

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Коваленко Ангелина Олеговна

**Вакцинный кандидат против SARS-CoV-2 на основе вирусов
растений: создание и характеристика**

1.5.10 – Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2023

Диссертация подготовлена на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ имени М.В.Ломоносова

Научные руководители

– Карпова Ольга Вячеславовна, доктор биологических наук, профессор

Евтушенко Екатерина Алексеевна, кандидат биологических наук

Официальные оппоненты

– Равин Николай Викторович, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», заместитель директора по научной работе

Дзагурова Тамара Казбековна, доктор медицинских наук, ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита), заведующий лабораторией геморрагических лихорадок

Шешукова Екатерина Владимировна, кандидат биологических наук, ФГБУН Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, старший научный сотрудник лаборатории генетического контроля устойчивости к стрессам

Защита диссертации состоится «07» декабря 2023 г. в 16:00 часов на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, Биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В.Ломоносова (Ломоносовский просп., д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/015.4/2751>

Автореферат разослан «___» _____ 2023 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности.

В марте 2020 г. Всемирная организация здравоохранения объявила о начале пандемии COVID-19, причиной которой стал бетакоронавирус SARS-CoV-2 (Telenti *et al.*, 2022). Ранее два других бетакоронавируса – SARS-CoV и MERS-CoV – уже вызывали вспышки тяжелого респираторного заболевания с высокой летальностью, но распространение этих случаев было весьма ограниченным (Rabaan *et al.*, 2020). В настоящий момент лицензированных вакцин против SARS-CoV и MERS-CoV не зарегистрировано, однако те концепции, которые были применены в ходе разработок соответствующих вакцинных кандидатов, помогли в довольно короткий срок создать ряд вакцин против нового бетакоронавируса SARS-CoV-2 с использованием различных подходов. Порядка 50 вакцин против SARS-CoV-2 были полностью одобрены регулирующими органами или получили разрешение на экстренное применение (COVID19 Vaccine Tracker, 2022). Большая часть из них относится к рекомбинантным белковым вакцинам, главным преимуществом которых является подтвержденный высокий профиль безопасности (Sarkar *et al.*, 2019).

В составе рекомбинантных белковых вакцин против SARS-CoV-2 чаще всего используют либо полноразмерный S-белок – основной антиген бетакоронавирусов, либо его рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain, RBD), к которому вырабатываются наиболее эффективные вируснейтрализующие антитела (Robbiani *et al.*, 2020; Wrapp *et al.*, 2020; Zost *et al.*, 2020; Pollet *et al.*, 2021a). Основным аргументом в пользу вакцин на основе S-белка является сохранение природы вакцинного антигена, близкой к нативному состоянию. Интерес к вакцинам на основе RBD, вероятно, продиктован опасениями по поводу возможных нежелательных иммунных реакций, ранее отмеченных при тестировании рекомбинантных белковых вакцин на основе полноразмерного S-белка против SARS-CoV (Kam *et al.*, 2007; Jaume *et al.*, 2012). Тем не менее, данные клинических исследований продемонстрировали эффективность и безопасность обоих типов рекомбинантных белковых вакцин против COVID-19. Некоторые исследовательские группы представили также мультиэпитопные вакцины на основе пептидов, повторяющих иммуногенные эпитопы SARS-CoV-2 (Рыжиков *и др.*, 2021a; Heitmann *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2022a).

Рекомбинантные белки для вакцин были получены в разных экспрессионных системах, преимущественно были использованы клетки млекопитающих ввиду их способности экспрессировать белки с необходимыми посттрансляционными модификациями. Однако недостатками данной системы экспрессии являются

длительность процесса культивирования клеток млекопитающих и его высокая стоимость. Одновременно с этим имеются данные о возможности получения рекомбинантного RBD, обладающего иммуногенными свойствами, в клетках бактерий *Escherichia coli* (Du *et al.*, 2009; Ke *et al.*, 2022; Rahbar *et al.*, 2022). Клетки *E. coli* характеризуются быстрым ростом, возможностью осуществления широкого спектра генетических манипуляций и экономической рентабельностью.

Одним из ключевых этапов получения безопасной рекомбинантной белковой вакцины против SARS-CoV-2 является подбор адъюванта, усиливающего иммуногенность вакцины и обеспечивающего Th1-направленный или Th1/Th2-сбалансированный иммунный ответ (Jeyanathan *et al.*, 2020). В составе разработанных рекомбинантных белковых вакцин против SARS-CoV-2 были использованы адъюванты на основе соединений алюминия, CpG-олигодезоксинуклеотиды, адъюванты растительного происхождения и некоторые другие (Pollet *et al.*, 2021a). В последние годы многообещающей безопасной платформой для презентации антигенов и стимуляции иммунного ответа признаны адъюванты на основе структурно модифицированных вирусов растений (Кондакова *и др.*, 2022). К настоящему моменту применение подобного рода адъювантов в составе вакцин против бетакоронавирусных инфекций осуществлено не было.

За время пандемии COVID-19 появилось множество генетических вариантов SARS-CoV-2, что привело к снижению эффективности существующих вакцин (Flores-Vega *et al.*, 2022). В этой связи необходимо создание вакцины, устойчивой к эволюции вирусного генома. Особенно важно разрабатывать универсальную вакцину, которая позволила бы одновременно бороться как с генетическим разнообразием вариантов SARS-CoV-2, так и с другими бетакоронавирусами, в том числе с теми, которые потенциально могут перейти межвидовой барьер. Создание панели вакцин, полученных с использованием различных подходов, в том числе с применением вирусов растений в качестве платформы-адъюванта, представляется актуальной задачей, решение которой может помочь предотвратить новую угрозу жизни и здоровью населения.

Цель и задачи исследования.

Цель исследования заключалась в создании и характеристике кандидатной рекомбинантной белковой вакцины против бетакоронавируса SARS-CoV-2 на основе вирусов растений.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1) Провести анализ аминокислотной последовательности S-белка SARS-CoV-2 и отбор антигенных участков, осуществить дизайн и получение генетических конструкций

для экспрессии в бактериальных клетках *E. coli* рекомбинантных коронавирусных антигенов.

2) Получить рекомбинантные белки и изучить их антигенные свойства.

3) Получить и охарактеризовать платформу-адьювант – сферические частицы (СЧ) вируса табачной мозаики (ВТМ).

4) Создать композиции СЧ с коронавирусными антигенами, проанализировать данные композиции и получить их физико-химические характеристики, исследовать иммуногенность композиций на лабораторных животных, сравнить иммунный ответ на адьювант (СЧ) и на целевые антигены.

5) Проанализировать нейтрализующую активность сывороток крови, полученных после иммунизации лабораторных животных композициями СЧ с коронавирусными антигенами, против SARS-CoV-2 в клеточной культуре.

6) Исследовать протективность вакцинного кандидата, полученного на основе композиций СЧ с коронавирусными антигенами, в опытах *in vivo* на экспериментальной модели коронавирусной инфекции.

Объект исследования.

Объектами исследования являлись рекомбинантные коронавирусные антигены, содержащие эпитопы S-белка SARS-CoV-2 и других SARS-подобных бетакоронавирусов, а также их композиции с СЧ ВТМ, представляющие собой основу вакцинного кандидата.

Научная новизна исследования.

В настоящей работе были получены и охарактеризованы три оригинальных рекомбинантных коронавирусных антигена – Co1, PE и CoF. Впервые показано, что антигены Co1 и CoF, сконструированные на основе последовательности RBD варианта SARS-CoV-2 Ухань и экспрессированные в *E. coli*, эффективно реагируют с сыворотками крови людей, переболевших различными вариантами SARS-CoV-2. Также впервые продемонстрировано взаимодействие RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF, экспрессированных в бактериальных клетках, с рекомбинантным ангиотензинпревращающим ферментом 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2). Антигены Co1, PE и CoF были использованы для создания вакцинного кандидата против SARS-CoV-2. Впервые в качестве платформы для получения вакцинного кандидата против коронавируса применена платформа-адьювант на основе структурно модифицированного вируса растений – СЧ ВТМ. Были созданы и полностью охарактеризованы композиции СЧ с тремя коронавирусными антигенами (СЧ + 3АГ). На лабораторных животных проведены опыты по оценке иммуногенности данных композиций, подтвердившие иммуностимулирующие свойства СЧ. Впервые в настоящем

исследовании продемонстрировано, что СЧ позволяют сформировать Th1/Th2-сбалансированный иммунный ответ при иммунизации композициями СЧ + ЗАГ. Также впервые показано, что вакцинные композиции индуцируют выработку SARS-CoV-2-нейтрализующих антител и обеспечивают протективный эффект при экспериментальном заражении лабораторных животных (сирийских хомяков) вирусом SARS-CoV-2.

Теоретическая и практическая значимость.

Полученные результаты позволяют позиционировать композиции СЧ с тремя коронавирусными антигенами Co1, PE и CoF, экспрессированными в бактериальных клетках, как перспективный вакцинный кандидат против SARS-CoV-2. Рекомбинантные белки Co1 и CoF, созданные на основе RBD исходного варианта SARS-CoV-2 Ухань, потенциально могут служить антигенами в тест-системах для выявления других, в том числе вновь появляющихся, вариантов SARS-CoV-2. Следует отметить, что рекомбинантные антигены были получены в клетках *E. coli* – экспрессионной системе, которая имеет значительные преимущества для масштабирования процесса получения белков медицинского назначения, что важно при быстром распространении и/или изменении инфекций.

