



Оценка гуморального иммунного ответа экспериментальных животных на введение рекомбинантного эктодомена поверхностного S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 с ИСКОМ-адьювантом

В.А. Евсеенко , А.В. Зайковская, А.С. Гудымо, О.С. Таранов, С.Е. Олькин, А.Р. Иматдинов, Е.Ю. Прудникова, Н.В. Данильченко, И.С. Шульгина, М.Н. Косенко, Е.И. Даниленко, С.А. Пьянков, А.Б. Рыжиков

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, АБК, к. 12а, Кольцово, Новосибирская область, 630559, Российская Федерация

✉ Евсеенко Василий Александрович; evseenko_va@vector.nsc.ru

Резюме

Актуальность. Использование рекомбинантных антигенов в вакцинах ограничено низкой иммуногенностью таких препаратов. Однако вакцина от COVID-19 (Nuvaxovid), содержащая не только рекомбинантный антиген гликопротеина Spike вируса SARS-CoV-2, но и вирусоподобный иммуностимулирующий комплекс ИСКОМ-адьювант, индуцирует выработку протективного вируснейтрализующего ответа. Исследование разработанного в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора ИСКОМ-адьюванта «Матрикс-В», играющего ключевую роль в формировании вируснейтрализующего иммунного ответа, позволит широко использовать рекомбинантные антигены в комплексе с адьювантом для разработки и производства новых отечественных вакцин.

Цель. Оценка гуморального иммунного ответа на внутримышечное введение животным комплекса рекомбинантного антигена RBD поверхностного Spike-гликопротеина SARS-CoV-2 (штамм «Ухань») и полученных вирусоподобных ИСКОМ с сапонидами *Quillaja saponaria*.

Материалы и методы. ИСКОМ-адьювант «Матрикс-В» получали по разработанной в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора технологии с применением метода тангенциальной фильтрации в системе Sartorius VivaFlow. Оценивали концентрацию сапонинов и детергента в препарате методом высокоэффективной жидкостной хроматографии. Получен рекомбинантный антиген RBD SARS-CoV-2, проведено электронно-микроскопическое исследование ультраструктуры комплекса «ИСКОМ – антиген». Комплексами «ИСКОМ – антиген» внутримышечно двукратно (через 14 сут) иммунизировали 25 (5 групп) мышей линии Balb/c и 15 (3 группы) разнополых аутобредных морских свинок. Образцы сыворотки крови исследовали в реакции нейтрализации и методом ИФА с антигенами 8 штаммов вируса SARS-CoV-2 (Государственная коллекция возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Результаты обрабатывались статистически в программе Statistica 10.

Результаты. Двукратное введение антигена RBD SARS-CoV-2 морским свинкам (по 1 мкг) и мышам (по 7 мкг) не приводило в реакции нейтрализации к достоверному формированию вируснейтрализующего ответа. В реакции нейтрализации со штаммом «Ухань» средние геометрические значения титров антител сыворотки крови животных, двукратно иммунизированных комплексом RBD SARS-CoV-2 (мыши – по 7 мкг, морские свинки – по 1 мкг) + Матрикс-В (по 25 мкг), были в пределах 1:83–1:178 и 1:174–1:587 соответственно.

В группах животных, однократно иммунизированных комплексом (1 мкг и 7 мкг антигена + Матрикс-В) антитела определялись в реакции нейтрализации (и/или ИФА) только в единичных случаях. В опытах ИФА наиболее интенсивный ответ (на антиген штамма Delta) получен после двукратной иммунизации комплексом Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг). Ответ на двукратное введение антигена Ecto-S-Wuhan (1 мкг) без ИСКОМ-адьюванта ($p=0,95$) не отличался от отрицательного контроля (значение титра менее 1:100). Двукратное введение мышам антигена RBD SARS-CoV-2 (по 7 мкг) приводило к формированию антител (значения титров 1:248–1:1477).

Выводы. Комплекс рекомбинантного антигена RBD SARS-CoV-2 и адьюванта «Матрикс-В» при двукратном внутримышечном введении индуцирует выработку вируснейтрализующих антител. Предложенный подход перспективен для разработки иммунобиологических препаратов профилактики и терапии широкого спектра инфекционных заболеваний.

Ключевые слова: вирусоподобные иммуностимулирующие комплексы; ИСКОМ-адьювант; сапонин; вакцина от COVID-19; иммунизация; SARS-CoV-2; рекомбинантный антиген; гликопротеин Spike; рекомбинантный эктодомен

Для цитирования: Евсеенко В.А., Зайковская А.В., Гудымо А.С., Таранов О.С., Олькин С.Е., Иматдинов А.Р., Прудникова Е.Ю., Данильченко Н.В., Шульгина И.С., Косенко М.Н., Даниленко Е.И., Пьянков С.А., Рыжиков А.Б. Оценка гуморального иммунного ответа экспериментальных животных на введение рекомбинантного эктодомена поверхностного S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 с ИСКОМ-адьювантом. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2023;23(4):530–543. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-530-543>

Финансирование. Работа выполнена в рамках Государственного задания Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека на проведение прикладных научных исследований (ГЗ 28/21).

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

Evaluation of humoral immune responses of experimental animals to the recombinant SARS-CoV-2 spike ectodomain with the ISCOM adjuvant

Vasily A. Evseenko , Anna V. Zaykovskaya, Andrei S. Gudymo, Oleg S. Taranov, Sergei E. Olkin, Almaz R. Imatdinov, Elena Yu. Prudnikova, Natalia V. Danilchenko, Irina S. Shulgina, Maksim N. Kosenko, Elena I. Danilenko, Stepan A. Pyankov, Aleksandr B. Ryzhikov

State Research Center for Virology and Biotechnology "Vector", 12/A ABK, Koltsovo, Novosibirsk Region 630559, Russian Federation

✉ Vasily A. Evseenko; evseenko_va@vector.nsc.ru

Abstract

Scientific relevance. The use of recombinant antigens in vaccine production is limited because vaccines based on such antigens tend to have low immunogenicity. However, a COVID-19 vaccine that combines recombinant SARS-CoV-2 spike glycoprotein as its antigen and virus-like immune-stimulating complexes (ISCOMs) as its adjuvant (Nuvaxovid) induces a protective virus-neutralising response. The State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" (hereinafter, Vector) has developed the ISCOM adjuvant Matrix-V, which plays a key role in inducing virus-neutralising antibodies. Studying Matrix-V will provide for the wide use of recombinant antigens combined with this adjuvant in the development and production of novel Russian vaccines.

Aim. This study aimed to evaluate the humoral immune responses of experimental animals to intramuscular injections of a complex combining the recombinant Wuhan-type SARS-CoV-2 spike RBD antigen and the virus-like ISCOM adjuvant containing *Quillaja saponaria* saponins.

Materials and methods. The Matrix-V ISCOM adjuvant was produced using Vector's proprietary technology, which involves cross-flow filtration through Sartorius VivaFlow cassettes. To determine the saponin and residual detergent concentrations in Matrix-V, the authors conducted high-performance liquid chromatography. Having produced the recombinant SARS-CoV-2 RBD antigen, the authors used electron microscopy to analyse the ultrastructure of the ISCOM-antigen complex. In the study of the ISCOM-antigen complex, 25 female Balb/c mice (5 groups) and 15 male and female outbred guinea pigs (3 groups) received two intramuscular injections with a 14-day interval. Serum tests relied on virus neutralisation (VN) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) methods and used antigens of 8 SARS-CoV-2 variants (State Collection of Viruses and Rickettsia, Vector). The authors used Statistica 10 to analyse the results. **Results.** Two injections of the SARS-CoV-2 RBD antigen (mice: 7 µg, guinea pigs: 1 µg) alone did not induce statistically significant virus-neutralising antibody responses, as shown by the VN results. Two injections of the SARS-CoV-2 RBD antigen (mice: 7 µg, guinea pigs: 1 µg) adjuvanted with Matrix-V (25 µg) resulted in geometric mean antibody titres of 1:83–1:178 (mice) and 1:174–1:587 (guinea pigs) in the VN tests with the Wuhan variant. One injection of the antigen (1 µg or 7 µg) with Matrix-V (25 µg) induced antibodies only in individual cases, as demonstrated by the VN and/or ELISA results. The most intensive immune response was observed in ELISA tests with the Delta variant after two injections of the Ecto-S-Wuhan (1 µg) and Matrix-V (25 µg) complex. Immune responses did not differ between the group that received two injections of the Ecto-S-Wuhan antigen (1 µg) without the ISCOM adjuvant and the negative control group (titres below 1:100; $p=0.95$). Two injections of the SARS-CoV-2 RBD antigen (7 µg) without the ISCOM adjuvant induced antibodies in mice (titres between 1:248 and 1:1477). **Conclusions.** Two intramuscular injections of the complex containing the recombinant SARS-CoV-2 RBD antigen and the Matrix-V ISCOM adjuvant induce virus-neutralising antibodies. The approach proposed by the authors has the potential for use in the development of immunobiological medicinal products to prevent and treat a wide range of infectious diseases.

