

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Коваленко Ангелина Олеговна

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

1.5.10 – Вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук, профессор
Карпова Ольга Вячеславовна;
кандидат биологических наук
Евтушенко Екатерина Алексеевна

Москва – 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1.Общая характеристика бетакоронавирусов человека	14
1.1.1.Таксономия, происхождение и распространение	14
1.1.2.Геном, структурная биология и жизненный цикл	18
1.1.3.Шиповидный S-белок	24
1.2.Генетические варианты SARS-CoV-2	29
1.3.Рекомбинантные белковые вакцины против SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2.....	33
1.3.1.Принципы создания вакцин	34
1.3.2.Экспрессионные системы и адъюванты	37
1.3.3.S-белок – основной вакцинный антиген.....	42
1.3.3.1.Вакцины на основе полноразмерного S-белка.....	42
1.3.3.2.Вакцины на основе рецептор-связывающего домена S-белка	48
1.3.4.Вакцины на основе нуклеокапсидного N-белка	54
1.3.5.Мультиэпитопные вакцины	55
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	62
2.1.Материалы	62
2.1.1.Плазмиды	62
2.1.2.Клеточные линии, штаммы бактерий, вирус SARS-CoV-2	63
2.1.3.Питательные среды и антибиотики.....	64
2.1.4.Растворы и буферы	64
2.1.5.Коммерческие наборы, препараты и реактивы.....	65
2.2.Методы	66
2.2.1.Получение ДНК-фрагмента путем комплементарного достраивания частично перекрывающихся олигонуклеотидов.....	66
2.2.2.Препаративная рестрикция	67
2.2.3.Электрофорез ДНК в агарозном геле.....	67
2.2.4.Выделение ДНК из агарозного геля.....	67

2.2.5.Измерение концентрации ДНК.....	68
2.2.6.Лигирование.....	68
2.2.7.Трансформация клеток <i>E. coli</i>	68
2.2.8.Выделение плазмидной ДНК из клеток <i>E. coli</i>	69
2.2.9.Аналитическая рестрикция	69
2.2.10.Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантных белков	69
2.2.11.Определение концентрации белка.....	71
2.2.12.Определение эндотоксинов.....	71
2.2.13.Электрофорез белков в полиакриламидном геле	72
2.2.14.Вестерн-блот анализ	73
2.2.15.Анализ связывания рекомбинантных антигенов с рецептором ACE2 .	74
2.2.16.Выделение вируса табачной мозаики (ВТМ).....	75
2.2.17.Получение сферических частиц (СЧ) ВТМ и композиций СЧ с рекомбинантными коронавирусными антигенами.....	76
2.2.18.Просвечивающая электронная микроскопия	77
2.2.19.Иммунофлуоресцентная микроскопия	77
2.2.20.Иммунизация и заражение лабораторных животных	78
2.2.21.Получение сывороток крови животных.....	80
2.2.22.Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ.....	80
2.2.23.Анализ сывороток крови на нейтрализацию вируса SARS-CoV-2 на клетках Vero E6	81
2.2.24.Гистологический анализ.....	82
2.2.25.Статистический анализ.....	84
3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	85
3.1.Дизайн и получение генетических конструкций рекомбинантных антигенов.....	86
3.2.Экспрессия и очистка рекомбинантных белков.....	92
3.3.Характеристика рекомбинантных антигенов	94
3.3.1.Антигенные свойства рекомбинантных белков.....	94
3.3.2.Взаимодействие RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF с рекомбинантным рецептором ACE2	97

3.3.3. Взаимодействие RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF с сыворотками крови людей, переболевших COVID-19	100
3.4. Получение и характеристика адьюванта – сферических частиц вируса табачной мозаики (СЧ ВТМ)	105
3.5. Получение и характеристика композиций СЧ ВТМ с тремя рекомбинантными коронавирусами антигенами (СЧ + ЗАГ)	107
3.6. Изучение иммуногенности композиций СЧ + ЗАГ	108
3.7. Сравнительный анализ иммунного ответа на СЧ ВТМ и на коронавирусные антигены	115
3.8. Исследование вируснейтрализующей активности сывороток крови иммунизированных животных.....	118
3.9. Создание и характеристика двух вакцинных кандидатов – MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5	120
3.10. Протективность и безопасность вакцинного кандидата в отношении вируса SARS-CoV-2 на модели инфекции у сирийских хомяков	125
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	133
ВЫВОДЫ.....	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	137

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ACE2 – angiotensin-converting enzyme 2, ангиотензинпревращающий фермент 2
- BAU – binding antibody units, единицы связывающих антител
- Co1 – рекомбинантный антиген, который содержит последовательность рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2
- CoF – рекомбинантный антиген, содержащий последовательность рецептор-связывающего домена S1-субъединицы и высококонсервативный эпитоп S2-субъединицы S-белка SARS-CoV-2
- CpG – cytosine-phosphate-guanine, цитозин-фосфат-гуанин
- ECDC – European Centre for Disease Prevention and Control, Европейский центр профилактики и контроля заболеваний
- EMA – European Medicines Agency, Европейское агентство лекарственных средств
- EU – endotoxin units, единицы эндотоксинов
- Fc – fragment crystallizable region, кристаллизуемый фрагмент иммуноглобулина
- HCoV – human coronavirus, коронавирус человека
- HR – heptad repeat, гептадный повтор
- HRP – horseradish peroxidase, пероксидаза хрена
- PE – полиэпитопный рекомбинантный антиген, содержащий антигенные участки S2-субъединицы S-белка, высококонсервативные среди SARS-CoV-2, SARS-CoV и других SARS-подобных бетакоронавирусов
- RBD – receptor-binding domain, рецептор-связывающий домен
- SAS – Sigma Adjuvant System, альтернатива адьюванту Фрейнда
- а.о. – аминокислотный остаток
- АГ – антиген
- БО – белок оболочки
- БОЕ – бляшкообразующая единица
- ВТМ – вирус табачной мозаики
- ДСН – додецилсульфат натрия
- ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид
- ИФА – иммуноферментный анализ
- НТ₅₀ – титр 50% нейтрализации
- ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия

СЧ – сферические частицы

СЧ + 3АГ – композиции, состоящие из сферических частиц вируса табачной мозаики и трех рекомбинантных коронавирусных антигенов

т.н. – тысяча нуклеотидов

ТГБ – трис-глициновый буфер

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

ТЦД₅₀ – 50% тканевая цитопатогенная доза

ВВЕДЕНИЕ

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; Jaime *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 адьюванта, 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 адьюванты на основе соединений алюминия, CpG-олигодезоксинуклеотиды, адьюванты растительного происхождения и некоторые другие (Pollet *et al.*, 2021a). В последние годы многообещающей безопасной платформой для презентации антигенов и стимуляции иммунного ответа признаны адьюванты на основе структурно модифицированных вирусов растений (Кондакова *и др.*, 2022). К настоящему моменту применение подобного рода адьювантов 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-адьюванта, 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 коронавируса 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 коронавируса 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-адъювант на основе структурно модифицированного вируса растений – СЧ ВТМ. Были созданы и полностью охарактеризованы композиции СЧ с тремя коронавирусными антигенами (СЧ + ЗАГ). 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 коронавирусами 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.

б) 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.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общая характеристика бетакоронавирусов человека

1.1.1. Таксономия, происхождение и распространение

Коронавирусы способны инфицировать организмы многих позвоночных. В соответствии с современной классификацией они принадлежат к семейству *Coronaviridae*, которое относится к подпорядку *Cornidovirineae*, порядку *Nidovirales*, классу *Pisoniviricetes*, типу *Pisuviricota*, царству *Orthornavirae*, реалму *Riboviria*. В семействе *Coronaviridae* выделяют три подсемейства – *Letovirinae*, *Orthocoronavirinae* и *Pitovirinae* (ICTV, релиз 2022). Представители подсемейств *Pitovirinae* и *Letovirinae* заражают костистых рыб и земноводных, соответственно (Woo *et al.*, 2023). Коронавирусы, инфицирующие птиц и млекопитающих, относятся к подсемейству *Orthocoronavirinae*, которое включает четыре рода – *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus*. Альфа- и бетакоронавирусы, как правило, заражают млекопитающих, в том числе человека, а гамма- и дельтакоронавирусы – в основном птиц (Ge *et al.*, 2017).

Первый коронавирус человека B814 был открыт в 1965 г., однако он не сохранился к настоящему моменту, и его таксономическое положение осталось неопределенным (Tyrrell & Вуное, 1965; Almeida *et al.*, 1968; Щелканов *и др.*, 2020). Из известных на сегодняшний день коронавирусов, инфицирующих человека (human coronaviruses, HCoV), особую опасность представляют бетакоронавирусы MERS-CoV (Middle East respiratory syndrome coronavirus, коронавирус ближневосточного респираторного синдрома), SARS-CoV (severe acute respiratory syndrome coronavirus, коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома) и SARS-CoV-2. Бетакоронавирусы SARS-CoV и MERS-CoV стали причиной смертельных вспышек респираторного синдрома в 2002–2003 гг. и 2012 г., соответственно. Возникшая в декабре 2019 г. в китайском Ухане вспышка инфекции, вызванной бетакоронавирусом SARS-CoV-2, быстро переросла в пандемию

коронавирусной болезни 2019 года (**coronavirus disease 2019**, COVID-19) (Rabaan *et al.*, 2020). Два других известных бетакоронавируса человека – HCoV-NKUI и HCoV-OC43 – обычно вызывают заболевания верхних дыхательных путей легкой степени тяжести, хотя могут представлять опасность для младенцев, детей младшего возраста и пожилых людей (Cui *et al.*, 2019).

В пределах рода *Betacoronavirus* выделяют пять подродов: *Embecovirus*, *Hibecovirus*, *Merbecovirus*, *Nobecovirus* и *Sarbecovirus* (ICTV, релиз 2022). SARS-CoV и SARS-CoV-2 относятся к подроду *Sarbecovirus*, MERS-CoV – к подроду *Merbecovirus*, HCoV-NKUI и HCoV-OC43 – к подроду *Embecovirus* (Coronaviridae Study Group of the ICTV, 2020; Escalera-Zamudio *et al.*, 2023).

Эволюционный анализ показал, что бетакоронавирусы человека имеют зоонозное происхождение: вероятно, грызуны являются первичным резервуаром HCoV-NKUI и HCoV-OC43, а летучие мыши – источником опасных коронавирусов SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 (Forni *et al.*, 2017; Rabaan *et al.*, 2020).

В ноябре 2002 г. в провинции Гуандун на юге Китая были отмечены случаи тяжелого острого респираторного синдрома (severe acute respiratory syndrome, SARS), возбудителем которого оказался бетакоронавирус SARS-CoV. В 2003 г. последовала эпидемия SARS, которая затронула более двадцати стран мира и в основном носила ограниченный характер, поскольку возбудитель передавался только при прямом контакте с инфицированным человеком. Всего было зарегистрировано 8098 случаев заболевания, из них 774 случая – с летальным исходом. Уровень смертности от вызванной SARS-CoV инфекции составил 9%, достигая 50% среди населения старше 60 лет (Fehr & Perlman, 2015). С эпидемией SARS удалось справиться с помощью карантинных мероприятий в июне 2003 г. После этого было зарегистрировано лишь несколько случаев заражения SARS-CoV (Stadler & Rappuoli, 2005; Rabaan *et al.*, 2020).

Считается, что естественным резервуаром SARS-CoV и SARS-CoV-подобных вирусов являются подковоносые летучие мыши (*Rhinolophus spp.*). Через промежуточного хозяина – гималайскую цивету (*Paguma larvata*) – SARS-CoV перешел к людям (Lau *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Геномная последовательность SARS-CoV человека более чем на 90% идентична последовательности нуклеотидов SARS-CoV-подобных вирусов, выделенных от летучих мышей и цивет (Wong *et al.*, 2019).

После эпидемии SARS уже в июне 2012 г. в городе Джидде (Саудовская Аравия) была зарегистрирована вспышка ближневосточного респираторного синдрома (Middle East respiratory syndrome, MERS), вызванного бетакоронавирусом MERS-CoV и впоследствии распространившегося и в других странах Ближнего Востока (Zaki *et al.*, 2012; Rabaan *et al.*, 2020). До сих пор отдельные случаи заболевания MERS встречаются у людей (Rabaan *et al.*, 2021). По оценкам Европейского центра профилактики и контроля заболеваний к концу июля 2023 г. общее число зарегистрированных случаев MERS в мире составило 2614, из них 945 случаев – с летальным исходом (уровень смертности около 36%) (ECDC, 2023).

Было установлено, что штаммы вируса MERS-CoV, изолированные от человека во время эпидемии MERS, почти идентичны штаммам MERS-CoV, выделенным от одногорбых верблюдов (*Camelus dromedarius*) (Raj *et al.*, 2014; Sabir *et al.*, 2016; Paden *et al.*, 2018). Геномные последовательности MERS-CoV, выделенного от человека и одногорбых верблюдов, только на 65–80% идентичны последовательностям нуклеотидов других представителей подрода *Merbecovirus*, выделенных от летучих мышей (Cui *et al.*, 2019; Wong *et al.*, 2019). Тем не менее, считается, что предок вируса MERS-CoV преодолел видовой барьер и перешел от летучих мышей к верблюдам более 30 лет назад (Kirtipal *et al.*, 2020).

Третий раз человечество столкнулось с опасной коронавирусной инфекцией в декабре 2019 г. Тогда в китайском Ухане (провинция Хубэй) были обнаружены случаи пневмонии неизвестной этиологии (Hu *et al.*, 2021).

В течение довольно короткого времени геном возбудителя был расшифрован и 12 января 2020 г. представлен в базе данных GenBank (Wuhan-Hu-1, код доступа MN908947) (Telenti *et al.*, 2022). Было установлено, что возбудитель инфекционного заболевания генетически близок SARS-подобным бетакоронавирусам. Международный комитет по таксономии вирусов присвоил новому коронавирусу название SARS-CoV-2 (Coronaviridae Study Group of the ICTV, 2020). 11 марта 2020 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила о начале пандемии COVID-19 (Telenti *et al.*, 2022).

Сравнение геномных последовательностей показало, что новый бетакоронавирус SARS-CoV-2 на 80% идентичен вирусу SARS-CoV и только на 50% – вирусу MERS-CoV (Wu *et al.*, 2020a). Наибольшее сходство было обнаружено между SARS-CoV-2 и различными коронавирусами летучих мышей, которые наряду с ним и SARS-CoV относятся к подроду *Sarbecovirus* (Nakagawa & Miyazawa, 2020). Так, геномная последовательность SARS-CoV-2 на 96% и 93% идентична последовательности нуклеотидов коронавируса RaTG13 азиатского подковоноса (*Rhinolophus affinis*) и последовательности коронавируса RmYN02 малайского подковоноса (*Rhinolophus malayanus*), соответственно. Основные различия наблюдаются в последовательности гена, кодирующего шиповидный S-белок (spike): у SARS-CoV-2 и RaTG13 эти последовательности идентичны на 93%, у SARS-CoV-2 и RmYN02 – на 72%. Анализ аминокислотного состава выявил, что структурные белки S (spike, шиповидный), M (membrane, мембранный), N (nucleocapsid, нуклеокапсидный) и E (envelope, белок оболочки) совпадают у коронавирусов SARS-CoV-2 и RaTG13 на 97,4%, 98,6%, 99% и 100%, соответственно (Zhou *et al.*, 2020a). В совокупности все эти данные позволяют предположить, что летучие мыши могут являться исходными хозяевами вируса SARS-CoV-2 (Rabaan *et al.*, 2020). Первоначально была выдвинута гипотеза, что промежуточным хозяином на пути передачи вируса SARS-CoV-2 от летучих мышей к человеку являются змеи (Ji *et al.*, 2020). Однако сравнение геномных

последовательностей SARS-CoV-2 и близких к нему коронавирусов, обнаруженных у малайских панголинов (*Manis javanica*), выявило идентичность геномов на уровне 85,5–92,4% (Lam *et al.*, 2020). Поэтому, вероятно, панголины являются промежуточными хозяевами вируса SARS-CoV-2 (Kirtipal *et al.*, 2020).

1.1.2. Геном, структурная биология и жизненный цикл

Представители семейства *Coronaviridae* – это сложные вирусы, вирионы которых имеют сферическую или плеоморфную форму. На поверхности вирусных частиц располагаются выступы в виде «шипов», напоминающие зубцы короны, которые образованы из молекул S-белка. Диаметр вирионов – 80–120 нм. Геномная РНК упакована в нуклеокапсид со спиральным типом симметрии [Рис. 1 (А, Б)] (Kirtipal *et al.*, 2020; Vai *et al.*, 2021).

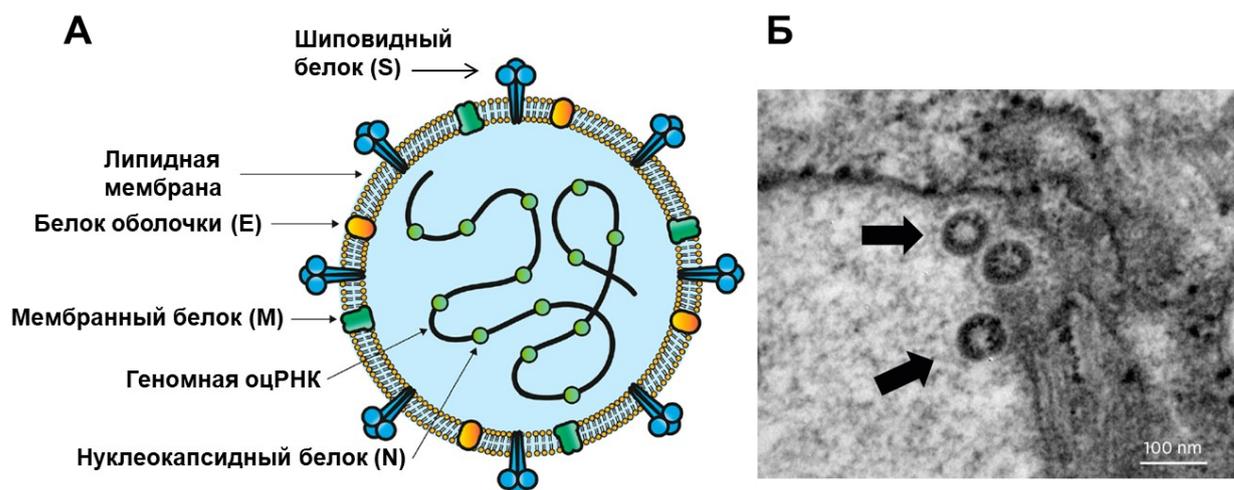


Рисунок 1. Строение вирионов коронавирусов.

А. Схематическое изображение вириона коронавирусов (адаптировано из статьи Martínez-Flores *et al.*, 2021). В липидную мембрану встроены структурные белки нескольких типов: белок оболочки (envelope, E), мембранный белок (membrane, M), а также шиповидный белок (spike, S), молекулы которого образуют тримеры. Нуклеокапсидный белок (nucleocapsid, N) связан с геномной одноцепочечной РНК (оцРНК).

Б. Электронно-микроскопическая фотография вирионов бетакоронавируса SARS-CoV-2 (из статьи Park *et al.*, 2020). Стрелками указаны вирусные частицы.

Геном бетакоронавирусов человека представлен большой (около 30 т.н.) несегментированной одноцепочечной РНК положительной полярности (Kirtipal *et al.*, 2020) и организован следующим образом: 5'-кэп–лидерная

последовательность–НТО–репликаза/транскриптаза–S–E–M–N–3'-НТО–поли(А)-хвост (Рис. 2).

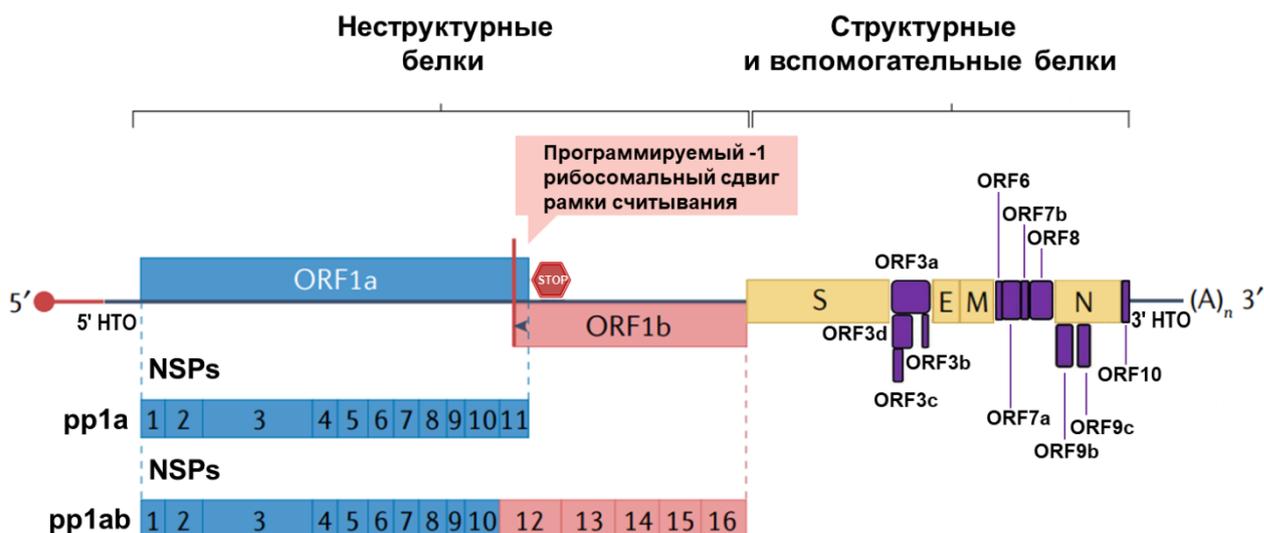


Рисунок 2. Схема геномной организации бетакоронавируса SARS-CoV-2 (модифицировано из статей Redondo *et al.*, 2021; Malone *et al.*, 2022). Первая часть генома – открытые рамки считывания (open reading frames, ORFs) 1a и 1b – кодирует полипротеины pp1a и pp1ab, которые расщепляются с образованием 16 неструктурных белков (non-structural proteins, NSPs), участвующих в процессах репликации/транскрипции. Вторая часть генома содержит гены четырех структурных белков (S, E, M и N), необходимых для сборки новых вирионов, а также ORFs, кодирующие вспомогательные белки (обозначены фиолетовым цветом). обозначает стоп-кодон в ORF1a. обозначает 5'-кэп и лидерную последовательность, (A)_n – 3'-поли(А)-хвост. НТО – нетранслируемая область.

На 5'-конце геномной РНК находятся открытые рамки считывания (open reading frames, ORFs) 1a и 1b, которые занимают две трети генома и кодируют компоненты комплекса репликаза/транскриптаза (Kirtipal *et al.*, 2020) (Рис. 2). Непосредственно с ORF1a и ORF1b транслируются полипротеины pp1a и pp1ab, при этом полипротеин pp1ab образуется с участием механизма программируемого -1 рибосомального сдвига рамки считывания. Ключевую роль в этом процессе играет псевдоузел РНК в конце ORF1a, перед которым рибосома делает паузу, что создает напряжение в геномной РНК. В результате рибосома может сдвинуться на один нуклеотид назад по «скользкой последовательности» (5'-U UUA AAC-3'). Так, рибосома пропускает стоп-кодон в ORF1a и дальше продолжает трансляцию ORF1b, синтезируя полипротеин pp1ab (Malone *et al.*, 2022). Полипротеины pp1a и pp1ab подвергаются автопротеолитическому процессингу, который осуществляют

вирусные протеазы: папаин-подобная протеаза (papain-like protease, PLpro) и 3С-подобная протеаза (3С-like protease, 3CLpro, главная протеаза коронавируса, химотрипсин-подобный фермент) (de Wilde *et al.*, 2018). В результате образуются 16 неструктурных белков (non-structural proteins, NSPs) с разными функциями. Белки Nsp1, Nsp4, Nsp7–9, Nsp12 (RNA-dependent RNA polymerase, RdRp, РНК-зависимая РНК-полимераза) и Nsp13 играют основную роль в процессах вирусной репликации/транскрипции. Nsp2 участвует в модуляции сигнальных путей выживания клеток-хозяев. Nsp3 (PLpro) и Nsp5 (3CLpro) отвечают за расщепление вирусных полипротеинов. Nsp6 индуцирует образование аутофагосом из мембран эндоплазматического ретикулума (ЭПР) клеток-хозяев. Nsp10 является кофактором белка Nsp14, обладающего экзорибонуклеазной активностью, и белка Nsp16, участвующего в реакции метилирования кэп-структуры мРНК. Nsp15 обладает эндорибонуклеазной активностью, тогда как функция Nsp11 остается неизвестной (Naqvi *et al.*, 2020; Martínez-Flores *et al.*, 2021).

После ORF1a и ORF1b находятся гены структурных белков (S, E, M и N), между которыми расположены ORFs, кодирующие вспомогательные белки (например, ORF3a кодирует вспомогательный белок Orf3a, и т.д.) (Рис. 2). Матрицами для трансляции структурных и вспомогательных белков являются субгеномные РНК (Kirtipal *et al.*, 2020). Белок S (молекулярная масса ~ 175 кДа) – это гликопротеин, он необходим для связывания вируса с рецепторами и проникновения внутрь клетки-хозяина. Это основной антиген коронавируса, индуцирующий выработку нейтрализующих антител. Белки М (~ 25–30 кДа) и Е (~ 8–12 кДа) участвуют в сборке и почковании вирионов. Также имеются данные о влиянии этих белков на транспорт S-белка внутри клетки и его N-гликозилирование. Белок N (~ 46–48 кДа) играет фундаментальную роль в упаковке вирусной РНК. В нем также присутствуют антигенные участки. У бетакоронавирусов HCoV-NKU1 и HCoV-OC43 есть пятый структурный белок гемагглютинин-эстераза, вероятно,

способствующий первичной адсорбции (Nakagawa & Miyazawa, 2020; Кордюкова и Шанько, 2021; Boson *et al.*, 2021; Martínez-Flores *et al.*, 2021).

Считается, что роль в вирулентности коронавирусов играют вспомогательные белки, они также вносят вклад в модулирование ответов организма-хозяина на инфекцию. У разных бетакоронавирусов человека количество вспомогательных белков варьирует (V'kovski *et al.*, 2021). Так, сообщается об 11 вспомогательных белках SARS-CoV-2 (Рис. 2). Белки Orf3b, Orf6, Orf7a и Orf8 являются важными антагонистами интерферонов I типа (Redondo *et al.*, 2021). Белок Orf3a участвует в индукции апоптоза (Bai *et al.*, 2022). Белки Orf9b и Orf9c взаимодействуют с клеточными органеллами, что приводит к подавлению противовирусного ответа в инфицированных клетках (Redondo *et al.*, 2021). В частности, взаимодействие вспомогательного белка Orf9b с белком митохондрий человека TOM70 приводит к инактивации продукции интерферонов I типа (Jiang *et al.*, 2020b). Функции белков Orf3c, Orf3d, Orf7b и Orf10 изучены недостаточно (Redondo *et al.*, 2021).

Жизненный цикл всех коронавирусов человека (Рис. 3) начинается с прикрепления вируса к рецептору на поверхности клетки-хозяина и проникновения в клетку. Ключевую роль в этом процессе играет шиповидный S-белок, активацию которого осуществляют клеточные протеазы: эндосомальные цистеиновые протеазы катепсины в случае эндосомального пути проникновения вируса, либо мембранные протеазы, такие как трансмембранная сериновая протеаза TMPRSS2 (transmembrane serine protease 2), в случае слияния оболочки вируса с клеточной мембраной (Zumla *et al.*, 2016; Shirato *et al.*, 2018; Kirtipal *et al.*, 2020).

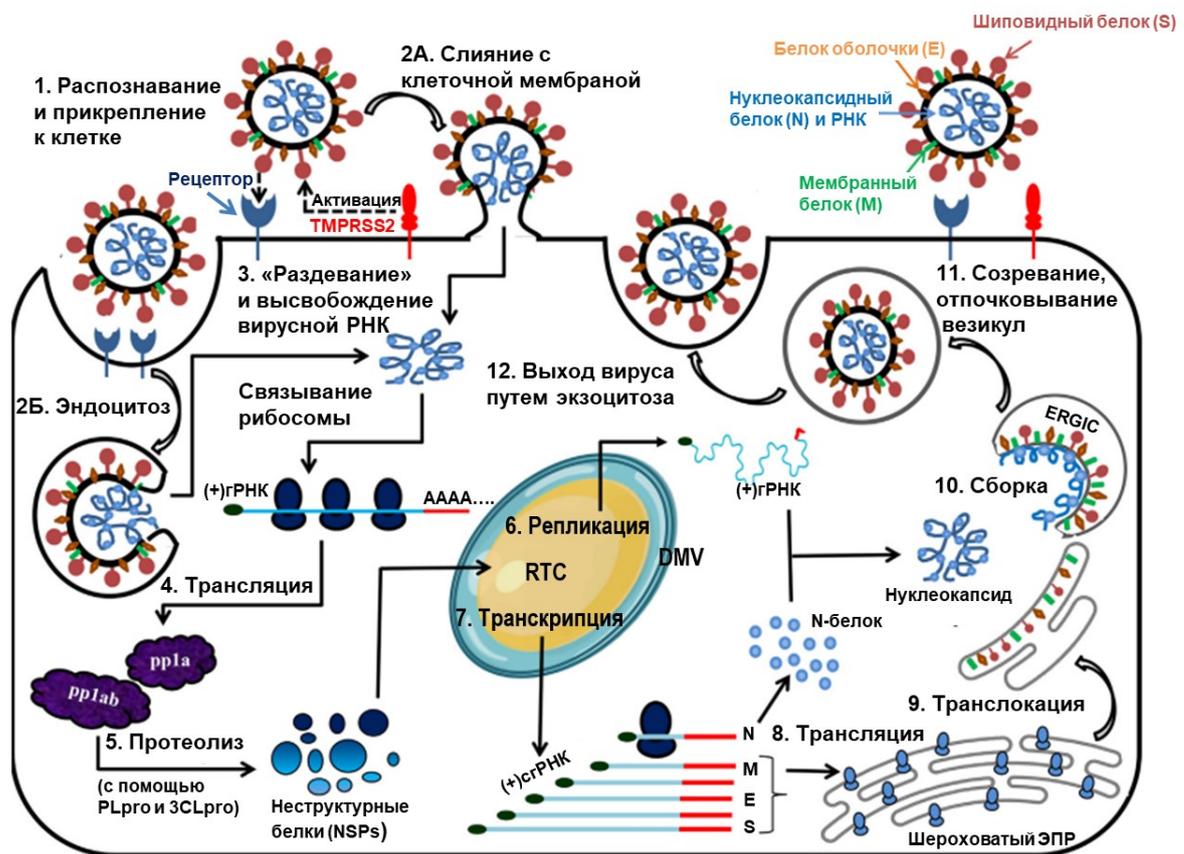


Рисунок 3. Жизненный цикл коронавируса человека (адаптировано из статьи Arya *et al.*, 2021). TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза (transmembrane serine protease 2); pp1a и pp1ab – полипротеины 1a и 1ab; PLpro и 3CLpro – папаин-подобная протеаза (papain-like protease) и 3С-подобная протеаза (3C-like protease); NSPs – неструктурные белки (non-structural proteins); RTC – репликационно-транскрипционный комплекс (replication-transcription complex); DMV – везикула с двойной мембраной (double-membrane vesicle); ERGIC – промежуточный компартмент ЭПР-Гольджи (ER-Golgi intermediate compartment). гРНК – геномная РНК; сгРНК – субгеномная РНК.

После высвобождения вирусного нуклеокапсида в цитоплазму с геномной РНК транслируются полипротеины pp1a и pp1ab и расщепляются с образованием неструктурных белков. В клетке путем перестройки ее мембраны образуются везикулы с двойной мембраной (double-membrane vesicles, DMVs), индуцируют этот процесс белки Nsp3, Nsp4 и Nsp6. На этих двумембранных везикулах происходит закрепление репликационно-транскрипционных комплексов (replication-transcription complexes, RTCs) вируса. Полноразмерная геномная РНК [(+)РНК] реплицируется через промежуточные (-)РНК (Fung & Liu, 2019; Arya *et al.*, 2021). Субгеномные РНК (сгРНК), кодирующие вирусные структурные и вспомогательные белки, синтезируются в ходе прерывистой транскрипции. В геноме коронавируса

есть определенные участки, называемые последовательностями, регулируемыми транскрипцию (transcription regulatory sequences, TRSs). После лидерной последовательности на 5'-конце генома находится последовательность TRS-L (leader TRS); перед каждой ORF, за исключением ORF1a и ORF1b, находятся последовательности TRS-B (body TRS). Суть прерывистой транскрипции (Рис. 4) заключается в том, что в процессе синтеза цепи (-)РНК при копировании последовательностей TRS-B RdRp-комплекс может «перескакивать» на последовательность TRS-L благодаря комплементарности TRS-B растущей цепи сРНК и геномной TRS-L (Hartenian *et al.*, 2020). В результате такого переключения матриц получаются (-)сРНК, содержащие антилидерную последовательность на 3'-конце. Они используются в качестве матриц для образования (+)сРНК. Синтезированные (+)сРНК включают 5'-концевую лидерную последовательность, идентичную 5'-концевой последовательности геномной РНК, и служат матрицами для трансляции вирусных белков (Malone *et al.*, 2022).

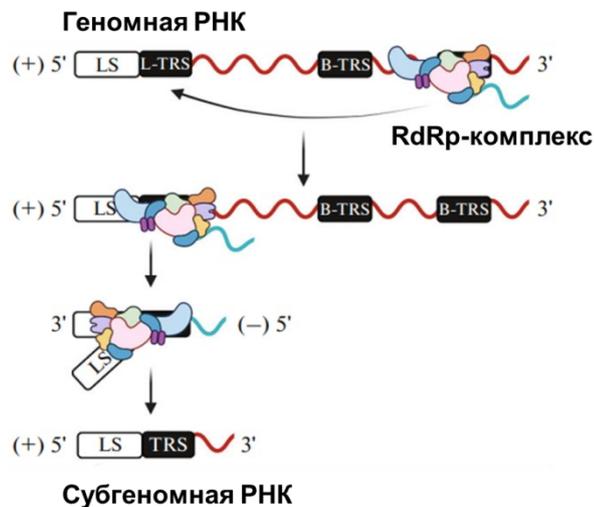


Рисунок 4. Модель прерывистой транскрипции (адаптировано из статьи Галкин *и др.*, 2022). LS – leader sequence, лидерная последовательность; TRS – transcription regulatory sequence, последовательность, регулирующая транскрипцию; L-TRS – лидерная TRS; B-TRS – body TRS, TRS кодирующей части.

Синтез N-белка происходит в цитоплазме, синтез белков S, M, E, а также некоторых ассоциированных с мембраной вспомогательных белков – в ЭПР. Сборка вирусных частиц происходит в промежуточном компартменте ЭПР-

Гольджи (ER-Golgi intermediate compartment, ERGIC). Затем вирусные частицы отпочковываются от ERGIC и транспортируются в составе гладкостенных везикул по секреторному пути. Выход зрелых вирионов из клетки осуществляется путем экзоцитоза (Fung & Liu, 2019; Arya *et al.*, 2021).

1.1.3. Шиповидный S-белок

S-белок содержит 1273, 1255 и 1353 аминокислоты у SARS-CoV-2, SARS-CoV и MERS-CoV, соответственно (Hatmal *et al.*, 2020). S-белок SARS-CoV-2 на 76% идентичен S-белку SARS-CoV и на 35% – S-белку MERS-CoV (Grifoni *et al.*, 2020). Поверхность S-белка обильно гликозилирована. Например, в S-белке SARS-CoV-2 картированы 22 сайта N-гликозилирования и 2 сайта O-гликозилирования (T323/S325) (Watanabe *et al.*, 2020). S-белок также содержит сайты для S-ацилирования остатками высших жирных кислот консервативных остатков цистеина, находящихся в цитоплазматическом хвосте S-белка (10 сайтов у SARS-CoV-2, 9 сайтов у SARS-CoV и 7 сайтов у MERS-CoV) (Mesquita *et al.*, 2021).

S-белок бетакоронавирусов содержит эктодомен, состоящий из двух функциональных субъединиц (subunits) – S1 и S2, трансмембранный домен (transmembrane domain, TM) и цитоплазматический хвост (cytoplasmic tail, CT) (Wrapp *et al.*, 2020). S1-субъединица необходима для связывания с клеточным рецептором, в роли которого для SARS-CoV и SARS-CoV-2 выступает ангиотензинпревращающий фермент 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2), который экспрессируется в эпителии полости носа, в легких, сердце, почках, кишечнике. Для MERS-CoV рецептором служит молекула дипептидилпептидазы-4 (dipeptidyl-peptidase 4, DPP4). Этот белок экспрессируется в иммунных клетках (Rabaan *et al.*, 2020; Radzikowska *et al.*, 2020). Известно, что аффинность связывания ACE2 с SARS-COV-2 в 10–20 раз выше, чем с SARS-CoV (Wrapp *et al.*, 2020).

S1-субъединица содержит N-концевой домен (N-terminal domain, NTD), рецептор-связывающий домен (receptor-binding domain, RBD), а также C-концевые домены 1 и 2 (C-terminal domain, CTD1 и CTD2). RBD содержит

рецептор-связывающий мотив (receptor-binding motif, RBM), за счет которого непосредственно происходит связывание с рецептором. S2-субъединица необходима для слияния мембраны вируса с клеточной мембраной, она содержит пептид слияния (fusion peptide, FP), гептадный повтор 1 (heptad repeat 1, HR1), центральную спираль (central helix, CH), коннекторный домен (connector domain, CD) и гептадный повтор 2 (heptad repeat 2, HR2) (Рис. 5А) (Duan *et al.*, 2020; Sun *et al.*, 2021a).