Полученные результаты представляют научный интерес для специалистов в области вирусологии и вакцинологии. Дальнейшая исследовательская работа может быть направлена на углубленное изучение механизмов действия адъюванта в составе созданных вакцинных композиций и типа иммунного ответа, индуцируемого данными композициями. Результаты, изложенные в диссертационной работе, могут быть использованы в образовательном процессе при чтении в МГУ имени М.В.Ломоносова курсов лекций по вирусологии.

Личный вклад автора.

Автор принимал непосредственное участие в работе с литературными данными, планировании и проведении экспериментальной части исследования, анализе и обработке полученных результатов. Автор внес вклад в подготовку научных публикаций по материалам диссертационной работы и представлял результаты исследований на конференциях. Автором написаны диссертация и автореферат к ней. Имена соавторов указаны в опубликованных работах. Участие соавторов отражено в тексте диссертации и автореферата. Вклад автора в представленную работу определяющий.

Методы и методология научного исследования.

В исследовании были применены современные методы генетической инженерии, биохимии, вирусологии, иммунохимии, микроскопии, методы работы с культурами клеток и с лабораторными животными, биоинформатические и статистические подходы.

Положения, выносимые на защиту.

1) Рекомбинантные антигены, содержащие эпитопы S-белка SARS-CoV-2 и других SARS-подобных бетакоронавирусов и полученные в бактериальных клетках, могут быть использованы в составе вакцинного кандидата против SARS-CoV-2.

2) Полученные антигены универсальны, они могут взаимодействовать с сыворотками крови людей, переболевших различными вариантами SARS-CoV-2, и служить компонентами вакцинного кандидата против ряда вариантов SARS-CoV-2.

3) Сферические частицы (СЧ) ВТМ способны проявлять свойства адьюванта и усиливать иммунный ответ на рекомбинантные коронавирусные антигены.

4) СЧ в качестве адьюванта индуцируют высокие титры антиген-специфических антител одновременно с низкими титрами адьювант-специфических антител при иммунизации композициями СЧ с коронавирусными антигенами.

5) Композиции СЧ с коронавирусными антигенами обладают способностью индуцировать выработку нейтрализующих антител против SARS-CoV-2.

6) Вакцинный кандидат на основе СЧ и коронавирусных антигенов обеспечивает протективный эффект в отношении SARS-CoV-2 на экспериментальной модели инфекции у сирийских хомяков.

Степень достоверности и результаты апробации.

Результаты были получены с применением актуальных методик и современного научного оборудования. Полученные данные были обработаны с привлечением методов статистического анализа. Результаты исследования опираются на экспериментальные данные, а также опубликованные в рецензируемых журналах литературные источники. По теме диссертационной работы опубликовано 4 статьи в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в Диссертационном совете МГУ по специальности 1.5.10 – Вирусология. Результаты диссертационной работы были представлены на 28-, 29- и 30-й Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2021, 2022, 2023), на международном онлайн-семинаре 5-ой Летней школы «5th Innovative Approaches for Identification of Antiviral Agents Summer School» (IAAASS) (Кальяри, Италия, 2021) и на 3-ем Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2022).

Структура и содержание работы.

Диссертационная работа состоит из введения, трех разделов (Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и обсуждение), заключения, выводов и списка литературы. Работа изложена на 159 страницах. Содержит 10 таблиц и 30 рисунков. Список цитируемой литературы включает 257 источников.

РЕЗУЛЬТАТЫ РАБОТЫ

1. Дизайн генетических конструкций и получение рекомбинантных антигенов

Одной из перспективных мишеней при создании вакцин против коронавирусной инфекции является рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain, RBD) S1-субъединицы шиповидного белка (spike, S) [Рис. 1 (А, Б)] (Robbiani *et al.*, 2020; Zost *et al.*, 2020). Поэтому в первую очередь при создании панели антигенов для будущего вакцинного кандидата была выбрана аминокислотная последовательность RBD вируса SARS-CoV-2 [319–541 а.о. в координатах референсной последовательности S-белка (Wuhan-Hu-1, YP_009724390.1) базы данных GenBank]. Рекомбинантный RBD-содержащий антиген был назван Co1 (Рис. 1В).

Проведенный нами анализ данных, полученных ранее для SARS-CoV, показал, что некоторые человеческие моноклональные антитела к участкам S2-субъединицы S-белка, в частности к гептадному повтору 1 (heptad repeat 1, HR1) и к гептадному повтору 2 (HR2), обеспечивают более широкий спектр защиты против различных изолятов SARS-CoV, чем моноклональные антитела к участкам S1-субъединицы, включая RBD (Lip *et al.*, 2006; Elshabrawy *et al.*, 2012). Поэтому в рамках данной работы было принято решение включить в состав панели антигенов рекомбинантные белки с высококонсервативными эпитопами, обладающими потенциальной возможностью индуцировать протективный иммунный ответ как против SARS-CoV-2, так и против SARS-CoV и, возможно, других SARS-подобных бетакоронавирусов.

На основе баз данных аминокислотных и нуклеотидных последовательностей UniProt и GenBank, а также литературных данных (Wang *et al.*, 2016; Ahmed *et al.*, 2020; Grifoni *et al.*, 2020) были отобраны консервативные участки, идентифицированные в пределах последовательности S2-субъединицы S-белка [Рис. 1 (А, Б)]: 950–1041 а.о. (включает фрагмент домена HR1) и 1157–1210 а.о. (домен HR2). Аминокислотные последовательности отобранных эпитопов S2-субъединицы совпадают (до 100% гомологии) у различных коронавирусов: SARS-CoV, SARS-CoV-2, коронавирусов некоторых видов летучих мышей родов *Rhinolophus* (включая коронавирус RaTG13) и *Chaerephon*, коронавирусов пальмовых цвет и панголинов.

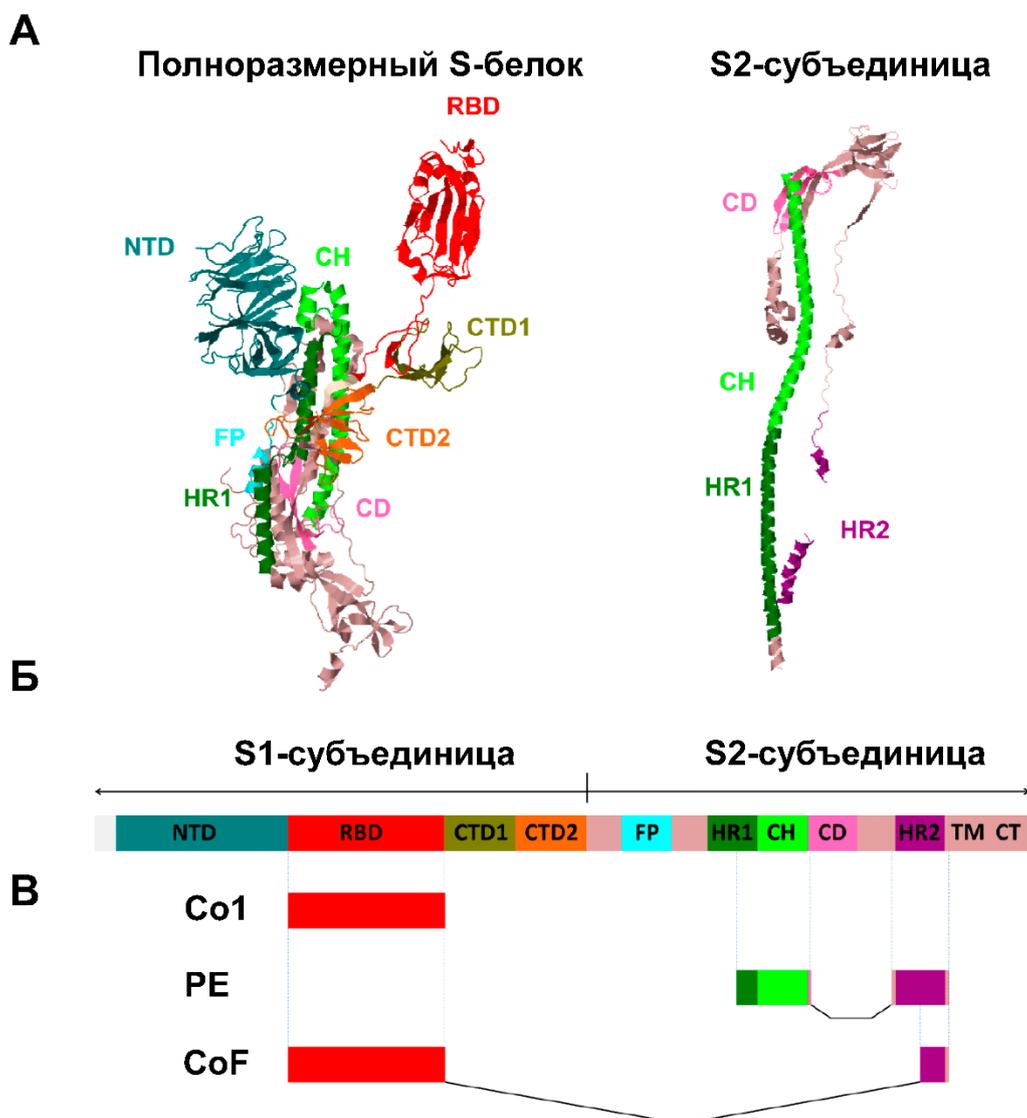


Рисунок 1. Структура шиповидного S-белка вируса SARS-CoV-2 и схематическое изображение рекомбинантных коронавирусных антигенов Co1, PE и CoF.