Keywords:

virus-like immune-stimulating complex; ISCOM adjuvant; saponin; COVID-19 vaccine; immunisation; SARS-CoV-2; recombinant antigen; spike glycoprotein; recombinant ectodomain

For citation:Evseenko V.A., Zaykovskaya A.V., Gudymo A.S., Taranov O.S., Olkin S.E., Imatdinov A.R., Prudnikova E.Yu., Danilchenko N.V., Shulgina I.S., Kosenko M.N., Danilenko E.I., Pyankov S.A., Ryzhikov A.B. Evaluation of humoral immune responses of experimental animals to the recombinant SARS-CoV-2 spike ectodomain with the ISCOM adjuvant. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(4):530–543. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-4-530-543>

Funding. The study reported in this publication was carried out as part of publicly funded applied research project No. Г3 28/21 of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing.

Disclosure. The authors declare having no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Использование новых генно-инженерных подходов, базирующихся на рекомбинантных белках, доказало свою эффективность при создании новых вакцин в борьбе как с пандемическими, так и с давно укоренившимися в человеческой популяции инфекциями. Ранее был получен иммуностимулирующий комплекс ИСКОМ-адьювант на основе сапонинов *Quillaja saponaria*, который индуцировал существенное усиление иммунного ответа на введение инактивированных антигенов вируса гриппа [1]. Препараты с аналогичными адьювантами широко применяются или находятся на финальных стадиях клинических исследований. Вакцина «NuvaXovid» (Novavax, США), состоящая из рекомбинантного Spike-белка (S-белок, спайк-белок) вируса SARS-CoV-2 и вирусоподобного ИСКОМ-адьюванта Matrix-M (Novavax, США),

показала высокую эффективность в отношении COVID-19 и широко применяется в мире [2]. Заслуживает внимания первая вакцина для профилактики малярии Mosquirix (GSK, Великобритания), одобренная ВОЗ в 2021 г., и противомаларийная вакцина R21/Matrix-M (University of Oxford, Великобритания), разрешенная к применению в Гане, Нигерии в 2023 г. Большие надежды возлагаются ВОЗ на противотуберкулезную вакцину M72 (адьювант AS01E, GSK, Великобритания). На завершающем этапе 3-й фазы клинических испытаний находится противогриппозная рекомбинантная квадριвалентная вакцина qNIV (Novavax, США). В России разработана и прошла клинические испытания I–II фаз противокоронавирусная вакцина «Бетувакс» («Бетувакс», Россия), которая представляет собой вирусоподобную сферическую частицу из природного материала, несущую на себе

фрагменты антигена коронавируса – фрагмента RBD-домена Spike-гликопротеина (S-гликопротеин, спайк-гликопротеин) вируса SARS-CoV-2 [3].

При использовании адъювантов вместе с рекомбинантными белками появляется ряд неоспоримых преимуществ. Отсутствует необходимость работы с вирусными или бактериальными патогенами, необходимы только антигены-мишени – нуклеотидные последовательности геномов для воссоздания антигена. Возникает возможность проектирования химерных белков, содержащих антигенно-значимые участки, характерные для различных серовариантов патогена. Отработаны универсальные технологии получения и очистки рекомбинантных белков, которые позволяют получать препараты с высокой фармакоэкономической эффективностью.

Цель работы – оценка гуморального иммунного ответа на внутримышечное введение животным комплекса рекомбинантного антигена RBD поверхностного Spike-гликопротеина SARS-CoV-2 (штамм «Ухань») и полученных вирусоподобных ИСКОМ с сапонины *Quillaja saponaria*.

Материалы и методы

Материалы

Культуральная среда DMEM/F12 + GlutaMAX (Gibco, США), фетальная бычья сыворотка (Gibco, США), амфотерицин В (Gibco, США). Набор биосенсоров: Anti-Penta-HIS (HIS1K) (Sartorius, Германия), Penta-His (Qiagen, Германия), VivaFlow

200 (Sartorius, Германия). Сорбенты: Profinity IMAC (Bio-Rad, США), Nuvia HP-Q (Bio-Rad, США). ПАВ лаурилсаркозинат натрия (Sodium Lauroyl Sarcosinate, Amerco кат. № 0719-500G, США). Холестерин (Cholesterol, PanReac AppliChem кат. № A0807, США), лецитин (Lecithin, PanReac AppliChem кат. № A0893, США), сапонины *Q. saponaria* (PanReac AppliChem, США), бета-пропиолактон (BPL) (Acros Organics, Бельгия).

Вирусы. Использованные в данной работе штаммы коронавируса SARS-CoV-2 (из эпидемиологических проб) из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора представлены в *таблице 1*.

Методы

Получение и очистка рекомбинантного эктодомена поверхностного S-гликопротеина SARS-CoV-2.

Рекомбинантный S-гликопротеин вируса SARS-CoV-2 (штамм «Ухань») – Ecto-S-Wuhan, получали с использованием оригинальной поликлональной клеточной линии-производителя HEK293_SBW4G_FdT4 [Spike_2019-nCoV-FdT4-8xHis], несущего химерный ген, кодирующий эктодомен S-гликопротеина, а также бета-пропеллерный тримерный домен фибритина бактериофага T4 с C-концевой 8-гистидиновой меткой (His8-tag) под контролем промотора CAG. В качестве репортера экспрессии использовался eGFP. Клетки HEK293_SBW4G_FdT4 культивировали в среде DMEM/F12 + Glutamax, с добавле-

Таблица 1. Штаммы коронавируса SARS-CoV-2, использованные в работе (таблица составлена авторами по данным источника [4])

Table 1. SARS-CoV-2 variants used in this study (adapted by the authors from [4])

| Название штамма <i>Variant name</i> | Собственное название штамма <i>Variant proper name</i> | Обозначение штамма согласно ВОЗ <i>WHO Variant of Concern label</i> | Генетическая линия <i>Genetic lineage</i> |
|---|---|--|--|
| hCoV-19/Australia/VIC01/2020 | Ухань <i>Wuhan</i> | – | B |
| hCoV-19/Russia/MOS-2512/2020 | Альфа <i>Alpha</i> | Альфа <i>Alpha</i> | B.1.1.7 |
| hCoV-19/Russia/MOS-SAB-1502/2021 | Бета <i>Beta</i> | Бета <i>Beta</i> | B.1.351 |
| hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 | Гамма <i>Gamma</i> | Гамма <i>Gamma</i> | P1 |
| hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 | Дельта <i>Delta</i> | Дельта <i>Delta</i> | B.1.617.2 |
| hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 | Омикрон <i>Omicron</i> | Омикрон 1 <i>Omicron 1</i> | BA.1 |
| hCoV-19/Russia/Amursk-1603/2022 | Омикрон BA.2 <i>Omicron BA.2</i> | Омикрон 2 <i>Omicron 2</i> | BA.2 |
| hCov-19/Russia/Moscow-49415/2022 | Омикрон BA.5.2 <i>Omicron BA.5.2</i> | Омикрон 5.2 <i>Omicron 5.2</i> | BA.5.2 |