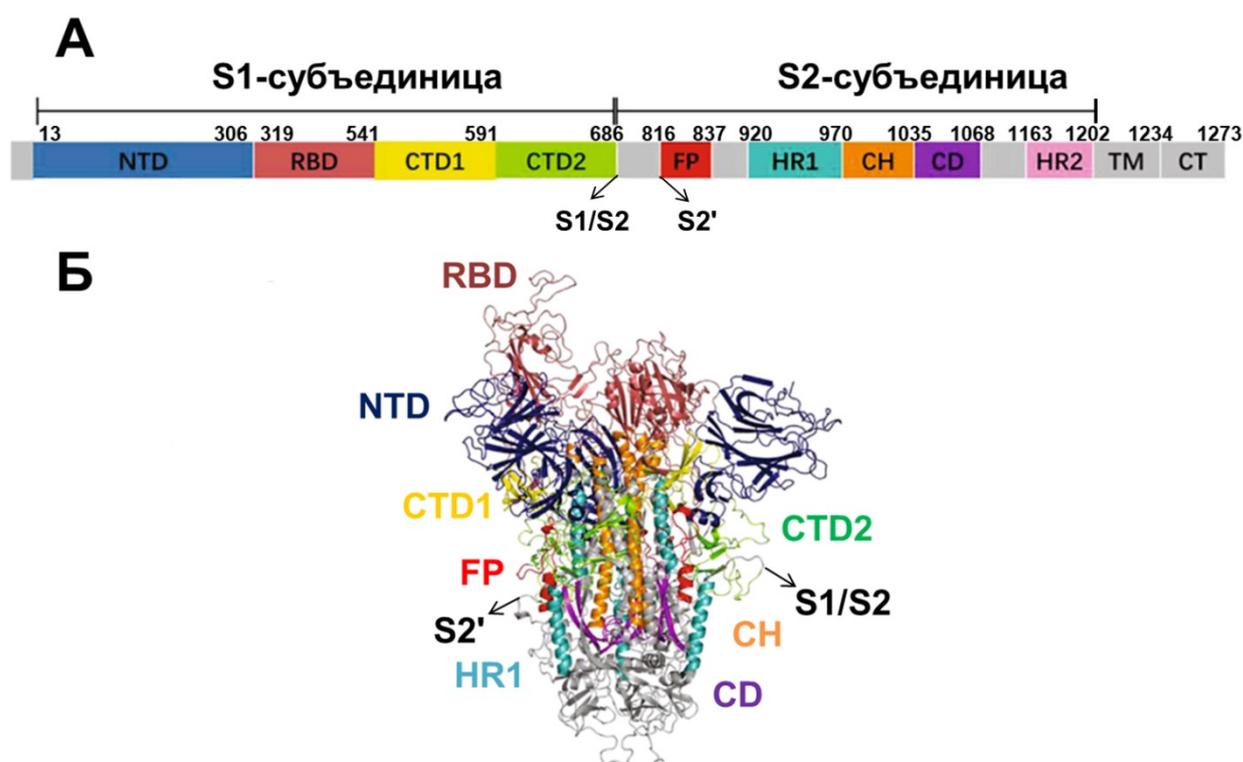


Рисунок 5. Структура S-белка бетакоронавируса SARS-CoV-2 (адаптировано из статьи Sun *et al.*, 2021a).

А. Доменная организация полноразмерного S-белка SARS-CoV-2.

Б. Структурная модель тримера S-белка SARS-CoV-2.

Указаны сайты расщепления протеазами S1/S2 (присутствует также у MERS-CoV, но не у SARS-CoV) и S2'.

S-белок бетакоронавирусов находится в составе вириона в виде тримеров (Рис. 5Б). Он относится к представителям класса I вирусных белков слияния, наряду с гликопротеином оболочки вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и гемагглютинином вируса гриппа (Duan *et al.*, 2020). Чтобы вирус мог проникнуть в клетку, S-белок должен быть расщеплен клеточными протеазами на субъединицы S1 и S2. У SARS-CoV протеолитическая

активация S-белка происходит либо после присоединения вириона к поверхности клетки за счет трансмембранной сериновой протеазы TMPRSS2, либо в лизосоме за счет протеаз катепсинов (Shang *et al.*, 2020). В случае SARS-CoV-2 такая активация S-белка происходит еще на этапе сборки вириона в аппарате Гольджи инфицированной клетки, что оказалось возможным благодаря наличию сайта расщепления (RRAR) протеазой фурином, расположенного на стыке S1/S2. В составе зрелой вирусной частицы субъединицы S1 и S2 остаются нековалентно связанными (Coutard *et al.*, 2020; Jackson *et al.*, 2022). Эта особенность отличает SARS-CoV-2 от SARS-CoV. Аналогично SARS-CoV-2, подобный сайт расщепления фурином (RSVR) также имеет MERS-CoV (Coutard *et al.*, 2020). Таким образом, дочерние вирионы SARS-CoV-2 с преактивированным S-белком способны инфицировать разные клетки в организме, что обуславливает высокий патогенный потенциал SARS-CoV-2 (Кордюкова и Шанько, 2021).

S-белок существует в двух конформациях – префузионной («до слияния») и постфузионной («после слияния»). За связывание с клеточным рецептором отвечает домен RBD, входящий в состав S1-субъединицы. С помощью метода криоэлектронной микроскопии была показана подвижность RBD S-белка SARS-CoV-2 в префузионной конформации. Кажущиеся стохастическими движения RBD наблюдали и ранее при структурной характеристике SARS-CoV и MERS-CoV (Wrapp *et al.*, 2020). Было показано, что в «закрытой» префузионной конформации все три RBD тримера S-белка SARS-CoV-2 находятся в положении «вниз» («лежа») и не могут связывать рецептор ACE2 (Рис. 6А). Для успешной вирусной инфекции клетки-хозяина, по крайней мере, один RBD должен находиться в положении «вверх» («стоя») (Рис. 6Б). Такую конформацию S-белка называют «открытой» префузионной (Jackson *et al.*, 2022). Для SARS-CoV-2 было показано, что его S-белок с помощью RBD также взаимодействует с гепарансульфатом – отрицательно заряженным линейным полисахаридом, компонентом многих органов и тканей. Это взаимодействие способствует образованию «открытой»

конформации S-белка, необходимой для связывания с ACE2 (Clausen *et al.*, 2020). Согласно гипотетической схеме, связывание одного RBD, находящегося в положении «вверх», с ACE2 инициирует «открытие» и связывание RBD второго, а затем третьего мономеров S-белка с молекулами ACE2. В результате происходит «сбрасывание» S1-субъединиц, и экспонируются до этого спрятанные в глубине шипа сайты S2' в составе S2-субъединиц (Benton *et al.*, 2020; Кордюкова и Шанько, 2021). Происходит сайт-специфичный гидролиз S-белка по сайту S2' непосредственно перед высококонсервативной последовательностью S-F-I-E-D-L-L-F (Sun *et al.*, 2020). Этот процесс катализирует протеаза TMPRSS2 в случае проникновения вируса в клетки через клеточную мембрану, либо катепсины лизосом в случае интернализации посредством клатрин-зависимого эндоцитоза. Расщепление по сайту S2' «обнажает» пептид слияния, а диссоциация S1-субъединицы вызывает серьезные конформационные изменения S2-субъединицы от префузионного состояния до постфузионного, пептид слияния внедряется в мембрану клетки (Рис. 6В). Три домена HR1 связываются друг с другом, три спирали образованного тримера HR1 взаимодействуют со спиралями домена HR2, формируя шестиспиральный пучок, который опосредует сближение мембран вируса и клетки (Рис. 6Г). Образуется пора слияния (Рис. 6Д), и далее вирусный геном проникает в клетку (Wang *et al.*, 2021b; Jackson *et al.*, 2022).

Таким образом, взаимодействие между RBD и специфическим рецептором клеточной поверхности, отличающимся для разных бетакоронавирусов, вызывает серьезные конформационные изменения в S-белке, которые приводят к слиянию мембран коронавируса и клетки-хозяина.

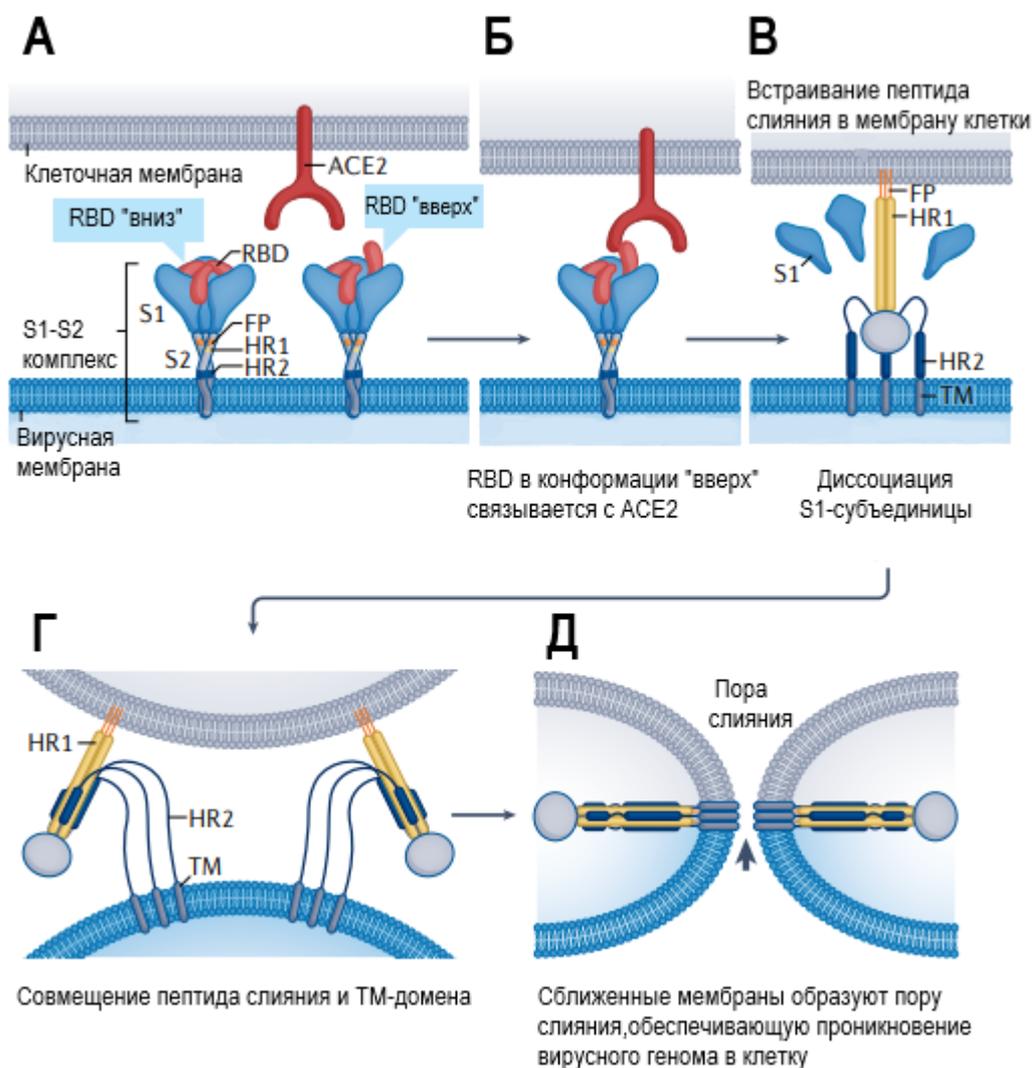


Рисунок 6. Модель индуцированного S-белком SARS-CoV-2 слияния мембран вируса и клетки (адаптировано из статьи Jackson *et al.*, 2022).

А. Тример S-белка в префузионном состоянии флуктуирует между закрытой конформацией (три RBD «вниз») и открытой конформацией (один RBD «вверх»).

Б. RBD связывается с рецептором ACE2.

В. Расщепление по сайту S2' снимает структурные ограничения, и пептид слияния (FP) встраивается в клеточную мембрану. Диссоциация S1-субъединицы вызывает серьезные конформационные изменения S2-субъединицы.

Г. Формируется пучок из трех спиралей гептадного повтора 1 (HR1) и трех спиралей гептадного повтора 2 (HR2), HR2 загибается назад, что приводит к совмещению пептида слияния и трансмембранного домена (TM). S2-субъединица переходит в постфузионное состояние.

Д. Сближение двух мембран, образование поры слияния и проникновение генома вируса в клетку.

Эти события могут происходить либо на плазматической мембране, либо в эндосомальном компартменте.

1.2. Генетические варианты SARS-CoV-2

Распространение нового бетакоронавируса SARS-CoV-2 стало причиной пандемии COVID-19, масштабы которой не идут ни в какое сравнение с масштабами предыдущих вспышек заболеваний SARS и MERS, вызванных бетакоронавирусами SARS-CoV и MERS-CoV, соответственно. Как и все вирусы, SARS-CoV-2 подвержен мутационной изменчивости, с высокими темпами которой связано появление новых генетических вариантов вируса, быстро распространившихся по всему миру. Возникающие мутации затрагивают преимущественно S-белок SARS-CoV-2, в частности домен RBD. С ними связано увеличение скорости распространения вируса, его способности уклоняться от иммунных защитных реакций организма и тяжести вызываемого вирусом заболевания. Появление новых вариантов SARS-CoV-2 привело к снижению эффективности существующих лицензированных вакцин и недостаточной эффективности терапии моноклональными антителами (Flores-Vega *et al.*, 2022).

Вариантом вируса принято называть отдельный вирусный геном, содержащий одну или несколько мутаций, отличающих его от других вирусных геномов (Telenti *et al.*, 2022). Одной из самых ранних значимых мутаций, выявленных у SARS-CoV-2, стала аминокислотная замена D614G, обнаруженная в S-белке. Несмотря на то, что замена D614G находится вне домена RBD, она приводила к усилению связывания S-белка с рецептором ACE2 и повышению трансмиссивности вируса. Мутация D614G быстро стала доминирующей во всем мире и впоследствии была выявлена у всех вариантов SARS-CoV-2 (Korber *et al.*, 2020; Choi & Smith, 2021).

В настоящее время исследователи используют несколько номенклатурных систем для классификации вариантов SARS-CoV-2 по линиям (номенклатура Pango) или кладам (номенклатуры GISAID и Nextstrain). ВОЗ классифицирует варианты SARS-CoV-2 на три типа в зависимости от их геномных мутаций и особенностей распространения, тяжести вызываемого заболевания, а также отклонения от иммунного ответа.

Это варианты, вызывающие интерес, варианты, вызывающие беспокойство, и варианты под наблюдением (Flores-Vega *et al.*, 2022). Чтобы облегчить коммуникацию с общественностью, для обозначения вариантов SARS-CoV-2 ВОЗ предложила использовать буквы греческого алфавита. Наиболее значимыми считаются варианты, вызывающие беспокойство, к которым ранее относились Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон (Табл. 1).

У варианта Альфа присутствует девять мутаций в S-белке, включая мутацию в RBD (Табл. 1), отличающих его от исходного варианта Ухань и увеличивающих трансмиссивность вируса. Были получены данные о повышении риска госпитализации и уровня смертности (Flores-Vega *et al.*, 2022).

Вариант Бета содержит десять мутаций в S-белке, три из них находятся в RBD (Табл. 1) (Mistry *et al.*, 2022). Он характеризуется повышенной скоростью распространения, увеличением риска госпитализации (31%) и летального исхода (17,7%) (Flores-Vega *et al.*, 2022). Было показано, что новые мутации снижают эффективность вакцинации против варианта Бета. Так, если против варианта Альфа эффективность мРНК-вакцины Pfizer-BioNTech (США/Германия) составила 89,5%, то против варианта Бета – 75% (Abu-Raddad *et al.*, 2021). Эффективность рекомбинантной белковой вакцины Novavax (США) составила 85,6% против варианта Альфа и 60% против варианта Бета (Mahase, 2021). Весьма низкую эффективность (10,4%) против варианта Бета показала аденовирусная векторная вакцина Oxford-AstraZeneca (Великобритания/Швеция) (Madhi *et al.*, 2021).

В S-белке варианта Гамма обнаружено 12 мутаций, включая три мутации в RBD, аналогичные варианту Бета (Табл. 1) (Mistry *et al.*, 2022). Было показано снижение нейтрализующей активности плазмы реконвалесцентов и сывороток крови вакцинированных лиц против варианта Гамма, а также снижение эффективности терапии моноклональными антителами (Wang *et al.*, 2021a).

Таблица 1. Циркулировавшие ранее варианты SARS-CoV-2, вызывающие беспокойство.

Наименование ВОЗ	Линия PANGO	Место и дата обнаружения	Некоторые значимые мутации в S-белке и обусловленные ими эффекты	Ссылки
Альфа	V.1.1.7	Великобритания, сентябрь 2020 г.	RBD: N501Y – увеличение аффинности связывания с ACE2. вне RBD: D614G; P681H – устойчивость к противовирусному действию интерферона бета в эпителиальных клетках легких человека.	Ali <i>et al.</i> , 2021; Flores-Vega <i>et al.</i> , 2022; Lista <i>et al.</i> , 2022
Бета	V.1.351	Южная Африка, октябрь 2020 г.	RBD: N501Y, K417N (ускользание от нейтрализующих антител), E484K (уклонение от иммунного ответа). вне RBD: D614G.	Mistry <i>et al.</i> , 2022; Rudan <i>et al.</i> , 2022
Гамма	P.1	Япония и Бразилия, ноябрь 2020 г.	RBD: N501Y, K417T, E484K. вне RBD: D614G.	Flores-Vega <i>et al.</i> , 2022; Mistry <i>et al.</i> , 2022
Дельта	V.1.617.2	Индия, декабрь 2020 г.	RBD: L452R (устойчивость вируса к моноклональным антителам), T478K (уклонение от иммунного ответа). вне RBD: D614G; P681R – усиление расщепления S-белка на S1- и S2-субъединицы.	Liu <i>et al.</i> , 2022; Mistry <i>et al.</i> , 2022; Rudan <i>et al.</i> , 2022
Омикрон	V.1.1.529	Южная Африка, ноябрь 2021 г.	RBD: N501Y, K417N, T478K, E484A. вне RBD: D614G, P681H.	Flores-Vega <i>et al.</i> , 2022

У варианта Дельта присутствует 11 мутаций в S-белке, причем мутации в RBD отличаются от предшествующих вариантов (Табл. 1) (Flores-Vega *et al.*, 2022). Для данного варианта было показано снижение титров нейтрализующих антител в плазме людей, иммунизированных мРНК-вакциной Moderna (США), в 2,6 раз по сравнению с вариантом D614G (McCallum *et al.*, 2021). Вируснейтрализующая активность сывороток крови людей, вакцинированных аденовирусной векторной вакциной Sputnik V (Россия), статистически значимо снизилась в 3,1, 2,8 и 2,5 раза в отношении вариантов Бета, Гамма и Дельта, соответственно (Gushchin *et al.*, 2021). Эффективность таких вакцин, как Pfizer-BioNTech и Novavax оценивается на уровне 85% и 60%, соответственно, как против варианта Гамма, так и против варианта Дельта (Sevik *et al.*, 2021). Вариант Дельта распространился по всему миру как среди полностью вакцинированных, так и среди непривитых людей. К июню 2021 г. он стал доминирующим в мире (Flores-Vega *et al.*, 2022).

Вариант Омикрон имеет более 30 мутаций в S-белке, среди них есть мутации, описанные и для других вариантов (Табл. 1) (Flores-Vega *et al.*, 2022). Появление этого нового варианта могло быть связано с эволюцией вируса у лиц с ослабленным иммунитетом (Kumar *et al.*, 2022). Существует предположение, что переход от варианта Дельта к варианту Омикрон был обусловлен в первую очередь уклонением от иммунного ответа и в меньшей степени присущим варианту Омикрон повышением базовой трансмиссивности (Lyngse *et al.*, 2022). Некоторые исследования показали, что скорость репликации в клетках легких у варианта Омикрон ниже, чем у варианта Дельта (Zhao *et al.*, 2022). В работах, посвященных исследованию эффективности вакцин против варианта Омикрон, было показано, что трехкратная иммунизация мРНК-вакцинами Pfizer-BioNTech или Moderna способствует повышению эффективности нейтрализующих антител в отношении варианта Омикрон, как и комбинация аденовирусной векторной вакцины Janssen (Нидерланды/США) с бустерной дозой Moderna (Garcia-Beltran *et al.*, 2022). Эпидемиологическая эффективность в отношении защиты

от госпитализации пациентов с COVID-19 в период доминирования варианта Омикрон составила 85,9% для тех, кто получил более одной дозы вакцины Sputnik V, 87,6% и 97,0% для тех, кто получил более двух и более трех доз вакцины, соответственно (Shkoda *et al.*, 2022).

15 марта 2023 г. ВОЗ обновила систему отслеживания вариантов SARS-CoV-2. Согласно внесенным изменениям варианты Альфа, Бета, Гамма, Дельта, а также родительская линия Омикрон (B.1.1.529) теперь считаются ранее циркулировавшими вариантами, вызывающими беспокойство. По состоянию на август 2023 г. только некоторые подварианты Омикрона рассматриваются в качестве вариантов, вызывающих интерес, либо вариантов под наблюдением (ВОЗ, 2023). Однако ВОЗ отмечает, что циркулирующие сублинии варианта Омикрон по-прежнему могут представлять опасность для населения. В связи с этим, актуальными остаются задачи разработки эффективных вакцин и диагностических средств, а также изучение протективности уже существующих и одобренных к применению вакцин против COVID-19.

1.3. Рекомбинантные белковые вакцины против SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2

В условиях пандемии новой коронавирусной инфекции появилась необходимость создания эффективных вакцин против COVID-19. Количество разработанных и дошедших до клинических исследований вакцин против COVID-19 несопоставимо больше количества вакцин против SARS и MERS. Однако результаты разработок вакцин против SARS и MERS стали начальной точкой для создания актуальной вакцины против новой коронавирусной инфекции.

Одними из наиболее перспективных с точки зрения безопасности применения и минимизации побочных эффектов можно считать рекомбинантные белковые вакцины. С самого начала пандемии COVID-19 разработке рекомбинантных белковых вакцин было уделено меньше внимания, чем, например, разработке вакцин на основе нуклеиновых кислот

или векторных вакцин. Тем не менее, у вакцин на основе рекомбинантных белков есть определенные преимущества, в первую очередь, это высокий профиль безопасности. Также рекомбинантные белковые вакцины могут служить идеальным дополнением при двухэтапной вакцинации (режим «прайм-буст»). Наконец, рекомбинантные белковые вакцины, в отличие от мРНК- и вакцин на основе вирусных векторов, менее требовательны к процессам производства, хранения и транспортировки (Pollet *et al.*, 2021a).

1.3.1. Принципы создания вакцин

Основные иммунологические принципы вакцинации против бетакоронавирусных инфекций заключаются в том, что эффективная вакцина должна индуцировать выработку вируснейтрализующих антител и формировать устойчивый ответ как CD4⁺ (Т-хелперных, Th), так и CD8⁺ (цитотоксических) Т-клеток (Jeyanathan *et al.*, 2020). Титры нейтрализующих антител коррелировали с количеством Т-клеток у реконвалесцентов, перенесших COVID-19 (Ni *et al.*, 2020).

Ряд исследований продемонстрировал, что для вакцины против бетакоронавирусов предпочтительными характеристиками являются сбалансированный CD4⁺/CD8⁺ Т-клеточный ответ или преобладающий ответ Т-хелперов 1-го типа (Th1), с меньшей вероятностью вызывающие иммунопатологические реакции в отличие от Th2-поляризованного ответа (Agrawal *et al.*, 2016; Swanson *et al.*, 2021).

При выборе антигена для дизайна рекомбинантной белковой вакцины против бетакоронавирусных инфекций можно выделить несколько основных стратегий. Первая стратегия заключается в применении в составе вакцины в качестве антигена полноразмерного S-белка. Считается, что префузионная конформация тримера S-белка наиболее оптимальна для индукции максимального иммунного ответа и предлагается в качестве одной из основных мишеней для разработки вакцин. Однако префузионное состояние, как правило, является очень нестабильным. Существует несколько подходов белковой инженерии, позволяющих решить эту проблему. Первый подход

заключается во введении двух остатков пролина (позиции 986 и 987 для SARS-CoV-2) в последовательность S2-субъединицы между гептадным повтором 1 и центральной спиралью. Эти мутации не подавляют подвижность RBD в составе SARS-CoV-2 (Riley *et al.*, 2021). Другие два подхода к стабилизации префузионного состояния изолированного S-белка заключаются в удалении сайта расщепления фурином (SARS-CoV-2 и MERS-CoV) и замене последовательностей TM- и СТ-доменов на искусственный мотив тримеризации (Pallesen *et al.*, 2017; Chakraborty *et al.*, 2021).

Ранее в одном из исследований, посвященном разработке вакцины на основе полноразмерного S-белка против SARS-CoV (Kam *et al.*, 2007), было показано, что с применением данной вакцины ассоциирован такой неблагоприятный эффект как антителозависимое усиление инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE). Поэтому вторая стратегия при разработке вакцин заключается в использовании в качестве антигена не полноразмерного S-белка, а его фрагментов, и исключении нежелательных эпитопов при дизайне генно-инженерных конструкций. Так, для SARS-CoV было доказано, что за ADE ответственны антитела к эпитопу S597-603 S1-субъединицы (Wang *et al.*, 2016). В классическом варианте при ADE специфические IgG формируют непрочные комплексы с вирусом, помогая ему проникать в клетки иммунной системы, несущие рецептор FcγRII (Нечипуренко *и др.*, 2020). Эффект ADE связывают с ненейтрализующими антителами или нейтрализующими антителами в неоптимальных концентрациях (Vangelista & Secchi, 2020). И поскольку основной мишенью вируснейтрализующих антител является RBD, именно его часто используют при разработке вакцин (Robbiani *et al.*, 2020; Zost *et al.*, 2020). Однако в недавнем исследовании был описан новый механизм ADE. Нейтрализующее моноклональное антитело (MAT), специфичное к RBD MERS-CoV, способствовало проникновению вируса в иммунные клетки *in vitro*. MAT распознавало RBD S-белка исключительно в ориентации «вверх», способствующей слиянию. Взаимодействие с S-белком индуцировало его

конформационные изменения, при этом МАТ связывалось с Fc-рецептором, и комплекс «антитело/Fc-рецептор» обеспечивал проникновение вируса в иммунные клетки (Wan *et al.*, 2020). Таким образом, подвижность RBD должна быть учтена при разработке вакцин и терапевтических средств, и можно предположить, что вероятность эффекта ADE меньше, если антитела нацелены на другие участки S-белка и не вызывают изменений его конформации.

Также существует подход к конструированию вакцин на основе картированных линейных В- и Т-клеточных эпитопов. Для этого синтезируют короткие частично перекрывающиеся пептиды и определяют среди них иммуногенные. Li с соавторами (2021b) для выявления линейных В-эпитопов S-белка синтезировали 211 частично перекрывающихся коротких пептидных фрагментов и определили для каждого пептида, реагирует ли он с антителами против SARS-CoV-2 сывороток крови пациентов с диагнозом COVID-19. Было выявлено две области, богатые линейными В-эпитопами. Это С-конец S1-субъединицы и область, близкая к сайту расщепления S2' и пептиду слияния. Интересным результатом оказался тот факт, что в RBD почти нет линейных В-эпитопов (Li *et al.*, 2021b). При составлении карты Т-эпитопов для белков SARS-CoV-2 показано, что в RBD очень мало эпитопов CD4⁺ Т-клеток, в то время как эпитопы CD8⁺ Т-клеток равномерно распределены среди различных антигенов коронавируса (Tarke *et al.*, 2021). Чтобы выявить среди всех белков коронавирусов значимые эпитопы также применяют биоинформатический анализ. Разработанные с помощью такого подхода мультиэпитопные вакцины представлены пептидами, повторяющимися предсказанные методами *in silico* иммуногенные эпитопы коронавирусов.

Стратегия с использованием в качестве вакцинных антигенов других структурных белков, в частности N-белка, в массовых исследованиях не нашла широкого признания. Однако N-белок может быть применен в качестве дополнительного вакцинного антигена. Он содержит Т-клеточные эпитопы и

высококонсервативен среди коронавирусов по сравнению с S-белком (Tiloca *et al.*, 2020; Dai & Gao, 2021).

1.3.2. Экспрессионные системы и адъюванты

Рекомбинантные антигены для белковых вакцин могут быть получены в различных системах экспрессии, таких как *Escherichia coli*, дрожжи, растения, клетки насекомых, клетки млекопитающих. *E. coli* – одна из самых ранних и наиболее широко используемых систем для экспрессии рекомбинантных белков, характеризующаяся быстрым ростом бактерий, простотой их культивирования, а также высоким выходом продукта (Demain & Vaishnav, 2009). Однако она не обеспечивает такие посттрансляционные модификации экспрессированных белков, как гликозилирование, которое может влиять на характер иммунного ответа, и образование дисульфидных связей, влияющих на правильность фолдинга белка и, как следствие, на его растворимость и стабильность (Pollet *et al.*, 2021a). Тем не менее, в ряде работ *E. coli* была применена в качестве системы экспрессии рекомбинантного RBD бетакоронавирусов (Du *et al.*, 2009; Ke *et al.*, 2022). Известно, что в отличие от других участков S-белка, поверхность RBD не так существенно экранирована гликанами от распознавания антителами (Dai & Gao, 2021).

Часто для получения рекомбинантных белков используют еще одну, ставшую классической, систему экспрессии – дрожжи. С ними проще и дешевле работать, чем с клетками насекомых или млекопитающих, они легко поддаются генетическим манипуляциям и легко адаптируются к процессам ферментации. Двумя наиболее часто используемыми штаммами дрожжей являются *Saccharomyces cerevisiae* и метилотрофы *Pichia pastoris* (Demain & Vaishnav, 2009). В клетках дрожжей происходит гликозилирование только секретлируемых белков. Поэтому для получения рекомбинантных гликозилированных белков необходимо использование сигнальных последовательностей, обеспечивающих проникновение белка через клеточную мембрану и его секрецию в культуральную среду. В процессе секреции происходит также образование дисульфидных связей. Секреция

гетерологичного белка в культуральную среду упрощает его очистку (Cereghino & Cregg, 2000; Idiris *et al.*, 2010).

Растения в качестве системы экспрессии сочетают в себе простоту и дешевизну, присущие прокариотам, и способность к посттрансляционным модификациям, свойственным эукариотам. Однако известно, что паттерны гликозилирования существенно различаются у растений и млекопитающих, и на сегодняшний день существуют подходы, направленные на гуманизацию гликозилирования терапевтических белков, экспрессируемых в растительных системах (Розов *и др.*, 2018). Получение рекомбинантных белков в растениях намного безопаснее по сравнению с клетками млекопитающих ввиду низкого риска контаминации вирусами животных, при этом вирусы растений не патогенны для человека (Никитин *и др.*, 2016). Еще одним преимуществом растений является то, что для их выращивания в промышленных масштабах требуется только вода, минеральные удобрения и солнечный свет, в отличие от культивирования клеток млекопитающих – процесса, требующего значительных затрат (Demain & Vaishnav, 2009).

Известно также множество клеточных линий насекомых, например, клеточная линия Sf9, полученная из яичников гусеницы *Spodoptera frugiperda*. Клетки насекомых пригодны для получения растворимых гетерологичных целевых белков (Agathos, 1991). По сравнению с *E. coli* или дрожжами, скорость роста клеток насекомых ниже, среда для их выращивания стоит дороже. Но по сравнению с клетками млекопитающих клетки насекомых могут достигать высоких плотностей за более короткий период времени. Кроме того, как и в клетках млекопитающих, экспрессированные в клетках насекомых рекомбинантные белки имеют правильную конформацию, растворимы и содержат нужные посттрансляционные модификации (Pollet *et al.*, 2021a). Однако, N-гликозилирование в клетках насекомых и млекопитающих не эквивалентно (Shi & Jarvis, 2007), и поэтому, если для правильного функционирования рекомбинантного белка требуется сложное

гликозилирование, клетки насекомых могут оказаться неоптимальной системой для его экспрессии.

Для большинства существующих вакцин против COVID-19 рекомбинантные белки были экспрессированы в культурах клеток млекопитающих, которые в последние годы часто используются для производства различных биофармацевтических препаратов, в том числе антител и вакцинных антигенов. Несмотря на высокую стоимость, клетки млекопитающих ценятся за их способность экспрессировать белки в нативной конформации и с наличием необходимых посттрансляционных модификаций (Tripathi & Shrivastava, 2019). Часто используют такие клеточные линии, как НЕК 293 (Human embryonic kidney 293, получена из почки эмбриона человека) и ее варианты (293F, 293T), ВНК (Baby hamster kidney cells, клетки почки новорожденного хомячка), СНО (Chinese hamster ovary cells, клетки яичника китайского хомячка).

Поскольку индивидуальные рекомбинантные белки обычно вызывают слабый иммунный ответ, большинство вакцин создаются в сочетании с различными адъювантами, усиливающими иммуногенность вакцин. Известны адъюванты на основе минеральных солей, эмульсий, микрочастиц, сапонинов, цитокинов и хемокинов, микробных компонентов/продуктов, липосом, нуклеиновых кислот и нуклеотидов, полисахаридов и др. (Apostólico *et al.*, 2016; Sarkar *et al.*, 2019). В доклинических исследованиях разрабатываемых рекомбинантных белковых вакцин против бетакоронавирусов были применены полный и неполный адъювант Фрейнда; Sigma Adjuvant System [SAS, альтернатива адъюванту Фрейнда, монофосфорил-липид А (MPL) + дикориномиколат трегалозы (TDM) в 2%-й эмульсии сквалена/твина-80]; и др. В таблице 2 представлены примеры адъювантов в составе рекомбинантных белковых вакцин против COVID-19, допущенных к клиническим исследованиям.

Таблица 2. Некоторые адъюванты, используемые в составе рекомбинантных белковых вакцин против COVID-19, допущенных к клиническим исследованиям*.

Адъювант	Состав	Основной механизм действия	Пример вакцины
Соединения алюминия	Гидроксид алюминия, фосфат алюминия и др.	Эффект депо, усиление фагоцитоза антигена, активация инфламмосомы NLRP3 (Pollet <i>et al.</i> , 2021a)	Abdala
CpG-олигодезоксинуклеотиды (CpG ODN)	Синтетические олигодезоксинуклеотиды, содержащие неметилированные CpG повторы	Агонисты толл-подобного рецептора 9 (TLR9) (Apostólico <i>et al.</i> , 2016)	MVC-COV1901
Montanide ISA51 и 720	Эмульсии, состоящие из масел и поверхностно-активного вещества моноолеата маннида	Депо антигена, привлечение антиген-презентирующих клеток, индукция миграции лимфоцитов в дренирующие лимфатические узлы (Aucouturier <i>et al.</i> , 2002)	AKS-452
MF59	Адъювант на основе эмульсии сквалена	Индукция выработки цитокинов и хемокинов, привлечение иммунных клеток (Apostólico <i>et al.</i> , 2016)	Sclamp
Advax	Адъювант на основе дельта-инулина	Активация комплемента по альтернативному пути, не индуцирует выработку провоспалительных цитокинов, тем не менее, усиливает гуморальный и клеточный ответы (Petrovsky & Cooper, 2015)	COVAX-19

Matrix-M	Адьювант на основе сапонинов	Индукция миграции лейкоцитов в дренирующие лимфатические узлы (Bengtsson <i>et al.</i> , 2013)	NVX-CoV2373
AS03	Масляная эмульсия, содержащая сквален, α -токоферол и полисорбат 80	Действие аналогично адьюванту MF59, а также усиление поглощения антигена, в частности моноцитами, презентация антигена в дренирующих лимфатических узлах (Sarkar <i>et al.</i> , 2019)	Vidprevtyn Beta
PIKA	Синтетический химический аналог дцРНК, полиинозиновая-полицитидиловая кислота с канамицином и кальцием	Агонист TLR3 (Wijaya <i>et al.</i> , 2017)	PIKA COVID-19 Vaccine
ALFQ	Липосомы, содержащие сапонин QS-21 и синтетический аналог монофосфорил-липида А (3D-PHAD [®]) – детоксифицированного производного липополисахарида грамотрицательной бактерии <i>Salmonella minnesota</i>	MPL является агонистом TLR4, сапонин QS21 активирует NLRP3 (Didierlaurent <i>et al.</i> , 2009; Cawlfeld <i>et al.</i> , 2019)	SpFN COVID-19 Vaccine
XS15	Синтетический липопептид	Агонист TLR1 и TLR2 (Heitmann <i>et al.</i> , 2022)	CoVac-1

Примечание: * - рекомбинантных белковых вакцин против SARS и MERS, допущенных к клиническим исследованиям, на данный момент нет.

Подбор адъюванта является важным этапом в разработке эффективных и безопасных белковых, а также инактивированных вакцин. Показано, что адъювант на основе полисахарида дельта-инулина не только повышает титр нейтрализующих антител, но также снижает эозинофильную иммунопатологию легких – неблагоприятный вакцинно-индуцированный эффект, который наблюдали, например, при исследовании инактивированной вакцины против SARS-CoV (Bolles *et al.*, 2011; Honda-Okubo *et al.*, 2015). Этот же эффект можно избежать при включении в состав вакцины адъювантов-агонистов TLR (Iwata-Yoshikawa *et al.*, 2014).

1.3.3. S-белок – основной вакцинный антиген

Среди всех белков бетакоронавирусов наиболее перспективным антигеном при разработке рекомбинантных вакцин стал S-белок. Известно, что в сыворотках крови пациентов, переболевших COVID-19, выявляются антитела к структурным белкам S и N, в некоторых исследованиях также сообщается об обнаружении антител к вспомогательным белкам Orf8, Orf3b, Orf9b и неструктурному белку Nsp5 (Hachim *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2020a). Однако именно S-белок индуцирует выработку нейтрализующих антител, которые блокируют проникновение вируса в клетку (Martínez-Flores *et al.*, 2021). Большая часть вакцин против бетакоронавирусов включает в качестве антигена S-белок или его домен RBD.

1.3.3.1. Вакцины на основе полноразмерного S-белка

SARS. В работе He с соавторами (2006) были получены рекомбинантные полноразмерный S-белок SARS-CoV и его эктодомен [т.е. участок S-белка без трансмембранного (TM) и цитоплазматического (CT) доменов]. Рекомбинантные белки экспрессировали в клетках насекомых. В качестве адъюванта использовали MPL + TDM (Sigma). В исследовании было продемонстрировано, что оба рекомбинантных белка индуцировали высокие титры нейтрализующих антител против псевдовирусов SARS-CoV, экспрессирующих S-белок штаммов Tor2 и GD03 (штаммы SARS-CoV

человека, выделенные от заболевших во время вспышек 2002–2003 гг. и 2003–2004 гг., соответственно), а также штамма SZ3, выделенного от пальмовой циветы (He *et al.*, 2006).