А. Структурная модель полноразмерного S-белка (код PDB: 6VSB) (Berman *et al.*, 2000; Wrapp *et al.*, 2020) и S2-субъединицы (код PDB: 6XRA) (Berman *et al.*, 2000; Cai *et al.*, 2020) вируса SARS-CoV-2. Изображения белковых структур созданы с помощью программного обеспечения Jmol (<http://www.jmol.org>).

Б. Линейная диаграмма доменной структуры полноразмерного S-белка вируса SARS-CoV-2 (не в масштабе). Цветовая кодировка в соответствии с рисунком 1А.

NTD: N-terminal domain, N-концевой домен; RBD: receptor-binding domain, рецептор-связывающий домен; CTD1, CTD2: C-terminal domain, C-концевые домены 1 и 2; FP: fusion peptide, пептид слияния; HR1, HR2: heptad repeat, гептадные повторы 1 и 2; CH: central helix, центральная спираль; CD: connector domain, коннекторный домен; TM: transmembrane domain, трансмембранный домен; CT: cytoplasmic tail, цитоплазматический хвост.

В. Схематическое изображение (не в масштабе) рекомбинантных коронавирусных антигенов Co1, PE и CoF.

Домены S-белка окрашены в соответствии с координатами, указанными в работе Sun *et al.*, 2021a.

Оба участка (950–1041 а.о. и 1157–1210 а.о.) также содержат предсказанные ранее В- и Т-клеточные эпитопы, которые частично перекрываются друг с другом (Ahmed *et al.*, 2020; Grifoni *et al.*, 2020). При выборе антигенных детерминант учитывали опубликованную информацию об эпитопах S-белка, антитела к которым могут вызывать такой неблагоприятный эффект как антителозависимое усиление инфекции (Wang *et al.*, 2016). На основе указанных высококонсервативных участков S2-субъединицы был сконструирован рекомбинантный полиэпитопный антиген, который получил название PE (Рис. 1В).

Выбранный участок 1157–1210 а.о. содержит эпитоп из 29 аминокислотных остатков **EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYI** (1182–1210 а.о. в координатах последовательности YP_009724390.1). Ранее Wang с соавторами (2016) показали, что в сыворотке крови пациентов, переболевших SARS, присутствуют антитела, специфически взаимодействующие с данным эпитопом. Антитела также связывались с вирусными частицами SARS-CoV и предотвращали инфекцию в клетках Vero E6 *in vitro* и у нечеловекообразных приматов (Wang *et al.*, 2016). Основываясь на этих данных, было принято решение сконструировать слитый белок, представляющий собой RBD вируса SARS-CoV-2, соединенный с консервативным эпитопом 1182–1210 а.о. из домена HR2. Рекомбинантный антиген был назван CoF (Рис. 1В).

На основе вектора pQE-30 были получены генетические конструкции для трех рекомбинантных антигенов (ЗАГ): Co1, PE и CoF. Рекомбинантные белки были экспрессированы в клетках *E. coli* и очищены с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии. Выход белков Co1, CoF и PE составил 8, 30 и 120 мг, соответственно, на 1 л питательной среды. Это свидетельствует о том, что клетки *E. coli* способны обеспечивать высокий выход целевых белков.

2. Характеристика рекомбинантных антигенов

2.1. Антигенные свойства рекомбинантных белков

Для исследования антигенных свойств рекомбинантных белков был использован вестерн-блот анализ (Рис. 2), параллельно с которым проводили электрофорез антигенов (Рис. 2А). Все три белка взаимодействовали с одним из вариантов коммерческих поликлональных антител к полноразмерному S-белку SARS-CoV или SARS-CoV-2. Антиген PE взаимодействовал с антителами к S-белку SARS-CoV (Рис. 2Б). Антигены Co1 и CoF реагировали с антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 2В).

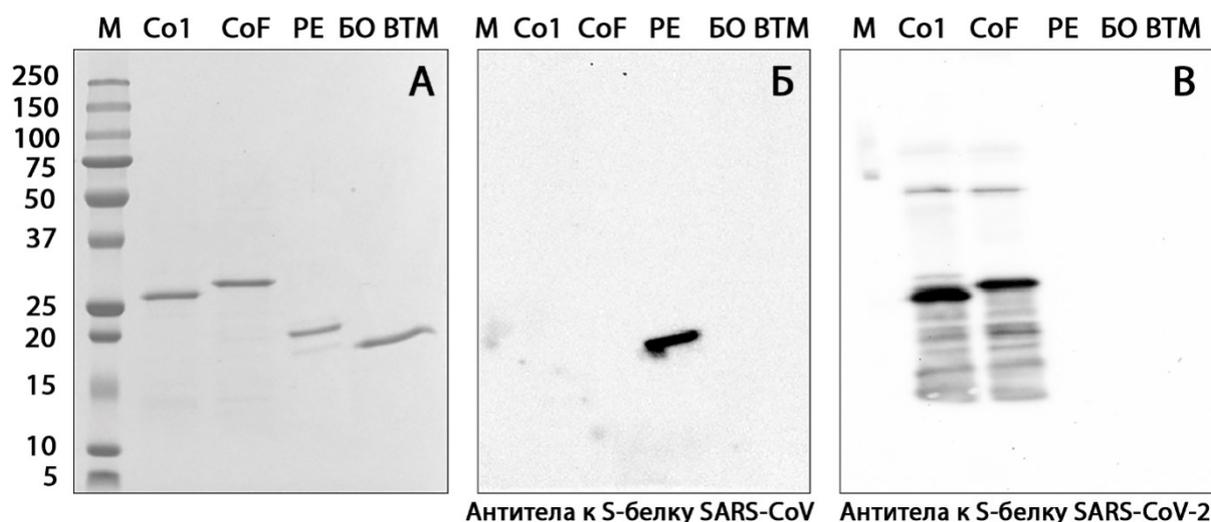


Рисунок 2. Взаимодействие очищенных рекомбинантных антигенов Co1, CoF и PE с коммерческими поликлональными антителами к полноразмерному S-белку различных бетакоронавирусов.

А. Электрофоретический анализ белков в градиентном ДСН-ПААГ (8–20%). Гель окрашен Кумасси G-250.

Б. Вестерн-блот анализ с поликлональными антителами к S-белку вируса SARS-CoV.

В. Вестерн-блот анализ с поликлональными антителами к S-белку вируса SARS-CoV-2.

М – маркеры молекулярной массы белков, слева указаны значения в кДа (5–250); **БО BTM** – белок оболочки вируса табачной мозаики (отрицательный контроль).

Использовали вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Как видно из рисунка 2, антиген Co1 реагировал с антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 2В), но не реагировал с антителами к S-белку SARS-CoV (Рис. 2Б). Несмотря на то, что аминокислотные последовательности RBD вирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV имеют 75% гомологии (Huang *et al.*, 2020), такой результат был предсказуем. Ранее уже было показано, что сыворотки крови пациентов, переболевших SARS, не способны эффективно нейтрализовать псевдовиральные частицы SARS-CoV-2 (Ou *et al.*, 2020).

Антиген CoF реагировал только с антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 2В), а PE – только с антителами к S-белку SARS-CoV (Рис. 2Б). Трудно было предвидеть отсутствие взаимодействия антигенов CoF и PE одновременно с обоими вариантами антител, поскольку в состав данных антигенов входят эпитопы S2-субъединицы, высококонсервативные для SARS-CoV и SARS-CoV-2.

Можно предположить, что отсутствие реакции антигена CoF с коммерческими поликлональными антителами к рекомбинантному полноразмерному S-белку SARS-CoV (Рис. 2Б) связано с небольшим размером консервативного эпитопа из домена HR2, входящего в состав антигена CoF.

Неожиданным оказался тот факт, что полиэпитопный антиген PE не реагировал с антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 2В). Принципиально важно отметить, что панель коронавирусных антигенов была разработана в самом начале пандемии COVID-19, и

анализ антигенных свойств рекомбинантных белков проводили с коммерческими антителами, которые были доступны в первой половине 2020 г. Вероятно, отсутствие взаимодействия антигена PE с антителами к S-белку SARS-CoV-2 может быть связано с качеством коммерческого препарата, который был получен в крайне сжатые сроки в связи с остротой ситуации и быстрым распространением инфекции. Тем не менее, поскольку консервативные эпитопы S2-субъединицы могут быть потенциальной мишенью при разработке терапевтических средств и вакцинных препаратов (Wang *et al.*, 2016; Shah *et al.*, 2021), белки CoF и PE, наряду с Co1, были включены в панель антигенов для будущего вакцинного кандидата. Дальнейшие результаты, на наш взгляд, подтвердили правильность этого решения.

2.2. Взаимодействие RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF с рекомбинантным рецептором ACE2 и с сыворотками крови людей, переболевших COVID-19

Было показано, что RBD-содержащие антигены Co1 и CoF связываются с рекомбинантным ангиотензинпревращающим ферментом 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) – клеточным рецептором, взаимодействующим с вирионами SARS-CoV и SARS-CoV-2.