нием 5% инактивированной при 56 °C FBS, пенициллина и амфотерицина В. Культуру клеток инкубировали в культуральных матрасах 75 см² (Nunc, США) в условиях CO₂-инкубатора при 37 °C с 5% содержанием CO₂. Пассировали клетки с интервалом 3–4 сут в разведении 1:4 [5]. Для концентрирования и перевода продукта в рабочий буферный раствор I (10 мМ имидазол, 50 мМ TRIS-HCl, 250 мМ NaCl, pH 8) применяли тангенциальную фильтрацию на касете VivaFlow 200 с полиэтилсульфоновой мембраной с размером пор 30 000 MWCO при давлении 0,25 МПа. Впоследствии рекомбинантный эктодомен S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2 очищали при помощи аффинной хроматографии на хроматографической системе ActaPure (GE HealthCare Life Sciences, США) с использованием сорбента Profinity IMAC (Bio-Rad, США). Объем сорбента рассчитывали из соотношения: 1 мл сорбента на 1 л продукта. После нанесения концентрата продукта в рабочем буфере I сорбент промывали 10 объемами рабочего буфера I, далее 10 объемами промывочного буфера (30 мМ имидазол, 50 мМ TRIS-HCl, 250 мМ NaCl, pH 8).

Элюцию целевого белка проводили элюирующим буфером (300 мМ имидазол, 50 мМ TRIS-HCl, 250 мМ NaCl, pH 8). Для дальнейшей очистки методом ионообменной хроматографии полученный элюат посредством диализа переводили в рабочий буфер II (50 мМ TRIS-HCl, pH 7,8, рI 6,43). Финальную очистку проводили на анионообменном сорбенте Nuvia HP-Q. Изоэлектрическую точку рекомбинантного эктодомена S-гликопротеина рассчитывали по аминокислотной последовательности при помощи инструмента Vitalonic¹. Элюцию целевого белка проводили ступенчатым градиентом концентрации NaCl: от 0 до 0,5 М с шагом 40 мМ; от 0,5 до 1 М с шагом 100 мМ. Выход целевого белка регистрировали при концентрации соли 120–160 мМ.

Концентрацию белка определяли с применением программного обеспечения хроматографа UNICORN 7.5 (GE HealthCare Bio-Sciences AB, Швеция): с использованием коэффициента экстинкции (33 350 М⁻¹см⁻¹), рассчитанного по аминокислотной последовательности с помощью онлайн инструмента Novo Pro². Концентрация белка варьировалась в пределах от 10 до 150 мкг/мл в зависимости от объема среды, наносимой на колонку. Чистоту белка оценивали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в модификации Лэммли [6]. Анализ

электрофореграммы проводили с помощью программного обеспечения GelAnalyzer 19.1³.

Получение и очистка антигенов штаммов вируса SARS-CoV-2

Пулы штаммов (табл. 1) наработали на культуре клеток Vero E6, трижды заморозили и разморозили, затем центрифугировали при 4 тыс. об/мин в течение 10 мин, отфильтровали через фильтрующие насадки (0,22 Merck, США), сконцентрировали при помощи центрифужных концентраторов Amicon Ultra-15, 50 кДа (Merck, США) согласно инструкции производителя. По объему вирусные суспензии были сконцентрированы в 20 раз. Полученную концентрированную фракцию инактивировали при помощи BPL. Конечная концентрация BPL в растворе составила 0,1%. Путем инфицирования культуры клеток Vero E6 проверяли остаточную инфекционность инактивированных фракций: она отсутствовала во всех образцах [4]. Антигены очищали методом ультрацентрифугирования (105 000 g) вирусных частиц этих штаммов, концентрированных из культуральной жидкости с зараженного монослоя чувствительной клеточной культуры Vero E6, предварительно фильтрованной шприц-насадкой 0,8 мкм (Sartorius, Германия). Очистку проводили на градиенте плотности сахарозы [6].

Получение ИСКОМ-адьюванта «Матрикс-В»

Использовали промышленно масштабируемую технологию получения ИСКОМ, разработанную в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, с применением лаурилсаркозината натрия, холестерина, лецитина, сапонинов *Q. saponaria*. Аппаратная основа технологии – система тангенциальной фильтрации-концентрирования с модулем Sartorius VivaFlow, 100 кДа. Была получена и исследована серия ИСКОМ-адьюванта «Матрикс-В» с концентрацией активного компонента сапонинов *Q. saponaria* 47,9 мг/мл, по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), и остаточного детергента – 0,63 мг/мл. При этом однократная доза ИСКОМ-адьюванта для одного животного составляла 25 мкг. Содержание детергента было ниже предела детекции ВЭЖХ (менее 10 нг/мл), в гемолитической реакции титр составил менее 1:2. Контроль размеров вирусоподобных частиц проводили с помощью метода динамического рассеяния света (dynamic light scattering, DLS).

¹ <http://vitalonic.narod.ru/biochem/index.html>

² <https://www.novoprolabs.com/tools/protein-extinction-coefficient-calculation>

³ <http://www.gelanalyzer.com/index.html>

Определение размера частиц

Размер вирусоподобных частиц ИСКОМ «Матрикс-В» определяли с помощью анализатора размера частиц Photocor Compact-Z (ООО «Фотокор», Россия). Материал для анализа готовили согласно инструкции к прибору. Переводили частицы в фосфатно-солевой буфер (ФСБ) pH 7,4 с помощью жидкостной хроматографии на колонке GE XK-16 с носителем Sephadex G-100 (Sigma-Aldrich, США) на хроматографе ActaPure. Использовали одноразовые квадратные кюветы BRAND кат. № 759035 (Sigma-Aldrich, США). Перед измерением фильтровали препарат и ФСБ через фильтрующую шприц-насадку 0,22 мкм, подготавливали последовательные 10-кратные разведения ИСКОМ «Матрикс-В» в ФСБ. Для определения частиц брали такое разведение, при котором счетчик прибора фиксировал значение в диапазоне 100–300 тыс. cps (counts per second, отсчетов в секунду). Параметр Fitting range устанавливали в диапазоне 120–140, число интервалов – 200.

Электронная микроскопия

Изображения получены методом негативного контрастирования уранилацетатом (1%) с анализом на просвечивающем электронном микроскопе JEM-1400 (JEOL, США).

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Содержание сапонинов *Q. saponaria* и детергента в ИСКОМ-адьюванте определяли методом ВЭЖХ на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором SPD M20A и колонкой Kromasil 300-5-C4 (Kromasil, Швеция). Объем анализируемой пробы – 50 мкл. Состав подвижной фазы А: 95% воды деионизованной, 5% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты. Состав подвижной фазы В: 5% воды деионизованной, 95% ацетонитрила, 0,1% трифторуксусной кислоты. Линейный градиент: увеличение содержания подвижной фазы В с 20 до 65% за время от 0 до 30 мин с последующим поддержанием плато (65% от уровня фазы В) до 35 мин. Скорость подвижной фазы – 0,5 мл/мин, определение – при длине волны 215 нм [4, 7].

В качестве образца сравнения использовали сапонин – сухой препарат Saponin from Quillaja Bark pure (PanReac, США), и лаурилсаркозинат натрия – Sodium Lauroyl Sarcosinate (Amerco, США) [4].

Иммунизация животных

Исследования выполнялись на самках мышей линии Balb/c и на разнополых аутбредных

морских свинок, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Животные до начала эксперимента находились на карантине в течение 14 сут; на протяжении всего периода исследования получали стандартный рацион питания. Экспериментальную работу с животными по забору крови проводили с использованием легкого анестетика (смесь Золетил®100+Ксила), вводимого внутримышечно. Кровь отбиралась индивидуально у каждого животного [8]. Проводимые манипуляции по иммунизации не были сопряжены с болевыми ощущениями.