Kam с соавторами (2007) получили в клетках млекопитающих ВНК рекомбинантный полноразмерный S-белок SARS-CoV и показали, что при экспрессии он образует преимущественно тримеры. Рекомбинантный S-белок (triSpike) в сочетании с адьювантом на основе геля гидроксида алюминия индуцировал выработку нейтрализующих антител против SARS-CoV. Однако в данном случае антитела к S-белку способствовали проникновению вируса в В-клетки, опосредуя тем самым эффект ADE, что вызвало серьезные опасения по поводу использования полноразмерного S-белка в качестве мишени для вакцины против SARS (Kam *et al.*, 2007; Jaume *et al.*, 2012).

Для разработки вакцинного кандидата против SARS также был применен подход, заключающийся в замене последовательностей TM- и CT-доменов S-белка на искусственный мотив тримеризации (Li *et al.*, 2013). При экспрессии в эукариотических системах рекомбинантный эктодомен S-белка (без TM- и CT-доменов) существует преимущественно в мономерной форме (Song *et al.*, 2004). Поэтому чтобы получить тримеризованную форму, Li с соавторами (2013) соединили эктодомен S-белка SARS-CoV с мотивом тримеризации фибритина бактериофага T4 – фолдоном (foldon). Мономер эктодомена S-белка (S) и его тример (S-foldon) были экспрессированы в клетках насекомых Sf9. У иммунизированных мышей S-foldon индуцировал значительно более высокий титр нейтрализующих антител, чем мономерный эктодомен S-белка. Также была исследована протективная эффективность рекомбинантных белков. У групп мышей, иммунизированных антигенами S и S-foldon в сочетании с адьювантом на основе геля гидроксида алюминия + MPL, SARS-CoV в легких после заражения не обнаруживался, в отличие от контрольной группы, иммунизированной PBS + адьювант (Li *et al.*, 2013).

MERS. Для получения тримеризованного эктодомена S-белка MERS-CoV в работе Pallesen с соавторами (2017) был применен аналогичный подход с использованием мотива тримеризации фибритина фага T4. В клетках млекопитающих 293F был экспрессирован растворимый тримеризованный эктодомен S-белка в префузионной конформации, стабилизация которой была достигнута за счет двух пролиновых мутаций (V1060P и L1061P) и замены сайта расщепления протеазой фурином (748-RSVR-751 -> ASVG). Рекомбинантный белок в сочетании с адьювантом SAS в анализе *in vitro* индуцировал у мышей высокий титр антител, обладающих нейтрализующей активностью против псевдовирuses, экспрессирующих S-белок различных штаммов MERS-CoV: Bisha1, Buraidah1, Florida USA2, Indiana USA1, JordanN3 и Korea002 (Pallesen *et al.*, 2017).

COVID-19. Вакцина NVX-CoV2373 (Nuvaxovid) (Табл. 3) представляет собой префузионно стабилизированные тримеры полноразмерного S-белка, собранные в наночастицы. Стабильность белка была достигнута за счет замены сайта расщепления фурином (682-RRAR-685 -> QQAQ) на стыке S1/S2 и двух пролиновых мутаций (K986P и V987P) (Tian *et al.*, 2021). Успешные испытания на животных моделях позволили перейти к клиническим исследованиям, подтвердившим эффективность и безопасность вакцины (Keech *et al.*, 2020). Вакцина NVX-CoV2373 обеспечивает 89,7% защиту от инфекции SARS-CoV-2 [согласно опубликованным результатам клинических исследований фазы 3, проведенных в Великобритании (Heath *et al.*, 2021)] и 92,6% [согласно результатам клинических исследований фазы 3, проведенных в США и Мексике (Dunkle *et al.*, 2022)].

Вакцина MVC-COV1901 (Табл. 3) получена на основе префузионно стабилизированного тримеризованного эктодомена S-белка. С целью повышения стабильности антигена были осуществлены две замены K986P и V987P и мутирован сайт расщепления фурином (682-RRAR-685 -> GSAS). Эктодомен S-белка соединили с мотивом тримеризации фибритина фага T4

(Kuo *et al.*, 2020). Клинические исследования показали, что вакцина MVC-COV1901 индуцирует высокие титры нейтрализующих антител, безопасна, хорошо переносится и редко вызывает лихорадку, как у молодых, так и у пожилых людей (Hsieh *et al.*, 2021).

Вакцина COVAX-19 (SpikoGen) (Табл. 3) основана на эктодомене S-белка с удаленным сайтом расщепления фурином. Интересно, что, как сообщают авторы, исследование сконструированного рекомбинантного антигена методом молекулярно-динамического моделирования показало его способность образовывать стабильный тример, несмотря на отсутствие трансмембранного и цитоплазматического доменов и мотива тримеризации. Доклинические исследования продемонстрировали, что у мышей вакцина индуцировала высокие титры нейтрализующих антител и вызывала формирование CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти (Li *et al.*, 2021a). У иммунизированных хомяков, которых заражали SARS-CoV-2, наблюдали снижение вирусной нагрузки в ротоглотке, легких и тканях носовых раковин (Li *et al.*, 2022). Вакцина COVAX-19 имеет приемлемый профиль безопасности и переносимости без серьезных побочных эффектов (Tabarsi *et al.*, 2022). Две дозы вакцины, введенные с интервалом в три недели, обеспечивают значительное снижение риска развития тяжелого заболевания COVID-19, вызванного вариантом Дельта (Tabarsi *et al.*, 2023).

Вакцина Vidprevtyn (Табл. 3) разработана на основе префузионно стабилизированного тримера S-белка (осуществлены замены K986P и V987P, замена 682-RRAR-685 -> GSAS, TM- и CT- домены заменены на мотив тримеризации фибритина фага T4) (Francica *et al.*, 2021). Неожиданными оказались предварительные результаты фазы 1/2 клинических исследований – вакцина не смогла вызвать эффективный иммунный ответ у людей старше 60 лет, также была отмечена более высокая, чем ожидалось, реактогенность после второй вакцинации. Во время исследования характеристик конечной лекарственной субстанции выяснилось, что уровень содержания остаточных

белков клеток-продуцента оказался выше, чем было заявлено перед началом клинических испытаний, соответственно, концентрация антигена в вакцинном препарате была существенно меньше (примерно в 4–6 раз), чем планировалось. К моменту обнаружения данного факта участники исследования получили, по крайней мере, одну дозу вакцины. Таким образом, для продолжения клинических испытаний вакцины была необходима оптимизация ее состава (Goepfert *et al.*, 2021). В дальнейшем данные клинических исследований фазы 2 показали, что вакцина обладает приемлемым профилем иммуногенности, безопасности и реактогенности, в том числе у лиц в возрасте 60 лет и старше и лиц с заболеваниями, сопряженными с высоким риском для жизни (Sridhar *et al.*, 2022). В Европе вакцина Vidprevtyn, включающая S-белок варианта Бета SARS-CoV-2, одобрена к применению в качестве однократной бустерной дозы для лиц, прошедших вакцинацию мРНК- или аденовирусной векторной вакциной против COVID-19 (EMA, 2022).

Вакцина SCB-2019 включает эктодомен S-белка, соединенный с мотивом тримеризации Trimer-Tag (C-пропептид $\alpha 1$ -цепи коллагена I типа человека). S-тример в сочетании с разными адьювантами (Табл. 3) индуцировал высокие уровни нейтрализующих антител и Th1-зависимый клеточный ответ у модельных животных, а также защищал нечеловекообразных приматов от заражения SARS-CoV-2 (Liang *et al.*, 2021). Клинические исследования фазы 1 показали, что вакцина вызывает гуморальный и клеточный ответы, индуцирует высокий уровень вируснейтрализующих антител (Richmond *et al.*, 2021). Клинические исследования фазы 2/3, в которых вакцину SCB-2019 применяли в сочетании с адьювантом CpG 1018 + гидроксид алюминия, показали, что две дозы вакцины обеспечивают защиту от SARS-CoV-2, в среднем эффективность составила 67,2% (Bravo *et al.*, 2022).

Вакцина PIKA COVID-19 Vaccine (Табл. 3) содержит эктодомен S-белка, соединенный с мотивом тримеризации фибритина фага T4. Для стабилизации белка в префузионной конформации была осуществлена замена в сайте расщепления фурином 682-RRAR-685 -> GSAS, а также замены K986P и V987P. Доклинические исследования продемонстрировали, что вакцина индуцирует устойчивые клеточный и гуморальный ответы, а также выработку нейтрализующих антител, высокий уровень которых сохраняется в течение не менее 400 дней. Исследование протективной эффективности вакцины на нечеловекообразных приматах показало, что индуцированные вакциной нейтрализующие антитела защищают от репликации вируса в легких животных после заражения SARS-CoV-2 (Liu *et al.*, 2021).

Вакцина SpFN COVID-19 Vaccine (Табл. 3) представлена наночастицами ферритина *Helicobacter pylori*, содержащими участок эктодомена S-белка (12–1158 а.о.), модифицированный путем введения двух остатков пролина (K986P и V987P) и замены сайта расщепления фурином (682-RRAR-685 -> GSAS). Соединение антигена с ферритином обеспечивает формирование тримеров, стабилизация образования которых была достигнута за счет введения мутаций (P1143S, F1148I, Y1155I, F1156H) в последовательность С-концевого гептадного повтора S-белка, для увеличения спираль-спиральных взаимодействий (Joyce *et al.*, 2021). В доклинических исследованиях была продемонстрирована иммуногенность вакцины, ее способность индуцировать выработку нейтрализующих антител и формирование Т-клеток (Carmen *et al.*, 2021; Joyce *et al.*, 2022). Исследование на приматах показало протективный эффект вакцины – быструю элиминацию вируса из дыхательных путей и легких после заражения высокими дозами SARS-CoV-2 (Joyce *et al.*, 2022).

Неоднозначные результаты были получены в ходе фазы 1 клинических исследований вакцины Sclamp (Квинслендский университет, Австралия) на основе тримеризованного эктодомена S-белка, стабилизированного с помощью «молекулярного зажима». «Молекулярный зажим» представляет

собой мотив тримеризации, включающий фрагменты гликопротеина gp41 (540–576 а.о. и 619–656 а.о.) ВИЧ-1, которые формируют стабильный пучок из шести спиралей. Включение этих последовательностей позволяет получать тримеризованный S-белок, стабилизированный в префузионной конформации (Watterson *et al.*, 2021). В целом, данная рекомбинантная вакцина в сочетании с адъювантом MF59 вызывала сильный иммунный ответ, однако последовательности гликопротеина gp41, присутствующие в «зажиме», создавали препятствия для диагностического анализа на ВИЧ, что не позволило в дальнейшем применять эту вакцину (Chappell *et al.*, 2021), и проект был остановлен.

1.3.3.2. Вакцины на основе рецептор-связывающего домена S-белка

При разработке вакцин против бетакоронавирусных инфекций внимание многих исследователей было сфокусировано на RBD, поскольку в основном нейтрализующие антитела направлены именно к этому домену S-белка и блокируют связывание вируса с клеточным рецептором (Tay *et al.*, 2020). Кроме того, использование отдельных фрагментов S-белка для получения вакцинного антигена может помочь минимизировать возможные нежелательные иммунопатологии, например, эффект ADE, который наблюдали при применении вакцинных кандидатов против SARS на основе полноразмерного S-белка (Kam *et al.*, 2007; Jaume *et al.*, 2012). Вакцинные кандидаты, разработанные на основе рекомбинантного RBD S-белка SARS-CoV или MERS-CoV, индуцировали синтез высоких титров нейтрализующих антител, при этом ассоциированных с их применением каких-либо выраженных иммунопатологических эффектов отмечено не было (He *et al.*, 2004; Du *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2009; Tai *et al.*, 2016).

SARS. Du с соавторами (2009) получили рекомбинантные RBD (rRBD) SARS-CoV в различных системах экспрессии, таких как клетки млекопитающих (293T), клетки насекомых (Sf9) и *E. coli*, и сравнили полученные rRBD при тестировании их эффективности на мышинной модели.

Все три белка rRBD сохраняли нативную конформацию, при введении совместно с адьювантом SAS индуцировали сильный иммунный ответ и защищали мышей от SARS-CoV – нейтрализующие антитела подавляли репликацию вируса в тканях легких. Авторы сделали вывод о том, что любая из представленных в исследовании экспрессионных систем может быть использована для производства рекомбинантных белковых вакцин на основе rRBD против SARS (Du *et al.*, 2009).

Одним из подходов при создании вакцин является получение слитых белков, содержащих целевой антиген и кристаллизующийся фрагмент (fragment crystallizable region, Fc) иммуноглобулина IgG человека. Fc-домен способствует правильному фолдингу слитого белка и может улучшить растворимость и стабильность молекулы-партнера (Carter, 2011). Присоединенный Fc-домен также позволяет слитым белкам взаимодействовать с Fc-рецепторами, расположенными на иммунных клетках, что особенно важно для их использования в вакцинах (Nimmerjahn & Ravetch, 2008). Для разработки вакцинных кандидатов против SARS на основе RBD был применен подход с использованием Fc-фрагмента IgG1 человека. Было показано, что RBD-Fc индуцировал выработку нейтрализующих антител против SARS-CoV у иммунизированных кроликов и мышей (He *et al.*, 2004). После иммунизации RBD-Fc нейтрализующие антитела могли сохраняться в течение 12 месяцев, защищая большинство иммунизированных мышей от SARS-CoV (Du *et al.*, 2007).

MERS. Был разработан вакцинный кандидат на основе rRBD вируса MERS-CoV, полученного в клетках насекомых. Иммуногенность была протестирована на мышах в комбинации с различными адьювантами. Иммунизация путем внутримышечной инъекции rRBD в сочетании с гидроксидом алюминия + CpG приводила к развитию RBD-специфического гуморального и клеточного иммунитета. rRBD в комбинации с неполным адьювантом Фрейда + CpG после подкожной инъекции индуцировал сильные

RBD-специфические антитела и Т-клеточный ответ, но при этом уровень нейтрализующих антител был низким (Lan *et al.*, 2014). Вакцинный кандидат на основе rRBD вируса MERS-CoV вместе с гидроксидом алюминия индуцировал значительный уровень нейтрализующих антител и Т-клеточного иммунитета у макак-резусов, а также облегчал течение пневмонии и обеспечивал снижение вирусной нагрузки при заражении MERS-CoV (Lan *et al.*, 2015).

Тримеризованный белок RBD-Fd был получен путем слияния RBD вируса MERS-CoV с мотивом тримеризации фибритина фага T4. В качестве экспрессионной системы использовали клетки млекопитающих 293Т. RBD-Fd связывался с DPP4 – молекулой, выступающей в роли рецептора для MERS-CoV, индуцировал у мышей продукцию устойчивых RBD-специфических нейтрализующих антител, в сочетании с адьювантом на основе алюминия защищал трансгенных мышей от летального исхода при заражении MERS-CoV (Tai *et al.*, 2016).

Подход с использованием Fc-фрагмента был применен и при разработке вакцинных кандидатов против MERS-CoV (Du *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2014a, b; Tang *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2016; Nyon *et al.*, 2018). В частности, в работе Zhang с соавторами (2016) был получен в клетках 293Т рекомбинантный белок, представляющий собой RBD вируса MERS-CoV, соединенный с Fc-фрагментом. В сочетании с адьювантом MF59 он индуцировал высокие титры антител изотипов IgG1 и IgG2a, нейтрализующих антител, а также защищал иммунизированных трансгенных мышей от MERS-CoV после заражения (Zhang *et al.*, 2016).

COVID-19. Вакцина Abdala (CIGB-66) (Табл. 3) является примером вакцины на основе мономера RBD. Результаты клинических исследований показали, что она безопасна, хорошо переносится и индуцирует гуморальный иммунный ответ (Hernández-Bernal *et al.*, 2022).

Вакцина ZF2001 (Zifivax) (Табл. 3) была разработана с использованием стратегии «tandem repeat single chain dimer» (sc-dimer, одноцепочечный димер RBD с тандемным повтором) для усиления иммуногенности RBD. В доклинических исследованиях было продемонстрировано, что димер RBD индуцирует 10-100-кратное увеличение титров нейтрализующих антител по сравнению с мономером RBD (Dai *et al.*, 2020). В клинических исследованиях фазы 1 и фазы 2 было показано, что вакцина не вызывает серьезных побочных эффектов. После трехкратной вакцинации уровень сероконверсии нейтрализующих антител достиг 93–100%. Вакцина также индуцировала развитие клеточного ответа, о чем свидетельствовала сбалансированная продукция цитокинов, ассоциированных с Т-хелперами 1 и 2 типа (Yang *et al.*, 2021). Результаты клинических исследований фазы 3 показали, что вакцина ZF2001 безопасна и эффективна против COVID-19 в течение как минимум шести месяцев после полной вакцинации (Dai *et al.*, 2022).

Вакцина Soberana 02 (FINLAY-FR-2) (Табл. 3) представлена несколькими копиями RBD, конъюгированного со столбнячным анатоксином для поддержания стабильности рекомбинантного белка. Вакцина продемонстрировала иммуногенность в доклинических исследованиях (Valdes-Balbin *et al.*, 2021). Согласно опубликованным результатам клинических испытаний фазы 1 и фазы 2а вакцина безопасна, вызывает у лиц в возрасте 19–80 лет иммунный ответ, индуцирует нейтрализующие антитела и специфический Т-клеточный ответ (Eugenia-Toledo-Romaní *et al.*, 2022). Результаты клинических исследований фазы 3 показали эффективность двух доз вакцины Soberana 02 на уровне около 70%, при этом добавление в качестве третьей дозы вакцины Soberana Plus (димер RBD) повышает эффективность до 92% (Toledo-Romaní *et al.*, 2023).

Вакцина Corbevax (BECOV2A) (Табл. 3) содержит рекомбинантный RBD, в последовательность которого введены мутации, способствующие снижению гликозилирования (делеция остатка N331) и агрегации (замена

C538A). Полученный рекомбинантный белок был эквивалентен рекомбинантному RBD дикого типа в анализе связывания ACE2 *in vitro*. Вакцина у мышей индуцировала высокие уровни антиген-специфических IgG и нейтрализующих антител. При применении вакцины в комбинации с гидроксидом алюминия было отмечено смещение в сторону Th2-иммунного ответа. Поэтому при тестировании вакцины в клинических испытаниях в ее состав дополнительно к гидроксиду алюминия был введен адъювант CpG 1018 для индукции более предпочтительного Th1-иммунного ответа (Chen *et al.*, 2021; Pollet *et al.*, 2021b). Данные клинических исследований фазы 1/2 подтвердили иммуногенность и безопасность вакцины (Thuluva *et al.*, 2022). В рамках клинических исследований фазы 3 была оценена эффективность вакцины Corbevax в сравнении с лицензированной во многих странах вакциной на основе аденовирусного вектора Oxford-AstraZeneca. Согласно результатам исследования, обе вакцины обладают сопоставимым профилем безопасности и уровнем сероконверсии анти-RBD IgG. При этом Corbevax индуцировала более высокие титры нейтрализующих антител (Thuluva *et al.*, 2023).

Вакцина GBP510 (SKYCovione) (Табл. 3) представлена самособирающимися белковыми наночастицами, экспонирующими 60 копий RBD с целью увеличения его иммуногенности. Модель белковой наночастицы была разработана с помощью вычислительного дизайна. В доклинических исследованиях было показано, что вакцина индуцирует эффективный гуморальный ответ. Было обнаружено, что антитела вырабатываются также и к наночастице, но их уровень примерно сопоставим или несколько ниже уровня антител, вырабатываемых к RBD. Титры нейтрализующих антител, индуцируемых вакциной, были в 10 раз выше по сравнению с титрами, индуцированными префузионно стабилизированным тримеризованным эктодоменом S-белка (Walls *et al.*, 2020). Вакцина подтвердила свою протективную эффективность на макаках-резус (Arunachalam *et al.*, 2021) и

была допущена к клиническим исследованиям, продемонстрировавшим иммуногенность вакцины и ее хорошую переносимость (Song *et al.*, 2022).

Как и в случае с SARS и MERS, разработчики применяют подходы к разработке вакцин против COVID-19, основанные на соединении RBD и Fc-фрагмента. Вакцина V-01 (Табл. 3) – это гибридная вакцина, в которой RBD слит с интерфероном альфа (IFN α) на N-конце, а на C-конце – с Fc-фрагментом IgG1 человека, за счет которого происходит димеризация; также в состав конструкции входит эпитоп PADRE (pan HLA DR-binding epitope) для усиления ответа CD4⁺ Т-клеток (Wu *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2021b). В доклинических исследованиях вакцина показала протективную эффективность (Sun *et al.*, 2021b). Результаты клинических испытаний продемонстрировали иммуногенность вакцины, способность индуцировать высокие титры нейтрализующих антител, безопасность и хорошую переносимость (Zhang *et al.*, 2021). Вакцина V-01 вызывала устойчивый гуморальный иммунитет у людей, ранее привитых инактивированными вакцинами BBIBP-CorV или CoronaVac (Китай) (Wang *et al.*, 2022c).

Протективность вакцины AKS-452 (Табл. 3), представляющей собой RBD, соединенный с Fc-фрагментом, была подтверждена в доклинических исследованиях (Alleva *et al.*, 2021). Данные клинических испытаний также показали иммуногенность и благоприятный профиль безопасности данной вакцины (Janssen *et al.*, 2022).

Уникальный подход был применен к производству вакцины КВР-201 (Табл. 3), заключающийся в химической конъюгации рекомбинантного антигена RBD-Fc, экспрессированного в *Nicotiana benthamiana*, с вирионами вируса табачной мозаики (ВТМ), модифицированного путем введения реактивного лизина в N-концевой участок белка оболочки (БО). Перед конъюгацией модифицированные вирусные частицы подвергали воздействию ультрафиолетового излучения для инактивации вирусной РНК. Доклинические исследования иммуногенности вакцины продемонстрировали,

что она индуцирует эффективный иммунный ответ у иммунизированных мышей, как в сочетании с адъювантом CpG 7909, так и без него. При этом вакцина без адъюванта индуцировала сбалансированный Th1/Th2-ответ, а вакцина с адъювантом – Th1-направленный ответ. Оба варианта вакцины индуцировали выработку вируснейтрализующих антител (Royal *et al.*, 2021). Вакцина защищала гуманизированных мышей, у которых экспрессируется человеческий ACE2, от летального исхода после заражения SARS-CoV-2 (DeMarco *et al.*, 2021).

Вакцина Betuvax-CoV-2 (Табл. 3) была разработана на основе RBD и Fc-фрагмента IgG1 человека. Рекомбинантный антиген адсорбирован на адъюванте растительного происхождения – бетулине (пентациклический тритерпеноид), формируя сферические частицы (betuspheres, бетусферы). Вакцина индуцирует у мышей выработку высоких титров RBD-специфических антител, вируснейтрализующих антител и развитие T-клеточного иммунитета (Krasilnikov *et al.*, 2022). В клинических исследованиях вакцина показала благоприятный профиль безопасности и способность вызывать сильный гуморальный ответ (Kudriavtsev *et al.*, 2023).

1.3.4. Вакцины на основе нуклеокапсидного N-белка

Большая часть работ посвящена вакцинам на основе S-белка или его RBD, но также имеются данные и о разработках вакцин на основе структурного N-белка.

Экспрессированный в *N. benthamiana* N-белок SARS-CoV вызывал у мышей индукцию антител подклассов IgG1 и IgG2a. Для первой иммунизации использовали полный адъювант Фрейнда, а для второй – неполный адъювант Фрейнда. Во время введения третьей и четвертой доз адъюванты не применяли. Также была показана индукция клеточного ответа (Zheng *et al.*, 2009).

Рекомбинантный белок нуклеокапсида (rN) SARS-CoV, экспрессированный в *E. coli*, в сочетании с адъювантами Montanide ISA51 +

СрG индуцировал у иммунизированных мышей выработку антител преимущественно изотипа IgG2a, т.е. смещение иммунного ответа в сторону Th1. Напротив, после иммунизации белком rN в PBS без адъювантов выработанные антитела относились преимущественно к изотипу IgG1 (Liu *et al.*, 2006).

Известно о разработке вакцины Convacell (Табл. 3) против COVID-19 на основе N-белка. Вакцина индуцировала у лабораторных животных устойчивую продукцию N-специфических IgG антител и N-специфический цитокиновый ответ смешанного Th1/Th2-типа. У мартышек после иммунизации было отмечено развитие N-специфического CD4+/CD8+ Т-клеточного ответа. У иммунизированных сирийских хомяков после заражения SARS-CoV-2 отмечали уменьшение тяжести поражения легких (Rabdano *et al.*, 2023).

Несмотря на то, что вакцины на основе N-белка, как правило, не индуцируют выработку нейтрализующих антител, его применение в составе универсальной вакцины против коронавирусов может способствовать индукции Т-клеточного иммунитета и улучшению перекрестной протективности.

1.3.5. Мультиэпитопные вакцины

Отдельно следует рассмотреть еще один подход, используемый при разработке вакцин против бетакоронавирусов. Это мультиэпитопные вакцины. В основе данного подхода лежит биоинформатический анализ, позволяющий идентифицировать антигенные детерминанты бетакоронавирусов – Т- и В-клеточные эпитопы. Чаще всего ищут Т-клеточные эпитопы, вызывающие длительный иммунный ответ CD4+ и CD8+ Т-клеток. Предсказание В-клеточных эпитопов (и линейных, и конформационных) считается не столь достоверным, кроме того, они не индуцируют сильный гуморальный ответ (Joshi *et al.*, 2020). Потенциальные Т-клеточные эпитопы могут быть предсказаны как для структурных, так и

неструктурных белков, однако в большинстве случаев анализируют последовательность S-белка как основной мишени вакцин против бетакоронавирусов. Использование методов *in silico* оптимизирует процесс разработки вакцины, позволяя включить в ее состав только иммуногенные Т- и В-клеточные эпитопы бетакоронавирусов для эффективной стимуляции клеточного и гуморального ответов. При этом нежелательные эпитопы, которые потенциально могут вызвать различные иммунопатологии, можно исключить при конструировании вакцинного антигена.

SARS и MERS. С использованием биоинформатических подходов для SARS и MERS был предложен дизайн мультивалентных вакцин, содержащих Т- и В-клеточные эпитопы структурных белков S, E, M, N и вспомогательных белков Orf. Методами *in silico* выбранные эпитопы были проверены на возможность их молекулярного взаимодействия с аллелями главного комплекса гистосовместимости. Также для эпитопов белков SARS-CoV было предсказано стабильное молекулярное взаимодействие с рецепторами TLR2 и TLR4, а для эпитопов белков MERS-CoV – с рецептором TLR3 (Srivastava *et al.*, 2018; Srivastava *et al.*, 2019). Авторы данных работ полагают, что поскольку вакцинные кандидаты, разработанные таким способом, содержат Т- и В-клеточные эпитопы, они должны индуцировать как клеточный, так и гуморальный ответы. Однако на данный момент результаты испытаний этих вакцинных кандидатов *in vivo* в публичных источниках не представлены.

COVID-19. Мультиэпитопная вакцина EpiVacCorona (Табл. 3) состоит из коротких пептидов, несущих консервативные линейные В-клеточные эпитопы S-белка SARS-CoV-2, выбор которых был основан на опубликованных пространственных структурах S-белка SARS-CoV и данных о генетических последовательностях SARS-CoV-2. Далее приведены последовательности используемых эпитопов (выделены перекрывающиеся части):

1. ⁴⁵⁴RLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGS⁴⁷⁷ — эпитоп из участка RBD;
2. ¹¹⁸¹KEIDRLNEVAKNLNESLIDLQE¹²⁰² — эпитоп из участка гептадного повтора 2 (HR2);
3. ¹¹⁹¹KNLNESLIDLQELGKYEYIK¹²¹¹ — эпитоп из участка HR2.

На основе данных эпитопов химически были синтезированы пептиды для вакцины и затем конъюгированы с рекомбинантным белком-носителем (патент 2743595C1). Доклинические исследования показали, что у животных вакцина ускоряет элиминацию вируса из верхних дыхательных путей, после заражения SARS-CoV-2 предотвращает развитие пневмонии (Рыжиков *и др.*, 2021a). Вакцина имеет низкую реактогенность (Рыжиков *и др.*, 2021б).

Пептидная вакцина UB-612 (Табл. 3) содержит RBD, слитый с Fc-фрагментом IgG1 человека, и синтетические иммуногенные пептиды на основе высококонсервативных последовательностей S2-субъединицы S-белка, белков N и M вируса SARS-CoV-2. В состав вакцины также входит пептид, полученный из белка слияния вируса кори, для усиления иммунного ответа (запатентованная технология UB1Th1a®) (Wang *et al.*, 2022b). В клинических исследованиях вакцина продемонстрировала благоприятный профиль безопасности, эффективность против вариантов Дельта и Омикрон, пролонгированный В- и Т-клеточный иммунитет (Wang *et al.*, 2022a).

Вакцина CoVac-1 (Табл. 3) состоит из химически синтезированных шести пептидов на основе Т-клеточных эпитопов белков S, E, M, N и Orf8 вируса SARS-CoV-2. Результаты клинических испытаний показали отсутствие серьезных побочных эффектов после вакцинации. У всех участников исследования вакцина индуцировала Т-клеточный ответ, опосредованный Th1- и цитотоксическими Т-клетками (Heitmann *et al.*, 2022).

Таким образом, представленные в литературном обзоре примеры показывают, что рекомбинантные белковые вакцины против COVID-19 (Табл. 3), разработанные с использованием различных подходов и с учетом

предшествующего опыта получения вакцинных кандидатов против SARS и MERS, оказались довольно успешными. Однако даже уже допущенные к клиническим испытаниям вакцины могут продемонстрировать неоднозначные результаты, и проекты могут быть прекращены. Поэтому разработку вакцин не следует останавливать, и только исследование широкого спектра вакцин, в том числе рекомбинантных белковых, позволит контролировать ситуацию с заболеваемостью COVID-19.

Таблица 3. Некоторые рекомбинантные белковые вакцины против COVID-19.

Вакцина	Разработчик	Технология	Система экспрессии	Адьювант	Фаза клинических исследований	Страны, одобренные применение ¹	Ссылки
Полноразмерный S-белок							
<i>NVX-CoV2373 (Nuvaxovid)</i>	Novavax (США)	Префузионно стабилизированные тримеры полноразмерного S-белка, собранные в наночастицы	Клетки насекомых Sf9	Matrix-M	3 (NCT04583995, NCT05556720, NCT05463068, NCT04611802, NCT05249816, NCT05372588)	40 стран (США, страны Европы и другие)	Heath <i>et al.</i> , 2021; Tian <i>et al.</i> , 2021; Dunkle <i>et al.</i> , 2022
<i>MVC-COV1901</i>	Medigen Vaccine Biologics Corporation (Тайвань)/NIAID/Dynavax (США)	Префузионно стабилизированный тримеризованный эктодомен S-белка	Клетки CHO	CpG 1018 и Al(OH) ₃	3 (NCT05426343, NCT05198596, NCT05011526)	Эсватини, Парагвай, Сомалиленд, Тайвань	Kuo <i>et al.</i> , 2020; Hsieh <i>et al.</i> , 2021
<i>COVAX-19 (SpikoGen)</i>	Vaxine (Австралия)/CinnaGen Co. (Иран)	Стабилизированный эктодомен S-белка	Клетки насекомых Tni	Advax-CpG55.2 (Advax-SM)	3 (NCT05542862, NCT05175625, NCT05005559)	Иран	Li <i>et al.</i> , 2021a; Tabarsi <i>et al.</i> , 2023
<i>Vidprevtyn Beta</i>	Sanofi (Франция)/GSK (Великобритания)	Префузионно стабилизированный тримеризованный эктодомен S-белка	Клетки насекомых expresSF+	AS03	3 (NCT05405283, NCT05124171)	30 стран Европы (в качестве бустера) ²	Francica <i>et al.</i> , 2021; Goepfert <i>et al.</i> , 2021; Sridhar <i>et al.</i> , 2022
<i>SCB-2019</i>	Clover Biopharmaceuticals Inc. (Китай)/GSK (Великобритания)/Dynavax (США)	Тример S-белка (запатентованная технология Trimer-Tag)	Клетки CHO	AS03 или CpG 1018 и Al(OH) ₃	3 (NCT05188677, NCT05470803)	-	Richmond <i>et al.</i> , 2021; Bravo <i>et al.</i> , 2022

¹ <https://covid19.trackvaccines.org> (последнее обновление 2 декабря 2022 г.)

² <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vidprevtyn-beta>

<i>PIKA COVID-19 Vaccine</i>	Yisheng Biopharma (Китай)	Префузионно стабилизированный тримеризованный эктодомен S-белка	Клетки CHO	PIKA	2/3 (NCT05463419)	-	Liu <i>et al.</i> , 2021
<i>SpFN COVID-19 Vaccine</i>	US Army Medical Research and Development Command (США)	Наночастицы ферритина, содержащие стабилизированные тримеры S-белка	Клетки Epxi293	ALFQ	1 (NCT04784767)	-	Carmen <i>et al.</i> , 2021; Joyce <i>et al.</i> , 2021; Joyce <i>et al.</i> , 2022
RBD							
<i>Abdala (CIGB-66)</i>	Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB) (Куба)	Мономер RBD	Клетки дрожжей <i>P. pastoris</i>	Гидроксид алюминия	3 RPCEC00000359	Куба, Мексика, Никарагуа, Сент-Винсент и Гренадины, Венесуэла, Вьетнам	Hernández-Bernal <i>et al.</i> , 2022
<i>ZF2001 (Zifivax)</i>	Anhui Zhifei Longcom (Китай)	Димер RBD	Клетки CHO	Гидроксид алюминия	3 (NCT04646590, NCT05107375, NCT05128643, NCT05091411, NCT05616754)	Китай, Колумбия, Индонезия, Узбекистан	Dai <i>et al.</i> , 2022
<i>Soberana 02 (FINLAY-FR-2)</i>	Instituto Finlay de Vacunas (Куба)	Конъюгированная вакцина (RBD+столбнячный анатоксин)	Клетки CHO	Гидроксид алюминия	3 (IFV/COR/09)	Куба, Иран, Никарагуа, Венесуэла	Valdes-Balbin <i>et al.</i> , 2021; Toledo-Romaní <i>et al.</i> , 2023
<i>Corbevax (BECOV2A)</i>	Biological E Limited (Индия)	RBD с мутациями, снижающими гликозилирование и агрегацию	Клетки дрожжей <i>P. pastoris</i>	СрG 1018 (Дупавах) и Al(OH) ₃	3 (CTRI/2021/08/ 036074)	Ботсвана, Индия	Chen <i>et al.</i> , 2021; Thuluva <i>et al.</i> , 2023
<i>GBP510 (SKYCovione)</i>	SK Bioscience Co Ltd (Республика Корея)	Самособирающиеся двухкомпонентные наночастицы, отображающие RBD	Клетки Epxi293F	AS03 (GSK, Великобрита ния)	3 (NCT05501522, NCT05007951)	Республика Корея	Walls <i>et al.</i> , 2020; Song <i>et al.</i> , 2022
<i>V-01</i>	Livzon Mabpharm Inc (Китай)	IFN-PADRE-RBD- Fc димер	Клетки CHO	Гидроксид алюминия	3 (NCT05096832)	Китай	Wang <i>et al.</i> , 2022c

<i>AKS-452</i>	University Medical Center Groningen (Нидерланды)	RBD-Fc	Клетки CHO	Montanide ISA 720	2/3 (CTRI/2021/10/037269)	-	Janssen <i>et al.</i> , 2022
<i>KBP-201</i>	Kentucky Bioprocessing (США)	RBD-Fc	Растения <i>N. benthamiana</i>	СрG	1/2 (NCT04473690)	-	DeMarco <i>et al.</i> , 2021; Royal <i>et al.</i> , 2021
<i>Betuvax-CoV-2</i>	Институт стволовых клеток человека (Россия)	RBD-Fc	Клетки CHO	Бетулин	1/2 (NCT05270954)	-	Krasilnikov <i>et al.</i> , 2022; Kudriavtsev <i>et al.</i> , 2023
Мультиэпитопные вакцины							
<i>EpiVacCorona</i>	Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Россия)	Химически синтезированные иммуногенные пептиды S-белка SARS-CoV-2, конъюгированные с белком-носителем	<i>E. coli</i> для экспрессии белка-носителя (N-белок SARS-CoV-2 и мальтозо-связывающий белок)	Гидроксид алюминия	3 (NCT05021016, NCT04780035)	Россия, Камбоджа, Туркменистан Венесуэла	Патент 2743595C1 Рыжиков <i>и др.</i> , 2021б
<i>UB-612</i>	COVAXX (США)/United Biomedical Inc. Asia (Тайвань)	RBD-Fc и синтетические пептиды N-, M- и S2-белков	Клетки CHO для экспрессии RBD-Fc	UBIth1a [®] , СрG и фосфат алюминия	3 (NCT05293665)	-	Wang <i>et al.</i> , 2022a
<i>CoVac-1</i>	University Hospital Tübingen (Германия)	Химически синтезированные пептиды белков S, E, M, N и Orf8	-	XS15, эмульгированный в Montanide ISA51 VG	1/2 (NCT04954469)	-	Heitmann <i>et al.</i> , 2022
Вакцины на основе N-белка							
<i>Convacell</i>	Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток ФМБА России (Россия)	N-белок	<i>E. coli</i>	Сквалан, α-токоферол, полисорбат 80	1/2 (NCT05156723)	-	Rabdano <i>et al.</i> , 2023

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Плазмиды

Все плазмиды, использованные в работе, были сконструированы на основе вектора pQE-30 (Qiagen, Хильден, Германия). Использовали следующие плазмиды:

1) pQE-Co1 – экспрессионная плазида, содержащая ген, кодирующий белок Co1, который включает RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 (319–541 а.о. в координатах последовательности YP_009724390.1 базы данных GenBank). Ген был получен из перекрывающихся олигонуклеотидов и клонирован в вектор pQE-30 между сайтами рестрикции BamHI и Sall.