Поскольку антигены на основе RBD часто служат компонентами различных тест-систем для выявления специфических антител, было решено проверить, будут ли взаимодействовать антигены Co1 и CoF с сыворотками крови людей, иммунными к SARS-CoV-2. Результаты твердофазного ИФА показали, что антигены Co1 и CoF эффективно реагируют с этими сыворотками [Рис. 3 (А, Б)]. Полученные значения титров антител коррелировали с международными единицами определения антител BAU/мл (binding antibody units) [Рис. 3 (В, Г)]. Для построения корреляции использовали значения BAU/ml, определенные с помощью тест-систем «ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG II Quant» (Abbott, США) и «Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S» (Roche Diagnostics, Швейцария).

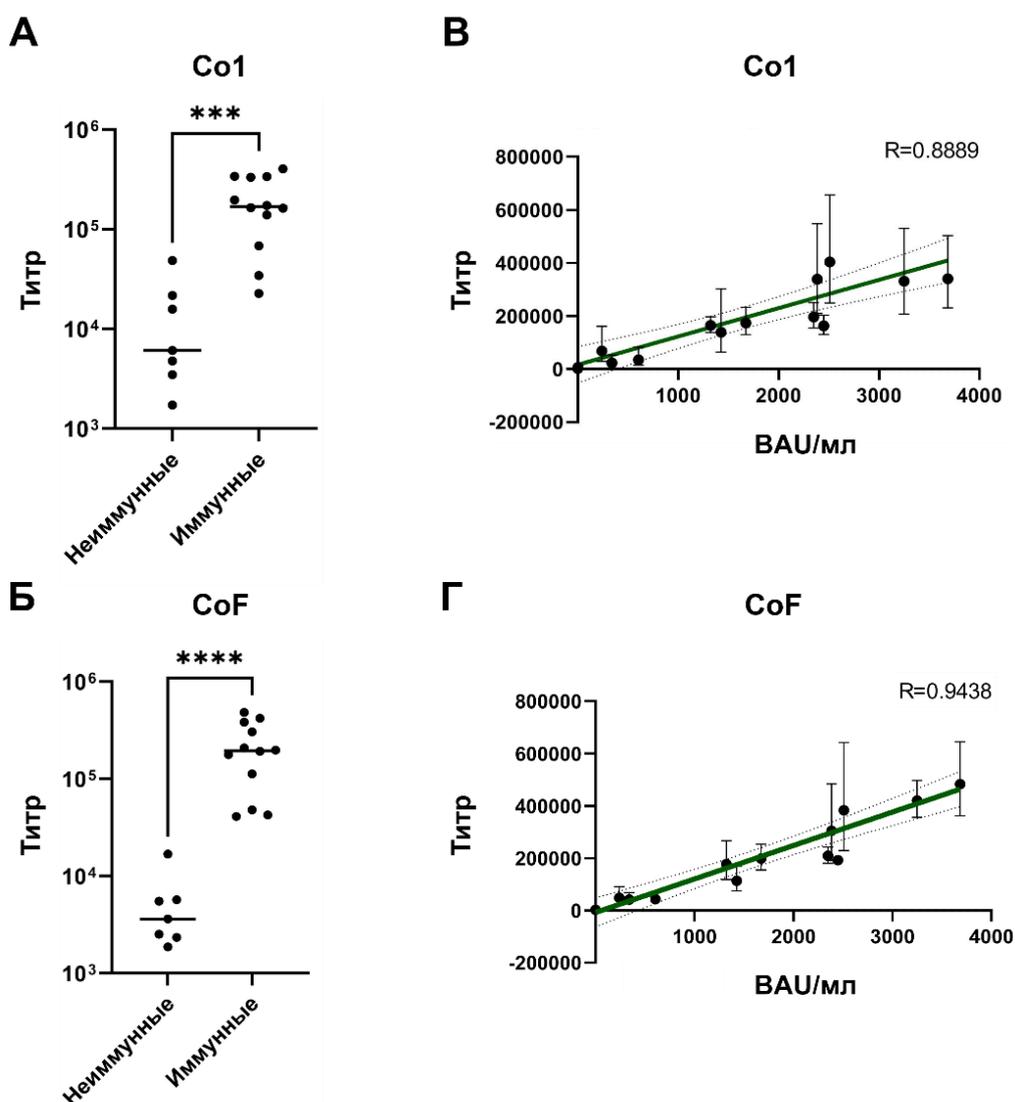


Рисунок 3. Взаимодействие RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF с иммунными к SARS-CoV-2 сыворотками крови людей.

А. Титры антител к антигену Co1. **Б.** Титры антител к антигену CoF.

В. Корреляция ВАУ/мл и титров антител к антигену Co1.

Г. Корреляция ВАУ/мл и титров антител к антигену CoF.

Титры антител определяли методом непрямого твердофазного ИФА. Концентрация антигена на планшете – 10 мкг/мл для обоих антигенов. P-value рассчитывали, используя U-критерий Манна-Уитни. *** $P < 0,001$; **** $P < 0,0001$. Для оценки корреляционной связи использовали коэффициент корреляции Пирсона (R). ● титр антител, — медианы титров антител. ВАУ, binding antibody units (единицы связывающих антител).

В следующей серии экспериментов была изучена эффективность взаимодействия RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF с сыворотками крови людей, у которых диагноз COVID-19 был подтвержден методом ОТ-ПЦР, при этом пациенты были дифференцированы по конкретным перенесенным вариантам SARS-CoV-2 – Ухань, Дельта или Омикрон (Рис. 4). В случае обоих антигенов, сконструированных на основе RBD варианта Ухань, титры антител в сыворотках крови пациентов, переболевших

различными вариантами SARS-CoV-2, достоверно отличались от титров антител в неиммунных сыворотках (Рис. 4).

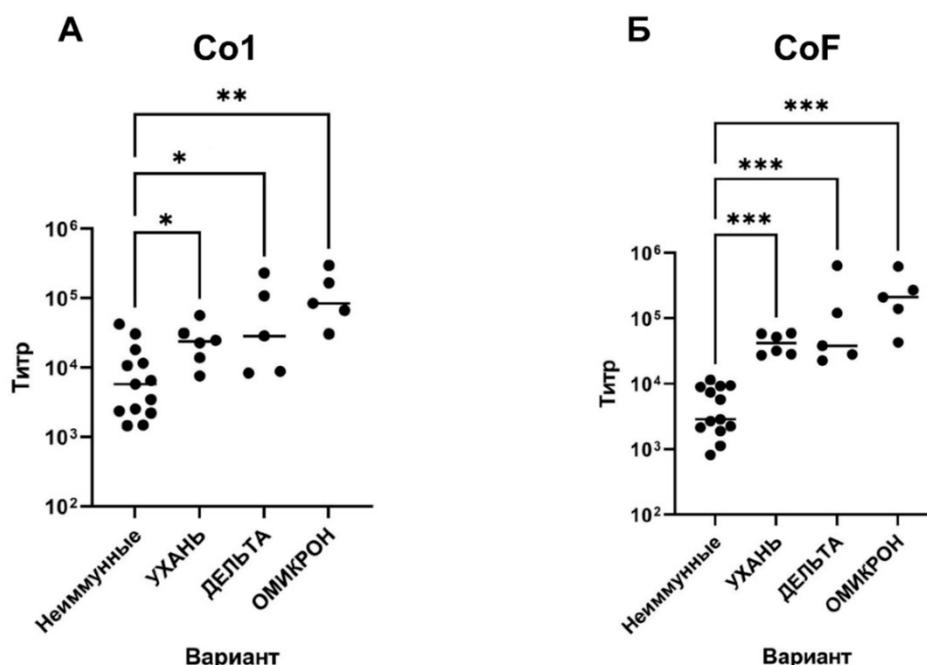


Рисунок 4. Титры антител к RBD-содержащим антигенам Co1 и CoF в сыворотках крови людей, переболевших разными вариантами вируса SARS-CoV-2.

А. Титры антител к антигену Co1. **Б.** Титры антител к антигену CoF.

Титры антител определяли методом непрямого ИФА. Концентрация антигена на планшете – 10 мкг/мл для обоих антигенов. P-value рассчитывали, используя U-критерий Манна-Уитни с поправкой Холма-Бонферрони. * P < 0,05; ** P < 0,01; *** P < 0,001. ● титр антител, — медианы титров антител.

В совокупности результаты данного раздела работы свидетельствуют о том, что экспрессированные в бактериальных клетках *E. coli* антигены Co1, PE и CoF могут быть применены для создания вакцинного кандидата против SARS-CoV-2. Кроме того, антигены Co1 и CoF на основе RBD варианта Ухань могут быть использованы в тест-системах для выявления антител в сыворотках крови людей, переболевших COVID-19, при этом, по-видимому, возможно детектировать антитела в сыворотках крови пациентов, которые были инфицированы разными вариантами SARS-CoV-2.

3. Получение и характеристика композиций СЧ ВТМ с тремя рекомбинантными коронавирусными антигенами (СЧ + 3АГ)

В качестве адъюванта и платформы для адсорбции трех рекомбинантных коронавирусных антигенов Co1, PE и CoF (3АГ) были выбраны структурно модифицированные частицы (СЧ) вируса табачной мозаики (ВТМ). В состав композиций СЧ + 3АГ входило по 7 мкг каждого рекомбинантного антигена (суммарная доза 21 мкг) и 250 мкг СЧ. Композиции СЧ + 3АГ были проанализированы методом непрямого иммунофлуоресцентной микроскопии (Рис. 5).