Все эксперименты проводились с одобрения Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, протокол БЭК № 3 от 07.06.2023.

Эксперименты на морских свинках. Для оценки иммуногенности препаратов Ecto-S-Wuhan и комплекса Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В 15 морских свинок весом 250–300 г были разделены на 3 группы (по 5 голов в каждой). Условия иммунизации животных во всех группах: двукратно, интервал между 1 и 2-й иммунизациями составил 14 сут; внутримышечно в две задние лапы; общий объем препарата – 500 мкл (по 250 мкл в каждое место иммунизации) [8]:

1-я группа – комплекс Ecto-S-Wuhan (однократная доза 1 мкг) + Матрикс-В (однократная доза 25 мкг);

2-я группа – комплекс Ecto-S-Wuhan (однократная доза 1 мкг);

3-я группа (контроль) – физиологический раствор.

Препараты готовили путем разведения исходных концентрированных компонентов в ФСБ (pH 7,4), смешивания и инкубации в течение 2 ч перед применением при комнатной температуре. Забор крови для анализа проводился до начала эксперимента, а также на 14-е сутки после 1 и 2-й иммунизациями, из крови отделяли сыворотку и хранили при –20 °С до проведения серологических исследований.

Эксперименты на мышах линии Balb/c. Эксперимент на мышах проводился позднее, с учетом данных, полученных на морских свинках. Для оценки иммуногенности препаратов Ecto-S-Wuhan и комплекса Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В были созданы 5 групп (по 5 голов в каждой) мышей весом 18–20 г. Интервал между 1 и 2-й иммунизациями – 14 сут. Иммунизация животных во всех группах: двукратно, внутримышечно в две задние лапы; общий объем препарата – 100 мкл (по 50 мкл в каждое место иммунизации):

- 1-я группа – комплекс Ecto-S-Wuhan (однократная доза 1 мкг) + Матрикс-В (однократная доза 25 мкг);
- 2-я группа – комплекс Ecto-S-Wuhan (однократная доза 7 мкг) + Матрикс В (однократная доза 25 мкг);
- 3-я группа – рекомбинантный S-белок вируса SARS-CoV-2 – Ecto-S-Wuhan (однократная доза 7 мкг);
- 4-я группа – адъювант «Матрикс-В»;
- 5-я группа (контроль) – физиологический раствор.

Препараты готовили путем разведения исходных концентрированных компонентов в ФСБ (рН 7,4), смешивания и инкубации в течение 2 ч перед применением при комнатной температуре. Забор крови для анализа проводился до начала эксперимента, а также на 14-е сутки после 1 и 2-й иммунизациями. Сыворотки крови хранились при -20°C до проведения серологических исследований.

Иммуноферментный анализ

Уровень гуморального ответа определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) как титр IgG к антигенам штаммов SARS-CoV-2 в образцах сыворотки крови. Антигены разводили до концентрации 2 мкг/мл раствором 0,1 М Na_2CO_3 и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета для ИФА (Nunc, США). После 18–20 ч инкубации при температуре от 17 до 27 $^{\circ}\text{C}$ содержимое лунок аспирировали, блокировали на 2 ч поверхность лунок раствором стабилизатора (200 мкл, 1% сахароза + 0,1% казеин). Содержимое лунок снова аспирировали и высушенный при температуре от 17 до 27 $^{\circ}\text{C}$ в течение 18–20 ч планшет упаковывали в цефленовый пакет с осушителем (силикагель) с последующим хранением при температуре от 4 до 8 $^{\circ}\text{C}$. Во все лунки вносили по 100 мкл разводящего буферного раствора (РБР-С), содержащего 0,1% казеина и 0,1% бычьего сывороточного альбумина. В верхний ряд лунок добавляли еще по 80 мкл РБР-С. Затем в верхний ряд вносили исследуемые образцы сыворотки крови (по 20 мкл), разведенные (1:10) в растворе для предварительного разведения сывороток. Также на каждом планшете титровали заведомо отрицательный контроль. Переноса в нижние лунки последовательно по 100 мкл раствора, титровали сыворотки крови с 1:100 до 1:12 800. Лунки закрывали клейкой пленкой и инкубировали в термошейкере при 37 $^{\circ}\text{C}$ и скорости вращения 700 об/мин в течение 60 мин.

Не связавшиеся антитела сыворотки пятикратно отмывали из лунок при помощи 400 мкл промывочного раствора ФСБ с добавлением Твин-20 (ФСБ-Т). Вносили по 100 мкл рабочего раствора пероксидазного конъюгата антител (Merck Life Science, США) против Fc-фрагмента антител мыши и морской свинки в разведении 1:5000 (согласно инструкции производителя) в растворе 0,1% казеина и 0,1% бычьего сывороточного альбумина для разведения конъюгата (РБР-К), закрывали клейкой пленкой и инкубировали в термошейкере при 37 $^{\circ}\text{C}$ и 700 об/мин в течение 30 мин. Не связавшийся конъюгат пятикратно отмывали из лунок 400 мкл ФСБ-Т. Вносили в лунки по 100 мкл рабочего раствора хромогена 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) в цитрат-фосфатном растворе с перекисью водорода и выдерживали 15 мин при 37 $^{\circ}\text{C}$. Останавливали реакцию развития окраски внесением в ТМБ по 50 мкл 1М серной кислоты (стоп-реагент). Регистрировали оптическую плотность раствора в лунках на планшетном сканере MultiScan (MultiScan Technologies LLC, США) при длине волны 450 нм. Титр IgG к антигенам штаммов SARS-CoV-2 рассчитывали как среднее значение максимальных разведений от повторов одного образца, титр каждого повтора оценивали по двукратному превышению оптической плотности заведомо отрицательного образца в этом же разведении [9].

Реакция нейтрализации

Культуру клеток Vero E6 выращивали в 96-луночном культуральном планшете. Исследуемые сыворотки прогревали при 56 $^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин, затем готовили последовательные двукратные разведения начиная с 1:10. Для разведения сывороток использовали среду DMEM с глутамином и добавлением антибиотиков. Готовили рабочую концентрацию вируса с титром 2×10^4 ЦПД₅₀/0,1 мл. Данная концентрация была выбрана с учетом того, что в лунку культурального планшета должно быть внесено 100 ЦПД₅₀ вируса, предварительно инкубированного с соответствующим разведением исследуемой сыворотки крови. Готовили смесь разведений сыворотки и рабочего разведения вируса в равных объемах. Смесь инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем добавляли в лунки 96-луночного планшета с монослоем культуры клеток Vero E6 и инкубировали в течение 4 сут при 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 . Любое специфическое повреждение клеточной культуры в лунке считали цитопатическим эффектом.

⁴ ЦПД₅₀ – доза вируса, вызывающая цитопатический эффект в 50% лунок с зараженной культурой клеток.

Результат учитывали визуально по наличию такого эффекта после окрашивания раствором генцианвиолета.

При постановке реакции нейтрализации (РН) были предусмотрены следующие контроли: контроль клеток (КК) – лунки, не инфицированные вирусом; отрицательный контроль (К-) – образец сыворотки мышей в разведении 1/10; контроль вируса (КВ) – лунки, инфицированные раствором с рабочим разведением вируса (разведен в 2 раза); контроль рабочей концентрации вируса (КВ/10, КВ/100) – два приготовленных последовательных 10-кратных разведения рабочей концентрации вируса. Титром сыворотки считали обратное значение ее последнего разведения, в котором не регистрировали признаков цитопатического эффекта.

Значения контрольных показателей учитывали следующим образом: КК – клеточный монослой в контрольных лунках должен быть сохранен полностью; К-, КВ и КВ/10 – полная дегенерация монослоя клеток; КВ/100 – половина инфицированных лунок имеет признаки цитопатического эффекта [4].