2) pQE-PE – экспрессионная плазида, содержащая ген, кодирующий полиэпитопный белок PE. Ген был получен из перекрывающихся олигонуклеотидов и клонирован в вектор pQE-30 между сайтами рестрикции BamHI и HindIII.

3) pQE-CoF – экспрессионная плазида, содержащая ген, кодирующий слитый белок CoF. Ген был получен из двух частично перекрывающихся олигонуклеотидов путем их комплементарного достраивания и последующего клонирования полученного фрагмента двухцепочечной ДНК в вектор pQE-Co1 между сайтами рестрикции Sall и HindIII. Синтез имеющих комплементарные участки прямого (Fwd) и обратного (Rev) олигонуклеотидов, необходимых для получения ДНК-фрагмента, осуществляла компания ЗАО Евроген (Москва, Россия). Последовательности олигонуклеотидов приведены в таблице 4.

Плазмиды pQE-Co1 и pQE-PE были получены компанией ЗАО Евроген. Плазида pQE-CoF была получена в ходе настоящей работы.

Таблица 4. Последовательности олигонуклеотидов, используемых для получения ДНК-фрагмента для создания плазмиды pQE-CoF.

Олигонуклеотид Fwd	5'- TGAC <u>GTTCGACGAAATCGACCGTCTGAACGAAGTTGCTAAAA</u> <u>ACCTG</u> <u>AACGAATCTCTGATTGAC</u> -3'
Олигонуклеотид Rev	5'- TCAG <u>AAGCTTGATGTACTGTTTCGTATTTACCCAGTTCCTGCAG</u> <u>GTCA</u> <u>ATCAGAGATTTCGTTTCAGGT</u> -3'

Примечание: последовательности олигонуклеотидов выделены в соответствии с цветовой кодировкой рисунка 8 (раздел «Результаты и обсуждение»). Сайты рестрикции подчеркнуты. Перекрывающиеся последовательности олигонуклеотидов выделены курсивом. Fwd – прямой олигонуклеотид, Rev – обратный олигонуклеотид.

2.1.2. Клеточные линии, штаммы бактерий, вирус SARS-CoV-2

В работе использовали следующие штаммы *Escherichia coli*:

- 1) XL1-Blue – для амплификации плазмид;
- 2) SG13009 – для экспрессии белков.

Для изучения вируснейтрализующей активности сывороток крови иммунизированных животных использовали линию клеток Vero E6 (ATCC, CRL-1586) (получена из эпителия почки африканской зеленой мартышки) и штамм SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/Moscow_PMVL-4/2020 (GISAID ID: EPI_ISL_470898), выделенный из образца назофарингеального аспирата пациента с COVID-19.

Для исследования безопасности и протективности вакцинного кандидата *in vivo* в отношении экспериментально вызванной формы COVID-19 у лабораторных животных использовали вирус SARS-CoV-2, вариант В (Ухань), который прошел два пассажа через культуру клеток Vero E6. Активность рабочей культуры вируса SARS-CoV-2, определенная методом негативных колоний на суточном монослое культуры клеток Vero E6, составила 6,4 lg БОЕ/мл.

Все эксперименты с SARS-CoV-2 проводили в соответствии с требованиями техники безопасности при работе с патогенами.

2.1.3. Питательные среды и антибиотики

Клетки *E. coli* выращивали в жидких средах 2YT (1,6% триптон, 1% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl) и в агаризованных средах YT (0,8% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,25% NaCl, 1,5% агар). Для приготовления селективных питательных сред использовали антибиотики: для клеток штамма XL1-Blue – ампициллин (61-238-RH, Corning, Корнинг, Нью-Йорк, США) в конечной концентрации 100 мкг/мл; для клеток штамма SG13009 – ампициллин и канамицин (61-176-RG, Corning) в конечной концентрации 100 мкг/мл и 50 мкг/мл, соответственно.

Для экспериментов по определению вируснейтрализующей активности сывороток клетки Vero E6 поддерживали в полной среде DMEM (ПанЭко, Москва, Россия) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС; NuClone, Логан, Юта, США) и 1× раствора пенициллин-стрептомицин (250 ЕД/мл и 250 мкг/мл; ПанЭко).

Для клеток Vero E6, которые использовали для приготовления инфицирующего препарата вируса SARS-CoV-2 (вариант B), в качестве ростовой использовали среду MEM на солевом растворе Хенкса, содержащую 7,5% ФБС. В качестве поддерживающей среды, необходимой для пассажей вируса с целью его накопления, использовали среду аналогичного состава, но с содержанием 2% ФБС.

2.1.4. Растворы и буферы

Буфер для проведения электрофореза ДНК в агарозном геле (ТАЕ): 40 mM Трис-ацетатный буфер (pH 8,0), содержащий 2 mM ЭДТА и бромистый этидий в концентрации 0,5 мг/л.

Буфер для проведения электрофореза белков в полиакриламидном геле (ТГБ) (pH 8,4): 25 mM Трис, 192 mM глицин, 0,1% додецилсульфат натрия (ДСН).

Буфер для подготовки образцов к белковому гель-электрофорезу (1x): 62,5 mM Трис-НСl (pH 6,8), 15% глицерин, 2,26% ДСН, 713 mM β -меркаптоэтанол, 0,04% краситель бромфеноловый синий.

Раствор для окрашивания белковых гелей: 0,22% Кумасси бриллиантовый синий G-250, 40% этанол, 8% уксусная кислота.

Буфер для переноса белков (pH 8,4): 25 mM Трис, 192 mM глицин, 0,1% ДСН, 20% этанол.

TBS: 10 mM Трис-НСl (pH 7,4), 150 mM NaCl.

tTBS: 10 mM Трис-НСl (pH 7,4), 150 mM NaCl, 0,05% твин-20.

PBS (pH 7,4): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,76 mM KH_2PO_4 .

Субстратный буфер для 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) (pH 5,0): 0,102 M Na_2HPO_4 , 50 mM лимонная кислота.

Буферы для выделения и очистки белков:

Буфер А (pH 8,0) – 6 M Гуанидин-НСl, 100 mM NaN_2PO_4 , 10 mM Трис-НСl;

Буфер В (pH 8,0) – 8 M мочевины, 100 mM NaN_2PO_4 , 10 mM Трис-НСl;

Буфер С (pH 6,3) – 8 M мочевины, 100 mM NaN_2PO_4 , 10 mM Трис-НСl;

Буфер D (pH 5,9) – 8 M мочевины, 100 mM NaN_2PO_4 , 10 mM Трис-НСl;

Буфер E (pH 4,5) – 8 M мочевины, 100 mM NaN_2PO_4 , 10 mM Трис-НСl;

Буфер F (без доведения pH) – 8 M мочевины, 200 mM уксусная кислота.

Для приготовления большинства растворов использовали деионизованную воду Milli-Q (Simplicity UV, Merck Millipore, Дармштадт, Германия).

2.1.5. Коммерческие наборы, препараты и реактивы

Для генно-инженерных работ с ДНК использовали: рестриктазы из набора FastDigest Value Pack (K1991, Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс, США) с поставляемым совместно с набором 10x FastDigest буфером или 10x FastDigest Green буфером; фрагмент Кленова ДНК-

полимеразы I *E. coli* (EP0054, Fermentas, Вильнюс, Литва); дНТФ (dNTP Mix по 25 мМ каждого, R1121, Fermentas); Т4 ДНК-лигазу (EL0011, Fermentas) с поставляемым совместно с ферментом 10х буфером для Т4 ДНК-лигазы.

Для иммунохимических работ использовали:

1) кроличьи поликлональные антитела к полноразмерному S-белку SARS-CoV-2 (434243, MyBioSource, Сан-Диего, Калифорния, США) и кроличьи поликлональные антитела к полноразмерному S-белку SARS-CoV (432054, MyBioSource).

2) поликлональные антитела к IgG кролика (W401B, Promega Corporation, Мэдисон, Висконсин, США), конъюгированные с пероксидазой хрена.

3) моноклональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (1G1ccC, Хайтест, Москва, Россия).

4) поликлональные антитела к IgG (ab6728), IgG1 (ab97240), IgG2a (ab97245), IgG2b (ab97250) и IgG3 (ab97260) мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Abcam, Кембридж, Великобритания).

5) поликлональные антитела к IgG морских свинок (706-035-148, Jascskon ImmunoResearch, Вест-Гроув, Пенсильвания, США), конъюгированные с пероксидазой хрена.

2.2. Методы

2.2.1. Получение ДНК-фрагмента путем комплементарного достраивания частично перекрывающихся олигонуклеотидов

Сначала лиофилизированные олигонуклеотиды Fwd и Rev, последовательности которых приведены в таблице 4, разводили водой Milli-Q до конечной концентрации 100 пМ/мкл. Затем в отдельной пробирке, содержащей 39,6 мкл воды Milli-Q и 5 мкл 10х FastDigest буфера, смешивали по 1 мкл каждого олигонуклеотида. Смесь кипятили на водяной бане в течение 5 минут и давали остыть при комнатной температуре. Далее к остывшей смеси добавляли 0,4 мкл дНТФ и 1 мкл фрагмента Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*

и проводили достраивание двуцепочечного фрагмента ДНК в течение 1 часа при температуре +37°C. После этого в течение 15 минут смесь инкубировали при температуре +75°C для инактивации фрагмента Кленова. Затем пробирку убирали в лед, давали смеси охладиться и далее проводили препаративную рестрикцию.

2.2.2. Препаративная рестрикция

Для препаративной рестрикции ДНК вставки (в объеме 50 мкл) и вектора pQE-Co1 (1 мкг вектора, объем реакционной смеси 30 мкл) использовали рестриктазы SalI и HindIII. Рестрикцию проводили в течение 16 часов при температуре +37°C, в 1x FastDigest буфере с добавлением соответствующих рестриктаз (по 1 мкл каждой).

2.2.3. Электрофорез ДНК в агарозном геле

Электрофорез молекул ДНК проводили в буфере TAE в 1% или 2% агарозном геле (в зависимости от длины целевого фрагмента ДНК). Использовали маркеры длин ДНК GeneRuler DNA Ladder Mix (SM0331, Thermo Fisher Scientific). Для подготовки образца раствор исследуемой ДНК смешивали с 6x буфером для нанесения (R0611, Thermo Fisher Scientific). Электрофорез проводили в мини-камере для горизонтального электрофореза SE-1 (Хеликон, Москва, Россия) при постоянном напряжении 70 В и температуре +4°C.

2.2.4. Выделение ДНК из агарозного геля

Для выделения целевых фрагментов ДНК из агарозного геля необходимые участки геля вырезали скальпелем под УФ-лампой ($\lambda=365$ нм). Вырезанные участки геля помещали в пробирки объемом 1,5 мл. Для выделения ДНК использовали реактивы из набора «GeneJET Gel Extraction Kit» (K0691, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя.

2.2.5. Измерение концентрации ДНК

Концентрацию ДНК измеряли с помощью спектрофотометра для микрообъемов NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific) при длине волны 260 нм.

2.2.6. Лигирование

Проведение реакции лигирования фрагментов ДНК осуществляли в 1х буфере для T4 ДНК-лигазы в объеме 30 мкл в течение 1 часа при температуре +14°C, затем смесь инкубировали еще 30 минут при температуре +25°C. Реакционная смесь содержала 180 нг фрагмента вектора pQE-Co1 (длина примерно 4100 нт) с липкими концами по сайтам рестрикции SalI и HindIII, 20 нг вставки (длина примерно 100 нт) с липкими концами по сайтам рестрикции SalI и HindIII, 0,2 mM АТФ (R0441, Fermentas), для проведения реакции использовали 1 единицу активности T4 ДНК-лигазы.

2.2.7. Трансформация клеток *E. coli*

Для трансформации использовали компетентные клетки *E. coli* (штамм XL1-Blue для дальнейшей амплификации и выделения плазмидной ДНК, либо штамм SG13009 для дальнейшей экспрессии рекомбинантных антигенов). В зависимости от эксперимента в пробирки, содержащие 200 мкл культуры бактериальных клеток, добавляли либо 15 мкл лигазной смеси (использовали штамм XL1-Blue), либо 2 мкл плазмидной ДНК с концентрацией 50–100 нг/мкл (использовали штамм SG13009), выдерживали 15 минут при температуре 0°C. Затем инкубировали пробирки в течение 90 секунд при температуре +42°C, после чего переносили в лед. Спустя 5 минут добавляли 800 мкл среды 2YT и инкубировали 40 минут при температуре +37°C. Суспензию клеток рассеивали на чашках Петри с агаризованной средой YT. Среда YT с агаром содержала селективные антибиотики: для клеток штамма XL1-Blue – ампициллин в конечной концентрации 100 мкг/мл, для клеток штамма SG13009 – ампициллин и канамицин в конечной концентрации 100

мкг/мл и 50 мкг/мл, соответственно. Чашки Петри помещали на ночь в термостат (+37°C).

2.2.8. Выделение плазмидной ДНК из клеток *E. coli*

Трансформированный бактериальный клон штамма XL1-Blue переносили в 2–3 мл среды 2YT с ампициллином в конечной концентрации 100 мкг/мл. Клетки выращивали в течение ночи при температуре +37°C при перемешивании 180 об/мин. Далее клетки осаждали центрифугированием (ротор F-45-12-11, мини-центрифуга MiniSpin Plus, Eppendorf, Гамбург, Германия) в течение 5 минут при 5000 об/мин. Для выделения плазмидной ДНК из культуры *E. coli* использовали набор «Plasmid Miniprep» (BC021L, Евроген) в соответствии с протоколом производителя.

2.2.9. Аналитическая рестрикция

Аналитическую рестрикцию плазмидной ДНК, выделенной из клонов клеток *E. coli*, трансформированных лигазной смесью, проводили по сайтам рестрикции BamHI и HindIII. Реакцию осуществляли в 1x FastDigest Green буфере в объеме 15 мкл в течение 30 минут при температуре +37°C. Реакционная смесь содержала по 0,5 мкл эндонуклеаз рестрикции BamHI и HindIII и 1 мкл (100–150 нг) плазмидной ДНК каждого клона. После электрофоретического анализа в 1% агарозном геле визуализировали продукты рестрикции при 302 нм с помощью гель-документирующей системы ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Калифорния, США).

2.2.10. Экспрессия, выделение и очистка рекомбинантных белков

Для экспрессии генов, кодирующих рекомбинантные белки, использовали штамм *E. coli* SG13009 (Qiagen). Для этого трансформированные бактериальные клоны, содержащие целевую плазмиду, выращивали в 6 мл среды 2YT с добавлением канамицина (конечная концентрация 50 мкг/мл) и ампициллина (конечная концентрация 100 мкг/мл) при +37°C при перемешивании 180 об/мин в течение ночи. Бактериальную ночную культуру пересеивали в колбу с 200 мл свежей среды 2YT, содержащей ампициллин и

канамицин в тех же концентрациях, и далее клеточную суспензию выращивали при +37°C при перемешивании 180 об/мин в течение 3 часов. Затем к культуре клеток добавляли индуктор биосинтеза целевого белка ИПТГ (00194, Chem-Impex Int'l Inc., Вуд Дейл, Иллинойс, США) до концентрации 2 мМ. Выращивали биомассу еще в течение 4–5 часов (+37°C). Клетки собирали центрифугированием при 5000 об/мин (ротор JA-14, центрифуга Avanti JXN-30, Beckman Coulter, Брея, Калифорния, США) в течение 10 минут.

Очистку (His)₆-меченых белков проводили в соответствии с протоколом «The QIAexpressionist» (Qiagen) в денатурирующих условиях, с модификациями. Собранный на предыдущем этапе клеточный осадок суспендировали в 5 мл буфера А с добавлением дезоксихолата натрия до концентрации 0,2% и лизировали при комнатной температуре при перемешивании 140 об/мин в течение 1,5 часов. Полученный лизат центрифугировали при 9000 об/мин в течение 15 минут (ротор JA-14, центрифуга Avanti JXN-30). Супернатант, полученный после центрифугирования, наносили на колонку с сорбентом Ni-NTA агарозой объемом 0,8 мл, уравновешенную буфером А. Проводили сорбцию белка в течение 1 часа. Далее промывали колонку буфером А с дезоксихолатом натрия (0,2%) (10 мл) и затем буфером А без дезоксихолата натрия (10 мл). Белок элюировали понижением рН, последовательно промывая колонку буфером В (рН 8,0, объем 8 мл), буфером С (рН 6,3, объем 10 мл), буфером D (рН 5,9, объем 2 мл), буфером Е (рН 4,5, объем 5 мл) и буфером F (6 мл), собирая фракции объемом по 1 мл. По окончании хроматографии фракции анализировали на наличие целевого белка с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) по методу Лэммли (Laemmli, 1970).

Отобранные по результатам электрофореза фракции белков диализовали против воды Milli-Q в соотношении 1:250 в течение 4 часов, осуществляя смену воды с периодичностью в один час. Использовали диализные мешки с диаметром пор 12–14 кДа, ширина диализного мешка – 6 или 16 мм (SERVA

Electrophoresis GmbH, Хайдельберг, Германия). Белки стерилизовали с использованием фильтров с диаметром пор 0,2 мкм (729024, CHROMAFIL® SA-20/25(S), Macherey-Nagel, Дюрен, Германия).

Теоретические молекулярные массы (Mr, кДа), изоэлектрические точки (pI) и коэффициенты экстинкции ($E_{0,1\%}$) рекомбинантных белков рассчитывали с использованием веб-сервиса PROTPARAM (Swiss Institute of Bioinformatics, <http://expasy.org/>).

2.2.11. Определение концентрации белка

Концентрацию рекомбинантных белков определяли методом УФ-спектрофотометрии (спектрофотометр U-2900 UV-VIS, Hitachi, Токио, Япония) при длине волны 280 нм для антигенов Co1 и CoF (коэффициент экстинкции $E_{280\text{нм}} 0,1\% = 1,233$ для антигена Co1 и $E_{280\text{нм}} 0,1\% = 1,208$ для антигена CoF) и при длине волны 205 нм для антигена PE (коэффициент экстинкции $E_{205\text{нм}} 0,1\% = 31$).

2.2.12. Определение эндотоксинов

Уровни эндотоксинов определяли с использованием хромогенного LAL-теста по конечной точке с минимальным пределом обнаружения 0,04 EU/мл (EU – Endotoxin Units). LAL-тест и интерпретацию его результатов проводили в соответствии с протоколом производителя (HIT302, Nycult Biotech Inc., Уэйн, Пенсильвания, США). Готовили исходный раствор стандартного образца эндотоксина с концентрацией 50 EU/мл и использовали его в серийных разведениях для построения калибровочной кривой. В апиригенных 96-луночных планшетах 50 мкл стандартных серийных разведений или анализируемых образцов смешивали с 50 мкл LAL-реактива. Через 20 минут инкубации при температуре +25°C реакцию останавливали добавлением 50 мкл 20% уксусной кислоты. Измеряли поглощение при длине волны 405 нм на спектрофотометре Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific). Концентрацию эндотоксинов в образцах определяли с помощью стандартной кривой.

2.2.13. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Для проведения гель-электрофореза белков по Лэммли (Laemmli, 1970) готовили пластины ПААГ, состоящие из двух слоев геля – верхнего (концентрирующего) и нижнего (разделяющего). Концентрирующий гель содержал 3,8% акриламид, 0,1% N,N'-метиленабисакриламид, 125 мМ Трис-НСl (рН 6,8), 0,1% ДСН в качестве денатурирующего агента. С целью улучшения разрешающей способности использовали пластины разделяющего геля с линейным градиентом концентрации акриламида 8–20% и N,N'-метиленабисакриламида 0,08–0,2%, гель также содержал 375 мМ Трис-НСl (рН 8,8) и 0,1% ДСН.

Перед проведением белкового гель-электрофореза в пробирки с анализируемыми фракциями добавляли буфер для подготовки образцов. Пробы инкубировали в настольном термостате Термит (ДНК-Технология, Москва, Россия) при температуре $95 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 5 минут, затем сбрасывали капли на приборе Microspin FV-2400 (BioSan, Рига, Латвия). В лунки концентрирующего геля вносили готовые образцы, а также окрашенные маркеры молекулярной массы белков 2–250 кДа (161-0377, Bio-Rad Laboratories) или 10–250 кДа (26620, Thermo Fisher Scientific). Электрофорез проводили в приборе Mini-PROTEAN Tetra Cell (Bio-Rad Laboratories) в ТГБ, поддерживая напряжение 200 В, в течение 1 часа. Гели окрашивали либо раствором Кумасси G-250 (40 минут, с последующей отмывкой геля в кипящей дистиллированной воде в течение 20 минут), либо с помощью серебра с использованием реактивов из набора «PierceTM Silver Stain Kit» (24612, Thermo Fisher Scientific) в соответствии с протоколом производителя. Фотографии гелей получали с помощью системы гель-документирования ChemiDoc XRS+, молекулярные массы антигенов оценивали методом линейной регрессии с помощью программного обеспечения ImageLabTM (версия 2.0.1) (Bio-Rad Laboratories).

2.2.14. Вестерн-блот анализ

Первый этап вестерн-блот анализа заключался в электрофоретическом разделении белков в градиентном 8–20% ДСН-ПААГ в восстанавливающих условиях. После проведения электрофореза осуществляли влажный перенос белков из геля на мембрану из поливинилиденфторида (Amersham™ Hybond-P, GE Healthcare Life Sciences, Чикаго, Иллинойс, США), предварительно активированную в 96% этаноле. Электроперенос белков проводили в приборе Mini-PROTEAN II (Bio-Rad Laboratories) с установленным блоком охлаждения в буфере для переноса белков при напряжении 30 В при температуре +4°C в течение около 15 часов.

После переноса мембрану помещали в 5% раствор обезжиренного сухого молока в tTBS и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Далее проводили инкубацию с первичными антителами, разведенными в 5% растворе сухого молока в tTBS, при комнатной температуре в течение 1 часа. В экспериментах по изучению антигенных свойств рекомбинантных коронавируса белков в качестве первичных антител использовали коммерческие кроличьи поликлональные антитела к полноразмерному S-белку SARS-CoV-2 (MBS434243) или кроличьи поликлональные антитела к полноразмерному S-белку SARS-CoV (MBS432054), в разведении 1:1000. В экспериментах по определению антигенной специфичности димеров и других форм БО ВТМ в препаратах сферических частиц (СЧ) и вакцинных кандидатов в качестве первичных антител использовали сыворотку, полученную после иммунизации морских свинок препаратом СЧ (Granovskiyy *et al.*, 2022), в разведении 1:1000.

После инкубации с первичными антителами проводили отмывку мембраны три раза по 10 минут раствором tTBS. Затем мембрану инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа со вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, разведенными в 5% растворе сухого молока в tTBS (разведение 1:10000).

Отмывали мембрану от несвязавшихся вторичных антител два раза по 10 минут раствором tTBS и один раз в течение 10 минут раствором TBS. Проявляли результаты вестерн-блот анализа с помощью ECL системы (Advansta Inc., Сан-Хосе, Калифорния, США) и детектировали хемилюминесцентный сигнал с помощью системы геле-документирования ChemiDoc XRS+.

2.2.15. Анализ связывания рекомбинантных антигенов с рецептором ACE2

На лунки полистиролового планшета (655001, Greiner Bio-One GmbH, Кремсмюнстер, Австрия) наносили тестируемые антигены в количестве 1, 10 и 50 мкг. Планшет инкубировали при температуре +4°C в течение ночи. Затем планшет промывали 5 раз PBS, содержащим 0,1% твин-20, по 200 мкл на лунку (все последующие промывки осуществляли аналогичным образом). Далее на планшет наносили 200 мкл блокирующего раствора [PBS с 1% бычьим сывороточным альбумином (БСА)] и инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов. Затем планшет промывали от блокирующего раствора и наносили 50 мкл раствора рекомбинантного ACE2 человека из коммерческого набора «SARS-CoV-2 Surrogate Virus Neutralization Test Kit» (ATO00040, AtaGenix Laboratories, Ухань, Китай). ACE2 предварительно разводили в 2000 раз буфером из набора (согласно протоколу производителя). Планшет с нанесенным ACE2 инкубировали при температуре +37°C в течение 1 часа. Затем планшет промывали и наносили раствор ТМБ (A3840,0001, ITW Reagents, Гленвью, Иллинойс, США) в субстратном буфере, содержащем перекись водорода, – 100 мкл на лунку. Через 10 минут реакцию останавливали добавлением 2 М H₂SO₄ (100 мкл на лунку). Оптическую плотность в лунках оценивали при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan FC.

2.2.16. Выделение вируса табачной мозаики (ВТМ)

Вирус табачной мозаики (ВТМ) (штамм U1, коллекция кафедры вирусологии МГУ) был накоплен в растениях табака (*Nicotiana tabacum L.*) сорта Samsun. ВТМ был выделен и очищен с помощью метода дифференциального центрифугирования. Листья зараженного табака, которые были подвергнуты заморозке, гомогенизировали с помощью лабораторного блендера (Waring Commercial, Торрингтон, Коннектикут, США) в 100 мМ Na-фосфатном буфере (рН 7,8), содержащем 20 мМ ЭДТА и 0,1% β -меркаптоэтанол (в соотношении 2 мл буфера на 1 г листьев). Затем отжатый через марлю растительный сок осветляли при 10000 об/мин (ротор JA-14, центрифуга Avanti JXN-30) при температуре +4°C в течение 20 минут. Для удаления клеточных пигментов и денатурировавших растительных белков к осветленному соку добавляли хлороформ в соотношении 1 мл хлороформа на 6 мл сока. Путем встряхивания эмульгировали полученную смесь в течение 10 минут. Методом низкоскоростного центрифугирования в течение 15 минут при 10000 об/мин (ротор JA-14, центрифуга Avanti JXN-30) осуществляли разделение фаз в полученной эмульсии. Верхнюю водную фазу, содержащую гидрофильные вирусные частицы, отбирали и к ней добавляли полиэтиленгликоль (Mr 6000) до концентрации 2% и NaCl до концентрации 1%. Раствор инкубировали при температуре +4°C в течение ночи. Полученный осадок вируса отделяли центрифугированием при 10000 об/мин (ротор JA-14, центрифуга Avanti JXN-30) в течение 20 минут. Из полученного осадка вирус экстрагировали в 10 мМ Трис-HCl буфере (рН 7,8) при температуре +4°C при постоянном перемешивании в течение 2–3 часов. Полученный экстракт осветляли центрифугированием при 10000 об/мин (ротор JA-14, центрифуга Avanti JXN-30) в течение 20 минут. Дальнейшую очистку вируса проводили с помощью двух циклов дифференциального центрифугирования. При первом цикле осветленный экстракт ультрацентрифугировали при 38000 об/мин (ротор P70AT2, центрифуга CP100WX, Hitachi) в течение 2 часов с

использованием 20%-й сахарозной подушки, приготовленной на 10 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,8). Полученные осадки растворяли в 10 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,8) при температуре +4°C в течение ночи. При втором цикле раствор осветленного вируса ультрацентрифугировали без сахарозной подушки при 38000 об/мин (ротор Р70АТ2, центрифуга СР100WХ) в течение 1,5 часов. Вирусный осадок растворяли в 10 мМ Трис-НСl буфере (рН 7,8).

Концентрацию вируса определяли с помощью метода спектрофотометрии на приборе NanoDrop 2000, используя коэффициент экстинкции $E_{260\text{нм}} 0,1\% = 3,0$. Соотношение A_{260}/A_{280} , равное 1,2, характеризовало высокоочищенные препараты ВТМ.

2.2.17. Получение сферических частиц (СЧ) ВТМ и композиций СЧ с рекомбинантными коронавирусными антигенами

Препарат сферических частиц (СЧ) был получен из ВТМ путем термической перестройки согласно методике, описанной ранее, с некоторыми модификациями (Atabekov *et al.*, 2011; Трифонова *и др.*, 2015). Для получения СЧ использовали раствор ВТМ с концентрацией 2 мг/мл. Раствор ВТМ разливали по 1 мл в стандартные 1,5 мл полипропиленовые пробирки и переносили их в предварительно нагретый до 98°C термостат Термит, инкубировали 10 минут, затем охлаждали пробирки при температуре +4°C в течение 20 минут. Далее проводили повторную инкубацию при температуре 98°C в течение 10 минут и снова охлаждали пробирки. Формирование СЧ фиксировали визуально по изменению мутности раствора.

Композиции СЧ + ЗАГ получали путем смешивания СЧ (250 мкг) с антигенами [по 7 мкг каждого антигена (Co1, PE и CoF)] в 1х PBS (70011-036, Gibco™, Thermo Fisher Scientific) (рН 7,4). Для опытов по оценке протективности композиций *in vivo* были получены вакцинные кандидаты MSU-CoV-4 (по 15 мкг каждого антигена и 250 мкг СЧ) и MSU-CoV-5 (по 20 мкг каждого антигена и 250 мкг СЧ) в том же растворе PBS.

2.2.18. Просвечивающая электронная микроскопия

Препараты СЧ и вакцинных кандидатов анализировали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Для анализа препараты в течение 15–20 секунд сорбировали на медной сетке для электронной микроскопии, покрытой коллодиевой пленкой, дополнительно стабилизированной напылением углерода. Контрастирование не проводили. Препараты анализировали с помощью микроскопа JEM-1400Flash или JEM-1011 (JEOL, Токио, Япония). Среднее значение диаметра СЧ определяли при помощи программы ImageJ (Национальные институты здравоохранения США).

2.2.19. Иммунофлуоресцентная микроскопия

Для иммунофлуоресцентной микроскопии препараты СЧ с коронавирусными антигенами наносили на покровные стекла, покрытые формваром, и выдерживали в течение 10 минут. Остатки препарата удаляли, покровные стекла обрабатывали в течение 1 часа блокирующим раствором (PBS с 1% БСА и 0,05% твин-20). Затем в течение 1 часа покровные стекла обрабатывали коммерческими первичными антителами либо к S-белку SARS-CoV (MBS432054), либо к S-белку SARS-CoV-2 (MBS434243), в разведении 1:50, приготовленном на блокирующем растворе. Контрольные покровные стекла первичными антителами не обрабатывали. После этого стекла трижды промывали раствором для отмывки (PBS с 0,25% БСА и 0,05% твин-20) и далее обрабатывали в течение 45 минут вторичными антивидовыми антителами, конъюгированными с Alexa Fluor® 546 (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific), в разведении 1:500, приготовленном на блокирующем растворе. После связывания вторичных антител препараты промывали трижды раствором для отмывки и один раз раствором PBS, затем ополаскивали водой и высушивали на воздухе. Непосредственно перед исследованием препараты обрабатывали фотозащитной добавкой 1,4-диазабицикло[2.2.2]октаном и просматривали под флуоресцентным

микроскопом Axiovert 200M (Carl Zeiss, Геттинген, Германия) с интегрированной камерой ORCAII-ERG2 (Hamamatsu Photonics К.К, Хамамацу, Япония).

2.2.20. Иммунизация и заражение лабораторных животных

В опытах по изучению иммуногенности вакцинных композиций использовали белых аутбредных самок мышей (возраст 6–8 недель, масса 20–25 г). Были сформированы три группы – одна контрольная (пять особей) и две экспериментальные (в каждой по десять особей). Мышей всех групп иммунизировали внутрибрюшинно двукратно с интервалом в две недели. Контрольной группе (группа 1) вводили PBS (0,2 мл). Одной экспериментальной группе (группа 2) вводили 21 мкг коронавирусных антигенов (7 мкг антигена Co1 + 7 мкг антигена PE + 7 мкг антигена CoF). Другой экспериментальной группе (группа 3) вводили композиции СЧ + ЗАГ, содержащие 250 мкг СЧ и 21 мкг коронавирусных антигенов. Все образцы вводили в 0,2 мл PBS. Через две недели после второй иммунизации осуществляли забор крови.

В экспериментах по оценке вируснейтрализующей активности сывороток крови использовали группу из десяти самок сирийских хомяков *Mesocricetus auratus* (возраст 8–10 недель, масса 64–106 г). Иммунизацию животных и забор крови проводили на базе ООО «Институт доклинических исследований». Особи были промаркированы путем выстригания шерсти на конечностях. В течение эксперимента (0-й, 21-й и 42-й дни) животных взвешивали на электронных весах Vibra AJ-1200CE (ShinkoDenshi, Токио, Япония). Хомяков иммунизировали композициями СЧ + ЗАГ (250 мкг СЧ + 21 мкг антигенов) внутримышечно двукратно с интервалом в три недели. Объем инъекции был равен 0,5 мл. Учитывая превышение максимально возможного объема для внутримышечного введения хомякам, в эксперименте использовали дробное введение в объеме 0,25 мл (в две тазовые конечности в

равных объемах) с интервалом в 1 час. Кровь отбирали из десневой вены через три недели после второй иммунизации.

В исследовании протективности вакцинных кандидатов использовали самок сирийских хомяков *M. auratus* массой от 40 до 45 г. Иммунизацию и заражение животных проводили на базе ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Акклиматизация полученных из питомника животных проходила в течение трех суток. Перед проведением иммунизации проводили клинический осмотр хомяков. Для эксперимента животных распределили на пять групп по 20 особей. Группы 1 и 2 были иммунизированы вакцинными кандидатами MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5, соответственно. Группе 3 вводили PBS. Группы 4 и 5 не иммунизировали. Препараты животным групп 1–3 вводили в 1-й и 22-й дни эксперимента внутримышечно (аналогично предполагаемому клиническому применению) в объеме 0,5 мл/особь (полная человеческая доза) без учета массы тела животного. Использовали дробное введение объемом 0,25 мл (в две тазовые конечности в равных объемах) с интервалом в 1 час.

Перед началом эксперимента (0-й день) и затем в течение периода иммунизации (с интервалом 6–7 дней) проводили взвешивание животных на электронных весах МК-6.2-А21 (МАССА-К, Санкт-Петербург, Россия). При взвешивании из каждой клетки отбирали произвольно по четыре особи для определения массы тела (пять взвешиваний в группе). Осмотр животных проводили ежедневно, оценивая их поведение, двигательную активность, аппетит, упитанность, дыхание, состояние волосяного и кожного покровов, слизистых глаз и рта, консистенцию и форму экскрементов. В 43-й день эксперимента животных групп 1–4 инфицировали интраназально вирусом SARS-CoV-2 (вариант В, Ухань) в дозе 5,0 lg БОЕ в объеме 50 мкл рабочего разведения вируса. Животных группы 5 не заражали. Для дальнейшей работы из групп 1–4 были отобраны 18 особей, из группы 5 было отобрано 9 особей; остальные хомяки не были использованы. Эвтаназию животных проводили методом цервикальной дислокации в 46-й и 49-й день эксперимента, каждый

раз умерщвляя в группах 1–4 по девять особей, в группе 5 – три и шесть особей, соответственно. У каждого животного отбирали легкие для гистологического исследования.

2.2.21. Получение сывороток крови животных

В экспериментах по изучению иммуногенности композиций СЧ с коронавирусными антигенами образцы крови, отобранные у мышей, инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов, а затем при температуре +4°C в течение ночи. На следующий день полученную сыворотку центрифугировали при максимальных оборотах (ротор F-45-12-11, мини-центрифуга MiniSpin Plus) в течение 5 минут. Супернатант отбирали и использовали для определения титров антител методом непрямого иммуноферментного анализа.

В экспериментах по изучению вируснейтрализующей активности сывороток кровь отбирали у хомяков из десневой вены в пробирки с активатором свертываемости (AG1100, InterVac Technology, Нарва, Эстония), затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 15 минут на центрифуге ОПн-3.04 Дастан (ОАО ТНК «Дастан», Бишкек, Киргизия). Отобранные образцы сывороток использовали для определения нейтрализующей активности против SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero E6.

2.2.22. Непрямой твердофазный иммуноферментный анализ

На 96-луночный планшет средней сорбции для иммуноферментного анализа (ИФА) (655001, Greiner Bio-One GmbH) наносили антигены Co1/PE/CoF/СЧ в концентрации 10 мкг/мл. Антигены для ИФА разводили в воде Milli-Q. Наносили 100 мкл на лунку. Планшет инкубировали при температуре +4°C в течение ночи. Затем промывали планшет пять раз раствором PBS, содержащим 0,1% твин-20, по 200 мкл на лунку [для всех промывок использовали прибор Wellwash (Thermo Fisher Scientific), все промывки осуществляли аналогичным образом]. Затем наносили блокирующий раствор (PBS с 1% сухим обезжиренным молоком) по 200 мкл

на лунку. Инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов и промывали от блокирующего раствора. В качестве первичных антител использовали сыворотки крови мышей, полученные после иммунизации вакцинными композициями, либо сыворотки крови людей, переболевших COVID-19. Сыворотки крови людей были получены из Референсного центра по коронавирусной инфекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, от всех пациентов было получено информированное добровольное согласие на использование образцов крови. Сыворотки разводили в блокирующем растворе и наносили их в последовательных трехкратных разведениях. Инкубировали планшет с первичными антителами при температуре +4°C в течение ночи. Затем планшет промывали и соответственно эксперименту наносили вторичные антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведении 1:10000, приготовленном на блокирующем растворе (100 мкл на лунку). После инкубации при температуре +37°C в течение 1 часа планшет промывали и наносили раствор ТМБ в субстратном буфере, содержащем перекись водорода, – 100 мкл на лунку. Инкубировали 10 минут, после этого добавляли 2 М H₂SO₄ (100 мкл на лунку). Анализировали эффективность поглощения при длине волны 450 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan FC. Титр сыворотки определяли как величину, обратную разведению сыворотки, при котором поглощение было равно среднему значению фонового сигнала + 3 стандартных отклонения.

2.2.23. Анализ сывороток крови на нейтрализацию вируса SARS-CoV-2 на клетках Vero E6

Перед постановкой реакции нейтрализации сыворотки крови инкубировали при температуре +56°C в течение 1 часа. Готовили разведения сывороток в полной ростовой среде DMEM и смешивали их с 100 ТЦД₅₀ SARS-CoV-2 (инфекционная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя). Микс сывороток с вирусом инкубировали при температуре +37°C в течение 1 часа, после чего переносили в 96-луночные планшеты с монослоем клеток

Vero E6. Планшеты инкубировали в атмосфере 5% CO₂ при температуре +37°C в течение 96 часов, после чего вирусиндуцированный цитопатический эффект оценивали с помощью МТТ-теста (Siniavin *et al.*, 2021). Эксперименты проводили совместно с сотрудниками ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Титр 50% нейтрализации (НТ₅₀) рассчитывали с помощью нелинейной регрессии из зависимости нормализованного процента нейтрализации от логарифма обратного разведения сыворотки. Для этого была использована модель сигмоиды (Variable slope model) и программное обеспечение GraphPad Prism, версия 9.1.0 (GraphPad Software Inc., Сан-Диего, Калифорния, США).