Композиции СЧ + ЗАГ

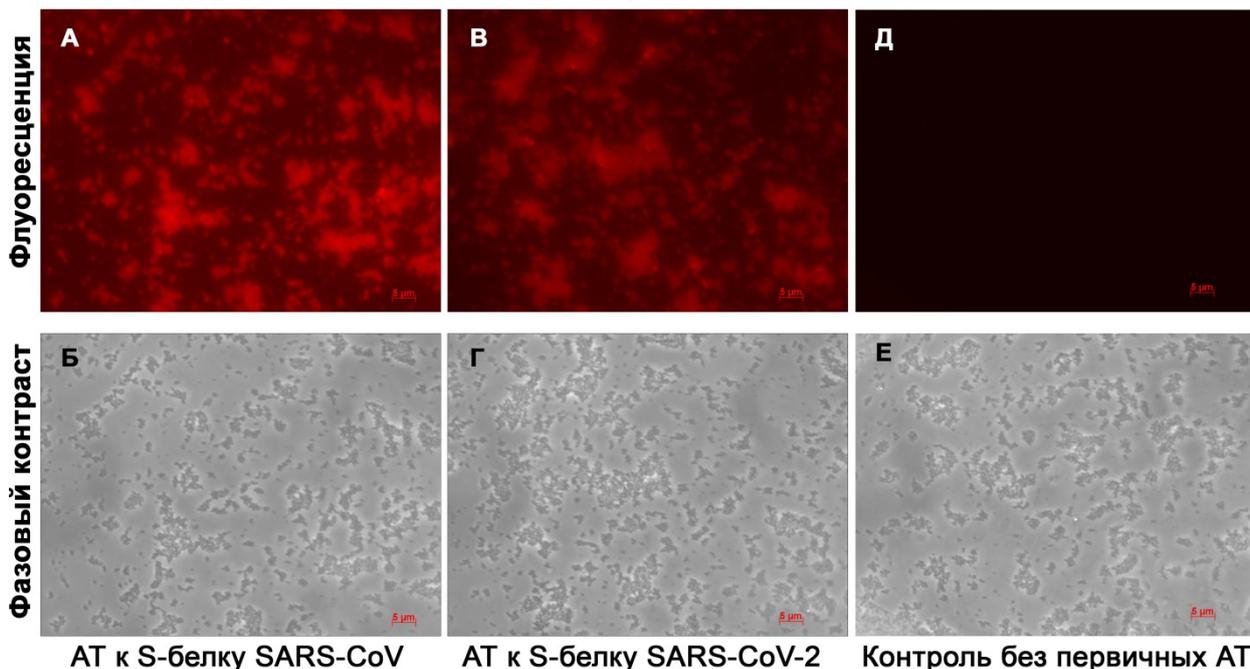


Рисунок 5. Иммунофлуоресцентный анализ композиций СЧ + ЗАГ.

А, Б. Композиции СЧ + ЗАГ, обработанные коммерческими поликлональными антителами к S-белку вируса SARS-CoV.

В, Г. Композиции СЧ + ЗАГ, обработанные коммерческими поликлональными антителами к S-белку вируса SARS-CoV-2.

Д, Е. Композиции СЧ + ЗАГ, обработанные только вторичными антителами (контрольный препарат).

А, В, Д. Режим флуоресценции. **Б, Г, Е.** Режим фазового контраста.

Использовали вторичные антитела (против IgG кролика), конъюгированные с Alexa Fluor® 546. Композиции СЧ + ЗАГ были получены в PBS. АТ, антитела. Масштабная метка, 5 мкм.

Наличие красного флуоресцентного сигнала, детектируемого на поверхности СЧ, указывает на то, что адсорбированные на СЧ белки сохраняют свою антигенную специфичность в составе полученных композиций. Точное соответствие положения СЧ, наблюдаемых в режиме флуоресценции [Рис. 5 (А, В)] и фазового контраста [Рис. 5 (Б, Г)], подтверждает, что все СЧ покрыты антигенами, т.е. подтверждает факт формирования композиций как минимум с одним из антигенов. Отсутствие флуоресцентного сигнала в контрольном препарате (Рис. 5Д) свидетельствует о специфичности взаимодействия.

Распознавание антигенов на поверхности СЧ как антителами к S-белку SARS-CoV (Рис. 5А), так и антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 5В) позволяет предположить, что композиции СЧ + ЗАГ будут способны индуцировать иммунный ответ на оба бетакоронавируса.

4. Изучение иммуногенности композиций СЧ + ЗАГ

Способность композиций СЧ + ЗАГ индуцировать выработку антител против коронавирусных антигенов Co1, PE и CoF была исследована на лабораторных животных.

Для этого белых аутбредных мышей иммунизировали внутривенно двукратно с интервалом в две недели (Рис. 6А). Группам мышей вводили либо 21 мкг коронавирусных антигенов [по 7 мкг каждого антигена (группа 2)], либо 21 мкг коронавирусных антигенов в композициях с 250 мкг СЧ (группа 3). Все препараты вводили в PBS (общий объем 0,2 мл). Контрольной группе (группа 1) вводили только 0,2 мл PBS. Через две недели после второй иммунизации осуществляли забор крови у мышей для определения уровней антител к антигенам Co1 (Рис. 6Б), PE (Рис. 6В) и CoF (Рис. 6Г). С помощью непрямого ИФА определяли уровни общих IgG, а также антител изотипов IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3.

Иммунный ответ на антиген Co1 (соответствующий RBD) оказался довольно низким как в случае иммунизации совместно с СЧ, так и без них (Рис. 6Б). О низкой иммуногенности рекомбинантного RBD известно и из других исследований (Yang *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2021). В то же время СЧ значительно усиливали иммунный ответ на антигены PE (Рис. 6В) и CoF (Рис. 6Г) в сравнении с иммунным ответом, индуцированным смесью индивидуальных антигенов без СЧ. Усиление иммуногенности при добавлении СЧ к антигенам PE и CoF также было продемонстрировано для титров каждого из отдельных изотипов – IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3 [Рис. 6 (В, Г)].

При применении вакцины против SARS-CoV-2 важно не допустить развитие Th2-поляризованного ответа, с которым может быть связано развитие легочных иммунопатологий (Tregoning *et al.*, 2020). У мышей на преобладающую активацию Th2-ответа указывают более высокие уровни IgG1 по сравнению с IgG2a (Mountford *et al.*, 1994). При иммунизации мышей композициями СЧ + 3АГ соотношение титров IgG2a/IgG1 для антигена PE составило 1, а для антигена CoF – 2,4, что может свидетельствовать о способности СЧ обеспечивать Th1/Th2-сбалансированную стимуляцию иммунного ответа. Эти результаты позволяют с определенной долей уверенности предположить, что СЧ могут быть эффективным адъювантом для коронавирусных антигенов.