Статистическая обработка данных

Результаты экспериментов обрабатывались статистически с помощью программы Statistica 10. Для данных реакции торможения гемагглютинации и ИФА определялось среднее геометрическое значение. Доверительный интервал для средних геометрических рассчитывали следующим образом. Полученные значения титров ИФА логарифмировали по основанию 2, после чего определяли среднее арифметическое значение логарифмов и 95% доверительный интервал ($ДИ_{95}$) при $p=0,95$ для них. Максимальное значение ДИ рассчитывали путем добавления к среднему значению ДИ, а минимальное значение ДИ – путем вычитания из среднего ДИ. После этого проводили потенцирование среднего арифметического значения, максимальной и минимальной величины $ДИ_{95}$ путем возведения в степень 2 значений среднего арифметического $ДИ_{95max}$ и $ДИ_{95min}$ [8].

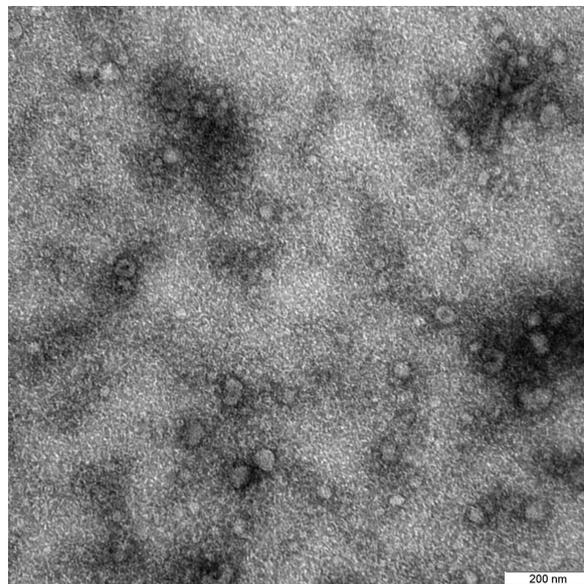
Результаты

Анализ размера частиц показал, что полученный препарат ИСКОМ «Матрикс-В» состоит из частиц, средний размер которых составляет $40,69 \pm 14,84$ нм. Ультраструктура комплекса Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг), использованного для иммунизации экспериментальных животных, представлена на *рисунке 1*.

После внутримышечного введения препарата Ecto-S-Wuhan и комплекса Ecto-S-

Wuhan+Матрикс-В животные не проявляли внешних признаков угнетения. Результаты ИФА образцов сыворотки крови морских свинок представлены на *рисунке 2*. Сыворотки крови животных всех экспериментальных групп, взятые на 14-е сутки после однократной иммунизации, достоверно ($p=0,95$) не отличались от отрицательного контроля, среднегеометрические титры (СГТ) антител были менее 1:100. Наиболее интенсивный ответ (на антиген штамма Delta) получен после двукратной иммунизации комплексом Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг). Статистически значимые различия титров ($p=0,95$) наблюдались в реакциях с антигенами штаммов Wuhan, Gamma и Omicron BA.2. Ответ на двукратное введение антигена Ecto-S-Wuhan (1 мкг) без ИСКОМ-адьюванта ($p=0,95$) не отличался от отрицательного контроля, значение титра менее 1:100.

Результаты реакции вирус-нейтрализации с образцами сывороток крови морских свинок представлены на *рисунке 3*. Обратные нейтрализующие титры сывороток крови после двукратного введения комплекса Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг) против штаммов Wuhan и Delta составили 1:320 и 1:184 соответственно, при этом различия оказались не достоверны ($p=0,95$). Нейтрализующая активность против



Фотография выполнена авторами / The photograph is taken by the authors

Рис. 1. Фотография частиц иммуностимулирующего комплекса, полученного с использованием сапонинов *Quillaja saponaria*. 100-кратный концентрат комплекса Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг). Просвечивающий электронный микроскоп JEM-1400 (JEOL, США).

Fig. 1. Particles of the immune-stimulating complex obtained using *Quillaja saponaria* saponins. 100-fold concentrate of the Ecto-S-Wuhan (1 μ g) and Matrix-V (25 μ g) complex. Transmission electron microscopy (JEM-1400; JEOL, USA).

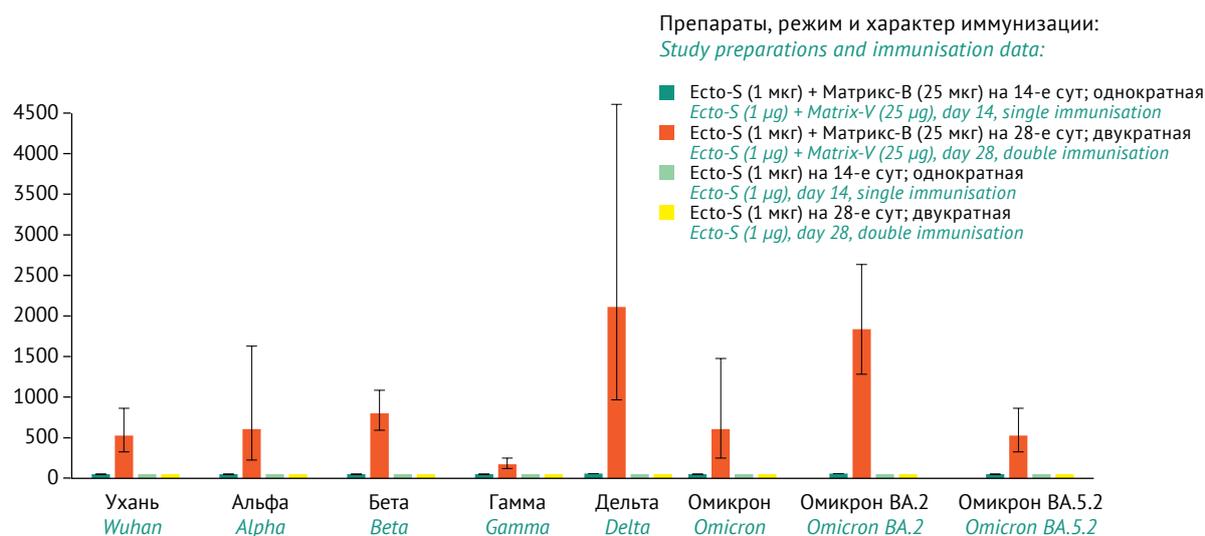


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Данные иммуноферментного анализа образцов сыворотки крови иммунизированных морских свинок. Ось абсцисс: штаммы вируса SARS-CoV-2, которые использовались для получения антигена. Ось ординат: среднее геометрическое значений обратных титров антител. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала ($p=0,95$).

Fig. 2. Enzyme-linked immunosorbent assay data on serum samples from immunised guinea pigs. The X-axis shows the SARS-CoV-2 variants used to obtain the study antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The whiskers reflect confidence intervals ($p=0.95$).

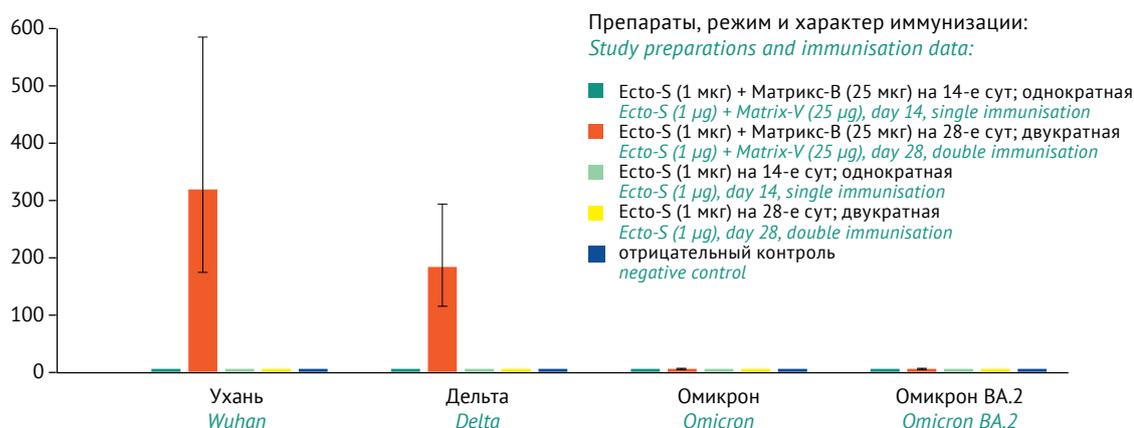


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Данные реакции вирус-нейтрализации с образцами сыворотки крови иммунизированных морских свинок. Ось абсцисс: штаммы вируса SARS-CoV-2, которые использовались для получения антигена. Ось ординат: среднее геометрическое значений обратных титров антител. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала ($p=0,95$).