2.2.24. Гистологический анализ

Гистологическое исследование проводили на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Для проведения гистологического анализа пробы легких от каждого хомяка (всего 81 образец) после эвтаназии отбирали в баночки с 10% раствором формалина для фиксации гистологических образцов (Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) (смена формалина через 24 часа, фиксация в течение не менее 21 дня). После окончания фиксации органы вырезали для гистологической проводки в гистологические кассеты (Leica Biosystems, Вецлар, Германия) (толщина вырезки 1–2,5 мм, органы нарезают вдоль). Гистологическую обработку тканей проводили на приборе Leica TP1020 (Leica Biosystems). Проводку осуществляли в изопропанол (изопреп, БиоВитрум, Санкт-Петербург, Россия) восходящей концентрации. Первые три станции содержали изопропанол в концентрациях 70%, 80% и 90%, соответственно. Последующие шесть станций содержали абсолютный изопропанол (время инфильтрации на первой станции 45 минут, в последующих – 1 час). После девяти станций с изопропанолом органы проходили четыре станции с расплавленным парафином (Paraplast, Leica Biosystems), по два часа в первых двух и по часу в двух последующих.

После окончания проводки органы заливали в парафиновые блоки (Paraplast, Leica Biosystems) на заливочной станции HistoCore Arcadia H C (Leica Biosystems). Охлажденные парафиновые блоки нарезами на микротоме Leica RM2265 (Leica Biosystems) (толщина срезов 2 мкм, приоритетно нарезами респираторный отдел легкого). Полученные срезы переносили на водяную баню для расправления, затем два среза с каждого парафинового блока помещали на предметное стекло и просушивали на нагревательном столике в течение получаса при температуре +40°C, после чего помещали в термостат, настроенный на +37°C, на ночь. С каждого парафинового блока было изготовлено одно предметное стекло.

На следующий день полученные срезы окрашивали по следующему протоколу с использованием аппарата Leica ST5010 (Leica Biosystems):

- 1) инкубация в термокамере, настроенной на +60°C, в течение 10 минут;
- 2) три станции с о-ксилолом по 3 минуты;
- 3) три станции с этанолом по 3 минуты (концентрация спирта 96%, 96% и 70%, соответственно);
- 4) промывка в дистиллированной воде (3 минуты);
- 5) окрашивание гематоксилином Gill II (Leica Biosystems) в течение 10 минут;
- 6) промывка в дистиллированной воде (3 минуты);
- 7) окрашивание эозином Y (Leica Biosystems) в течение 2 минут;
- 8) промывка в дистиллированной воде (3 минуты);
- 9) три станции с этанолом (концентрация 96%) по 0,5, 2 и 2 минуты, соответственно;
- 10) обработка смесью ксилол-фенол в течение 1 минуты;
- 11) две станции с ксилолом по 2 минуты.

Окрашенные срезы покрывали покровными стеклами в аппарате для заключения препаратов Leica CV5030 (Leica Biosystems) [среда для

заклучения Sub-X (Leica Biosystems)]. Готовые гистологические препараты выдерживали до застывания среды и анализировали под микроскопом Leica DM2000 (Leica Microsystems, Вецлар, Германия) с цифровой камерой.

Гистологические препараты оценивали по признакам воспаления легких: тяжесть интерстициальной пневмонии, бронхита, эпителиального некроза бронхов и альвеол, гиперплазия альвеолярных эпителиальных клеток II типа. Микроскопические повреждения легких классифицировали на три типа: минимальное, умеренное и тяжелое.

2.2.25. Статистический анализ

Для парных сравнений использовали двусторонний критерий Уилкоксона-Манна-Уитни. Для множественных сравнений использовали критерий Краскела-Уоллиса с последующим тестом Данна, либо двусторонний критерий Уилкоксона-Манна-Уитни с поправкой на множественность сравнения Холма-Бонферрони. Для оценки корреляционной связи использовали коэффициент корреляции Пирсона (R). Статистические тесты, использованные в каждом отдельном эксперименте, указаны в подписях к рисункам. Различия между группами считались достоверными при $p < 0,05$. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism, версия 9.1.0 (GraphPad Software Inc.) и программы Microsoft Office Excel.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

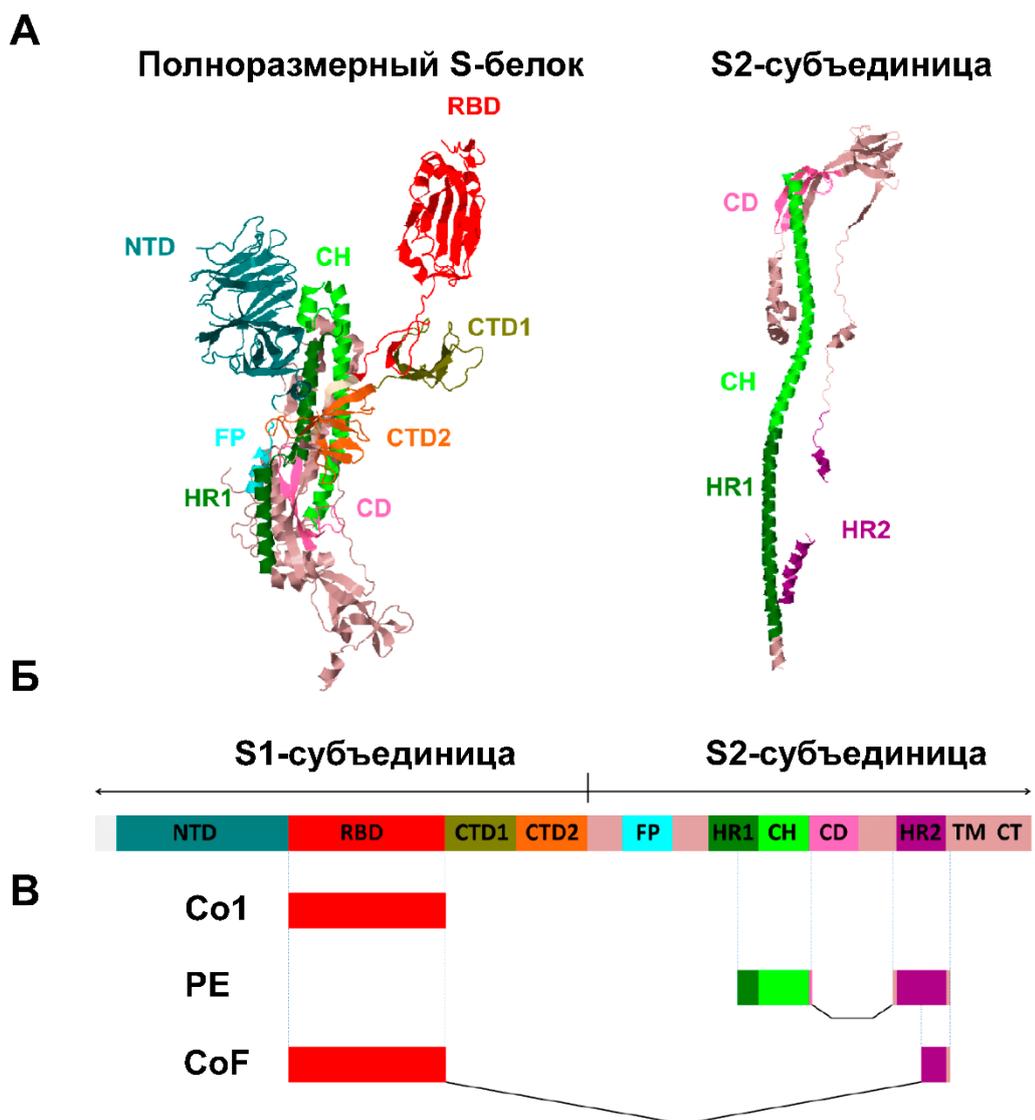
Пандемия COVID-19 – уже третья по счету в XXI веке вспышка опасной коронавирусной инфекции зоонозного происхождения в человеческой популяции, возбудителем которой стал вирус SARS-CoV-2. Наряду с инфекционными агентами SARS-CoV и MERS-CoV, ответственными за предыдущие вспышки инфекций, новый коронавирус SARS-CoV-2 принадлежит к роду *Betacoronavirus* и может вызывать тяжелый острый респираторный синдром с летальным исходом (Coronaviridae Study Group of the ICTV, 2020; Wu *et al.*, 2020b).

Для борьбы с SARS-CoV-2 усилия исследователей были направлены на разработку вакцин с использованием различных подходов. Среди них живые аттенуированные и инактивированные вакцины, вакцины на основе вирусоподобных частиц, вакцины на основе нуклеиновых кислот, векторные вакцины, а также рекомбинантные белковые вакцины, преимущественно включающие в свой состав либо полноразмерный S-белок (основной антиген коронавирусов), либо его рецептор-связывающий домен (RBD) (Yadav *et al.*, 2020). Одобренные к применению вакцины демонстрировали в клинических испытаниях протективность и безопасность, однако их эффективность начала снижаться с появлением новых генетических вариантов SARS-CoV-2, мутации в которых затрагивают преимущественно S-белок (Flores-Vega *et al.*, 2022). Это свидетельствует о необходимости продолжения разработки вакцин, устойчивых к эволюции основного вирусного антигена, и исследования их эффективности в отношении различных, в том числе вновь появляющихся, вариантов SARS-CoV-2. Кроме того, включение в состав вакцины высококонсервативных эпитопов различных патогенных для человека бетакоронавирусов может стать важным шагом на пути создания универсальной вакцины, которая, возможно, будет защищать не только от SARS-CoV-2, но и от других бетакоронавирусов, которые уже циркулируют в популяции людей или могут в дальнейшем перейти межвидовой барьер.

Настоящая работа посвящена получению и характеристике рекомбинантных коронавирусных антигенов, содержащих эпитопы S-белка SARS-CoV-2 и других SARS-подобных бетакоронавирусов, а также созданию и исследованию свойств вакцинного кандидата, представляющего собой композиции коронавирусных антигенов со сферическими частицами (СЧ) вируса табачной мозаики (ВТМ).

3.1. Дизайн и получение генетических конструкций 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) [структура и линейная диаграмма доменной организации S-белка бетакоронавируса SARS-CoV-2 представлена на рисунке 7 (А, Б)]. В предыдущих исследованиях было показано, что именно к RBD вырабатываются эффективные нейтрализующие антитела, которые блокируют связывание вируса с клеточным рецептором (Robbiani *et al.*, 2020; Zost *et al.*, 2020). Также ранее на животных моделях была подтверждена безопасность и протективная эффективность вакцинных кандидатов на основе RBD бетакоронавирусов SARS-CoV и MERS-CoV (Du *et al.*, 2009; Tai *et al.*, 2016). Поэтому в первую очередь при создании панели антигенов для будущего вакцинного кандидата нами была выбрана аминокислотная последовательность RBD вируса SARS-CoV-2 [319–541 а.о. в координатах референсной последовательности шиповидного белка (Wuhan-Hu-1, YP_009724390.1) базы данных GenBank]. Рекомбинантный RBD-содержащий антиген был назван Co1 (Рис. 7В).



Co1 (27,5 кДа, pI=8,9)

MRGSHHHHHHGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSLVYNSASFSTFKCYGVSP
 KLNDLCFTNYYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYYNYLRLFRKSNLKPF
 ERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFVD
 LQPSLIS

PE (18,8 кДа, pI=6,14)

MRGSHHHHHHGS DVVNQNAQALNTLVKQLSSNFGAISSVLNDILSRLDKVEAEVQIDRLITGRLQSLQTYVTQQLIRAA
 EIRASANLAATKMSECVLGQSKRVDSAGSAAGSGEFKNHTSPDVLGDISGINASVNIQKIDRLNEVAKNLNESLID
 LQELGKYEQYIKLN

CoF (30,5 кДа, pI=8,48)

MRGSHHHHHHGSRVQPTESIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNKRKISNCVADYSLVYNSASFSTFKCYGVSP
 KLNDLCFTNYYADSFVIRGDEVQRQIAPGQTGKIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGGNYYNYLRLFRKSNLKPF
 ERDISTEIQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVLSFELLHAPATVCGPKKSTNLVKNKCVNFVD
 EIDRLNEVAKNLNESLIDLQELGKYEQYIKLN

Рисунок 7. 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 7А.

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) и аминокислотные последовательности рекомбинантных коронавируса антигенов Co1, PE и CoF. Антигенные последовательности коронавируса выделены жирным шрифтом [цветовая кодировка в соответствии с рисунком 7 (А, Б)]; последовательности из шести остатков гистидина (His)₆ и глицин-сериновый линкер в составе белка PE обозначены курсивом; аминокислотные остатки, кодируемые сайтами рестрикции, которые были использованы при клонировании (BamHI, HindIII, SalI), подчеркнуты; последовательности, кодируемые вектором pQE30, включая фрагменты полилинкера, показаны обычным шрифтом.

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

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). Также известно, что домен RBD является вариабельным по аминокислотным остаткам (Zhou *et al.*, 2020b). 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) при дизайне одного из рекомбинантных антигенов были отобраны консервативные участки, идентифицированные в пределах

последовательности S2-субъединицы S-белка [Рис. 7(А, Б)]: 950–1041 а.о. (включает фрагмент домена HR1) и 1157–1210 а.о. (домен HR2). Сравнение с помощью алгоритма Lipman-Pearson из пакета DNASTAR Lasergene 11 показало, что аминокислотные последовательности отобранных эпитопов S2-субъединицы совпадают (до 100% гомологии) у SARS-CoV (GenBank AAS10463, ADC35483) и SARS-CoV-2 (NC_045512). Схожий процент гомологии обнаружен у S2-эпитопов указанных бетакоронавирусов человека и коронавирусов некоторых видов летучих мышей родов *Rhinolophus* (QDF43830, AIA62320, ATO98145) [включая коронавирус RaTG13 (QHR63300)] и *Chaerephon* (AGC74176), коронавирусов пальмовых цвет (AAV97990, AAU04664) и панголинов (QIA48641), а также SARS-CoV, выделенного из носовых полостей хорьков (AFR58714), и SARS-CoV, выделенного после персистенции в клетках Vero E6 (BAE93401). 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 мы также учитывали опубликованную информацию об эпитопах S-белка, антитела к которым могут вызывать антителозависимое усиление инфекции (antibody-dependent enhancement, ADE). Так, в работе Wang с соавторами (2016) было показано, что за ADE ответственны антитела к эпитопу LYKDVNC (597–603 а.о.) S1-субъединицы SARS-CoV (Wang *et al.*, 2016). В последовательности S-белка SARS-CoV-2 присутствует аналогичный (100% гомологии) участок 611–617 а.о. (в координатах референсной последовательности SARS-CoV-2).

Поскольку известно, что соединение функциональных доменов без линкерных последовательностей может привести к неправильной укладке белка и снижению его биологической активности, выбранные участки 950–1041 а.о. и 1157–1210 а.о. при конструировании антигена соединили с помощью обогащенного глицином и серином «гибкого» линкера GSAGSAAGSGEF (Waldo *et al.*, 1999; Chen *et al.*, 2013). Сконструированный

на основе высококонсервативных участков S2-субъединицы и глицин-серинового линкера рекомбинантный полиэпитопный антиген был назван PE (Рис. 7B).

Выбранный нами 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, нами 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. 7B).

На следующем этапе исследования были получены генетические конструкции для трех рекомбинантных коронавирусных антигенов (ЗАГ): Co1, PE и CoF. Для создания экспрессионных конструкций последовательности всех рекомбинантных антигенов были подвергнуты «обратной трансляции» *in silico*. Поскольку экспрессия предполагалась в клетках *Escherichia coli*, полученные последовательности были оптимизированы с учетом частоты встречаемости кодонов в *E. coli*. Также был проведен мутагенез нежелательных сайтов рестрикции и различных цис-регуляторных элементов, которые потенциально могли бы снизить эффективность экспрессии белка в клетках бактерий. Процедуру оптимизации последовательностей проводили, в частности, с использованием алгоритмов IDT (<https://eu.idtdna.com/CodonOpt>) и GenScript (<https://www.genscript.com/tools/gensmart-codon-optimization>).

Для клонирования был выбран вектор pQE-30. Ген, кодирующий RBD, клонировали между сайтами рестрикции BamHI и SalI, в результате чего была получена плазмида для экспрессии белка Co1, которая была названа pQE-Co1. Дизайн вектора pQE-Co1 предполагает возможность быстрого и удобного получения конструкции для экспрессии слитого белка, содержащего дополнительные эпитопы на С-конце белка Co1. Поскольку сайт рестрикции SalI не является крайним 3'-концевым сайтом полилинкера, то существует возможность добавления дополнительной последовательности на 3'-конец гена, кодирующего Co1, путем одностадийного клонирования по сайтам SalI и HindIII. С помощью такого клонирования на основе вектора pQE-Co1 была получена плазмида pQE-CoF (Рис. 8) для экспрессии слитого белка, состоящего из домена RBD и участка домена HR2 (1182–1210 а.о.).

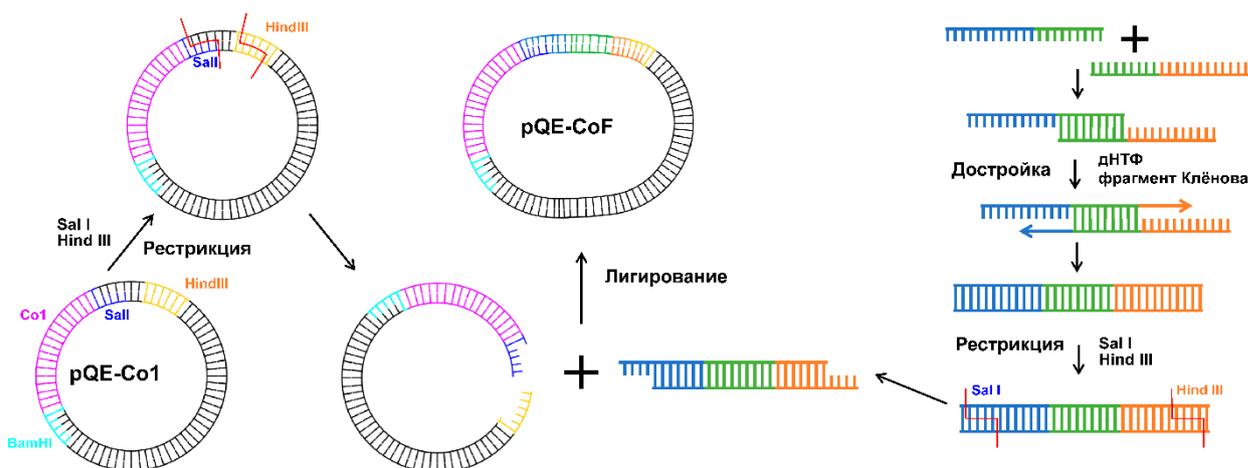


Рисунок 8. Схема получения генетической конструкции для экспрессии рекомбинантного белка CoF. Процедура получения конструкции pQE-CoF подробно описана в разделе «Материалы и методы».

Фрагмент двухцепочечной ДНК, кодирующий эпитоп S2-субъединицы, был получен из двух синтезированных частично перекрывающихся одноцепочечных олигонуклеотидов путем их комплементарного достраивания. Полученный двухцепочечный фрагмент, кодирующий эпитоп, а также вектор pQE-Co1 были разрезаны по сайтам рестрикции SalI и HindIII. В результате последующего лигирования была получена плазмида pQE-CoF (Рис. 8).

Таким образом, были получены генетические конструкции для экспрессии в клетках *E. coli* трех рекомбинантных коронавирусных антигенов – Co1, PE и CoF. В состав антигенов входят последовательность RBD S1-субъединицы S-белка SARS-CoV-2 и высококонсервативные (среди SARS-подобных бетакоронавирусов) эпитопы S2-субъединицы. Гибкий «модульный» дизайн конструкций Co1 и CoF позволяет обновлять их путем слияния с различными целевыми эпитопами. Разработанная панель антигенов в короткие сроки может быть модифицирована и адаптирована для борьбы с новыми бетакоронавирусами.

3.2. Экспрессия и очистка рекомбинантных белков

В качестве продуцента рекомбинантных антигенов Co1, PE и CoF был выбран штамм *E. coli* SG13009. *E. coli* в качестве системы экспрессии рекомбинантных белков используется уже более 40 лет и имеет ряд преимуществ (Rosano & Seccarelli, 2014). Недостатком данной экспрессионной системы является отсутствие посттрансляционных модификаций белков, в частности гликозилирования, характерного для эукариотических клеток. Если же отсутствие гликанов не влияет на функциональную активность гликопротеина, то клетки *E. coli* вполне могут быть применены для получения такого белка (Kamionka, 2011). Известно, что в пределах S1-субъединицы S-белка SARS-CoV-2 идентифицированы 13 сайтов N-гликозилирования, два из которых находятся в RBD. Также RBD содержит два сайта O-гликозилирования (Watanabe *et al.*, 2020). В недавнем исследовании был охарактеризован рекомбинантный негликозилированный RBD (non-glycoRBD), полученный в клетках *E. coli*. Вакцинный кандидат на основе non-glycoRBD в сочетании с адьювантами CpG + Al(OH)₃ вызывал сильный иммунный ответ и обладал способностью индуцировать выработку антител, нейтрализующая активность которых была продемонстрирована с использованием псевдовиральных частиц SARS-CoV-2 «дикого» типа, а также вариантов Дельта и Омикрон (Ke *et al.*, 2022). Можно полагать, что

гликозилирование RBD не является решающим фактором для индукции защитного иммунного ответа. Некоторые исследования показали, что для полученного в клетках *E. coli* RBD вируса SARS-CoV-2 может понадобиться рефолдинг белка в буферном растворе, содержащем L-аргинин, смесь окисленного и восстановленного глутатиона, мочевины (He *et al.*, 2021).

В пределах S2-субъединицы SARS-CoV-2 охарактеризованы девять сайтов N-гликозилирования, при этом три из них находятся в участке 1157–1210 а.о., входящем в состав антигена PE. Это сайты N1158, N1173 и N1194 (Watanabe *et al.*, 2020). В литературе встречается не так много примеров получения антигенов на основе S2-субъединицы в клетках *E. coli*. Известно об исследовании Guo с соавторами (2005), в котором было показано, что экспрессированный в клетках *E. coli* рекомбинантный фрагмент S2-субъединицы SARS-CoV (681–980 а.о.) специфически распознается сывороткой крови людей, переболевших SARS (Guo *et al.*, 2005). В работе Keng с соавторами (2005) было продемонстрировано, что полученный в клетках *E. coli* фрагмент 1029–1192 а.о., включающий аминокислотные остатки домена HR2 (1148–1193 а.о.) вируса SARS-CoV, стимулирует выработку нейтрализующих антител, в отличие от фрагмента 798–1055 а.о., содержащего домен HR1 (891–975 а.о.) (Keng *et al.*, 2005). Можно предположить, что конформация или гликозилирование могут влиять на распознавание антителами S2-антигенов, экспрессированных в клетках *E. coli*, и на формирование протективного иммунитета, однако это показано лишь для некоторых эпитопов S2-субъединицы.

Экспрессированные в *E. coli* рекомбинантные белки были выделены из клеток штамма-продуцента 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. Для сравнения, в исследовании He с соавторами (2021) выход белка на основе RBD в *E. coli* составил 13,3 мг/л клеточной культуры и всего 5 мг/л в клетках млекопитающих (He *et al.*, 2021).

Молекулярные массы рекомбинантных белков (M_r , кДа), определенные с помощью электрофоретического анализа (Рис. 9), соответствовали значениям, рассчитанным с использованием веб-сервиса PROTPARAM (<http://expasy.org/>), и составили 26,5 кДа для Co1 (теоретическое значение 27,5 кДа), 28,2 кДа для CoF (теоретическое значение 30,5 кДа) и 18,1 кДа для PE (теоретическое значение 18,8 кДа).

Содержание эндотоксинов в рекомбинантных белках составило: 5,48 EU/мг для антигена Co1, 1,24 EU/мг для антигена CoF и 23,15 EU/мг для антигена PE.

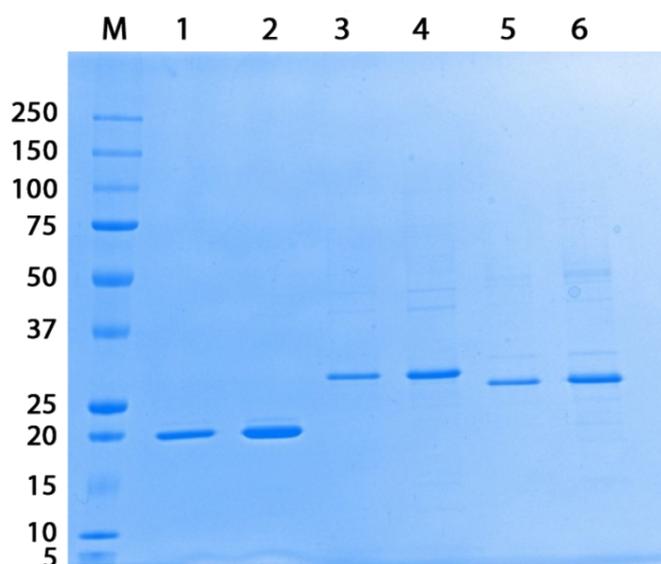


Рисунок 9. Электрофоретический анализ рекомбинантных антигенов.

М – маркеры молекулярной массы белков, слева указаны значения в кДа (5–250); **1, 2** – белок PE, 1 и 2 мкг, соответственно; **3, 4** – белок CoF, 1 и 2 мкг, соответственно; **5, 6** – белок Co1, 1 и 2 мкг, соответственно.

Электрофорез в градиентном ДСН-ПААГ (8–20%). Гель окрашен Кумасси G-250.

Таким образом, по нашим данным, бактериальные клетки *E. coli* являются подходящей системой экспрессии рекомбинантных коронавирусных антигенов Co1, PE и CoF, обеспечивая высокий выход целевого белка.

3.3. Характеристика рекомбинантных антигенов

3.3.1. Антигенные свойства рекомбинантных белков

На первом этапе исследования свойств антигенов был использован вестерн-блот анализ (Рис. 10), параллельно с которым проводили электрофорез антигенов (Рис. 10А). 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. 10Б). Антигены Co1 и CoF реагировали с антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 10В).

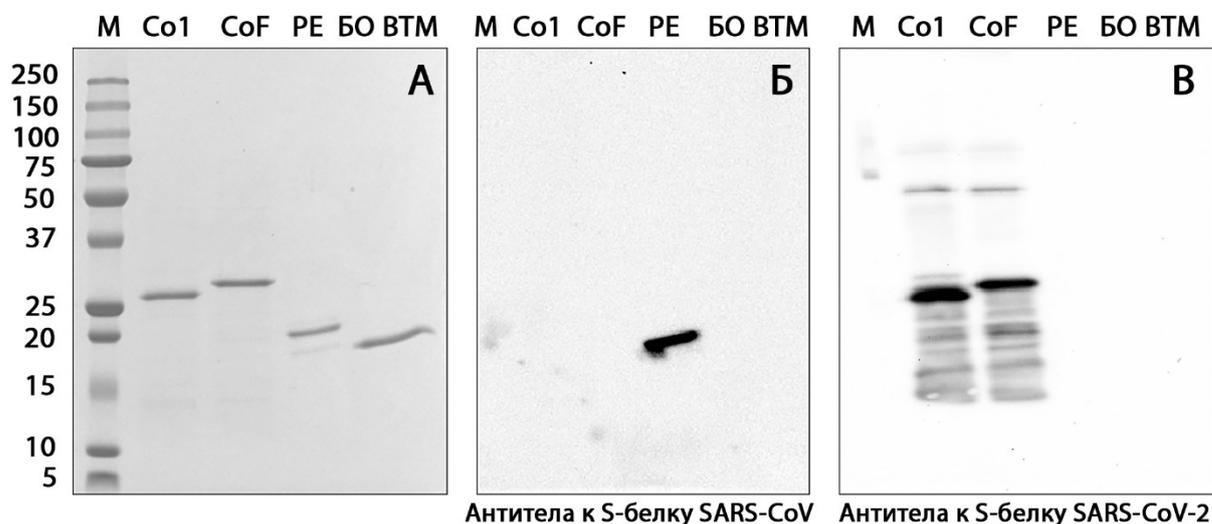


Рисунок 10. Взаимодействие очищенных рекомбинантных антигенов Co1, CoF и PE с коммерческими поликлональными антителами к полноразмерному S-белку различных бетакоронавирусов.

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 10, антиген Co1 реагировал с антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 10В), но не реагировал с антителами к S-белку SARS-CoV (Рис. 10Б). 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, обеспечивают ограниченный уровень перекрестной нейтрализации в отношении псевдовирусных частиц SARS-CoV-2 (Ou *et al.*, 2020). Еще в одном исследовании было продемонстрировано,

что моноклональные антитела, специфичные к RBD SARS-CoV, не связывались с RBD SARS-CoV-2 (Wrapp *et al.*, 2020).

В то же время мы рассчитывали увидеть взаимодействие антигенов CoF и PE одновременно с обоими вариантами антител, так как в состав данных антигенов входят эпитопы S2-субъединицы, высококонсервативные для SARS-CoV и SARS-CoV-2. Однако CoF реагировал только с антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 10B), а PE – только с антителами к S-белку SARS-CoV (Рис. 10Б).

Мы предполагаем, что отсутствие реакции антигена CoF с антителами к S-белку SARS-CoV (Рис. 10Б) связано с небольшим размером консервативного эпитопа из домена HR2, входящего в состав антигена CoF. Вероятно, что в данном случае коммерческие поликлональные антитела, полученные к рекомбинантному полноразмерному S-белку, оказались недостаточно специфичны для распознавания небольшого фрагмента белковой последовательности (29 а.о.).

Более неожиданным для нас оказался тот факт, что полиэпитопный антиген PE не реагировал с антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 10B). 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. На наш взгляд, 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.

3.3.2. Взаимодействие RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF с рекомбинантным рецептором ACE2

На следующем этапе исследования свойств полученных белков важно было узнать, способны ли экспрессированные в клетках *E. coli* рекомбинантные RBD-содержащие антигены Co1 и CoF связываться с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (angiotensin-converting enzyme 2, ACE2) – клеточным рецептором, взаимодействующим с вирионами SARS-CoV и SARS-CoV-2. Эксперимент, схема проведения которого представлена на рисунке 11, проводили с использованием коммерческого рекомбинантного ACE2, конъюгированного с пероксидазой хрена (ACE2-HRP). Помимо антигенов Co1 и CoF в эксперименте использовали антигены, которые не содержат RBD: коронавирусный белок PE и рекомбинантный протективный антиген сибирской язвы rPA83m, полученный ранее в нашей лаборатории (Ryabchevskaya *et al.*, 2022), и два контроля – положительный (контроль ACE2) и отрицательный (контроль без антигена). В случае положительного контроля в лунку планшета вносили только конъюгат ACE2-HRP, при этом ни какой-либо из анализируемых антигенов, ни блокирующий раствор, который бы препятствовал сорбции ACE2, в лунку не добавляли. В случае отрицательного контроля без антигена в лунку планшета вносили только блокирующий раствор для предотвращения неспецифической сорбции ACE2 и конъюгат ACE2-HRP. Результаты эксперимента интерпретировали следующим образом: если после инкубации тестируемого антигена с конъюгатом ACE2-HRP и нанесения субстрата цвет в лунках менялся, значит, произошло специфическое взаимодействие меченого рецептора ACE2 с антигеном.

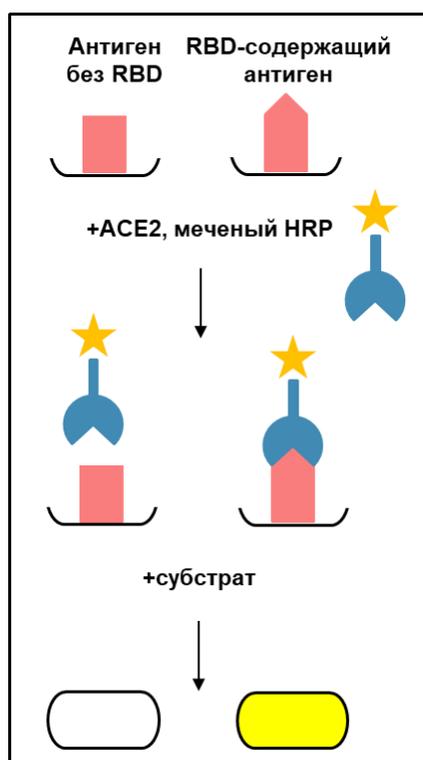


Рисунок 11. Схема эксперимента по определению возможности взаимодействия RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF с рекомбинантным рецептором ACE2. Антигены, не содержащие RBD: рекомбинантный протективный антиген сибирской язвы rPA83m и рекомбинантный коронавирусный антиген PE. Использовали фермент ACE2, конъюгированный с пероксидазой хрена (ACE2-HRP), и ТМБ в качестве субстрата.

В таблице 5 представлены средние значения оптической плотности, измеренной при $\lambda=450$ нм, для RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF, антигенов PE и rPA83m, положительного и отрицательного контролей. Экспрессированные в клетках *E. coli* RBD-содержащие антигены Co1 и CoF специфически взаимодействуют с рекомбинантным рецептором ACE2 (при этом связывание ACE2 наблюдали даже при количестве нанесенного антигена от 1 мкг на лунку), в отличие от не содержащих RBD антигенов, где сигнал не был детектирован. Контроли также позволили убедиться в специфичности взаимодействия. В случае положительного контроля наличие сигнала свидетельствует о неспецифической сорбции в лунке планшета конъюгата ACE2-HRP и ферментативной реакции HRP с субстратом ТМБ. В случае отрицательного контроля без антигена отсутствие сигнала подтверждает тот факт, что блокирующий раствор действительно препятствует неспецифической сорбции ACE2. Таким образом, детектированный в случае

антигенов Co1 и CoF сигнал связан именно со специфическим взаимодействием ACE2 с RBD-содержащими антигенами.

Таблица 5. Результаты анализа эффективности связывания RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF с рекомбинантным рецептором ACE2. Представлены средние значения оптической плотности ($\lambda=450$ нм) \pm стандартное отклонение.

RBD-содержащие антигены					
Co1			CoF		
1 мкг	10 мкг	50 мкг	1 мкг	10 мкг	50 мкг
0,117 \pm 0,011	0,169 \pm 0,001	0,523 \pm 0,012	0,132 \pm 0,003	0,362 \pm 0,006	0,535 \pm 0,022
Антигены, не содержащие RBD					
PE			rPA83m		
1 мкг	10 мкг	50 мкг	1 мкг	10 мкг	50 мкг
0,064 \pm 0,003	0,057*	0,057 \pm 0,001	0,062 \pm 0,001	0,059 \pm 0,003	0,059 \pm 0,001
Контроли					
ACE2 (положительный контроль)			Без антигена (отрицательный контроль)		
1,94 \pm 0,0772			0,049 \pm 0,0019		

Примечание: * - измеренное значение оптической плотности было одинаковым для обоих технических повторов.

Полученные данные согласуются с результатами исследования He с соавторами (2021), в котором сравнили структуру рекомбинантных RBD вируса SARS-CoV-2, экспрессированных в клетках *E. coli* и в клетках млекопитающих HEK293. Авторы не обнаружили существенных различий во вторичной и третичной структуре белков и их способности связываться с рецептором ACE2, несмотря на то, что RBD, экспрессированный в клетках *E. coli*, не был гликозилирован (He *et al.*, 2021). Рекомбинантный белок non-glycoRBD, охарактеризованный в работе Ke с соавторами (2022), был получен в клетках *E. coli* и взаимодействовал с рецептором ACE2 аналогично гликозилированному RBD (Ke *et al.*, 2022).

3.3.3. Взаимодействие RBD-содержащих антигенов Co1 и CoF с сыворотками крови людей, переболевших COVID-19

Поскольку антигены на основе RBD часто служат компонентами не только вакцинных препаратов, но и различных тест-систем для выявления специфических антител, мы решили проверить, будут ли реагировать полученные нами RBD-содержащие антигены Co1 и CoF с сыворотками крови людей, иммунными к SARS-CoV-2. Всего в данном эксперименте было проанализировано 19 образцов сывороток крови, пять из которых были получены от пациентов до начала пандемии COVID-19, т.е. они заведомо могли быть отнесены к неиммунным образцам. Остальные 14 образцов были собраны в период распространения коронавирусной инфекции, и для них были известны значения BAU/мл (binding antibody units), определенные в лабораториях «INVITRO» и «Гемотест». Тем не менее, все сыворотки крови, включая пять сывороток, собранных до 2020 г., перед началом основного эксперимента были проверены с помощью экспресс-набора Leccurate™ (Lepu Medical), предназначенного для качественного тестирования на наличие антител к SARS-CoV-2. Данный экспресс-тест разработан по принципу иммунохроматографического анализа на основе коллоидного золота. На основании результатов экспресс-теста сыворотки крови были классифицированы на иммунные и неиммунные образцы. К положительным иммунным образцам было отнесено 12 сывороток, что совпадало с интерпретацией для них значений BAU/мл; к отрицательным неиммунным – семь сывороток (среди них пять сывороток, собранных до начала пандемии COVID-19, и две сыворотки, полученные в период пандемии со значениями BAU/мл 0,4 и 2,9).

Далее с помощью твердофазного ИФА все сыворотки крови были проверены на возможность взаимодействия с RBD-содержащими антигенами Co1 и CoF. На рисунке 12 представлены результаты данного эксперимента.