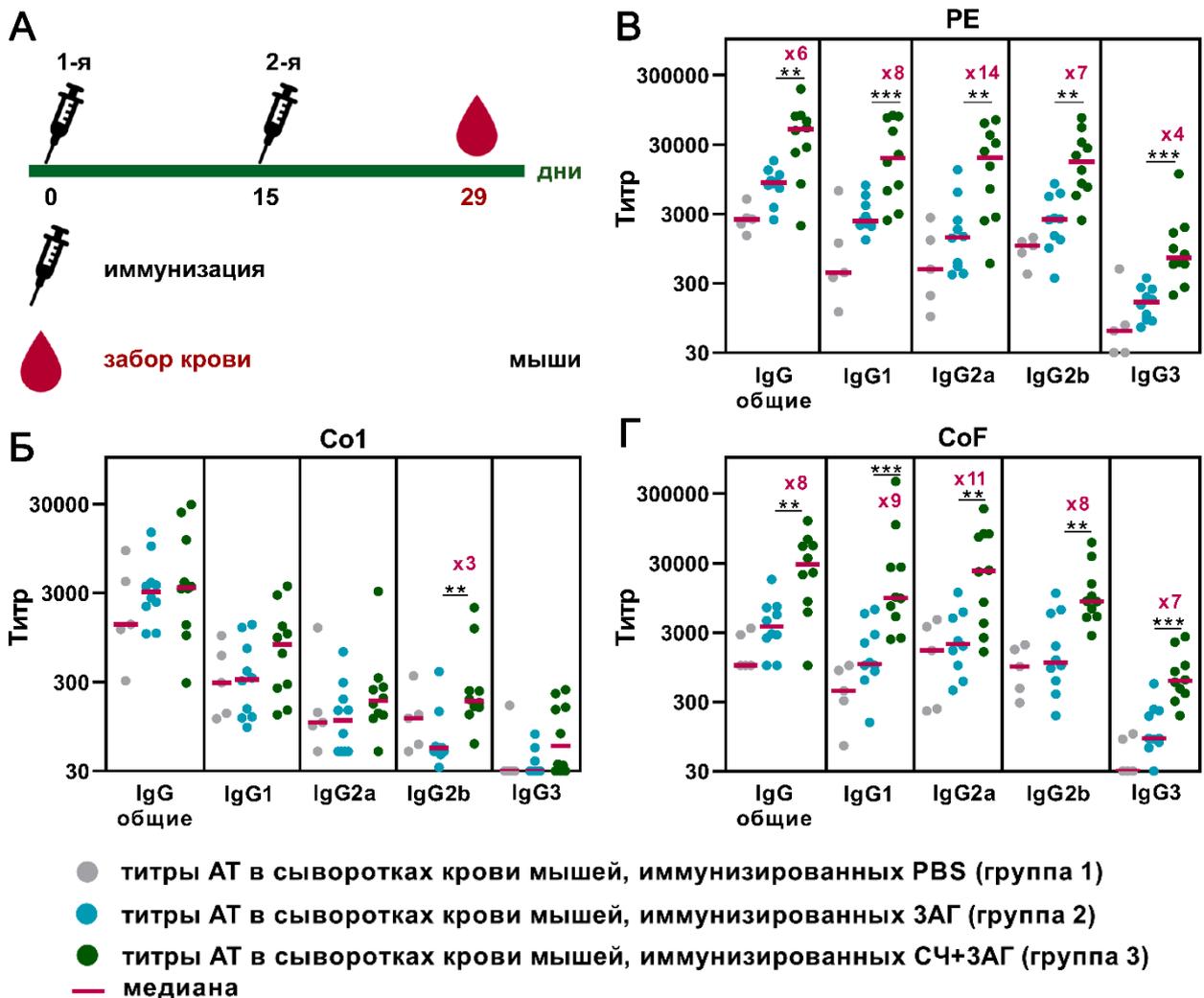


Рисунок 6. Иммуногенность композиций СЧ + 3АГ.

А. Схема иммунизации лабораторных животных. **Б.** Титры антител к антигену Co1.

В. Титры антител к антигену PE. **Г.** Титры антител к антигену CoF.

Титры антител в сыворотках крови мышей оценивали с помощью непрямого ИФА через две недели после второй иммунизации композициями СЧ + 3АГ, либо 3АГ в отсутствие СЧ, либо PBS. Концентрация антигена на планшете – 10 мкг/мл для всех антигенов. P-value рассчитывали с использованием U-критерия Манна-Уитни. **P < 0,01; ***P < 0,001.

5. Сравнительный анализ иммунного ответа на СЧ ВТМ и на коронавирусные антигены

Поскольку белок СЧ является чужеродным белковым антигеном для млекопитающих, при иммунизации композициями СЧ + 3АГ можно было ожидать индукцию антител к СЧ. С помощью непрямого ИФА были проанализированы титры общих IgG к СЧ в сыворотках, полученных после второй иммунизации мышей композициями СЧ + 3АГ. Было проведено сравнение титров общих IgG, специфичных к СЧ и к каждому из коронавирусных антигенов (Рис. 7). Титры антител к антигену Co1 были низкими и оказались сопоставимы с титрами к СЧ. Титры общих IgG к целевым антигенам PE и CoF были в 16 и в 9 раз, соответственно, выше, чем к СЧ (Рис. 7).

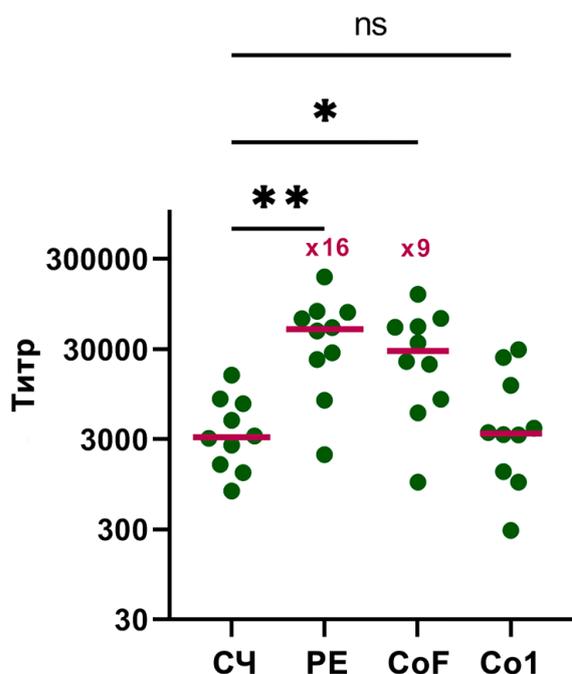


Рисунок 7. Сравнительный анализ иммунного ответа на СЧ и на коронавирусные антигены. Группу мышей (группа 3) иммунизировали внутривенно двукратно композициями СЧ + ЗАГ. Титры антител в сыворотках крови, полученных через две недели после второй иммунизации, оценивали с помощью непрямого ИФА. Концентрация СЧ и коронавирусных антигенов на планшете – 10 мкг/мл. P-value рассчитывали с использованием критерия Краскела-Уоллиса (P-value 0,0012) с последующим тестом Данна. *P < 0,05; **P < 0,01; ns, not significant, статистически значимого различия между группами нет. ● титр антител, — медианы титров антител.

Изучение соотношения титров антител, вырабатываемых к платформе-адъюванту и к целевому антигену, является важным аспектом исследования эффективности рекомбинантных белковых вакцин. Ранее в некоторых исследованиях сообщалось, что титры антител, специфичных к другим адъювантам белковой природы, были выше или примерно сопоставимы с титрами антител к целевым антигенам (Ma *et al.*, 2020; Walls *et al.*, 2020). Показано, что при иммунизации композициями СЧ + ЗАГ иммунный ответ вырабатывается преимущественно на ЗАГ, а не на платформу-адъювант (титры антител к антигенам CoF и PE превышали титры к СЧ в 9 и в 16 раз, соответственно). В этой связи, уникальное свойство СЧ индуцировать высокие титры антиген-специфических антител одновременно с низкими титрами адъювант-специфических антител является обнадеживающим показателем их эффективности.

6. Исследование вируснейтрализующей активности сывороток крови иммунизированных животных

На следующем этапе была оценена вируснейтрализующая активность сывороток крови животных, иммунизированных композициями СЧ + ЗАГ. Самок сирийских хомяков иммунизировали внутримышечно композициями СЧ + ЗАГ (250 мкг СЧ и по 7 мкг каждого антигена в 0,5 мл PBS на особь) двукратно с интервалом в три недели (Рис. 8А). Через три недели после второй иммунизации у хомяков отбирали кровь с целью дальнейшего тестирования образцов сывороток на наличие вируснейтрализующей активности.

Вируснейтрализующую активность сывороток оценивали с использованием нативного вируса SARS-CoV-2 на клетках Vero E6. Определяли обратное разведение сыворотки, необходимое для ингибирования цитопатогенного действия вируса на 50% (50% нейтрализующий титр, NT₅₀). Эксперименты проводили совместно с сотрудниками ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России. Было показано, что образцы сывороток крови иммунизированных хомяков проявляют вируснейтрализующую активность со значениями NT₅₀ от 18 до 87 (Рис. 8Б).

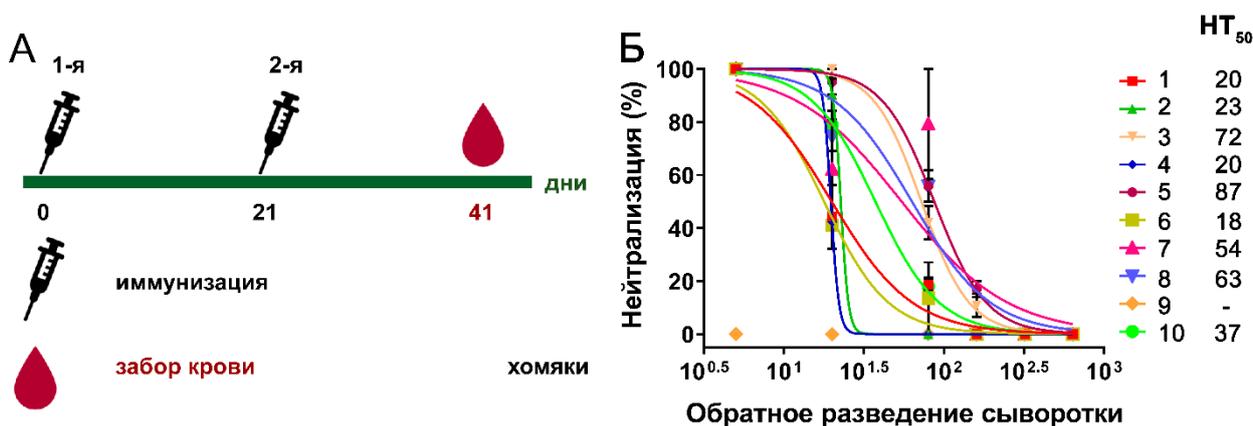


Рисунок 8. Вируснейтрализующая активность сывороток крови животных, иммунизированных композициями СЧ + ЗАГ.

А. Схема иммунизации лабораторных животных.

