. Zinkina-Orikhan. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8499-2232>
zinkina@biocad.ru

Anton A. Lutskii, Cand. Sci. (Med.). ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2884-1568>
lutskii@biocad.ru

Поступила 07.07.2022

После доработки 12.10.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Received 7 July 2022

Revised 12 October 2022

Accepted 7 December 2022

Благодарности рецензентам Thank You to All Our Reviewers

Выражаем искреннюю признательность рецензентам, которые оказали неоценимую помощь при подготовке выпусков журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение». В 2022 г. объективную оценку и рекомендации авторам поступивших в редакцию рукописей дали:

Абзаева Н.В. (Ставрополь)	Лазарян Д.С. (Пятигорск)
Авдеева Ж.И. (Москва)	Лебедев В.Н. (Сергиев Посад, Московская обл.)
Агафонов А.П. (Кольцово, Новосибирская обл.)	Легонькова О.А. (Москва)
Алешкин А.В. (Москва)	Ледов В.А. (Москва)
Алпатова Н.А. (Москва)	Логинова С.Я. (Сергиев Посад, Московская обл.)
Амвросьева Т.В. (Минск, Республика Беларусь)	Макаревич П.И. (Москва)
Анисимов Р.Л. (Вольгинский, Владимирская обл.)	Максимов Н.Л. (Санкт-Петербург)
Аракелов С.А. (Санкт-Петербург)	Марахова А. И. (Москва)
Бабушкина Н.А. (Москва)	Медведева О.А. (Курск)
Бахрушина Е.О. (Москва)	Мельникова Е.В. (Москва)
Бондарев В.П. (Москва)	Мионов А.Н. (Москва)
Борисевич С.В. (Сергиев Посад, Московская обл.)	Мухачева А.В. (Москва)
Бутина Е.В. (Киров)	Найденова Е.В. (Саратов)
Владимирский М.А. (Москва)	Нетесова Н.А. (Кольцово, Новосибирская обл.)
Волкова Р.А. (Москва)	Никитюк Н.Ф. (Москва)
Волох О.А. (Саратов)	Николаева Т.Л. (Москва)
Губенко А.И. (Москва)	Оксанич А.С. (Москва)
Гончаров А.Е. (Минск, Республика Беларусь)	Ортенберг Э.А. (Тюмень)
Горячев Д.В. (Москва)	Пашенко Ю.И. (Сергиев Посад, Московская обл.)
Дармов И.В. (Киров)	Перелыгина О.В. (Москва)
Дубинкин И.В. (Москва)	Перунова Н.Б. (Оренбург)
Жуков В.А. (Сергиев Посад, Московская обл.)	Подколзин И.В. (Вольгинский, Владимирская обл.)
Зайковская А.В. (Кольцово, Новосибирская обл.)	Потеряев Д.А. (Вольгинский, Владимирская обл.)
Зинченко А.И. (Минск, Республика Беларусь)	Родин И.А. (Москва)
Иванов Р.А. (Сириус, Краснодарский край)	Романов Б.К. (Москва)
Иванов В.Б. (Москва)	Русанова Д.В. (Ставрополь)
Игнатъев Г.М. (Москва)	Салимова Е.Л. (Санкт-Петербург)
Ильичева Т.Н. (Кольцово, Новосибирская обл.)	Саканян Е.И. (Москва)
Каира А.Н. (Москва)	Саяпина Л.В. (Москва)
Карань Л.С. (Москва)	Скирда Т.А. (Москва)
Касина И.В. (Москва)	Смирнов В.В. (Москва)
Карякин А.В. (Москва)	Солдатов А.А. (Москва)
Кафтырева Л.А. (Санкт-Петербург)	Соколова Т.М. (Москва)
Киселевич О.К. (Москва)	Токаревич Н.К. (Санкт-Петербург)
Клевно Н.И. (Москва)	Торопыгин И.Ю. (Москва)
Ковалева М.А. (Кузьмоловский, Ленинградская обл.)	Тыринова Т.В. (Новосибирск)
Козловская Л.И. (Москва)	Углева С.В. (Москва)
Красько А.Г. (Минск, Республика Беларусь)	Устинникова О.Б. (Москва)
Кретенчук О.Ф. (Ростов-на-Дону)	Федосеенко М.В. (Москва)
Кузнецовский А.В. (Киров)	Хамитов Р.А. (Вольгинский, Владимирская обл.)
Кульминская А.А. (Гатчина, Ленинградской обл.)	Шмаров М.М. (Москва)
Куслий А.Г. (Кольцово, Новосибирская обл.)	Щуковская Т.Н. (Саратов)



ISSN 2221-996X



9 772221 996004