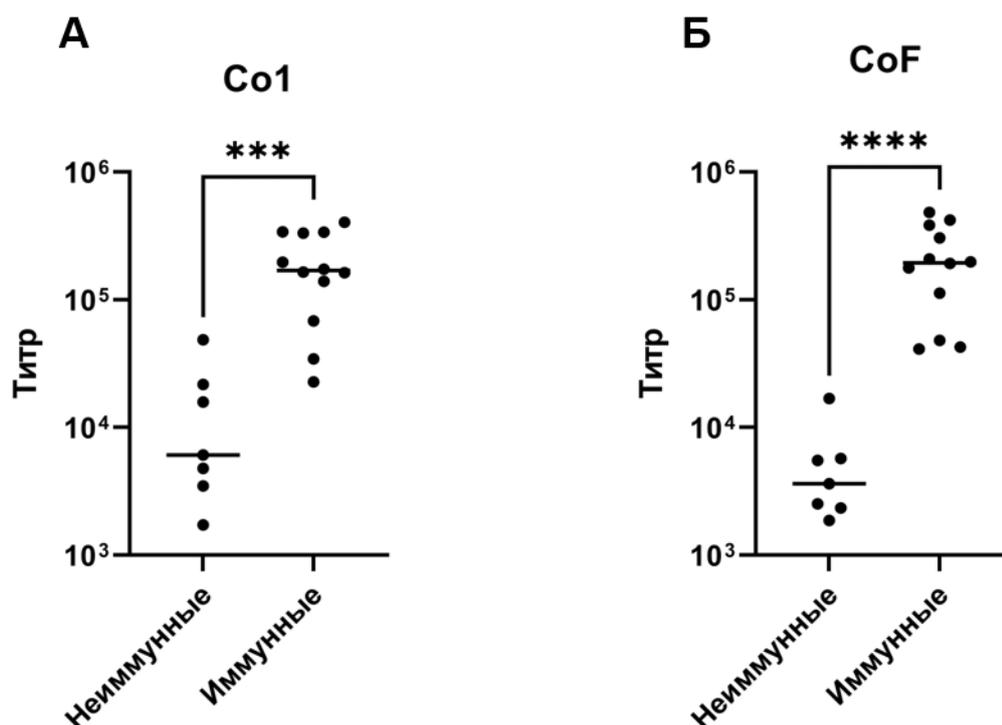


Рисунок 12. Титры антител к RBD-содержащим антигенам Co1 и CoF в иммунных к SARS-CoV-2 сыворотках крови людей.

А. Титры антител к антигену Co1.

Б. Титры 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. ● титр антител, — медианы титров антител.

Показано, что RBD-содержащие антигены Co1 и CoF эффективно реагируют с иммунными к SARS-CoV-2 сыворотками крови людей (медиана титров антител в случае антигена Co1 – 169233, медиана титров антител в случае антигена CoF – 194786). Более того, полученные нами значения титров антител коррелировали с единицами определения антител ВАУ/мл (Рис. 13). Значения ВАУ/ml во всех 12 иммунных сыворотках крови были измерены с помощью хемилюминесцентного иммуноанализа «ARCHITECT SARS-CoV-2 IgG II Quant» (Abbott, США) в медицинской лаборатории «INVITRO». Данную тест-систему довольно часто применяют для количественного обнаружения антител IgG к RBD S-белка SARS-CoV-2. Для построения корреляционной зависимости также были использованы значения ВАУ/ml, определенные в двух неиммунных сыворотках крови, собранных в период пандемии

COVID-19. Один из этих образцов был проанализирован в лаборатории «INVITRO» с использованием тест-системы «ARCHИТЕКТ» (значение ВАУ/мл составило 2,9). Вторая неиммунная сыворотка была протестирована в лаборатории «Гемотест» с помощью электрохемилюминесцентного иммуноанализа «Elecsys Anti-SARS-CoV-2 S» (Roche Diagnostics, Швейцария), позволяющего количественно оценивать антитела IgG к RBD; значение ВАУ/мл составило 0,4. Пять неиммунных сывороток крови, собранных до 2020 г., в построение корреляции не включали, так как значение ВАУ/ml для них не определялось.

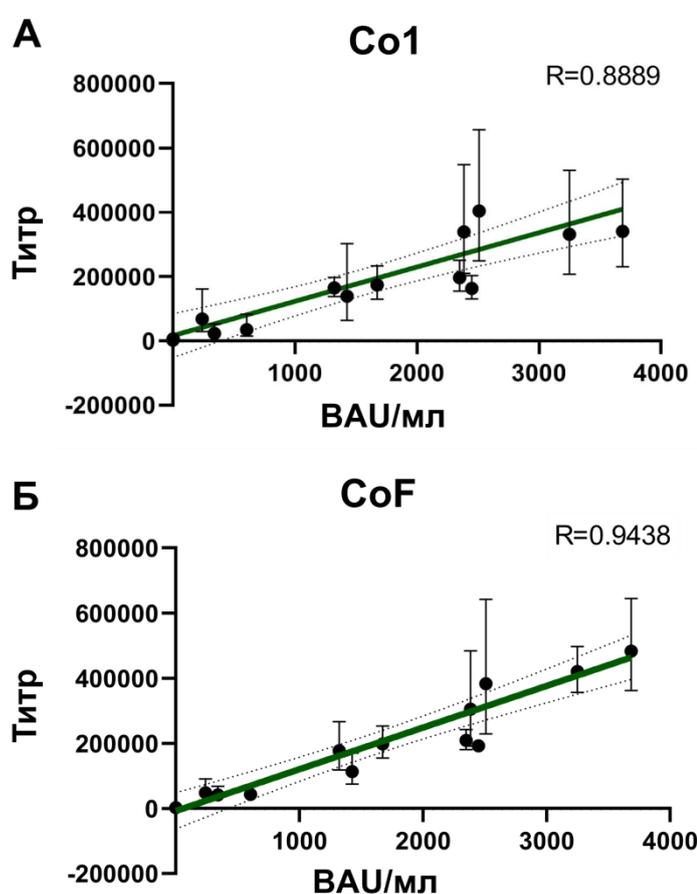


Рисунок 13. Корреляция титров антител к RBD-содержащим антигенам Co1 и CoF со значениями ВАУ/мл.

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

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

Для оценки корреляционной связи использовали коэффициент корреляции Пирсона (R). ВАУ, binding antibody units (единицы связывающих антител).

Для выявления специфических антител в сыворотках крови людей был разработан широкий спектр систем ИФА на основе различных антигенов, в том числе и на основе RBD. При выборе экспрессионной системы предпочтение отдают клеткам млекопитающих, например, клеткам человека Expi293 (Klumpp-Thomas *et al.*, 2021). Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что рекомбинантные RBD-содержащие антигены Co1 и CoF, экспрессированные в бактериальных клетках *E. coli*, могут быть применены в различных тест-системах наравне с антигенами, получаемыми в клетках млекопитающих, что может оказаться экономически значительно более выгодным.

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 перенесенной инфекции конкретными генетическими вариантами SARS-CoV-2 – исходный вариант Ухань, Дельта или Омикрон (Рис. 14). Также было проанализировано 13 неиммунных сывороток крови (две сыворотки были собраны в период пандемии COVID-19 и отнесены к неиммунным на основании результатов качественного экспресс-теста на наличие антител к SARS-CoV-2, другие 11 неиммунных сывороток были собраны до 2020 г.).

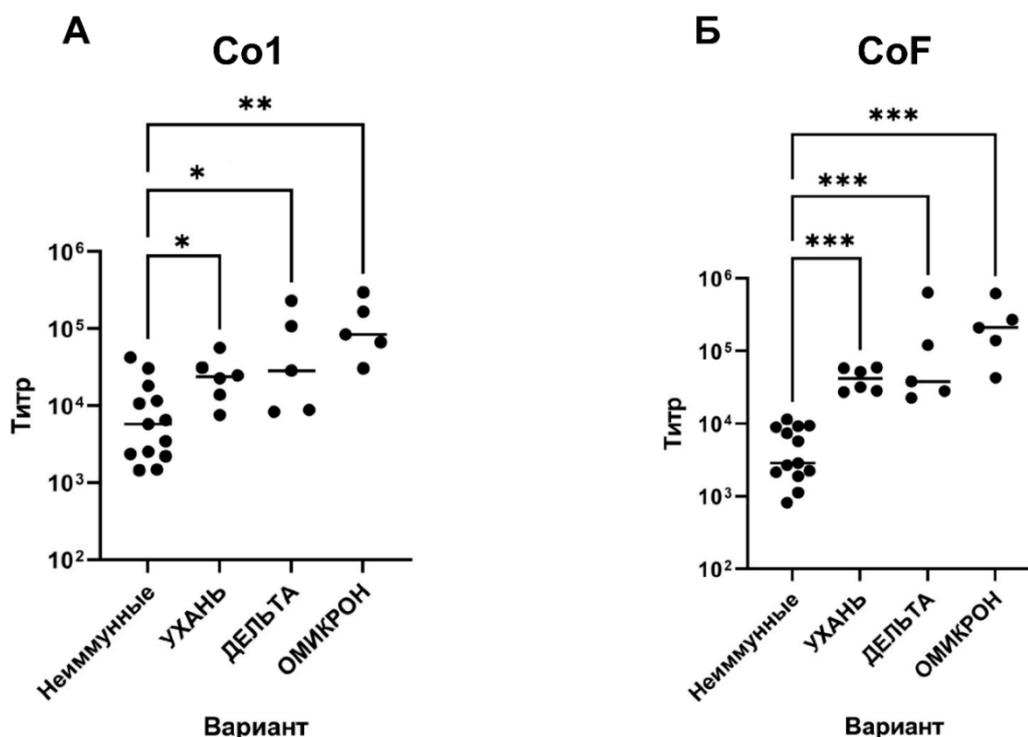


Рисунок 14. Титры антител к RBD-содержащим антигенам Co1 и CoF в сыворотках крови людей, переболевших разными вариантами вируса SARS-CoV-2.

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.

Как видно из рисунка 14, в случае обоих антигенов, сконструированных на основе RBD варианта Ухань, титры антител в сыворотках крови пациентов, переболевших не только вариантом Ухань, но и вариантами Дельта и Омикрон, достоверно отличались от титров антител в неиммунных сыворотках. Аналогичные результаты были получены в исследовании Rahbar с соавторами (2022): рекомбинантный белок на основе RBD исходного варианта Ухань, экспрессированный в клетках *E. coli*, реагировал с антителами сывороток крови людей, инфицированных вариантом Дельта (Rahbar *et al.*, 2022).

Одно из ограничений данного исследования связано с отсутствием сведений о том, могли ли пациенты, инфицированные вариантами Дельта или Омикрон, ранее перенести заражение предшествующими вариантами SARS-

CoV-2, в том числе и исходным вариантом Ухань. Также стоит отметить, что увеличение объема выборки исследуемых образцов может позволить выявить различия в эффективности взаимодействия RBD-содержащих антигенов с сыворотками крови людей, переболевших разными вариантами SARS-CoV-2.

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 существует потенциальная возможность детектировать антитела в сыворотках крови пациентов, которые были инфицированы разными вариантами SARS-CoV-2.

3.4. Получение и характеристика адъюванта – сферических частиц вируса табачной мозаики (СЧ ВТМ)

Поскольку индивидуальные рекомбинантные белки-антигены обладают слабой иммуногенностью, в составе вакцин их обычно применяют в сочетании с различными адъювантами, усиливающими на них иммунный ответ (Apostólico *et al.*, 2016). Подбор эффективного и безопасного адъюванта является важным этапом создания вакцин. В этой связи весьма перспективным представляется использование адъювантов на основе вирусов растений и вирусоподобных частиц.

Ранее в нашей лаборатории впервые было показано, что для различных вирусов растений со спиральным типом симметрии существует возможность структурной перестройки при воздействии высоких температур (Atabekov *et al.*, 2011; Трифонова *и др.*, 2015; Nikitin *et al.*, 2016; Трифонова *и др.*, 2017). Так, вирус табачной мозаики (ВТМ) при термической обработке формирует сферические частицы (СЧ), состоящие из структурно модифицированного белка оболочки (БО) ВТМ. В предыдущих наших исследованиях СЧ ВТМ были охарактеризованы с точки зрения их адъювантной активности и

безопасности (Никитин *и др.*, 2011; Karpova *et al.*, 2012; Trifonova *et al.*, 2014; Никитин *и др.*, 2016; Nikitin *et al.*, 2018b, c; Evtushenko *et al.*, 2020). Была продемонстрирована возможность использования СЧ в составе вакцинных кандидатов против различных возбудителей заболеваний вирусной и бактериальной природы (Trifonova *et al.*, 2017; Nikitin *et al.*, 2018a; Рябчевская *и др.*, 2020; Kurashova *et al.*, 2020; Ryabchevskaya *et al.*, 2021). Предположительно, СЧ в композициях с целевым белком действуют как депо антигена, презентуя его на своей поверхности в течение определенного периода времени. Это свойство СЧ, возможно, определяет их адьювантный эффект (Trifonova *et al.*, 2017).

В настоящем исследовании СЧ ВТМ были применены в качестве адьюванта и платформы для адсорбции рекомбинантных коронавирусных антигенов Co1, PE и CoF. Для получения СЧ использовали препарат ВТМ с концентрацией 2 мг/мл. СЧ были охарактеризованы с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) (Рис. 15). Среднее значение диаметра СЧ, рассчитанное по данным ПЭМ, находилось в диапазоне от 389 до 466 нм.

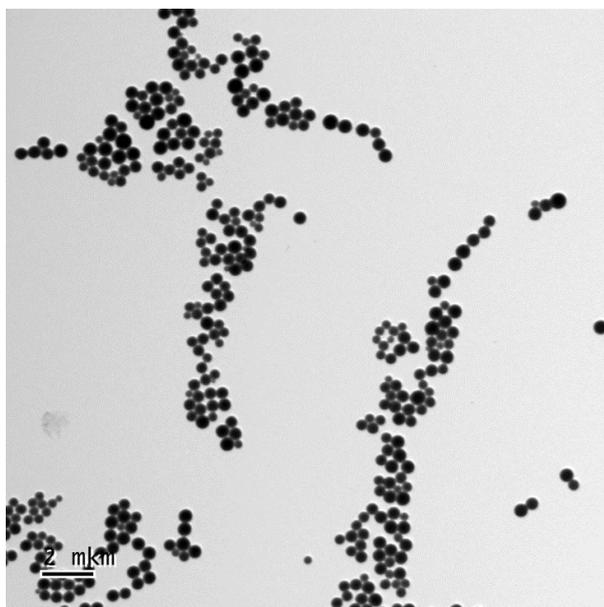


Рисунок 15. СЧ, полученные из препарата ВТМ с исходной концентрацией вируса 2 мг/мл. ПЭМ, без контрастирования. Масштабная метка, 2 мкм.

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

Для получения композиций три рекомбинантных антигена (3АГ) Co1, PE и CoF смешивали с СЧ. В качестве буфера был выбран PBS, так как он является оптимальным раствором для вакцинных препаратов (Usach *et al.*, 2019). В состав композиций СЧ + 3АГ входило по 7 мкг каждого рекомбинантного антигена (суммарная доза 21 мкг) и 250 мкг СЧ. Массовое соотношение СЧ/антигены составило 11,9/1, что близко к соотношению 10/1, для которого ранее была показана эффективная иммуностимуляция (Trifonova *et al.*, 2017). Композиции СЧ с антигенами Co1, PE и CoF были получены в количествах, достаточных для последующих экспериментов. Эти композиции являются основой вакцинного кандидата против SARS-CoV-2, представленного в настоящем исследовании.

Композиции СЧ + 3АГ были проанализированы методом непрямой иммунофлуоресцентной микроскопии (Рис. 16). Важность этого подхода состоит в том, что в отличие от вестерн-блот анализа он позволяет исследовать антигенную специфичность белков в нативных условиях. В качестве первичных антител использовали коммерческие поликлональные антитела к полноразмерному S-белку SARS-CoV [Рис. 16 (А, Б)] или SARS-CoV-2 [Рис. 16 (В, Г)]. При подготовке контрольного препарата композиции СЧ + 3АГ первичными антителами не обрабатывали [Рис. 16 (Д, Е)]. В качестве вторичных антител использовали антитела против IgG кролика, конъюгированные с флуорофором Alexa 546.

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. 16 (А, Б)] и фазового контраста [Рис. 16 (В, 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. 16Д) свидетельствует о специфичности взаимодействия.

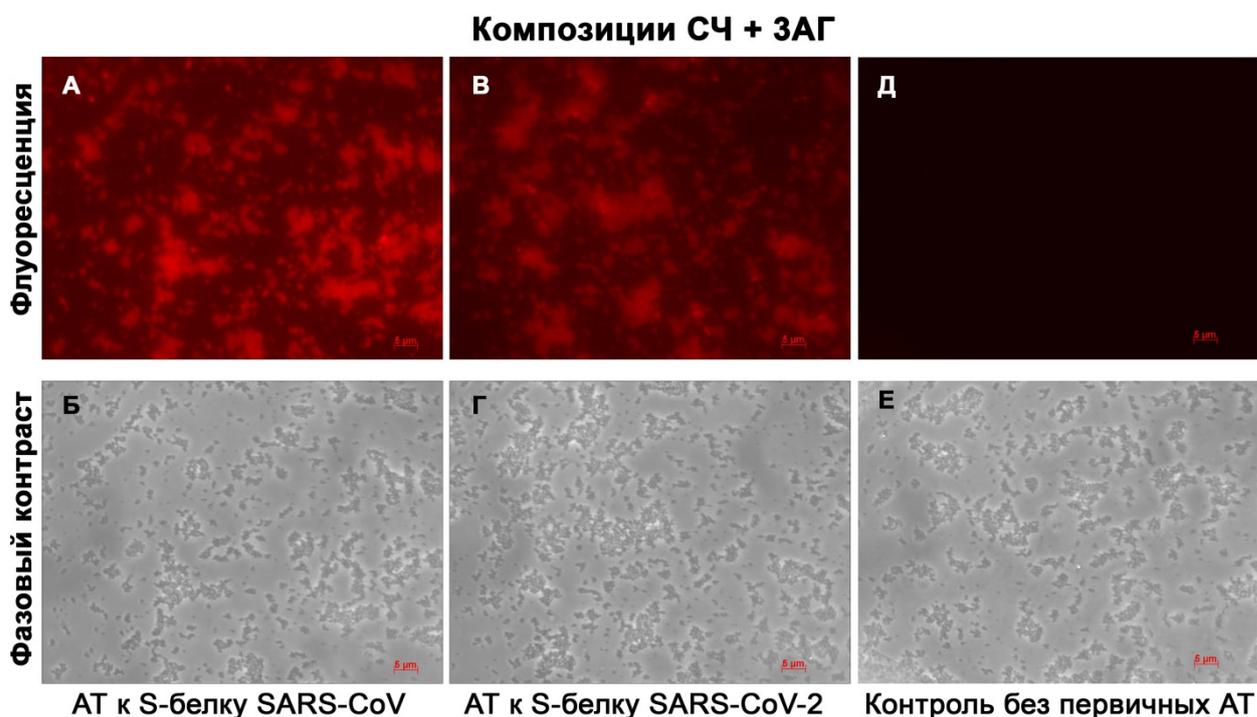


Рисунок 16. Иммунофлуоресцентный анализ композиций СЧ + ЗАГ.

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

В, Г. Композиции СЧ + ЗАГ, обработанные 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.

Распознавание антигенов на поверхности СЧ как антителами к S-белку SARS-CoV (Рис. 16А), так и антителами к S-белку SARS-CoV-2 (Рис. 16В) позволяет предположить, что композиции СЧ + ЗАГ будут способны индуцировать иммунный ответ на оба бетакоронавируса.

3.6. 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 внутривбрюшинно двукратно с интервалом в две недели. В эксперименте участвовали три группы мышей. Одной из групп вводили композиции СЧ + 3АГ, содержащие 21 мкг коронавирусных антигенов (по 7 мкг каждого антигена) и 250 мкг СЧ в 0,2 мл PBS (группа 3). Другой группе мышей вводили такую же дозу (21 мкг) коронавирусных антигенов (по 7 мкг каждого антигена) в отсутствие СЧ (группа 2). Контрольной группе мышей (группа 1) вводили 0,2 мл PBS. Схема иммунизации и описание групп животных представлены на рисунке 17 и в таблице 6.



Рисунок 17. Схема иммунизации лабораторных животных, участвующих в эксперименте по оценке иммуногенности композиций СЧ с коронавирусными антигенами Co1, PE и CoF.

Таблица 6. Описание групп животных, участвующих в эксперименте по оценке иммуногенности композиций СЧ + 3АГ.

	Вводимый препарат	Кол-во животных
Группа 1 (контроль)	PBS	5
Группа 2	3АГ (Co1, PE и CoF)	10
Группа 3	СЧ + 3АГ	10

Примечание: группам мышей внутривбрюшинно 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. АГ – антиген; СЧ – сферические частицы, полученные при термической перестройке ВТМ.

В течение всего периода иммунизации наблюдали за общим состоянием животных. Каких-либо патологических изменений в организме животных и их гибели отмечено не было.

Через две недели после второй иммунизации осуществляли забор крови у мышей для определения уровней антител к антигенам Co1 (Рис. 18), PE (Рис. 19) и CoF (Рис. 20). С помощью непрямого ИФА определяли уровни общих IgG, а также антител изотипов IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3.

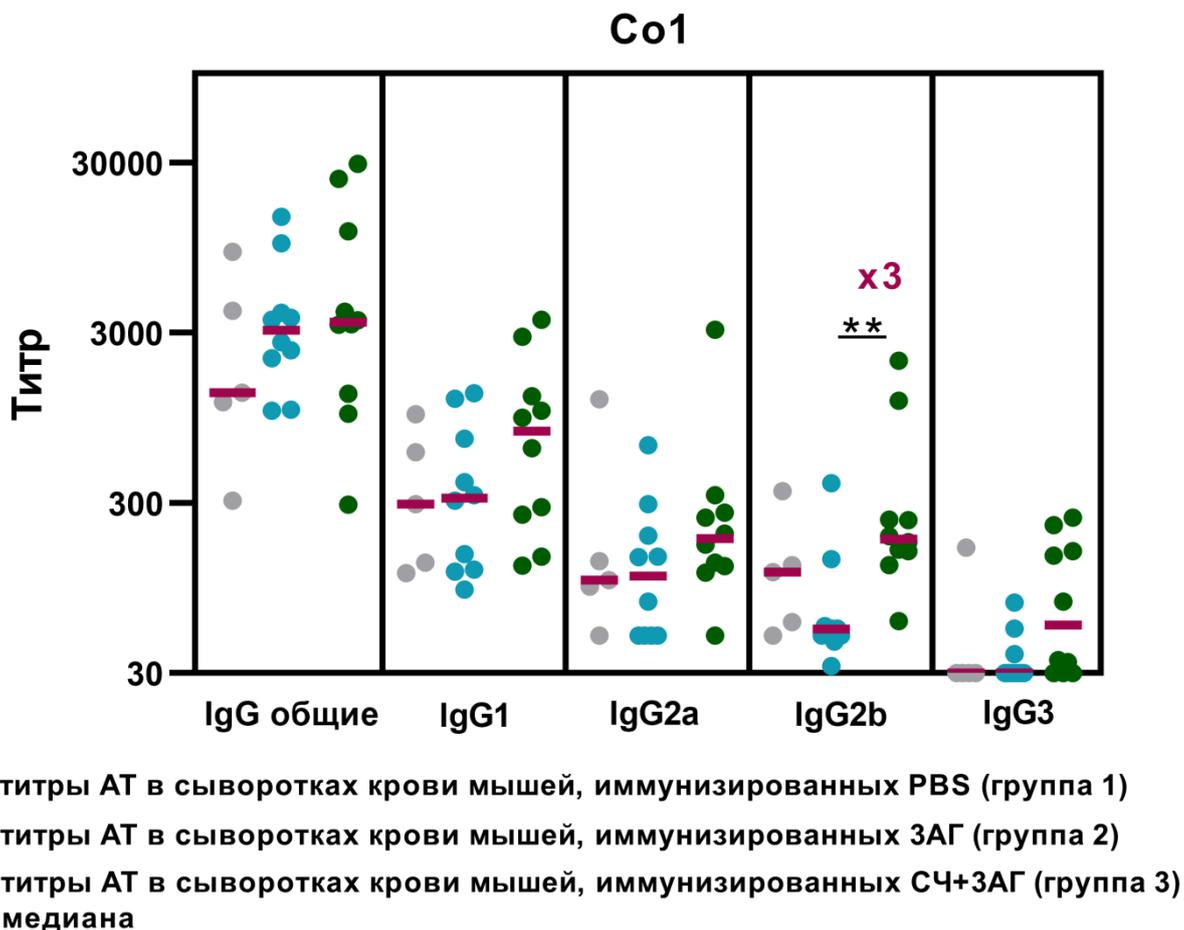
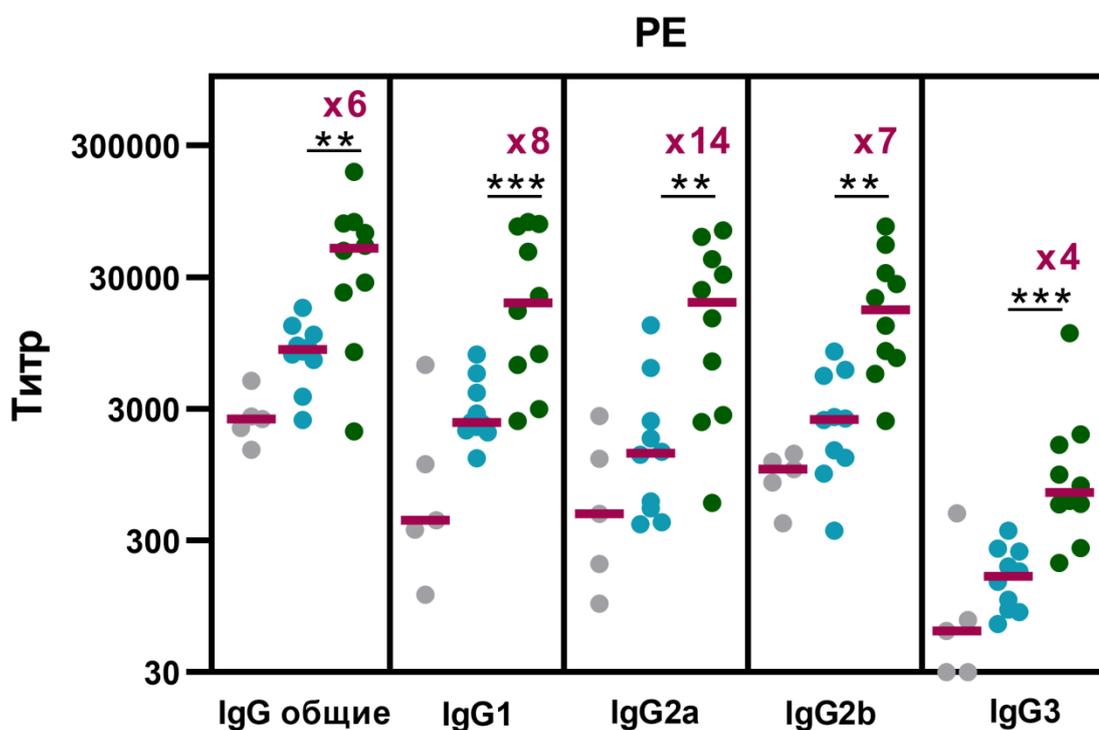


Рисунок 18. Титры антител к антигену Co1 в сыворотках крови мышей через две недели после второй иммунизации композициями СЧ + 3АГ, либо 3АГ в отсутствие СЧ, либо PBS. Титры антител в сыворотках крови оценивали с помощью непрямого ИФА. Концентрация антигена на планшете – 10 мкг/мл. P-value рассчитывали с использованием U-критерия Манна-Уитни. ****P < 0,01.**



- титры АТ в сыворотках крови мышей, иммунизированных PBS (группа 1)
- титры АТ в сыворотках крови мышей, иммунизированных 3АГ (группа 2)
- титры АТ в сыворотках крови мышей, иммунизированных СЧ+3АГ (группа 3)
- медиана

Рисунок 19. Титры антител к антигену PE в сыворотках крови мышей через две недели после второй иммунизации композициями СЧ + 3АГ, либо 3АГ в отсутствие СЧ, либо PBS. Титры антител в сыворотках крови оценивали с помощью непрямого ИФА. Концентрация антигена на планшете – 10 мкг/мл. P-value рассчитывали с использованием U-критерия Манна-Уитни. **P < 0,01; ***P < 0,001.

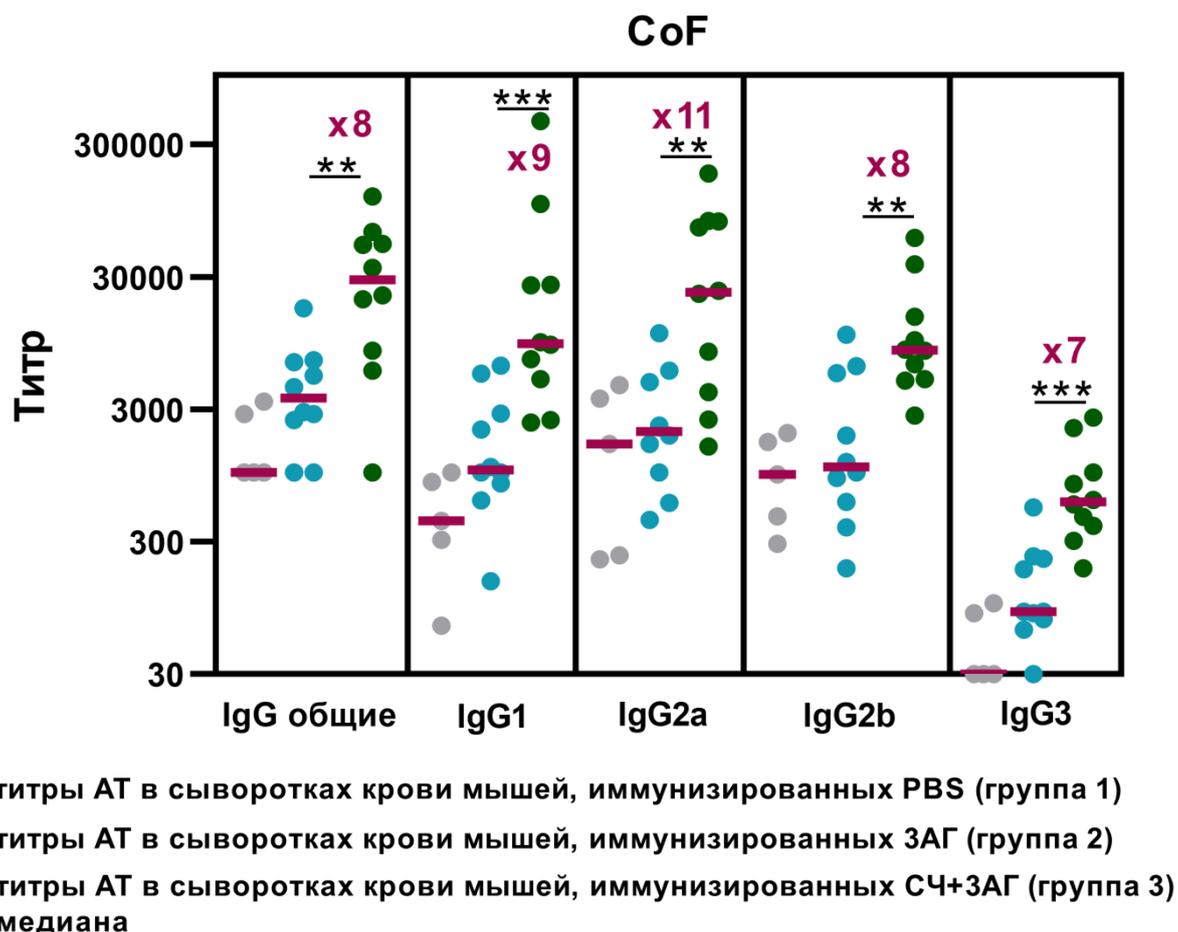


Рисунок 20. Титры антител к антигену CoF в сыворотках крови мышей через две недели после второй иммунизации композициями СЧ + 3АГ, либо 3АГ в отсутствие СЧ, либо PBS. Титры антител в сыворотках крови оценивали с помощью непрямого ИФА. Концентрация антигена на планшете – 10 мкг/мл. P-value рассчитывали с использованием U-критерия Манна-Уитни. **P < 0,01; ***P < 0,001.

Чтобы определить влияние СЧ на иммуногенность коронавирусных антигенов в составе композиций СЧ + 3АГ, было проведено сравнение титров антител в сыворотках крови, полученных от мышей группы 2 и группы 3, которые отличались только наличием СЧ. Было показано, что СЧ значительно усиливают иммунный ответ на антиген PE [медиана титров общих IgG – 49805 при иммунизации композициями СЧ + 3АГ (группа 3), медиана титров общих IgG – 8511 при иммунизации смесью индивидуальных антигенов (группа 2)] (Рис. 19). Аналогичную картину можно было наблюдать и в случае антигена CoF (медиана титров общих IgG – 28505 для группы 3, медиана титров общих IgG – 3645 для группы 2) (Рис. 20). Для обоих антигенов (PE и CoF) также было показано, что титры антител, относящихся к изотипам IgG1, IgG2a, IgG2b и

IgG3, были значительно выше в сыворотках крови мышей, иммунизированных композициями СЧ + 3АГ, в отличие от титров антител в сыворотках крови мышей, иммунизированных смесью индивидуальных антигенов без СЧ (Рис. 19 и Рис. 20). В случае антигена Co1 существенных различий при сравнении титров общих IgG в сыворотках крови мышей группы 2 и группы 3 зарегистрировано не было. Статистическая значимость была выявлена лишь при сравнении титров антител изотипа IgG2b, которые были в три раза выше после иммунизации композициями СЧ + 3АГ (медиана титров IgG2b – 185 для группы 3), чем после иммунизации смесью индивидуальных коронавирусных антигенов без СЧ (медиана титров IgG2b – 55 для группы 2) (Рис. 18).

Иммунный ответ на антиген Co1 (соответствующий RBD) оказался довольно низким как в случае иммунизации совместно с СЧ, так и без них. О низкой иммуногенности рекомбинантных белковых вакцин на основе RBD, экспрессированного в клетках насекомых и в клетках млекопитающих, известно и из других исследований (Yang *et al.*, 2020; Tan *et al.*, 2021). В частности, Yang с соавторами (2020) представили данные о низких титрах антител к RBD в сыворотках крови мышей, иммунизированных двукратно RBD, полученным в клетках насекомых, в количестве 5 мкг в сочетании с адьювантом гидроксидом алюминия. Однако титры специфических антител к RBD увеличились после введения второй бустерной дозы, т.е. после третьей иммунизации (Yang *et al.*, 2020). Наши результаты также подтвердили низкую иммуногенность рекомбинантного RBD-содержащего антигена Co1 и тот факт, что двух иммунизаций, по-видимому, недостаточно для обеспечения необходимых титров антител, специфичных к RBD, даже в случае иммунизации с адьювантом СЧ.

Важно отметить, что СЧ значительно усиливали иммунный ответ на антигены PE (содержит консервативные участки S2-субъединицы) и CoF (представляет собой RBD, соединенный с консервативным эпитопом из домена HR2) в сравнении с иммунным ответом, индуцированным смесью

индивидуальных антигенов без СЧ. Более того, усиление иммуногенности при добавлении СЧ к антигенам PE и CoF было продемонстрировано не только для титров общих IgG, но и оказалось верным для титров каждого из отдельных изотипов – IgG1, IgG2a, IgG2b и IgG3. Это является косвенным признаком того, что композиции СЧ + ЗАГ могут стимулировать как Th1-, так и Th2-опосредованный иммунный ответ. Изучение соотношения Th1- и Th2-иммунного ответа является важным этапом получения эффективных и безопасных вакцин против SARS-CoV-2, поскольку важно не допустить развитие Th2-поляризованного ответа, с которым может быть связано развитие легочных иммунопатологий (Tregoning *et al.*, 2020). В случае использования мышинной модели косвенно о преимущественной активации той или иной ветви иммунного ответа можно судить по соотношению количества иммуноглобулинов, относящихся к изотипам IgG1 и IgG2a: более высокие уровни IgG1 по сравнению с IgG2a у мышей указывают на преобладающую активацию Th2-ответа (Mountford *et al.*, 1994). В настоящей работе при иммунизации мышей композициями СЧ + ЗАГ 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 и служить эффективным адъювантом для коронавирусных антигенов.

Представленные данные об иммуногенности PE и CoF согласуются с результатами недавнего исследования, в котором были получены наночастицы ферритина *Helicobacter pylori*, конъюгированные с RBD и консервативными участками S2-субъединицы – гептадными повторами HR (наночастицы RBD-HR), и наночастицы ферритина, конъюгированные с RBD (наночастицы RBD). Обнаружено, что в комбинации с адъювантом Sigma Adjuvant System (SAS, альтернатива адъюванту Фрейнда) наночастицы RBD-HR вызывают гуморальный и клеточный ответы после двух иммунизаций мышей. Оба типа наночастиц защищали трансгенных мышей,

экспрессирующих человеческий ACE2, от инфекции SARS-CoV-2, но лишь наночастицы RBD-HR вызывали образование нейтрализующих антител не только против SARS-CoV-2, но и против других коронавирусов (Ma *et al.*, 2020). Можно предположить, что антитела, выработанные в ответ на антигены PE и CoF, которые содержат консервативные участки S2-субъединицы, могут играть решающую роль в защите от спектра SARS-подобных коронавирусов.

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

Поскольку белок СЧ является чужеродным белковым антигеном для млекопитающих, при иммунизации композициями СЧ + ЗАГ можно было ожидать индукцию антител к СЧ. В предыдущих исследованиях нашей лаборатории было показано, что при иммунизации композициями СЧ с другими антигенами титры антител к СЧ были существенно ниже, чем к целевым белкам (Табл. 7) (Trifonova *et al.*, 2017; Evtushenko *et al.*, 2020; Granovski *et al.*, 2022).

Определено соотношение титров антител к СЧ и к трем антигенам (Co1, PE и CoF) после иммунизации мышей композициями СЧ + ЗАГ. С помощью непрямого ИФА были проанализированы титры общих IgG к СЧ в сыворотках, полученных после второй иммунизации. Сравнение титров общих IgG, специфичных к СЧ и к каждому из коронавирусных антигенов, представлено на рисунке 21. Медианное значение титров общих IgG к антигену Co1 было низким и не отличалось от титров к СЧ (Рис. 21). Между тем, после двух иммунизаций титры общих IgG к целевым антигенам PE и CoF были в 16 и в 9 раз, соответственно, выше, чем к СЧ (Рис. 21).