Б. Дозозависимые кривые ингибирования цитопатического эффекта SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6 под действием различных разведений исследуемых сывороток. Приведены значения NT₅₀ (50% нейтрализующий титр) для каждого исследуемого образца. Данные представляют собой средние значения трех технических повторов. Планки погрешности показаны в виде стандартной ошибки среднего. Цифры (1–10) обозначают отдельные сыворотки. Эксперименты проводили совместно с сотрудниками ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

7. Протективность и безопасность вакцинного кандидата в отношении вируса SARS-CoV-2 на модели инфекции у сирийских хомяков

Для исследования протективности композиций СЧ + ЗАГ при экспериментально вызванной форме COVID-19 у лабораторных животных (сирийских хомяков) было получено два вакцинных кандидата на основе СЧ + ЗАГ, различающиеся по суммарному количеству рекомбинантных коронавируса белков. Они получили названия MSU-CoV-4 (45 мкг трех антигенов) и MSU-CoV-5 (60 мкг трех антигенов). Количество СЧ в препаратах осталось то же, что и в предыдущих экспериментах (250 мкг).

Было сформировано пять экспериментальных групп животных (в каждой по 20 особей). Иммунизацию и заражение животных проводили на базе ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Дизайн эксперимента представлен на рисунке 9.



Рисунок 9. Схема исследования протективности вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5 на модели инфекции SARS-CoV-2 у сирийских хомяков. Вакцинные кандидаты были получены путем смешивания рекомбинантных антигенов и СЧ в PBS.

Группы 1 и 2 были иммунизированы вакцинными кандидатами MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5, соответственно. Группе 3 (плацебо) вводили PBS. Препараты животным групп 1–3 вводили в 1-й и 22-й дни эксперимента внутримышечно, в объеме 0,5 мл/особь. Животные, иммунизированные препаратами MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5, на протяжении всего срока иммунизации соответствовали показателям физиологической нормы, потери массы тела не наблюдали, что позволяет сделать вывод о безопасности вакцинных кандидатов. В 43-й день эксперимента животных инфицировали интраназально вирусом SARS-CoV-2 (вариант Ухань) в дозе 5,0 lg БОЕ. В группе 4 (контроль дозы инфицирования) заражение хомяков вирусом SARS-CoV-2 проводили без предварительной иммунизации. В группе 5 (интактные животные) манипуляции иммунизации и заражения с животными не проводили. После инфицирования из каждой группы (группы 1–4) были отобраны 18 особей, из группы 5 (интактные животные) – 9 особей. В 46-й день эксперимента в группах 1–4 была проведена эвтаназия девяти животных (в группе 5 – трех животных). В 49-й день эксперимента в группах 1–4 были умерщвлены оставшиеся девять животных (в группе 5 – оставшиеся шесть животных).

Протективность вакцинных кандидатов исследовали, анализируя гистологические изменения в легких вакцинированных хомяков после заражения SARS-CoV-2. Гистологическое исследование проводили на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Гистологические препараты оценивали по признакам воспаления легких, классифицируя микроскопическое повреждение на три типа: минимальное, умеренное и тяжелое. На шестой день после заражения хомяков вирусом SARS-CoV-2 в группе 4 (контроль дозы инфицирования) у семи животных были обнаружены признаки умеренного повреждения легких, при этом в группе, вакцинированной препаратом MSU-CoV-5 (группа 2), повреждения такой же степени тяжести были выявлены только у трех особей. В группе, которой вводили плацебо (группа 3), на шестые сутки после инфицирования SARS-CoV-2 четыре особи демонстрировали признаки тяжелой легочной патологии, в группе MSU-CoV-5 таких животных выявлено

не было (Рис. 10). Изображения легких хомячков на шестой день после заражения SARS-CoV-2 представлены на рисунке 11.

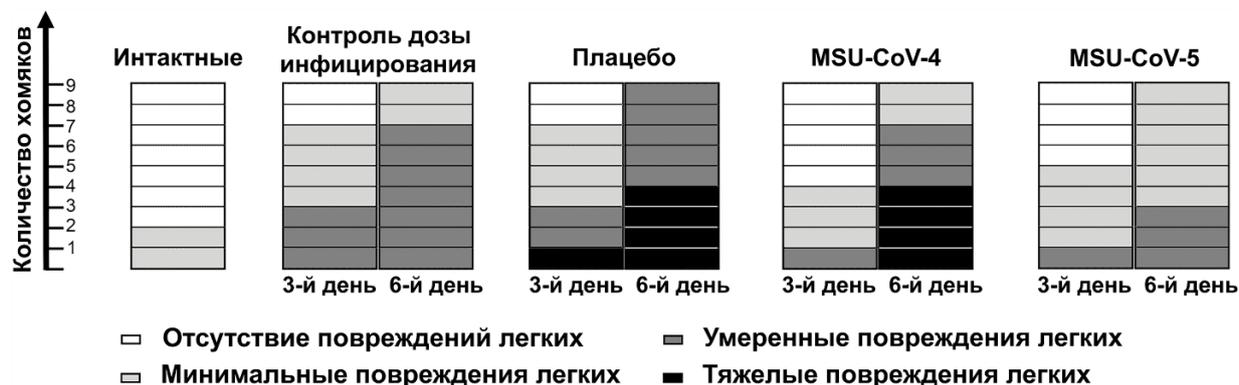


Рисунок 10. Количество хомячков в каждой группе с отсутствием повреждений легких, минимальной, умеренной или тяжелой легочной патологией, оцененной по признакам воспаления легких. Анализ степени выраженности воспаления легких проводили для двух временных точек исследования: третий день и шестой день после заражения вирусом SARS-CoV-2. MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5 – группы животных, иммунизированных соответствующими вакцинными кандидатами; плацебо – группа животных, которым вводили PBS; контроль дозы инфицирования – группа животных, зараженных вирусом без предварительной иммунизации; интактные – группа животных, не подвергавшихся процедурам иммунизации и заражения.

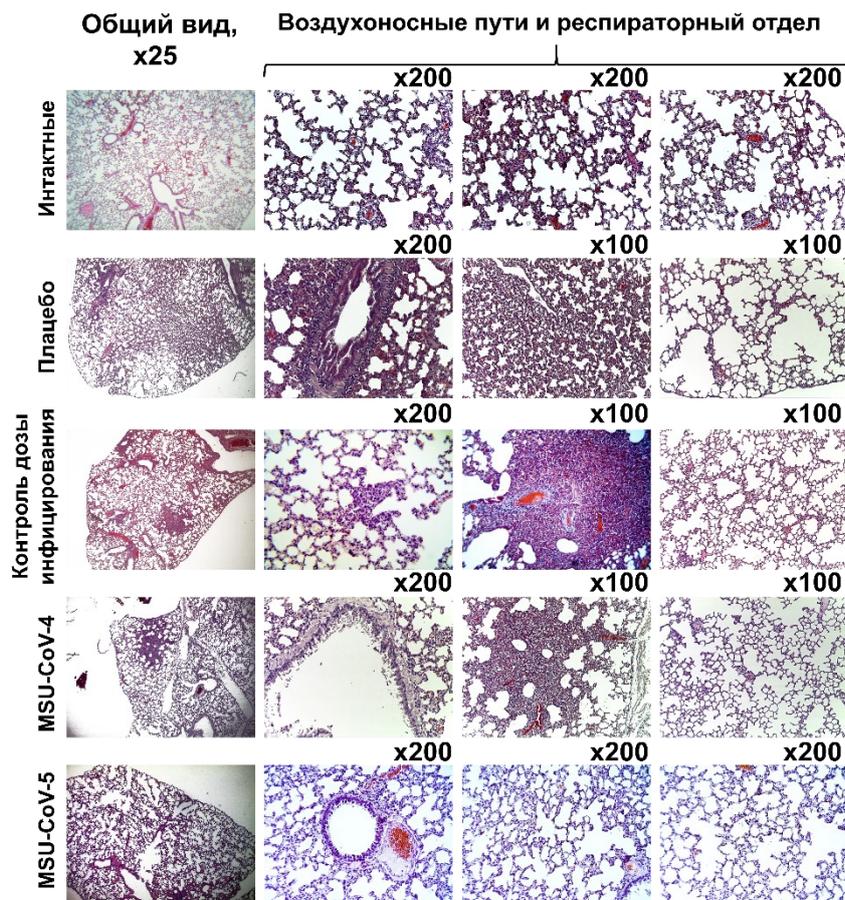


Рисунок 11. Изображения легких сирийских хомячков на шестой день после заражения вирусом SARS-CoV-2. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличения x25, x100 и x200. Гистологическое исследование проводили на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России.

Таким образом, при анализе изменений в легких после вакцинирования была отмечена положительная динамика на фоне введения препарата MSU-CoV-5 на шестой день после инфицирования SARS-CoV-2 в сравнении с аналогичными группами отрицательного контроля (контроль дозы инфицирования и плацебо). Вакцинный кандидат MSU-CoV-5 обеспечивал протективный эффект, а именно отсутствие или слабую выраженность бронхоинтерстициальной и/или диффузной интерстициальной пневмонии легких, вызванной вирусной инфекцией SARS-CoV-2. В свою очередь, действие препарата MSU-CoV-4 демонстрировало меньший эффект, признаки бронхоинтерстициальной и/или диффузной интерстициальной пневмонии легких были более выражены, чем в группе сирийских хомяков, вакцинированных MSU-CoV-5. Вероятно, это связано с уменьшенным количеством антигенов в препарате MSU-CoV-4 (45 мкг) по сравнению с MSU-CoV-5 (60 мкг). Известно, что при снижении дозы антигена вакцинный препарат может обеспечивать лишь частичную защиту от повреждения легких, вызванного SARS-CoV-2 (DeMarco *et al.*, 2021).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании был впервые получен и охарактеризован вакцинный кандидат против бетакоронавируса SARS-CoV-2 на основе структурно модифицированных частиц вируса растения и рекомбинантных коронавирусных антигенов. Для дизайна антигенов были выбраны участки основного антигена коронавирусов – шиповидного S-белка: рецептор-связывающий домен (RBD), входящий в состав S1-субъединицы, и последовательности S2-субъединицы, высококонсервативные среди SARS-подобных бетакоронавирусов. Получены генетические конструкции для экспрессии в бактериальных клетках *E. coli* трех рекомбинантных антигенов:

- 1) Co1 – содержит последовательность RBD S-белка SARS-CoV-2 (вариант Ухань);
- 2) PE – полиэпитопный белок, содержит антигенные участки S2-субъединицы S-белка, высококонсервативные среди SARS-CoV-2, SARS-CoV и других SARS-подобных бетакоронавирусов;
- 3) CoF – слитый белок, содержит последовательность RBD вируса SARS-CoV-2 (вариант Ухань) и высококонсервативный эпитоп S2-субъединицы.

