



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 BBIP-CoV (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 BBIP-CoV 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 гидроокиси 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 гидроокись 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 гидроокиси 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 г 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 г 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 (МАТ) 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 МАТ к другому эпитопу RBD Spike-белка, меченные пероксидазой хрена. Если в исследуемом образце присутствовал S-антиген, то при инкубации происходило его связывание с МАТ 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 окраски 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

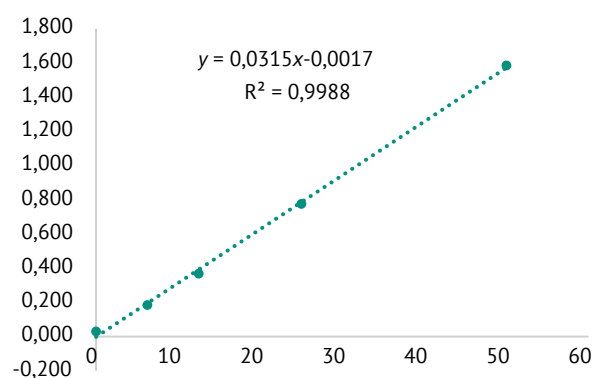


Рис. 1. Калибровочный график, полученный с использованием набора реагентов «БиоСкан-SARS-CoV-2 (S)». Ось ординат – оптическая плотность при 450 нм, ось абсцисс – концентрация S-антигена, нг/мл.

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 (С) 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±m <i>S-antigen concentration, ng/mL, M±m</i>	Расчетная концентрация специфического белка в вакцине (C), мкг/мл <i>Estimated specific protein concentration in the vaccine (C), µg/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-держательной 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, Maftei 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. *Bioinformatics*. 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, Piniava 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, Traiyan 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. Красько — 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

Красько 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