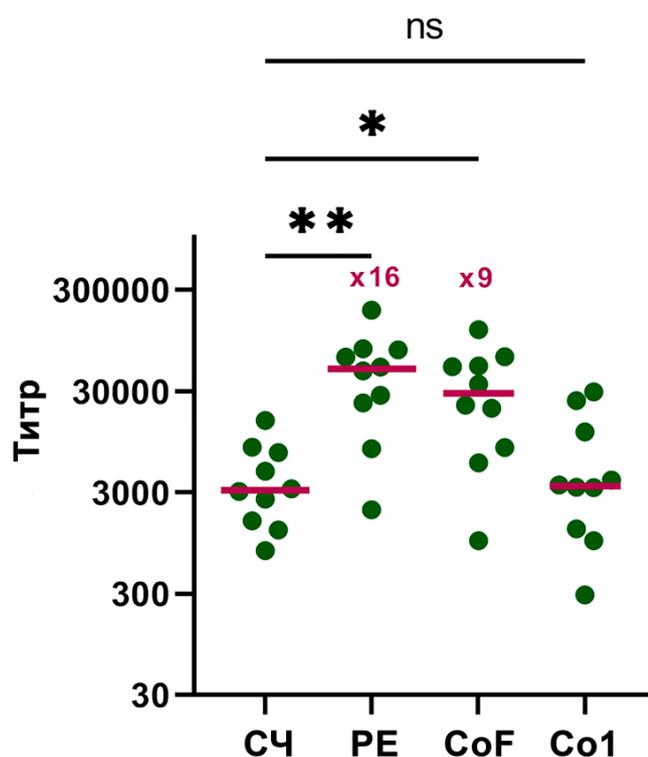


Рисунок 21. Сравнительный анализ иммунного ответа на СЧ и на коронавирусные антигены. Группу мышей (группа 3) иммунизировали внутрибрюшинно двукратно композициями СЧ + ЗАГ. Титры антител в сыворотках крови, полученных через две недели после второй иммунизации, оценивали с помощью непрямого ИФА. Концентрация 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.

Соотношение титров антител к различным антигенам и к СЧ может варьироваться: в разных экспериментах титры антител к антигенам превышали титры антител к СЧ от 6 до 150 раз (Табл. 7) (Trifonova *et al.*, 2017; Evtushenko *et al.*, 2020; Granovskiyy *et al.*, 2022). В настоящей работе титры антител к антигену Co1 и к СЧ оказались сопоставимы. Титры антител к CoF и к PE были в 9 и в 16 раз выше, чем титры антител к СЧ, соответственно (Табл. 7). Можно считать, что такие соотношения оптимальны для нашего вакцинного кандидата.

Таблица 7. Соотношение титров общих IgG к антигенам и к СЧ в сыворотках крови животных после иммунизации композициями СЧ с различными антигенами.

Антиген(ы) в составе композиций с СЧ	Соотношение титров общих IgG к антигену(-ам) и к СЧ	Источник
Рекомбинантные антигены коронавируса Co1 + PE + CoF	PE/СЧ = 16/1 CoF/СЧ = 9/1 Co1/СЧ = 1/1	Настоящая работа
Рекомбинантный антиген вируса краснухи A ₄	6/1	Trifonova <i>et al.</i> , 2017
Овальбумин	47/1	Evtushenko <i>et al.</i> , 2020
Рекомбинантный протективный антиген сибирской язвы rPA83m	rPA83m/СЧ = 150/1 (94/1 при иммунизации препаратом СЧ+rPA83m, подвергшимся инкубации при +37° в течение 27 дней)	Granovskiy <i>et al.</i> , 2022

Показано, что при иммунизации композициями СЧ + ЗАГ иммунный ответ вырабатывается преимущественно на ЗАГ, а не на платформу-адъювант. Ранее в других 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). Было показано, что при иммунизации наночастицами RBD-HR титры антител к ферритину в 10 раз превышали титры антител к антигенам. Авторы исследования предполагают, что, скорее всего, ферритин *H. pylori* и антитела к нему не должны обладать токсичностью *in vivo*, поскольку известно о двух вакцинах против гриппа на основе наночастиц ферритина, клинические исследования которых завершены (NCT03186781, NCT03814720), и никаких серьезных побочных эффектов не было зарегистрировано (Ma *et al.*, 2020). Тем не менее, изучение соотношения титров антител, вырабатываемых к платформе-адъюванту и к целевому антигену, является важным аспектом исследования эффективности рекомбинантных белковых вакцин. В этой

связи, уникальное свойство СЧ индуцировать высокие титры антиген-специфических антител одновременно с низкими титрами адьювант-специфических антител является обнадеживающим показателем их эффективности.

3.8. Исследование вируснейтрализующей активности сывороток крови иммунизированных животных

Поскольку было показано, что при иммунизации мышей композиции СЧ + ЗАГ обеспечивают более сильный иммунный ответ, чем индивидуальные коронавирусные антигены (ЗАГ) без СЧ, в следующем эксперименте было решено оценить вируснейтрализующую активность сывороток крови животных, иммунизированных композициями. С этой целью самок сирийских хомячков 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. Через три недели после второй иммунизации у хомячков отбирали кровь с целью дальнейшего тестирования образцов сывороток на наличие вируснейтрализующей активности. Схема иммунизации представлена на рисунке 22.

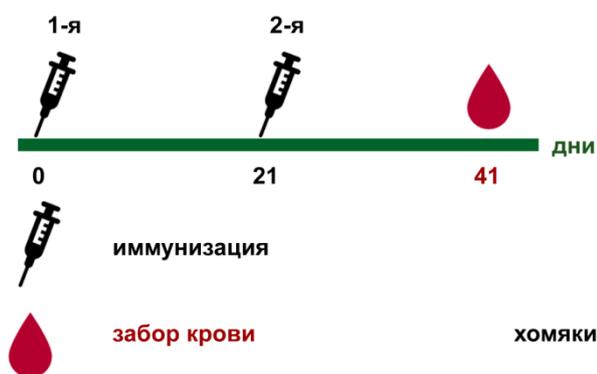


Рисунок 22. Схема иммунизации лабораторных животных. Самок хомячков (десять животных) иммунизировали внутримышечно композициями СЧ + ЗАГ (250 мкг СЧ + 21 мкг ЗАГ) двукратно с интервалом в три недели. Все образцы вводили в PBS (общий объем 0,5 мл). Через три недели после второй иммунизации осуществляли забор крови для оценки вируснейтрализующей активности сывороток.

В течение всего периода иммунизации осуществляли ежедневный мониторинг общего состояния животных и контролировали их массу тела (в 0-й, 21-й и 42-й дни эксперимента). Каких-либо патологических изменений в

организме животных и их гибели отмечено не было. Существенной потери массы тела у животных не регистрировали (Табл. 8).

Таблица 8. Масса тела хомяков, иммунизированных композициями СЧ + 3АГ (250 мкг СЧ + 21 мкг 3АГ), в течение периода иммунизации.

Масса тела хомяков в течение периода иммунизации, г			
Идентификационный номер животного	0-й день	21-й день	42-й день*
1	103	105	100
2	98	104	99
3	81	95	98
4	97	109	104
5	106	117	109
6	104	106	116
7	96	112	110
8	64	73	78
9	95	108	109
10	96	110	109

Примечание: * - массу анализировали через сутки после забора крови.

Анализ нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 важен для оценки антитело-опосредованной защиты у инфицированных и вакцинированных людей. Однако валидированные и стандартизированные методы данного анализа в настоящее время отсутствуют (Gundlapalli *et al.*, 2020). В лабораториях применяют такие подходы, как реакция нейтрализации нативного SARS-CoV-2 или псевдовиральных частиц в чувствительной культуре клеток, использование «суррогатных» тест-систем, и т. д. (Lu *et al.*, 2021). Однако трудно адекватно сравнивать результаты, полученные с использованием различных подходов к анализу данных и методологий проведения эксперимента. Также следует отметить, что уровни вируснейтрализующих антител не всегда коррелируют с защитной эффективностью вакцинного кандидата (Gao *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2020).

Мы оценивали вируснейтрализующую активность сывороток 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, НТ₅₀). 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 NT_{50} от 18 до 87 (Рис. 23).

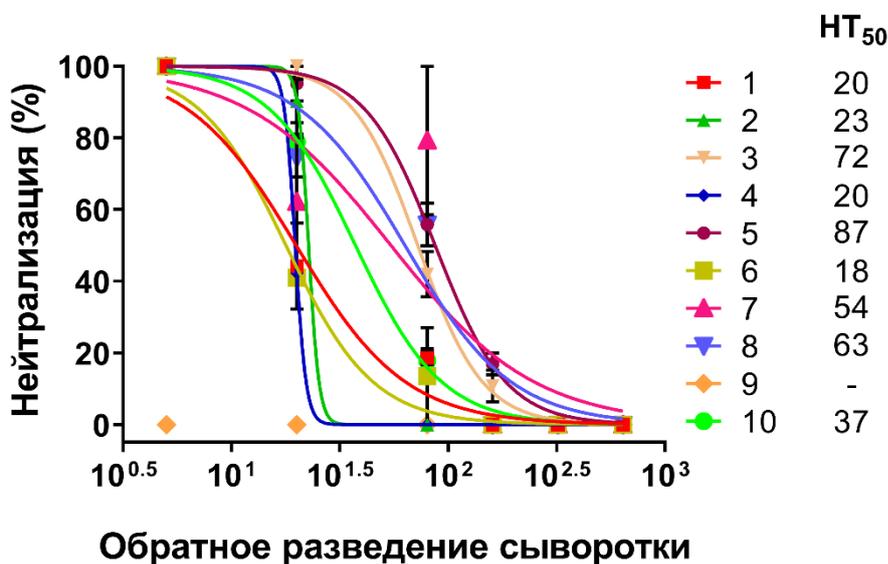


Рисунок 23. Анализ нейтрализующей активности сывороток крови хомяков, иммунизированных композициями СЧ + ЗАГ, в отношении вируса SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero E6. Представлены дозозависимые кривые ингибирования цитопатического эффекта SARS-CoV-2 под действием различных разведений исследуемых сывороток. Приведены значения NT_{50} (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.

Можно сделать вывод, что композиции СЧ + ЗАГ индуцировали у хомяков вируснейтрализующие антитела против SARS-CoV-2, что позволяет рассматривать их в качестве перспективного вакцинного кандидата.

3.9. Создание и характеристика двух вакцинных кандидатов – MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5

Дальнейшие задачи настоящего исследования были направлены на получение дополнительных сведений о безопасности композиций СЧ + ЗАГ и их протективности в отношении вируса SARS-CoV-2 на модели *in vivo*. Представленные в литературе экспериментальные данные свидетельствуют о том, что увеличение дозы антигена в составе вакцинного кандидата приводит к усилению иммунного ответа (Yang *et al.*, 2020; Nazarian *et al.*, 2022). Так, в

исследовании Nazarian с соавторами (2022) была отмечена индукция более высоких титров антител при иммунизации мышей вакцинным кандидатом, содержащим 80 либо 120 мкг коронавируса антигенов, по сравнению с 40 мкг антигенов. В дальнейшем авторы данной работы выбрали дозу 120 мкг антигенов для изучения протективности вакцинного кандидата на нечеловекообразных приматах после заражения SARS-CoV-2 (Nazarian *et al.*, 2022). В настоящем исследовании иммуногенность композиций, содержащих 250 мкг СЧ и 21 мкг коронавируса антигенов, была подтверждена в опытах на мышах. Для проведения серии экспериментов, посвященных исследованию протективности композиций СЧ + 3АГ на животных после инфицирования SARS-CoV-2, мы решили увеличить суммарное количество антигенов в составе композиций, полагая, что в этом случае защитный эффект будет более выраженным. Были подготовлены два вакцинных кандидата на основе СЧ + 3АГ, различающиеся по суммарному количеству рекомбинантных коронавируса белков, – 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).

Вакцинные кандидаты были получены путем смешивания рекомбинантных антигенов и СЧ в PBS:

MSU-CoV-4 (15 мкг Co1 + 15 мкг PE + 15 мкг CoF + 250 мкг СЧ в 0,5 мл PBS),

MSU-CoV-5 (20 мкг Co1 + 20 мкг PE + 20 мкг CoF + 250 мкг СЧ в 0,5 мл PBS).

Препараты были охарактеризованы с помощью ПЭМ [Рис. 24 (А, Б)]. Среднее значение диаметра СЧ в составе вакцинного кандидата MSU-CoV-4, рассчитанное по данным ПЭМ, составило 403 ± 99 нм (среднее \pm стандартное отклонение, $n=100$), в составе MSU-CoV-5 – 404 ± 104 нм.

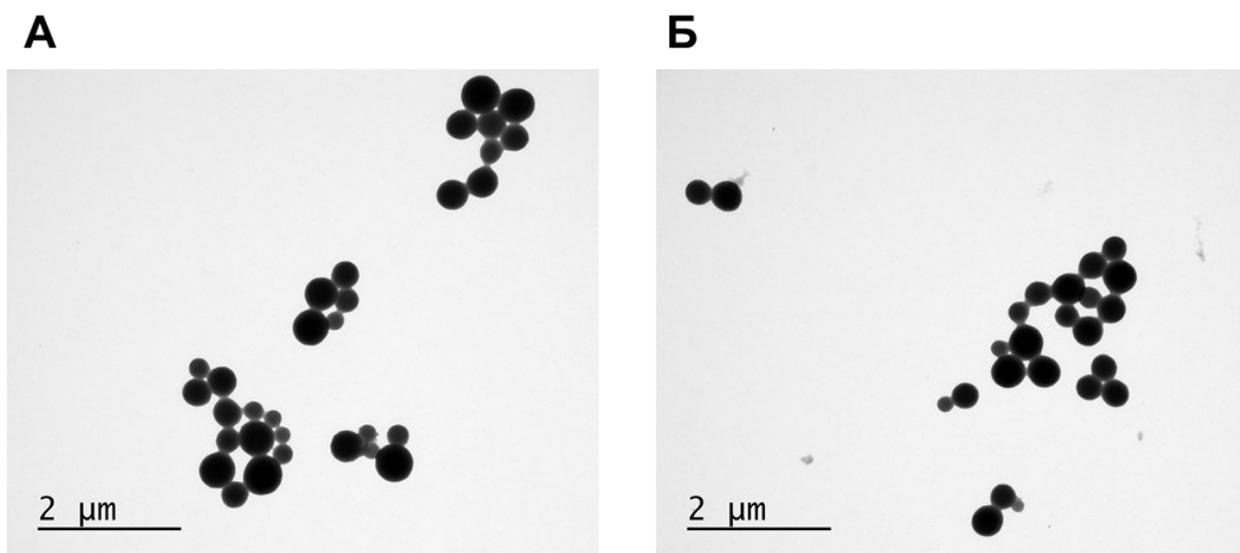


Рисунок 24. Препараты MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5. ПЭМ, без контрастирования. Масштабная метка, 2 мкм.

А. Препарат MSU-CoV-4.

Б. Препарат MSU-CoV-5.

Вакцинные кандидаты MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5 представляют собой суспензии для внутримышечного введения. Для препаратов, введение которых осуществляется парентеральным путем (в т.ч. с помощью внутримышечной инъекции), рекомендовано значение pH, близкое к физиологическому значению (около 7,4), с целью минимизации постинъекционных осложнений. Так, было установлено, что при введении препарата с показателем pH выше 9 может возникать некроз тканей, тогда как болевые ощущения в месте инъекции могут быть вызваны введением препарата, имеющего значение pH ниже 3 (Usach *et al.*, 2019). Значения pH, определенные для вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5, были близки к физиологическому показателю: $7,35 \pm 0,01$ (среднее \pm стандартное отклонение) и $7,34 \pm 0,03$, соответственно.

Белковый состав вакцинных кандидатов был проанализирован методом электрофореза в ДСН-ПААГ в денатурирующих условиях (Рис. 25). В подготовленных для анализа образцах соотношение СЧ/антигены было сохранено.

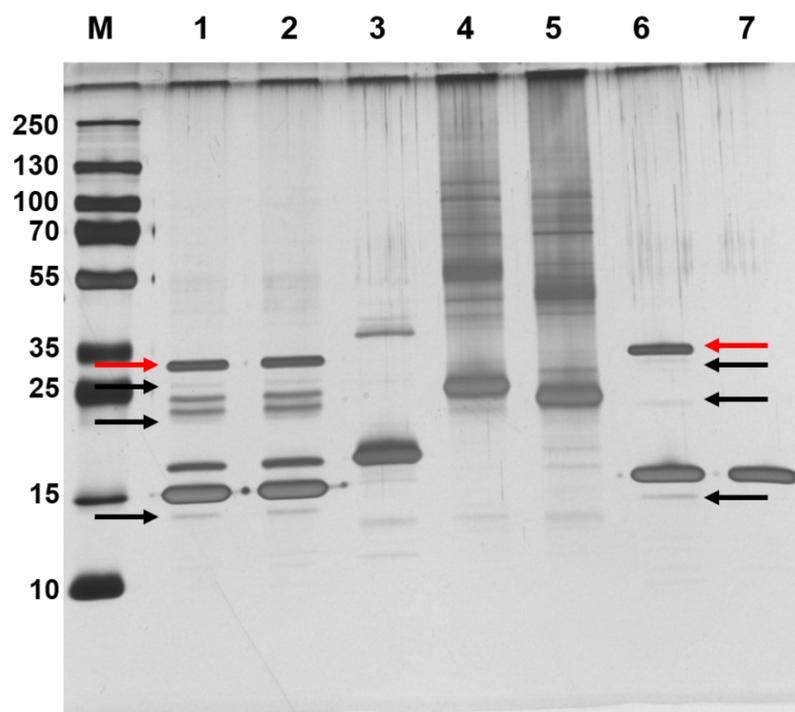


Рисунок 25. Электрофоретический анализ вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5.

М – маркеры молекулярной массы белков, слева указаны значения в кДа (10–250); **1** – MSU-CoV-4 (нанесено 1 мкг СЧ и 0,06 мкг каждого антигена); **2** – MSU-CoV-5 (нанесено 1 мкг СЧ и 0,08 мкг каждого антигена); **3** – антиген РЕ, 1 мкг; **4** – антиген СоF, 1 мкг; **5** – антиген Со1, 1 мкг; **6** – СЧ ВТМ, 1 мкг; **7** – БО ВТМ, 1 мкг.

Стрелками красного цвета обозначена димерная форма белка СЧ, стрелками черного цвета обозначены другие белковые продукты.

Электрофорез в градиентном ДСН-ПААГ (8–20%). Гель окрашен серебром.

Как видно из рисунка 25, в препаратах обоих вакцинных кандидатов (дорожки 1 и 2) детектируются полосы, соответствующие по молекулярной массе СЧ (дорожка 6) и антигенам РЕ, СоF и Со1 (дорожки 3, 4 и 5, соответственно). В образце СЧ ВТМ (дорожка 6) на уровне 35 кДа детектируется полоса (обозначена стрелкой красного цвета), соответствующая димерной форме белка СЧ [$17-17,5$ кДа (молекулярная масса БО ВТМ) $\times 2 = 35$ кДа]. Помимо димерной формы белка СЧ на приведенной электрофореграмме препарата СЧ ВТМ (дорожка 6) визуальнo детектируются дополнительные полосы (отмечены стрелками черного цвета). Эти же полосы обнаруживаются на электрофореграммах вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 (дорожка 1) и MSU-CoV-5 (дорожка 2). Поэтому принципиально важно далее было понять, являются ли все дополнительные белковые продукты,

детектируемые при электрофоретическом анализе состава СЧ и вакцинных кандидатов, продуктами олигомеризации и фрагментации БО ВТМ – единственного компонента СЧ. Антигенную специфичность мономера, димеров, предположительно олигомеров и низкомолекулярных фрагментов БО ВТМ в препаратах СЧ и вакцинных кандидатов проверяли методом вестерн-блот анализа, в качестве первичных антител использовали сыворотку, специфичную к БО ВТМ. Данная сыворотка была получена ранее в нашей лаборатории после иммунизации морских свинок препаратом СЧ ВТМ (Granovskiy *et al.*, 2022). На рисунке 26 представлены результаты данного эксперимента.

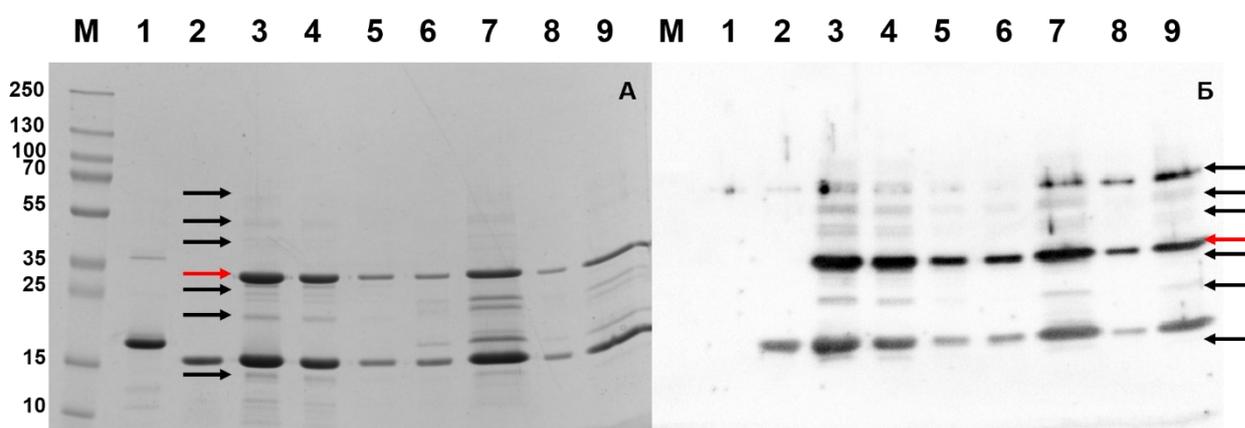


Рисунок 26. Результаты вестерн-блот анализа по определению антигенной специфичности мономера, димеров, олигомеров и низкомолекулярных фрагментов БО ВТМ в препаратах СЧ и вакцинных кандидатах MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5.

А. Электрофоретический анализ СЧ ВТМ и вакцинных кандидатов в градиентном ДСН-ПААГ (8–20%). Гель окрашен Кумасси G-250.

Б. Вестерн-блот анализ с сывороткой к БО ВТМ.

М – маркеры молекулярной массы белков, слева указаны значения в кДа (10–250); **1** – антиген PE (отрицательный контроль); **2** – БО ВТМ (положительный контроль); **3, 4, 5** – СЧ ВТМ в количестве 10, 5 и 1 мкг, соответственно; **6, 7** – MSU-CoV-5 (нанесено 1 и 10 мкг СЧ, соответственно); **8, 9** – MSU-CoV-4 (нанесено 1 и 10 мкг СЧ, соответственно). Стрелками красного цвета обозначена димерная форма белка СЧ, стрелками черного цвета обозначены олигомеры и низкомолекулярные фрагменты БО ВТМ.

Из представленных на рисунке 26 результатов следует, что димеры и другие формы БО ВТМ, детектируемые в суспензии СЧ (дорожки 3, 4, 5), а также в вакцинных кандидатах MSU-CoV-4 (дорожки 8, 9) и MSU-CoV-5 (дорожки 6, 7), узнаются антителами, специфичными к БО ВТМ. При этом коронавирусные антигены в составе вакцинных кандидатов не реагируют с

антителами к БО ВТМ. Таким образом, было показано, что белковые продукты, отличающиеся по своей электрофоретической подвижности от мономерной и димерной формы БО ВТМ, могут быть продуктами его деградации или олигомеризации.

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

Одной из общепризнанных экспериментальных моделей для изучения COVID-19 являются сирийские, или золотистые, хомяки *Mesocricetus auratus*. Модель характеризуется различными клиническими симптомами инфекции, в частности, микроскопическими признаками воспаления легких с максимальным развитием симптомов на шестые-седьмые сутки после заражения (Imai *et al.*, 2020; Johansen *et al.*, 2020; Sia *et al.*, 2020).

В настоящем исследовании безопасность вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5 оценивали, контролируя физиологическое состояние лабораторных животных (сирийских хомяков), в том числе их массу тела, в процессе иммунизации. Протективность вакцинных кандидатов исследовали, анализируя гистологические изменения в легких вакцинированных хомяков после заражения SARS-CoV-2.

Для исследования эффективности вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5 было сформировано пять экспериментальных групп животных. Каждая группа включала 20 хомяков. Иммунизацию и заражение животных проводили на базе ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Дизайн эксперимента по изучению протективности вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5 при экспериментально вызванной форме COVID-19 у сирийских хомяков представлен в таблице 9 и на рисунке 27.

Таблица 9. Дизайн эксперимента по изучению протективности вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5 при экспериментально вызванной форме COVID-19 у сирийских хомяков.

№	Группа	Разовая доза, мл	Схема введения препаратов	Инфицирование вирусом SARS-CoV-2	Срок эвтаназии (день и кол-во животных)	
					46-й день	49-й день
1	MSU-CoV-4 (250 мкг СЧ + 45 мкг ЗАГ в PBS)	0,5	Внутримышечно в 1-й и 22-й день эксперимента	В 43-й день эксперимента, интраназально в дозе 5,0 lg БОЕ	9	-
					-	9
2	MSU-CoV-5 (250 мкг СЧ + 60 мкг ЗАГ в PBS)	0,5			9	-
					-	9
3	Плацебо (PBS, pH 7,4)	0,5			9	-
					-	9
4	Контроль дозы инфицирования (заражение без предварительной иммунизации)	-	-	-		
			9	-		
5	Интактные животные	-	-	-		
			3	-		
					-	6



Рисунок 27. Схема исследования протективности вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5 на модели инфекции SARS-CoV-2 у сирийских хомяков.

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.

В течение периода иммунизации физиологические показатели (поведение, двигательная активность, аппетит, упитанность, дыхание, волосяной и кожный покровы, слизистые глаз и рта, консистенция и форма экскрементов) соответствовали норме у животных всех групп. В таблице 10 представлены данные взвешиваний экспериментальных животных перед началом эксперимента (0-й день) и в течение срока вакцинации. Потери массы тела вакцинированных животных не наблюдали.

Таблица 10. Результаты изучения влияния исследуемых вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5 на массу тела сирийских хомяков (n=20).

№	Группа	Масса тела животных в каждой группе (г), среднее ± стандартное отклонение						
		0-й день	6-й день	13-й день	20-й день	27-й день	34-й день	41-й день
1	MSU-CoV-4	42,3 ±0,7	49,1 ±1,1	49,4 ±2,3	57,9 ±4,2	68,5 ±2,5	73,9 ±2,1	81,8 ±4,8
2	MSU-CoV-5	41,2 ±0,8	49,5 ±1,7	56,0 ±2,2	65,6 ±4,3	75,4 ±5,4	83,4 ±5,5	91,9 ±7,0
3	Плацебо	41,8 ±1,4	48,9 ±1,7	51,3 ±3,3	57,7 ±4,8	67,9 ±5,9	73,5 ±8,5	78,8 ±9,2
4	Контроль дозы инф.	42,9 ±1,1	51,2 ±1,5	56,7 ±2,2	63,6 ±3,0	73,9 ±8,5	79,6 ±10,2	88,4 ±7,8
5	Интактные животные	43,1 ±1,2	52,6 ±1,7	55,9 ±1,3	65,4 ±1,6	75,7 ±2,4	79,8 ±3,1	91,1 ±3,0

Примечание: группы 1 и 2 иммунизировали вакцинными кандидатами MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5, соответственно; группе 3 вводили PBS; группа 4 – контроль дозы инфицирования: неиммунизированные животные, которых в дальнейшем заражали вирусом; группа 5 – интактные животные: манипуляции иммунизации и заражения не проводили.

Таким образом, применение вакцинных кандидатов MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5 безопасно для сирийских хомяков.

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 для оценки протективности вакцинных кандидатов.

На третий день после заражения животных (46-й день эксперимента) в группах 1–4 была проведена эвтаназия девяти животных. Оставшиеся девять животных были умерщвлены на шестой день после инфицирования (49-й день эксперимента). В группе 5 (интактные животные) в 46-й день эксперимента была проведена эвтаназия трех животных и в 49-й день эксперимента – шести животных. При некропии хомяков опытных (группы 1 и 2) и контрольных групп (группы 3–5) было показано, что выделения из естественных отверстий отсутствовали. Положение и размеры внутренних органов нарушений не представляли. Величина и форма сердца, печени, селезенки были не изменены. Мышца сердца была умеренно плотной, коричневатой окраски. Ткань печени была умеренно полнокровной. Ткань селезенки была умеренно плотной консистенции, темно-вишневого цвета.

Для определения специфики и тяжести поражения легких в настоящей работе было проведено гистологическое исследование легких сирийских хомяков (всего 81 образец). Исследование проводили на базе ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России. Гистологическое строение легких хомяков группы 5 (интактные животные) соответствовало норме, существенных различий в строении легких интактных животных выявлено не было. Обнаруженные патоморфологические признаки (эмфизематозные изменения, спадение легочной ткани – ателектаз, «островки» воспалительной инфильтрации) в легких животных групп 1–4 после инфицирования подтвердили заражение вирусом SARS-CoV-2.

Изображения легких хомяков на третий день и шестой день после заражения SARS-CoV-2 представлены на рисунках 28 и 29, соответственно.

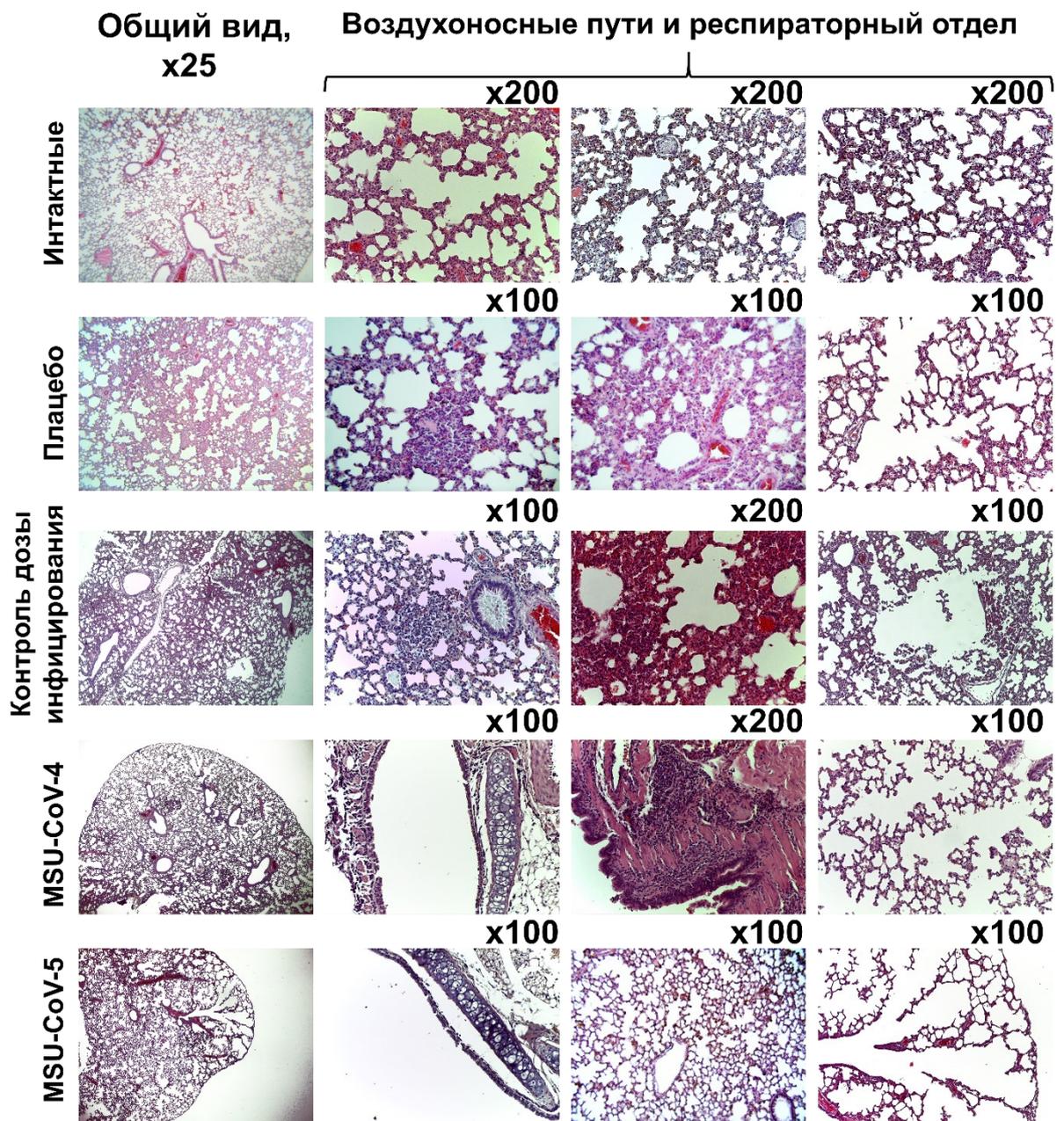


Рисунок 28. Изображения легких сирийских хомячков на третий день после заражения вирусом SARS-CoV-2. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличения x25, x100 и x200.

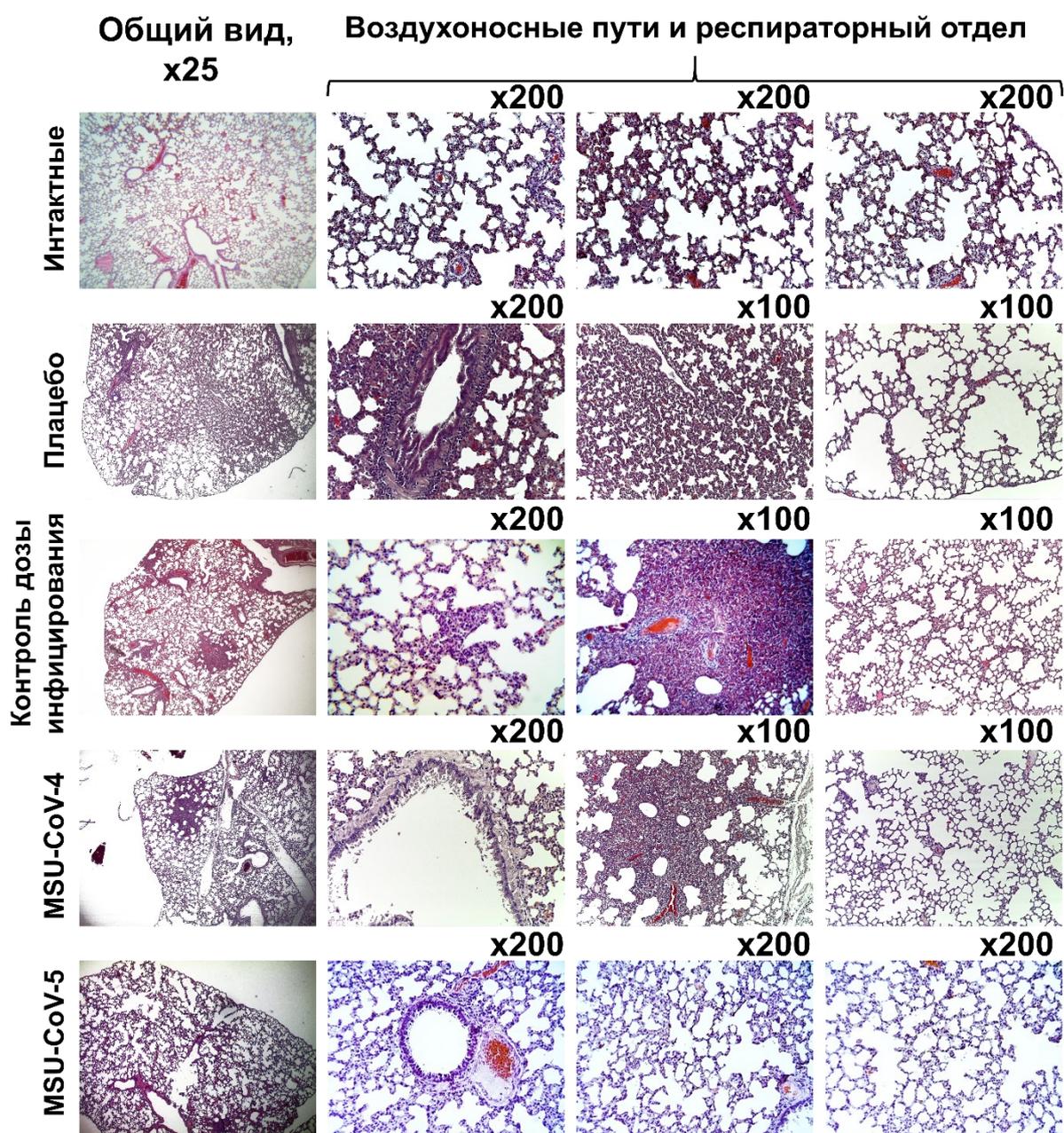


Рисунок 29. Изображения легких сирийских хомяков на шестой день после заражения вирусом SARS-CoV-2. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличения x25, x100 и x200.

Гистологические препараты оценивали, классифицируя микроскопическое повреждение легких на три типа: минимальное, умеренное и тяжелое. Исследование гистопатологических изменений в легких включало оценку признаков воспаления легких, таких как тяжесть интерстициальной пневмонии, бронхита, эпителиального некроза бронхов и альвеол и гиперплазия альвеолярных эпителиальных клеток II типа.

На рисунке 30 представлены данные о количестве хомяков в каждой группе с минимальной, умеренной или тяжелой легочной патологией, оцененной по признакам воспаления легких.