Рекомбинантные белки экспрессированы в клетках *E. coli*, выделены и очищены. Методом вестерн-блот анализа подтверждено, что полученные антигены реагируют с коммерческими поликлональными антителами к полноразмерному S-белку бетакоронавирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV. Впервые установлено, что RBD-содержащие антигены Co1 и CoF способны взаимодействовать с ACE2 (клеточный

рецептор, обеспечивающий проникновение вирионов SARS-CoV-2 и SARS-CoV). Также показано, что антигены Co1 и CoF эффективно реагируют с иммунными сыворотками крови людей, при этом значения титров антител коррелируют с международными единицами измерения антител ВАУ/мл. Более того, антигены Co1 и CoF, сконструированные на основе RBD варианта Ухань, взаимодействуют с сыворотками крови людей, переболевших не только исходным первым вариантом SARS-CoV-2, но также вариантами Дельта и Омикрон. Важно подчеркнуть, что антигены были получены в бактериальной системе экспрессии в отсутствие гликозилирования рекомбинантных белков, осуществляемого в эукариотических клетках. Наши результаты показывают, что RBD-содержащие антигены Co1 и CoF могут быть применены в качестве антигенов в диагностических тест-системах для выявления COVID-19, наряду с коммерческими антигенами, получаемыми преимущественно в клетках млекопитающих. Успешная экспрессия антигенов в клетках *E. coli*, продемонстрированная в настоящем исследовании, представляет собой масштабируемый, эффективный и рентабельный подход к производству вакцинных антигенов.

Антигены Co1, PE и CoF были использованы для создания вакцинных композиций, состоящих из трех рекомбинантных коронавируса антигенов (ЗАГ) и платформы-адьюванта СЧ ВТМ, представляющей собой структурно модифицированные сферические частицы вируса табачной мозаики. Методом иммунофлуоресцентной микроскопии с использованием коммерческих поликлональных антител к S-белку бетакоронавирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV было подтверждено получение композиций СЧ + ЗАГ. Тестирование иммуногенности этих композиций на животной модели (мышь) впервые показало, что СЧ усиливают иммунный ответ на коронавируса антигены PE и CoF. При этом титры общих IgG к PE и к CoF были в 16 и в 9 раз выше, чем к платформе-адьюванту СЧ, соответственно. В работе впервые была продемонстрирована способность СЧ обеспечивать Th1/Th2-сбалансированную стимуляцию иммунного ответа при иммунизации композициями СЧ + ЗАГ. Эти результаты подтверждают возможность использования СЧ в качестве адьюванта для вакцинного кандидата. Также впервые была продемонстрирована нейтрализующая активность образцов сывороток крови сирийских хомяков, иммунизированных композициями СЧ + ЗАГ, в отношении SARS-CoV-2 в культуре клеток.

На основе композиций СЧ + ЗАГ были получены два вакцинных кандидата против SARS-CoV-2 – MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5, различающиеся количеством коронавируса антигенов. Была проведена оценка безопасности и протективности вакцинных кандидатов в отношении экспериментальной формы COVID-19 у сирийских хомяков в опытах *in vivo*.

Показано, что применение обоих вакцинных кандидатов безопасно для хомяков: животные на протяжении всего срока наблюдения соответствовали показателям физиологической нормы, также не было отмечено потери массы тела. Гистологическое исследование легких инфицированных SARS-CoV-2 животных показало, что вакцинный кандидат MSU-CoV-5 обеспечивает более выраженный в сравнении с MSU-CoV-4 протективный эффект, проявляющийся в отсутствии или слабой выраженности бронхоинтерстициальной и/или диффузной интерстициальной пневмонии легких, вызванной вирусной инфекцией.

Таким образом, полученные композиции СЧ + 3АГ можно считать перспективным вакцинным кандидатом против SARS-CoV-2. При этом, поскольку панель антигенов включает высококонсервативные среди ряда бетакоронавирусов эпитопы, можно предположить, что полученный вакцинный кандидат способен индуцировать иммунный ответ не только против SARS-CoV-2, но и против SARS-CoV, а также других потенциально опасных SARS-подобных бетакоронавирусов.

ВЫВОДЫ

1) Созданы генетические конструкции и в бактериальной системе экспрессии получены рекомбинантные белки – Co1, PE и CoF, которые содержат участки основного антигена коронавируса (S-белка) и реагируют с коммерческими поликлональными антителами к S-белку SARS-CoV-2 и SARS-CoV.

2) Показано, что экспрессированные в *E. coli* RBD-содержащие антигены Co1 и CoF связываются с рекомбинантным рецептором ACE2 и эффективно взаимодействуют с сыворотками крови людей, переболевших разными вариантами SARS-CoV-2.

3) Получены и охарактеризованы композиции, состоящие из сферических частиц (СЧ) ВТМ и коронавирусных антигенов Co1, PE и CoF (СЧ + 3АГ).

4) Установлено, что СЧ ВТМ, используемые в составе композиций в качестве платформы-адьюванта, усиливают иммунный ответ на коронавирусные антигены, обеспечивая Th1/Th2-сбалансированную иммуностимуляцию. Титры антител к целевым белкам существенно превышают титры адьювант-специфических антител.

5) Показано, что сыворотки крови, полученные после иммунизации лабораторных животных композициями СЧ + 3АГ, обладают способностью нейтрализовать вирус SARS-CoV-2 в культуре клеток.

6) Вакцинный кандидат MSU-CoV-5 обеспечивает протективный эффект, проявляющийся в снижении степени тяжести воспаления легких лабораторных животных после инфицирования SARS-CoV-2.

Список публикаций по теме диссертации.

1. **Kovalenko A.O.**, Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., Manukhova T.I., Kondakova O.A., Ivanov P.A., Arkhipenko M.V., Gushchin V.A., Nikitin N.A., Karpova O.V. Vaccine candidate against COVID-19 based on structurally modified plant virus as an adjuvant // *Frontiers in microbiology*. 2022. V. 13. P. 845316. JIF (WoS) 5,2

2. **Kovalenko A.O.**, Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., Nikitin N.A., Karpova O.V. Recombinant Protein Vaccines against Human Betacoronaviruses: Strategies, Approaches and Progress // *International Journal of Molecular Sciences*. 2023. V. 24. № 2. P. 1701. JIF (WoS) 5,6

3. **Kovalenko A.O.**, Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., Kondakova O.A., Ivanov P.A., Arkhipenko M.V., Nikitin N.A., Karpova O.V. Dataset on safety and protective efficacy studies of COVID-19 vaccine candidates based on structurally modified plant virus in female hamsters // *Data in Brief*. 2023. V. 48. P. 109158. JIF (WoS) 1,2

4. Nikitin N.A., Vasiliev Yu.M., **Kovalenko A.O.**, Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Evtushenko E.A., Karpova O.V. Plant Viruses as Adjuvants for Next-Generation Vaccines and Immunotherapy // *Vaccines*. 2023. V. 11. № 8. P. 1372. JIF (WoS) 7,8

Дополнительный список публикаций и патентов.

1. **Kovalenko A.O.**, Chernyshov S.V., Kutyshenko V.P., Molochkov N.V., Prokhorov D.A., Odinkova I.V., Mikoulinskaia G.V. Investigation of the calcium-induced activation of the bacteriophage T5 peptidoglycan hydrolase promoting host cell lysis // *Metallomics*. 2019. V. 11. № 4. P. 799-809. JIF (WoS) 3,4

2. Manukhova T.I., Evtushenko E.A., Ksenofontov A.L., Arutyunyan A.M., **Kovalenko A.O.**, Nikitin N.A., Karpova O.V. Thermal remodelling of Alternanthera mosaic virus virions and virus-like particles into protein spherical particles // *PLoS One*. 2021. V. 16. № 7. P. e0255378. JIF (WoS) 3,7

3. Булушова Н.В., Серкина А.В., **Коваленко А.О.**, Рыков С.В., Свиридов Б.В., Мухина И.В., Лапшин Р.Д. Фармацевтическая композиция для лечения глазных инфекций, вызванных метициллин-устойчивыми штаммами *Staphylococcus aureus*, включающая в качестве активного начала N-концевой СНАР-домен эндолизина бактериофага К *Staphylococcus aureus* // Патент РФ № 2715694 от 02.03.2020 г. Заявка № 2019110306 от 08.04.2019 г.