Fig. 3. Virus neutralisation data on serum samples from immunised guinea pigs. The X-axis shows the SARS-CoV-2 variants used to obtain the study antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The whiskers reflect confidence intervals ($p=0.95$).

штаммов Omicron и Omicron BA.2 отсутствовала. Однократное введение препаратов животным всех экспериментальных групп не привело к выработке вируснейтрализующих антител.

Для верификации результатов, полученных в эксперименте на морских свинках, была проведена иммунизация мышей идентичным комплексом Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В

(25 мкг), а также отдельно антигеном Ecto-S-Wuhan с повышенной концентрацией (7 мкг). Результаты ИФА представлены на рисунке 4. После однократного введения всех препаратов иммунный ответ в ИФА определялся только у единичных животных, а при оценке группы не отличался достоверно ($p=0,95$) от отрицательного контроля. После двукратной иммунизации

отметили существенное увеличение значений титров антител образцов сыворотки крови мышей против Ecto-S-Wuhan (7 мкг, без адъюванта) при связывании с антигеном SARS-CoV-2 штамма Wuhan. Также значительное увеличение титров антител в сыворотке крови мышей наблюдали при двукратном введении комплекса Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг) (рис. 4).

В РН получены результаты, которые подтверждают данные, полученные на модели морских свинок (рис. 5). Однократное введение всех препаратов мышам не приводило к формированию вируснейтрализующего ответа (значения титров антител менее 1:10). Двукратное введение комплекса Ecto-S-Wuhan (1 мкг) + Матрикс-В (25 мкг) индуцировало вируснейтрализующий

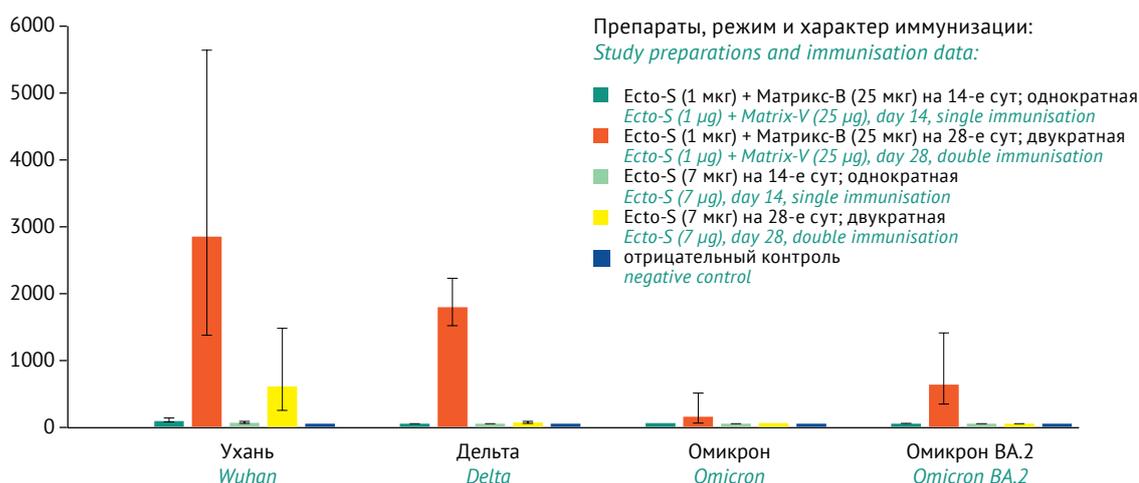


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 4. Данные иммуноферментного анализа с образцами сыворотки крови иммунизированных мышей. Ось абсцисс – штаммы вируса SARS-CoV-2, которые использовались для получения антигена. Ось ординат – среднее геометрическое значений обратных титров антител. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала ($p=0,95$).

Fig. 4. Enzyme-linked immunosorbent assay data on serum samples from immunised mice. The X-axis shows the SARS-CoV-2 variants used to obtain the study antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The whiskers reflect confidence intervals ($p=0.95$).

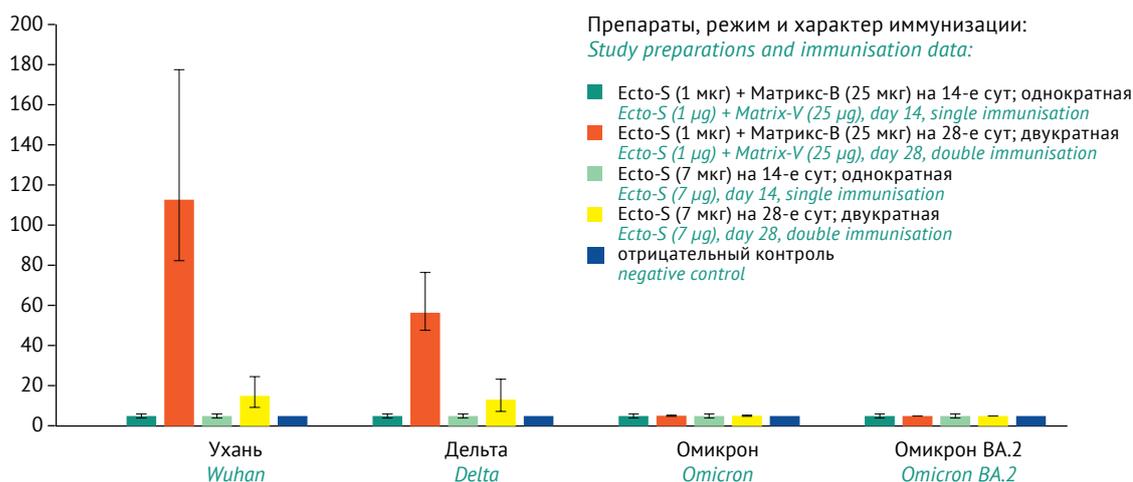


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Данные реакции вирус-нейтрализации с образцами сыворотки крови иммунизированных мышей. Ось абсцисс: штаммы вируса SARS-CoV-2, которые использовались для получения антигена. Ось ординат: среднее геометрическое значений обратных титров антител. Вертикальные маркеры погрешностей указывают значения доверительного интервала ($p=0,95$).

Fig. 5. Virus neutralisation data on serum samples from immunised mice. The X-axis shows the SARS-CoV-2 variants used to obtain the study antigens. The Y-axis represents geometric means of reciprocal antibody titres. The whiskers reflect confidence intervals ($p=0.95$).

ответ на антиген штаммов Wuhan и Delta: значения титров антител составили 1:113 и 1:56 соответственно. При этом нейтрализующая способность сывороток крови была достоверно выше в отношении линии Wuhan, чем Delta. Вирусы Omicron и Omicron BA.2 не были нейтрализованы антителами сыворотки крови мышей, иммунизированных разработанными препаратами.

Обсуждение

Разработанная генетическая конструкция позволила получить рекомбинантный белок, идентичный по антигенным свойствам эктодомену S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2. В данной работе не затронуты вопросы оптимизации трансфекции клеток, отбора клонов и эффективности с точки зрения производства. Приводятся данные, характеризующие антиген, который использовался для иммунизации животных.

Первая рекомбинантная противокоронавирусная вакцина NuvaXovid с ИСКОМ-адьювантом, которая была внедрена, включает в себя рекомбинантный S-белок вируса SARS-CoV-2, полученный в клетках насекомых биотехнологическим методом – бакуловирусной системой экспрессии. Данная система ранее применялась для экспрессии рекомбинантного гемагглютинаина вируса гриппа, который использовался для производства противогриппозной вакцины Flublok®. Препарат не содержит адьювантов, а иммуногенные свойства рекомбинантного гемагглютинаина обусловлены особенностями процессинга белка клетками насекомых и самосборкой в вирусоподобные частицы размером около 40 нм. При этом нагрузка по специфическому белку составляет 15 мкг гемагглютинаина каждого субтипа. Для создаваемого нами вакцинного прототипа изначально планировалось применение ИСКОМ-адьюванта. При таком дизайне вирусоподобные свойства обусловлены частицей адьюванта и преимущества бакуловирусного антигена не очевидны. Была выбрана хорошо зарекомендовавшая себя разработанная в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора система экспрессии рекомбинантных белков на основе клеток HEK293.

Оценка иммуногенных свойств произведенного антигена в комплексе с ИСКОМ-адьювантом была проведена на двух видах животных – мышах и морских свинках, и результаты иммунного ответа оказались близко сопоставимы. Однократное введение Ecto-S-Wuhan, а также комплекса Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В не приводило к определяемому ответу. Ранее аналогичные результаты при введении доз от 50 нг до 1 мкг были показаны на примере гриппозных

инактивированных антигенов [1]. В настоящей работе на мышинной модели исследовался антиген в дозе 7 мкг, но при однократном введении только у единичных животных в ИФА фиксировалось незначительное превышение значений по сравнению с данными отрицательного контроля. Наличие специфических антител анализировали при помощи двух методов – РН и ИФА. Второй метод широко используется для диагностики, первый – позволяет определить наличие вируснейтрализующих антител. Результаты ИФА сывороток крови экспериментальных животных (рис. 4) свидетельствуют о том, что двукратное введение Ecto-S-Wuhan, а также комплекса Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В приводит к формированию выраженного гуморального ответа как у мышей, так и у морских свинок.

В представленной работе был разработан и исследован антиген Ecto-S-Wuhan, созданный на основе генетической последовательности штамма Wuhan SARS CoV-2, характерного для начала пандемии. В результате вирусной эволюции уже возникло множество генетических вариантов вируса, для которых нейтрализующая способность сывороток, специфичных к исходным штаммам вируса, существенно снижена либо отсутствует. В связи с этим для проверки нейтрализующей специфической активности сывороток животных, иммунизированных исследуемыми препаратами, были использованы штаммы вируса SARS CoV-2 разных генетических линий.

Кросс-реактивность между использовавшимися антигенами штаммов SARS CoV-2 и антителами сыворотки крови экспериментальных животных, индуцированными двукратным введением синтетического комплекса Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В в ИФА, показана для всех пар сравнения. По данным эксперимента на морских свинках, достоверно ($p=0,95$) более высокий ответ на иммунизацию комплексом зафиксирован для антигенов Delta и Omicron BA.2. По данным эксперимента на мышах Balb/c, достоверно ($p=0,95$) более высокий ответ зафиксирован для гомологичного антигена Wuhan и Delta (рис. 2). Исследования в РН показали уровень кросс-реактивности антител сыворотки крови экспериментальных животных и штаммов SARS CoV-2 с точки зрения нейтрализующих свойств.

На обеих животных моделях показано, что достоверной ($p=0,95$) нейтрализующей активностью обладают сыворотки животных, двукратно иммунизированных комплексом Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В (рис. 3, 5). Максимальная

нейтрализующая активность проявилась в отношении генетических линий Wuhan и Delta, между которыми нет достоверных различий ($p=0,95$). Несмотря на сравнительно высокие значения СГТ-нейтрализующих титров антител сыворотки крови мышей и морских свинок к вирусам Wuhan и Delta, достоверных ($p=0,95$) признаков нейтрализации образцов штаммов Omicron и Omicron BA.2 не отмечено (рис. 3, 5). Эти результаты соответствуют представленными ранее, анализ которых показал, что нейтрализующая активность сывороток, полученных к антигенам штаммов Omicron 1 и 2 (СГТ 1:1437, 1:368), по отношению к прототипному штамму Wuhan SARS-CoV-2 (СГТ 1:80, 1:20), снижена в 18 раз [4].

Только у единичных мышей, двукратно иммунизированных Ecto-S-Wuhan в однократной дозе 7 мкг, были отмечены вируснейтрализующие свойства антител крови против генетических линий Wuhan и Delta, титр антител составил 1:40 в обоих случаях, но значения СГТ в этих группах достоверно ($p=0,95$) не отличались от показателей в группах отрицательного контроля. Фактически даже двукратное

введение рекомбинантного антигена без адьюванта не приводило к формированию нейтрализующего иммунного гуморального ответа против гомологичного вируса.

Заключение

Оценка уровня гуморального иммунного ответа экспериментальных животных на внутримышечное введение Ecto-S-Wuhan – рекомбинантного эктодомена S-белка вируса SARS-CoV-2 (генетическая линия Wuhan), совместно с ИСКОМ-адьювантом, содержащим сапонины *Q. saponaria*, продемонстрировала следующее: комплекс Ecto-S-Wuhan+Матрикс-В при двукратном внутримышечном введении индуцирует высокий уровень вируснейтрализующих антител, что позволяет рассматривать комплекс в качестве прототипа противоковидной вакцины. Разработанный нами ИСКОМ-адьювант перспективен для использования в качестве компонента иммунобиологических препаратов на основе рекомбинантных антигенов для профилактики и терапии широкого спектра инфекционных заболеваний.

Литература/References

1. Евсеенко ВА, Гудымо АС, Данильченко НВ, Святченко СВ, Таранов ОС, Рыжиков АБ. Разработка и лабораторное получение вирусоподобных иммуностимулирующих комплексов на основе сапонинов, оценка их адьювантных свойств при иммунизации мышей гриппозными антигенами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2022;22(2):170–86.
Evseenko VA, Gudymo AS, Danilchenko NV, Svyatchenko SV, Taranov OS, Ryzhikov AB. Development and laboratory production of virus-like immune-stimulating complexes based on saponins and evaluation of their adjuvant potential using mice immunisation with influenza antigens. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2022;22(2):170–86 (In Russ.).
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-22-2-170-186>
2. Underwood E, Dunkle LM, Madhi SA, Gay CL, Heath PT, Kotloff KL, et al. Safety, efficacy, and immunogenicity of the NVX-CoV2373 vaccine. *Expert Rev Vaccines*. 2023;22(1):501–17.
<https://doi.org/10.1080/14760584.2023.2218913>
3. Kudriavtsev AV, Vakhrusheva AV, Kryuchkov NA, Frolova ME, Blagodatskikh KA, Ivanishin TV, et al. Safety and immunogenicity of Betuvax-CoV-2, an RBD-Fc-based SARS-CoV-2 recombinant vaccine: preliminary results of the first-in-human, randomized, double-blind, placebo-controlled phase I/II clinical trial. *Vaccines (Basel)*. 2023;11(2):326.
<https://doi.org/10.3390/vaccines11020326>
4. Зайковская АВ, Евсеенко ВА, Олькин СЕ, Пянков ОВ. Изучение антигенных свойств штаммов коронавируса SARS-CoV-2, выделенных на территории РФ в 2020–2022 гг., в реакции нейтрализации с использованием гипериммунных сывороток мышей. *Инфекция и иммунитет*. 2023;13(1):37–45.
Zaykovskaya AV, Evseenko VA, Olkin SE, Pyankov OV. Investigating antigenic features of the SARS-CoV-2 isolated in Russian Federation in 2021–2022 by hyperimmune mouse serum neutralisation. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2023;13(1):37–45 (In Russ.).
<https://doi.org/10.15789/2220-7619-IAF-1998>
5. Herrera NG, Morano NC, Celikgil A, Georgiev GI, Malonis RJ, Lee JH, et al. Characterization of the SARS-CoV-2 S protein: biophysical, biochemical, structural, and antigenic analysis. *ACS Omega*. 2021;6(1):85–102.
<https://doi.org/10.1021/acsomega.0c03512>
6. Остерман ЛА. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование. М.: Наука; 1981.
Osterman LA. *Methods for studying proteins and nucleic acids: electrophoresis and ultracentrifugation*. Moscow: Nauka; 1981 (In Russ.).
7. San Martín R, Briones R. Quality control of commercial quillaja (*Quillaja saponaria* Molina) extracts by reverse phase HPLC. *J Sci Food Agric*. 2000;80(14):2063–8.
[https://doi.org/10.1002/1097-0010\(200011\)80:14%3C2063::AID-JSFA750%3E3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/1097-0010(200011)80:14%3C2063::AID-JSFA750%3E3.0.CO;2-2)
8. Гудымо АС, Мальцев СВ, Евсеенко ВА, Данильченко НВ, Марченко ВЮ, Дурьманов АГ, Рыжиков АБ. Экстракт цикламена европейского (*Cyclamen purpurascens*) в качестве адьюванта при интраназальной иммунизации мышей гриппозными антигенами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2017;17(4):233–9.

Gudymo AS, Maltsev SV, Evseenko VA, Danilchenko NV, Marchenko VYu, Durymanov AG, Ryzhikov AB. *Cyclamen europaeum* (*Cyclamen purpurascens*) extract as adjuvant for nasal immunization of mice with influenza antigens. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2017;17(4):233–9 (In Russ.).

EDN: [ZXGLLN](#)

9. Щелкунов СН, Сергеев АА, Кабанов АС, Якубицкий СН, Бауэр ТВ, Пьянков СА. Патогенность

и иммуногенность вариантов вируса осповакцины при разных способах их введения мышам. *Инфекция и иммунитет*. 2021;11(2):357–64.

Shchelkunov SN, Sergeev AA, Kabanov AS, Yakubitsky SN, Bauer TV, Pyankov SA. Route-coupled pathogenicity and immunogenicity of vaccinia virus variant inoculated mice. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(2):357–64 (In Russ.).

<https://doi.org/10.15789/2220-7619-PAI-1375>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **В.А. Евseenko** – разработка технологии и получение иммуностимулирующих вирусоподобных комплексов, разработка концепции и дизайна экспериментального исследования; анализ и интерпретация экспериментальных данных, написание текста рукописи; **А.В. Зайковская** – получение антигенов штаммов SARS-CoV-2, проведение исследования методом вирус-нейтрализации, комплекс работ по экспериментам с животными; **А.С. Гудымо, Н.В. Данильченко** – комплекс работ по экспериментам с животными; **О.С. Таранов** – проведение комплекса электронно-микроскопических исследований; **С.Е. Олькин** – определение концентрации детергента и вирусоподобных комплексов; **А.Р. Иmatдинов, Е.Ю. Прудникова** – разработка и получение генетических конструкций для получения поверхностного S-гликопротеина вируса SARS-CoV-2; **Е.И. Даниленко** – комплекс работ по наработке S-гликопротеина; **И.С. Шульгина, С.А. Пьянков** – наработка антигенов и постановка иммуноферментного анализа; **М.Н. Косенко** – выделение и очистка S-гликопротеина, получение стерильной готовой формы препарата; **А.Б. Рыжиков** – утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Все исследования проводились в соответствии с рекомендациями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, принципами этического кодекса CIOMS «Международные рекомендации по проведению биомедицинских исследований с использованием животных», Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ГОСТ 33216–2014). Проведение исследований и все эксперименты были одобрены на заседании Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол заседания БЭК № 3 от 07.06.2023).

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **V.A. Evseenko** developed the production technology and applied it to produce virus-like immune-stimulating complexes, conceptualised and designed the experimental study, analysed and interpreted experimental data, and drafted the manuscript. **A.V. Zaykovskaya** obtained SARS-CoV-2 variant antigens, conducted virus neutralisation testing, and worked with experimental animals. **A.S. Gudymo** and **N.V. Danilchenko** worked with experimental animals. **O.S. Taranov** carried out electron microscopy. **S.E. Olkin** determined detergent and virus-like complex concentrations. **A.R. Imatdinov** and **E.Yu. Prudnikova** developed and produced genetic constructs to obtain SARS-CoV-2 surface glycoprotein (S). **E.I. Danilenko** produced SARS-CoV-2 surface glycoprotein (S). **I.S. Shulgina** and **S.A. Pyankov** produced antigens and conducted ELISA. **M.N. Kosenko** isolated and purified SARS-CoV-2 surface glycoprotein (S), produced the final sterile product. **A.B. Ryzhikov** approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. All the experiments were performed according to the recommendations of 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, the CIOMS International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals, and the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and Other Scientific Purposes (Russian Standard GOST 33216-2014). The Bioethics Committee at the State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector” approved the study and all the experiments (Bioethics Committee’s Meeting Minutes No. 3 of 7 June 2023).

Об авторах / Authors

Евseenko Василий Александрович, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6720-1040>
evseenko_va@vector.nsc.ru

Зайковская Анна Владимировна, канд. биол. наук
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>
zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

Vasily A. Evseenko, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6720-1040>
evseenko_va@vector.nsc.ru

Anna V. Zaykovskaya, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>
zaykovskaya_av@vector.nsc.ru

Гудымо Андрей Сергеевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6952-6412>
gudymo_as@vector.nsc.ru

Таранов Олег Святославович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
taranov@vector.nsc.ru

Олькин Сергей Евгеньевич, канд. хим. наук

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-7158-9889>
olkin_se@vector.nsc.ru

Иматдинов Алмаз Рамисович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2889-6112>
imatdinov_ar@vector.nsc.ru

Прудникова Елена Юрьевна, канд. вет. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7983-5312>
prudnikova_eyu@vector.nsc.ru

Данильченко Наталья Викторовна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2655-4629>
danielchenko_nv@vector.nsc.ru

Шульгина Ирина Сергеевна

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6850-338X>
shulgina_is@vector.nsc.ru

Косенко Максим Николаевич

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8023-0601>
kosenko_mn@vector.nsc.ru

Даниленко Елена Игоревна

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8106-7037>
danilenko_ei@vector.nsc.ru

Пьянков Степан Александрович

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6593-6614>
pyankov_sa@vector.nsc.ru

Рыжиков Александр Борисович, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7009-0748>
ryzhik@vector.nsc.ru

Поступила 27.07.2023

После доработки 01.11.2023

Принята к публикации 24.11.2023

Andrei S. Gudymo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6952-6412>
gudymo_as@vector.nsc.ru

Oleg S. Taranov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6746-8092>
taranov@vector.nsc.ru

Sergei E. Olkin, Cand. Sci. (Chem.)

ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-7158-9889>
olkin_se@vector.nsc.ru

Almaz R. Imatdinov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2889-6112>
imatdinov_ar@vector.nsc.ru

Elena Yu. Prudnikova, Cand. Sci. (Vet.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7983-5312>
prudnikova_eyu@vector.nsc.ru

Natalia V. Danilchenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2655-4629>
danielchenko_nv@vector.nsc.ru

Irina S. Shulgina

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6850-338X>
shulgina_is@vector.nsc.ru

Maksim N. Kosenko

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8023-0601>
kosenko_mn@vector.nsc.ru

Elena I. Danilenko

ORCID: <https://orcid.org/0009-0007-8106-7037>
danilenko_ei@vector.nsc.ru

Stepan A. Pyankov

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6593-6614>
pyankov_sa@vector.nsc.ru

Aleksandr B. Ryzhikov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7009-0748>
ryzhik@vector.nsc.ru

Received 27 July 2023

Revised 1 November 2023

Accepted 24 November 2023