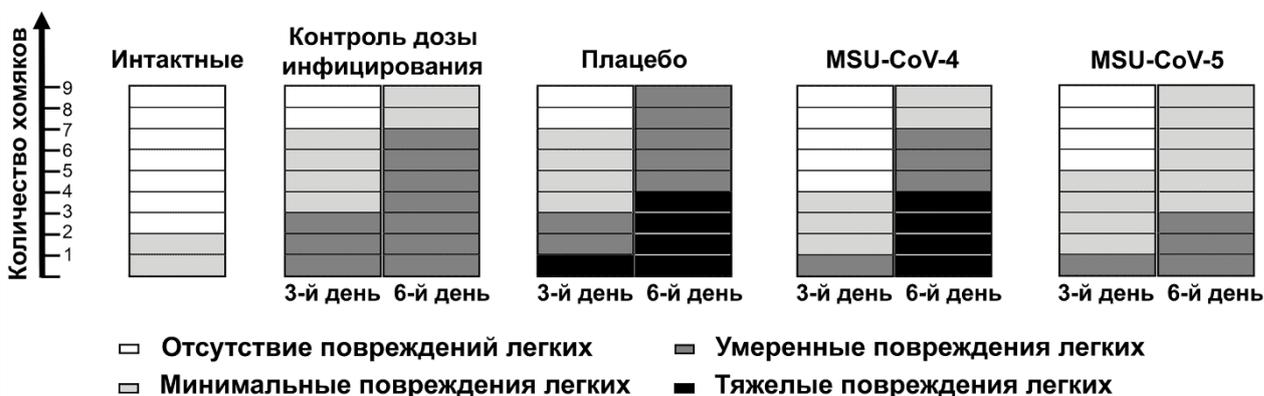


Рисунок 30. Количество хомяков в каждой группе с отсутствием повреждений легких, минимальной, умеренной или тяжелой легочной патологией, оцененной по признакам воспаления легких. Анализ степени выраженности воспаления легких проводили для двух временных точек исследования: третий день и шестой день после 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.

Как видно из рисунка 30, 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.

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). В литературе встречаются аналогичные примеры, демонстрирующие, что при снижении дозы антигена вакцинный препарат может обеспечивать лишь частичную защиту от симптоматического заболевания, вызванного SARS-CoV-2, и последующего повреждения легких (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 коронавируса 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 коронавирусных 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 (мыши) впервые показало, что СЧ усиливают иммунный ответ на коронавирусные 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 + 3АГ были получены два вакцинных кандидата против SARS-CoV-2 – MSU-CoV-4 и MSU-CoV-5, различающиеся количеством коронавирусных 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 коронавирусов (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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ). Отслеживание вариантов вируса SARS-CoV-2 [Электронный ресурс]. URL: <https://www.who.int/ru/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>. Дата обращения: 31.08.2023.
2. Галкин С.О., Анисенко А.Н., Шадрина О.А., Готтих М.Б. Генно-инженерные системы для изучения вирусных патогенов человека из семейства Coronaviridae // Молекулярная биология. 2022. Т. 56. № 1. С. 83-102.
3. Кондакова О.А., Евтушенко Е.А., Баранов О.А., Никитин Н.А., Карпова О.В. Структурно модифицированные частицы вирусов растений и бактериофагов. Свойства и применение // Биохимия. 2022. Т. 87. № 6. С. 727-740.
4. Кордюкова Л.В., Шанько А.В. COVID-19: Мифы и реальность // Биохимия. 2021. Т. 86. № 7. С. 964-984.
5. Нечипуренко Ю.Д., Анашкина А.А., Матвеева О.В. Изменение антигенных детерминант S-белка вируса SARS-CoV-2 как возможная причина антителизависимого усиления инфекции и цитокинового шторма // Биофизика. 2020. Т. 65. № 4. С. 824-832.
6. Никитин Н.А., Малинин А.С., Рахнянская А.А., Трифонова Е.А., Карпова О.В., Ярославов А.А., Атабеков И.Г. Использование поликатионного спейсера для нековалентной иммобилизации альбумина на термически модифицированных вирусных частицах // Высокомолекулярные соединения. Серия А. 2011. Т. 53. № 11. С. 1885-1891.
7. Никитин Н.А., Трифонова Е.А., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Биобезопасность вирусов растений для человека и животных // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2016. № 3. С. 20-26.
8. Розов С.М., Пермьякова Н.В., Дейнеко Е.В. Основные стратегии гликоинженерии растительных систем экспрессии для получения гуманизированных рекомбинантных фармацевтических белков // Биохимия. 2018. Т. 83. № 3. С. 328-348.
9. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Гаврилова Е.В., Даниленко Е.Д., Иматдинов И.Р., Максюттов Р.А., Нечаева Е.А., Попова А.Ю., Пьянков О.В., и др. Вакцинная композиция против коронавирусной инфекции COVID-19. Патент 2743595С1 Россия. Опубликовано 20 февраля 2021.
10. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Даниленко Е.Д., Иматдинов И.Р., Нечаева Е.А., Пьянков О.В., Пьянкова О.Г., Суслопаров И.М., Таранов О.С., и др. Иммуногенные и протективные свойства пептидной вакцины против SARS-CoV-2 // Вестник РАМН. 2021(а). Т. 76. № 1. С. 5-19.
11. Рыжиков А.Б., Рыжиков Е.А., Богрянцева М.П., Усова С.В., Даниленко Е.Д., Нечаева Е.А., Пьянков О.В., Пьянкова О.Г., Гудымо А.С., Боднев С.А., и др. Простое слепое плацебо-контролируемое рандомизированное исследование безопасности, реактогенности и иммуногенности вакцины «ЭпиВакКорона» для профилактики COVID-19 на

добровольцах в возрасте 18–60 лет (фаза I–II) // Инфекция и иммунитет. 2021(б). Т. 11. № 2. С. 283-296.

12. Рябчевская Е.М., Евтушенко Е.А., Архипенко М.В., Манухова Т.И., Донченко Е.К., Никитин Н.А., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Новый подход к разработке кандидатной вакцины против ротавируса на основе двух вирусов растений // Сельскохозяйственная биология. 2020. Т. 55. № 5. С. 1004-1017.

13. Трифонова Е.А., Никитин Н.А., Архипенко М.В., Донченко Е.К., Атабеков И.Г., Карпова О.В. Сравнительное изучение термической перестройки вирусов с икосаэдрическим и спиральным типом симметрии // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2017. Т. 72. № 4. С. 209-214.

14. Трифонова Е.А., Никитин Н.А., Кирпичников М.П., Карпова О.В., Атабеков И.Г. Способ получения и характеристика сферических частиц - новых биогенных платформ // Вестник Московского университета. Серия 16: Биология. 2015. № 4. С. 46-50.

15. Щелканов М.Ю., Попова А.Ю., Дедков В.Г., Акимкин В.Г., Малеев В.В. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) // Инфекция и иммунитет. 2020. Т. 10. № 2. С. 221-246.

16. Abu-Raddad L.J., Chemaitelly H., Yassine H.M., Benslimane F.M., Al Khatib H.A., Tang P., Malek J.A., Coyle P., Ayoub H.H., Al Kanaani Z., et al. Pfizer-BioNTech mRNA BNT162b2 Covid-19 vaccine protection against variants of concern after one versus two doses // J Travel Med. 2021. V. 28. № 7. P. taab083.

17. Agathos S.N. Production scale insect cell culture // Biotechnol Adv. 1991. V. 9. № 1. P. 51-68.

18. Agrawal A.S., Tao X., Algaissi A., Garron T., Narayanan K., Peng B.-H., Couch R.B., Tseng C.-T. Immunization with inactivated Middle East Respiratory Syndrome coronavirus vaccine leads to lung immunopathology on challenge with live virus // Hum Vaccin Immunother. 2016. V. 12. № 9. P. 2351-2356.

19. Ahmed S.F., Quadeer A.A., McKay M.R. Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies // Viruses. 2020. V. 12. № 3. P. 254.

20. Ali F., Kasry A., Amin M. The new SARS-CoV-2 strain shows a stronger binding affinity to ACE2 due to N501Y mutant // Med Drug Discov. 2021. V. 10. P. 100086.

21. Alleva D.G., Delpero A.R., Scully M.M., Murikipudi S., Ragupathy R., Greaves E.K., Sathiyaseelan T., Haworth J.R., Shah N.J., Rao V., et al. Development of an IgG-Fc fusion COVID-19 subunit vaccine, AKS-452 // Vaccine. 2021. V. 39. № 45. P. 6601-6613.

22. Almeida J.D., Berry D.M., Cunningham C.H., Hamre D., Hofstad M.S., Mallucci L., McIntosh K., Tyrrell D.A.J. Virology: Coronaviruses // Nature. 1968. V. 220. № 5168. P. 650.

23. Apostólico J.de S., Lunardelli V.A., Coirada F.C., Boscardin S.B., Rosa D.S. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing // *J Immunol Res.* 2016. V. 2016. P. 1459394.
24. Arunachalam P.S., Walls A.C., Golden N., Atyeo C., Fischinger S., Li C., Aye P., Navarro M.J., Lai L., Edara V.V., et al. Adjuvanting a subunit COVID-19 vaccine to induce protective immunity // *Nature.* 2021. V. 594. № 7862. P. 253-258.
25. Arya R., Kumari S., Pandey B., Mistry H., Bihani S.C., Das A., Prashar V., Gupta G.D., Panicker L., Kumar M. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins // *J Mol Biol.* 2021. V. 433. № 2. P. 166725.
26. Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. Thermal transition of native tobacco mosaic virus and RNA-free viral proteins into spherical nanoparticles // *J Gen Virol.* 2011. V. 92. № 2. P. 453-456.
27. Aucouturier J., Dupuis L., Deville S., Ascarateil S., Ganne V. Montanide ISA 720 and 51: a new generation of water in oil emulsions as adjuvants for human vaccines // *Expert Rev Vaccines.* 2002. V. 1. № 1. P. 111-118.
28. Bai C., Zhong Q., Gao G.F. Overview of SARS-CoV-2 genome-encoded proteins // *Sci China Life Sci.* 2022. V. 65. № 2. P. 280-294.
29. Bai Z., Cao Y., Liu W., Li J. The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation // *Viruses.* 2021. V. 13. № 6. P. 1115.
30. Bengtsson K.L., Karlsson K.H., Magnusson S.E., Reimer J.M., Stertman L. Matrix-M adjuvant: enhancing immune responses by 'setting the stage' for the antigen // *Expert Rev Vaccines.* 2013. V. 12. № 8. P. 821-823.
31. Benton D.J., Wrobel A.G., Xu P., Roustan C., Martin S.R., Rosenthal P.B., Skehel J.J., Gamblin S.J. Receptor binding and priming of the spike protein of SARS-CoV-2 for membrane fusion // *Nature.* 2020. V. 588. № 7837. P. 327-330.
32. Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. The Protein Data Bank // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 1. P. 235-242.
33. Bolles M., Deming D., Long K., Agnihothram S., Whitmore A., Ferris M., Funkhouser W., Gralinski L., Titura A., Heise M., et al. A double-inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus vaccine provides incomplete protection in mice and induces increased eosinophilic proinflammatory pulmonary response upon challenge // *J Virol.* 2011. V. 85. № 23. P. 12201-12215.
34. Boson B., Legros V., Zhou B., Siret E., Mathieu C., Cosset F.-L., Lavillette D., Denolly S. The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles // *J Biol Chem.* 2021. V. 296. P. 100111.
35. Bravo L., Smolenov I., Han H.H., Li P., Hosain R., Rockhold F., Clemens S.A.C., Roa C. Jr, Borja-Tabora C., Quinsa A., et al. Efficacy of the adjuvanted subunit protein COVID-19 vaccine, SCB-2019: a phase 2 and 3 multicentre, double-blind, randomised, placebo-controlled trial // *Lancet.* 2022. V. 399. № 10323. P. 461-472.

- 36.** Cai Y., Zhang J., Xiao T., Peng H., Sterling S.M., Walsh R.M. Jr., Rawson S., Rits-Volloch S., Chen B. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein // *Science*. 2020. V. 369. № 6511. P. 1586-1592.
- 37.** Carmen J.M., Shrivastava S., Lu Z., Anderson A., Morrison E.B., Sankhala R.S., Chen W.-H., Chang W.C., Bolton J.S., Matyas G.R., et al. SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccine induces robust innate immune activity driving polyfunctional spike-specific T cell responses // *NPJ Vaccines*. 2021. V. 6. № 1. P. 151.
- 38.** Carter P.J. Introduction to current and future protein therapeutics: a protein engineering perspective // *Exp Cell Res*. 2011. V. 317. № 9. P. 1261-1269.
- 39.** Cawlfeld A., Genito C.J., Beck Z., Bergmann-Leitner E.S., Bitzer A.A., Soto K., Zou X., Hadiwidjojo S.H., Gerbasi R.V., Mullins A.B., et al. Safety, toxicity and immunogenicity of a malaria vaccine based on the circumsporozoite protein (FMP013) with the adjuvant army liposome formulation containing QS21 (ALFQ) // *Vaccine*. 2019. V. 37. № 29. P. 3793-3803.
- 40.** Cereghino J.L., Cregg J.M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* // *FEMS Microbiol Rev*. 2000. V. 24. № 1. P. 45-66.
- 41.** Cevik M., Grubaugh N.D., Iwasaki A., Openshaw P. COVID-19 vaccines: Keeping pace with SARS-CoV-2 variants // *Cell*. 2021. V. 184. № 20. P. 5077-5081.
- 42.** Chakraborty S., Mallajosyula V., Tato C.M., Tan G.S., Wang T.T. SARS-CoV-2 vaccines in advanced clinical trials: Where do we stand? // *Adv Drug Deliv Rev*. 2021. V. 172. P. 314-338.
- 43.** Chappell K.J., Mordant F.L., Li Z., Wijesundara D.K., Ellenberg P., Lackenby J.A., Cheung S.T.M., Modhiran N., Avumegah M.S., Henderson C.L., et al. Safety and immunogenicity of an MF59-adjuvanted spike glycoprotein-clamp vaccine for SARS-CoV-2: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial // *Lancet Infect Dis*. 2021. V. 21. № 10. P. 1383-1394.
- 44.** Chen W.-H., Wei J., Kundu R.T., Adhikari R., Liu Z., Lee J., Versteeg L., Poveda C., Keegan B., Villar M.J., et al. Genetic modification to design a stable yeast-expressed recombinant SARS-CoV-2 receptor binding domain as a COVID-19 vaccine candidate // *Biochim Biophys Acta Gen Subj*. 2021. V. 1865. № 6. P. 129893.
- 45.** Chen X., Zaro J.L., Shen W.-C. Fusion protein linkers: property, design and functionality // *Adv Drug Deliv Rev*. 2013. V. 65. № 10. P. 1357-1369.
- 46.** Choi J.Y., Smith D.M. SARS-CoV-2 Variants of Concern // *Yonsei Med J*. 2021. V. 62. № 11. P. 961-968.
- 47.** Clausen T.M., Sandoval D.R., Spliid C.B., Pihl J., Perrett H.R., Painter C.D., Narayanan A., Majowicz S.A., Kwong E.M., McVicar R.N., et al. SARS-CoV-2 Infection Depends on Cellular Heparan Sulfate and ACE2 // *Cell*. 2020. V. 183. № 4. P. 1043-1057.e15.
- 48.** Coronaviridae Study Group of the International Committee on Taxonomy of Viruses. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus:

classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2 // *Nat Microbiol.* 2020. V. 5. № 4. P. 536-544.

49. Coutard B., Valle C., de Lamballerie X., Canard B., Seidah N.G., Decroly E. The spike glycoprotein of the new coronavirus 2019-nCoV contains a furin-like cleavage site absent in CoV of the same clade // *Antiviral Res.* 2020. V. 176. P. 104742.

50. COVID19 Vaccine Tracker [Электронный ресурс]. URL: <https://covid19.trackvaccines.org/>. Последнее обновление 2 декабря 2022 г. Дата обращения: 25.07.2023.

51. Cui J., Li F., Shi Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses // *Nat Rev Microbiol.* 2019. V. 17. № 3. P. 181-192.

52. Dai L., Gao G.F. Viral targets for vaccines against COVID-19 // *Nat Rev Immunol.* 2021. V. 21. № 2. P. 73-82.

53. Dai L., Gao L., Tao L., Hadinegoro S.R., Erkin M., Ying Z., He P., Girsang R.T., Vergara H., Akram J., et al. Efficacy and Safety of the RBD-Dimer-Based Covid-19 Vaccine ZF2001 in Adults // *N Engl J Med.* 2022. V. 386. № 22. P. 2097-2111.

54. Dai L., Zheng T., Xu K., Han Y., Xu L., Huang E., An Y., Cheng Y., Li S., Liu M., et al. A Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID-19, MERS, and SARS // *Cell.* 2020. V. 182. № 3. P. 722-733.e11.

55. de Wilde A.H., Snijder E.J., Kikkert M., van Hemert M.J. Host Factors in Coronavirus Replication // *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018. V. 419. P. 1-42.

56. Demain A.L., Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms // *Biotechnol Adv.* 2009. V. 27. № 3. P. 297-306.

57. DeMarco J.K., Royal J.M., Severson W.E., Gabbard J.D., Hume S., Morton J., Swope K., Simpson C.A., Shepherd J.W., Bratcher B., et al. CoV-RBD121-NP Vaccine Candidate Protects against Symptomatic Disease following SARS-CoV-2 Challenge in K18-hACE2 Mice and Induces Protective Responses That Prevent COVID-19-Associated Immunopathology // *Vaccines (Basel).* 2021. V. 9. № 11. P. 1346.

58. Didierlaurent A.M., Morel S., Lockman L., Giannini S.L., Bisteau M., Carlsen H., Kielland A., Vosters O., Vanderheyde N., Schiavetti F., et al. AS04, an aluminum salt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity // *J Immunol.* 2009. V. 183. № 10. P. 6186-6197.

59. Du L., Kou Z., Ma C., Tao X., Wang L., Zhao G., Chen Y., Yu F., Tseng C.-T., Zhou Y., et al. A truncated receptor-binding domain of MERS-CoV spike protein potently inhibits MERS-CoV infection and induces strong neutralizing antibody responses: implication for developing therapeutics and vaccines // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12. P. e81587.

60. Du L., Zhao G., Chan C.C., Sun S., Chen M., Liu Z., Guo H., He Y., Zhou Y., Zheng B.-J., et al. Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and E. coli cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity // *Virology.* 2009. V. 393. № 1. P. 144-150.

61. Du L., Zhao G., He Y., Guo Y., Zheng B.-J., Jiang S., Zhou Y. Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces long-term protective immunity in an animal model // *Vaccine*. 2007. V. 25. № 15. P. 2832-2838.
62. Duan L., Zheng Q., Zhang H., Niu Y., Lou Y., Wang H. The SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein Biosynthesis, Structure, Function, and Antigenicity: Implications for the Design of Spike-Based Vaccine Immunogens // *Front Immunol*. 2020. V. 11. P. 576622.
63. Dunkle L.M., Kotloff K.L., Gay C.L., Áñez G., Adelglass J.M., Barrat Hernández A.Q., Harper W.L., Duncanson D.M., McArthur M.A., Florescu D.F., et al. Efficacy and Safety of NVX-CoV2373 in Adults in the United States and Mexico // *N Engl J Med*. 2022. V. 386. № 6. P. 531-543.
64. Elshabrawy H.A., Coughlin M.M., Baker S.C., Prabhakar B.S. Human monoclonal antibodies against highly conserved HR1 and HR2 domains of the SARS-CoV spike protein are more broadly neutralizing // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 11. P. e50366.
65. Escalera-Zamudio M., Kosakovsky Pond S.L., Martínez de la Viña N., Gutiérrez B., Inward R.P.D., Thézé J., van Dorp L., Castelán-Sánchez H.G., Bowden T.A., Pybus O.G., et al. Identification of Evolutionary Trajectories Shared across Human Betacoronaviruses // *Genome Biol Evol*. 2023. V. 15. № 6. P. ead076.
66. Eugenia-Toledo-Romaní M., Verdecia-Sánchez L., Rodríguez-González M., Rodríguez-Noda L., Valenzuela-Silva C., Paredes-Moreno B., Sánchez-Ramírez B., Pérez-Nicado R., González-Mugica R., Hernández-García T., et al. Safety and immunogenicity of anti-SARS CoV-2 vaccine SOBERANA 02 in homologous or heterologous scheme: Open label phase I and phase IIa clinical trials // *Vaccine*. 2022. V. 40. № 31. P. 4220-4230.
67. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). MERS-CoV worldwide overview [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ecdc.europa.eu/en/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers-cov-situation-update>. Дата обращения: 30.08.2023.
68. European Medicines Agency (EMA). VidPrevtyn Beta [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/vidprevtyn-beta>. Дата обращения: 25.07.2023.
69. Evtushenko E.A., Ryabchevskaya E.M., Nikitin N.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Plant virus particles with various shapes as potential adjuvants // *Sci Rep*. 2020. V. 10. № 1. P. 10365.
70. Fehr A.R., Perlman S. Coronaviruses: an overview of their replication and pathogenesis // *Methods Mol Biol*. 2015. V. 1282. P. 1-23.
71. Flores-Vega V.R., Monroy-Molina J.V., Jiménez-Hernández L.E., Torres A.G., Santos-Preciado J.I., Rosales-Reyes R. SARS-CoV-2: Evolution and Emergence of New Viral Variants // *Viruses*. 2022. V. 14. № 4. P. 653.
72. Forni D., Cagliani R., Clerici M., Sironi M. Molecular Evolution of Human Coronavirus Genomes // *Trends Microbiol*. 2017. V. 25. № 1. P. 35-48.
73. Francica J.R., Flynn B.J., Foulds K.E., Noe A.T., Werner A.P., Moore I.N., Gagne M., Johnston T.S., Tucker C., Davis R.L., et al. Vaccination with SARS-

CoV-2 Spike Protein and AS03 Adjuvant Induces Rapid Anamnestic Antibodies in the Lung and Protects Against Virus Challenge in Nonhuman Primates // bioRxiv [Preprint]. 2021. doi: 10.1101/2021.03.02.433390.

74. Fung T.S., Liu D.X. Human Coronavirus: Host-Pathogen Interaction // *Annu Rev Microbiol.* 2019. V. 73. P. 529-557.

75. Gao Q., Bao L., Mao H., Wang L., Xu K., Yang M., Li Y., Zhu L., Wang N., Lv Z., et al. Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2 // *Science.* 2020. V. 369. № 6499. P. 77-81.

76. Garcia-Beltran W.F., St Denis K.J., Hoelzemer A., Lam E.C., Nitido A.D., Sheehan M.L., Berrios C., Ofoman O., Chang C.C., Hauser B.M., et al. mRNA-based COVID-19 vaccine boosters induce neutralizing immunity against SARS-CoV-2 Omicron variant // *Cell.* 2022. V. 185. № 3. P. 457-466.e4.

77. Ge X.-Y., Yang W.-H., Zhou J.-H., Li B., Zhang W., Shi Z.-L., Zhang Y.-Z. Detection of alpha- and betacoronaviruses in rodents from Yunnan, China // *Virology J.* 2017. V. 14. № 1. P. 98.

78. Goepfert P.A., Fu B., Chabanon A.-L., Bonaparte M.I., Davis M.G., Essink B.J., Frank I., Haney O., Janoszyk H., Keefer M.C., et al. Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine formulations in healthy adults: interim results of a randomised, placebo-controlled, phase 1-2, dose-ranging study // *Lancet Infect Dis.* 2021. V. 21. № 9. P. 1257-1270.

79. Granovskiy D.L., Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., Kondakova O.A., Arkhipenko M.V., Kravchenko T.B., Bakhteeva I.V., Timofeev V.S., Nikitin N.A., Karpova O.V. New formulation of a recombinant anthrax vaccine stabilised with structurally modified plant viruses // *Front Microbiol.* 2022. V. 13. P. 1003969.

80. Grifoni A., Sidney J., Zhang Y., Scheuermann R.H., Peters B., Sette A. A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2 // *Cell Host Microbe.* 2020. V. 27. № 4. P. 671-680.e2.

81. Gundlapalli A.V., Salerno R.M., Brooks J.T., Averhoff F., Petersen L.R., McDonald L.C., Iademarco M.F.; CDC COVID-19 Response. SARS-CoV-2 Serologic Assay Needs for the Next Phase of the US COVID-19 Pandemic Response // *Open Forum Infect Dis.* 2020. V. 8. № 1. P. ofaa555.

82. Guo Y., Sun S., Wang K., Zhang S., Zhu W., Chen Z. Elicitation of immunity in mice after immunization with the S2 subunit of the severe acute respiratory syndrome coronavirus // *DNA Cell Biol.* 2005. V. 24. № 8. P. 510-515.

83. Gushchin V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., Odintsova A.S., Siniavin A.E., Nikiforova M.A., Pochtovyi A.A., Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Burgasova O.A., et al. Neutralizing Activity of Sera from Sputnik V-Vaccinated People against Variants of Concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants // *Vaccines (Basel).* 2021. V. 9. № 7. P. 779.

84. Hachim A., Kavian N., Cohen C.A., Chin A.W.H., Chu D.K.W., Mok C.K.P., Tsang O.T.Y., Yeung Y.C., Perera R.A.P.M., Poon L.L.M., et al. ORF8 and

ORF3b antibodies are accurate serological markers of early and late SARS-CoV-2 infection // *Nat Immunol.* 2020. V. 21. № 10. P. 1293-1301.

85. Hartenian E., Nandakumar D., Lari A., Ly M., Tucker J.M., Glaunsinger B.A. The molecular virology of coronaviruses // *J Biol Chem.* 2020. V. 295. № 37. P. 12910-12934.

86. Hatmal M.M., Alshaer W., Al-Hatamleh M.A.I., Hatmal M., Smadi O., Taha M.O., Oweida A.J., Boer J.C., Mohamud R., Plebanski M. Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their Interactions with ACE2 // *Cells.* 2020. V. 9. № 12. P. 2638.

87. He Y., Li J., Heck S., Lustigman S., Jiang S. Antigenic and immunogenic characterization of recombinant baculovirus-expressed severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein: implication for vaccine design // *J Virol.* 2006. V. 80. № 12. P. 5757-5767.

88. He Y., Qi J., Xiao L., Shen L., Yu W., Hu T. Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from *Escherichia coli* // *Eng Life Sci.* 2021. V. 21. № 6. P. 453-460.

89. He Y., Zhou Y., Liu S., Kou Z., Li W., Farzan M., Jiang S. Receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein induces highly potent neutralizing antibodies: implication for developing subunit vaccine // *Biochem Biophys Res Commun.* 2004. V. 324. № 2. P. 773-781.

90. Heath P.T., Galiza E.P., Baxter D.N., Boffito M., Browne D., Burns F., Chadwick D.R., Clark R., Cosgrove C., Galloway J., et al. Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine // *N Engl J Med.* 2021. V. 385. № 13. P. 1172-1183.

91. Heitmann J.S., Bilich T., Tandler C., Nelde A., Maringer Y., Marconato M., Reusch J., Jäger S., Denk M., Richter M., et al. A COVID-19 peptide vaccine for the induction of SARS-CoV-2 T cell immunity // *Nature.* 2022. V. 601. № 7894. P. 617-622.

92. Hernández-Bernal F., Ricardo-Cobas M.C., Martín-Bauta Y., Navarro-Rodríguez Z., Piñera-Martínez M., Quintana-Guerra J., Urrutia-Pérez K., Urrutia-Pérez K., Chávez-Chong C.O., Azor-Hernández J.L., et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of a SARS-CoV-2 recombinant spike RBD protein vaccine: A randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1-2 clinical trial (ABDALA Study) // *EClinicalMedicine.* 2022. V. 46. P. 101383.

93. Honda-Okubo Y., Barnard D., Ong C.H., Peng B.-H., Tseng C.-T., Petrovsky N. Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus vaccines formulated with delta inulin adjuvants provide enhanced protection while ameliorating lung eosinophilic immunopathology // *J Virol.* 2015. V. 89. № 6. P. 2995-3007.

94. Hsieh S.-M., Liu M.-C., Chen Y.-H., Lee W.-S., Hwang S.-J., Cheng S.-H., Ko W.-C., Hwang K.-P., Wang N.-C., Lee Y.-L., et al. Safety and immunogenicity of CpG 1018 and aluminium hydroxide-adjuvanted SARS-CoV-2 S-2P protein vaccine MVC-COV1901: interim results of a large-scale, double-blind,

randomised, placebo-controlled phase 2 trial in Taiwan // *Lancet Respir Med.* 2021. V. 9. № 12. P. 1396-1406.

95. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.-L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19 // *Nat Rev Microbiol.* 2021. V. 19. № 3. P. 141-154.

96. Huang Y., Yang C., Xu X.-F., Xu W., Liu S.-W. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19 // *Acta Pharmacol Sin.* 2020. V. 41. № 9. P. 1141-1149.

97. Idiris A., Tohda H., Kumagai H., Takegawa K. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010. V. 86. № 2. P. 403-417.

98. Imai M., Iwatsuki-Horimoto K., Hatta M., Loeber S., Halfmann P.J., Nakajima N., Watanabe T., Ujie M., Takahashi K., Ito M., et al. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development // *Proc Natl Acad Sci USA.* 2020. V. 117. № 28. P. 16587-16595.

99. International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Current ICTV Taxonomy Release [Электронный ресурс]. URL: <https://ictv.global/taxonomy>. Дата обращения: 17.07.2023.

100. Iwata-Yoshikawa N., Uda A., Suzuki T., Tsunetsugu-Yokota Y., Sato Y., Morikawa S., Tashiro M., Sata T., Hasegawa H., Nagata N. Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine // *J Virol.* 2014. V. 88. № 15. P. 8597-8614.

101. Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells // *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022. V. 23. № 1. P. 3-20.

102. Janssen Y.F., Feitsma E.A., Boersma H.H., Alleva D.G., Lancaster T.M., Sathiyaseelan T., Murikipudi S., Delpero A.R., Scully M.M., Ragupathy R., et al. Phase I interim results of a phase I/II study of the IgG-Fc fusion COVID-19 subunit vaccine, AKS-452 // *Vaccine.* 2022. V. 40. № 9. P. 1253-1260.

103. Jaume M., Yip M.S., Kam Y.W., Cheung C.Y., Kien F., Roberts A., Li P.H., Dutry I., Escriou N., Daeron M., et al. SARS CoV subunit vaccine: antibody-mediated neutralisation and enhancement // *Hong Kong Med J.* 2012. V. 18. Suppl. 2. P. 31-36.

104. Jeyanathan M., Afkhami S., Smaill F., Miller M.S., Lichty B.D., Xing Z. Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies // *Nat Rev Immunol.* 2020. V. 20. № 10. P. 615-632.

105. Ji W., Wang W., Zhao X., Zai J., Li X. Cross-species transmission of the newly identified coronavirus 2019-nCoV // *J Med Virol.* 2020. V. 92. № 4. P. 433-440.

106. Jiang H.-W., Li Y., Zhang H.-N., Wang W., Yang X., Qi H., Li H., Men D., Zhou J., Tao S.-C. SARS-CoV-2 proteome microarray for global profiling of COVID-19 specific IgG and IgM responses // *Nat Commun.* 2020(a). V. 11. № 1. P. 3581.

107. Jiang H.-W., Zhang H.-N., Meng Q.-F., Xie J., Li Y., Chen H., Zheng Y.-X., Wang X.-N., Qi H., Zhang J., et al. SARS-CoV-2 Orf9b suppresses type I

interferon responses by targeting TOM70 // *Cell Mol Immunol.* 2020(b). V. 17. № 9. P. 998-1000.

108. Johansen M.D., Irving A., Montagutelli X., Tate M.D., Rudloff I., Nold M.F., Hansbro N.G., Kim R.Y., Donovan C., Liu G., et al. Animal and translational models of SARS-CoV-2 infection and COVID-19 // *Mucosal Immunol.* 2020. V. 13. № 6. P. 877-891.

109. Joshi A., Joshi B.C., Mannan M.A., Kaushik V. Epitope based vaccine prediction for SARS-COV-2 by deploying immuno-informatics approach // *Inform Med Unlocked.* 2020. V. 19. P. 100338.

110. Joyce M.G., Chen W.-H., Sankhala R.S., Hajduczki A., Thomas P.V., Choe M., Martinez E.J., Chang W.C., Peterson C.E., Morrison E.B., et al. SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccines elicit broad SARS coronavirus immunogenicity // *Cell Rep.* 2021. V. 37. № 12. P. 110143.

111. Joyce M.G., King H.A.D., Elakhal-Naouar I., Ahmed A., Peachman K.K., Macedo Cincotta C., Subra C., Chen R.E., Thomas P.V., Chen W.-H., et al. A SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccine elicits protective immune responses in nonhuman primates // *Sci Transl Med.* 2022. V. 14. № 632. P. eabi5735.

112. Kam Y.W., Kien F., Roberts A., Cheung Y.C., Lamirande E.W., Vogel L., Chu S.L., Tse J., Guarner J., Zaki S.R., et al. Antibodies against trimeric S glycoprotein protect hamsters against SARS-CoV challenge despite their capacity to mediate FcγR2-dependent entry into B cells in vitro // *Vaccine.* 2007. V. 25. № 4. P. 729-740.

113. Kamionka M. Engineering of therapeutic proteins production in *Escherichia coli* // *Curr Pharm Biotechnol.* 2011. V. 12. № 2. P. 268-274.

114. Karpova O., Nikitin N., Chirkov S., Trifonova E., Sheveleva A., Lazareva E., Atabekov J. Immunogenic compositions assembled from tobacco mosaic virus-generated spherical particle platforms and foreign antigens // *J Gen Virol.* 2012. V. 93. № 2. P. 400-407.

115. Ke Q., Sun P., Wang T., Mi T., Xu H., Wu J., Liu B. Non-glycosylated SARS-CoV-2 RBD elicited a robust neutralizing antibody response in mice // *J Immunol Methods.* 2022. V. 506. P. 113279.

116. Keech C., Albert G., Cho I., Robertson A., Reed P., Neal S., Pleded J.S., Zhu M., Cloney-Clark S., Zhou H., et al. Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine // *N Engl J Med.* 2020. V. 383. № 24. P. 2320-2332.

117. Keng C.-T., Zhang A., Shen S., Lip K.-M., Fielding B.C., Tan T.H., Chou C.-F., Loh C.B., Wang S., Fu J., et al. Amino acids 1055 to 1192 in the S2 region of severe acute respiratory syndrome coronavirus S protein induce neutralizing antibodies: implications for the development of vaccines and antiviral agents // *J Virol.* 2005. V. 79. № 6. P. 3289-3296.

118. Kirtipal N., Bharadwaj S., Kang S.G. From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses // *Infect Genet Evol.* 2020. V. 85. P. 104502.

119. Klumpp-Thomas C., Kalish H., Drew M., Hunsberger S., Snead K., Fay M.P., Mehalko J., Shunmugavel A., Wall V., Frank P., et al. Standardization of ELISA protocols for serosurveys of the SARS-CoV-2 pandemic using clinical and at-home blood sampling // *Nat Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 113.

120. Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Hengartner N., Giorgi E.E., Bhattacharya T., Foley B., et al. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus // *Cell.* 2020. V. 182. № 4. P. 812-827.e19.

121. Krasilnikov I.V., Kudriavtsev A.V., Vakhrusheva A.V., Frolova M.E., Ivanov A.V., Stukova M.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Vasilyev K.A., Mushenkova N.V., Isaev A.A. Design and Immunological Properties of the Novel Subunit Virus-like Vaccine against SARS-CoV-2 // *Vaccines (Basel).* 2022. V. 10. № 1. P. 69.

122. Kudriavtsev A.V., Vakhrusheva A.V., Kryuchkov N.A., Frolova M.E., Blagodatskikh K.A., Ivanishin T.V., Djonovic M., Romanovskaya-Romanko E.A., Kovalenko A.N., Lioznov D.A., 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. V. 11. № 2. P. 326.

123. Kumar S., Thambiraja T.S., Karuppanan K., Subramaniam G. Omicron and Delta variant of SARS-CoV-2: A comparative computational study of spike protein // *J Med Virol.* 2022. V. 94. № 4. P. 1641-1649.

124. Kuo T.-Y., Lin M.-Y., Coffman R.L., Campbell J.D., Traquina P., Lin Y.-J., Liu L.T., Cheng J., Wu Y.-C., Wu C.-C., et al. Development of CpG-adjuvanted stable prefusion SARS-CoV-2 spike antigen as a subunit vaccine against COVID-19 // *Sci Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 20085.

125. Kurashova S.S., Ishmukhametov A.A., Dzagurova T.K., Egorova M.S., Balovneva M.V., Nikitin N.A., Evtushenko E.A., Karpova O.V., Markina A.A., Aparin P.G., et al. Various Adjuvants Effect on Immunogenicity of Puumala Virus Vaccine // *Front Cell Infect Microbiol.* 2020. V. 10. P. 545371.

126. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680-685.

127. Lam T.T., Jia N., Zhang Y.-W., Shum M.H., Jiang J.-F., Zhu H.-C., Tong Y.-G., Shi Y.-X., Ni X.-B., Liao Y.-S., et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins // *Nature.* 2020. V. 583. № 7815. P. 282-285.

128. Lan J., Deng Y., Chen H., Lu G., Wang W., Guo X., Lu Z., Gao G.F., Tan W. Tailoring subunit vaccine immunity with adjuvant combinations and delivery routes using the Middle East respiratory coronavirus (MERS-CoV) receptor-binding domain as an antigen // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 11. P. e112602.

129. Lan J., Yao Y., Deng Y., Chen H., Lu G., Wang W., Bao L., Deng W., Wei Q., Gao G.F., et al. Recombinant Receptor Binding Domain Protein Induces Partial Protective Immunity in Rhesus Macaques Against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Challenge // *EBioMedicine.* 2015. V. 2. № 10. P. 1438-1446.

130. Lau S.K., Woo P.C., Li K.S., Huang Y., Tsoi H.-W., Wong B.H., Wong S.S., Leung S.-Y., Chan K.-H., Yuen K.-Y. Severe acute respiratory syndrome coronavirus-like virus in Chinese horseshoe bats // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005. V. 102. № 39. P. 14040-14045.

131. Li J., Ulitzky L., Silberstein E., Taylor D.R., Viscidi R. Immunogenicity and protection efficacy of monomeric and trimeric recombinant SARS coronavirus spike protein subunit vaccine candidates // *Viral Immunol*. 2013. V. 26. № 2. P. 126-132.

132. Li L., Honda-Okubo Y., Baldwin J., Bowen R., Bielefeldt-Ohmann H., Petrovsky N. Covax-19/Spikogen® vaccine based on recombinant spike protein extracellular domain with Advax-CpG55.2 adjuvant provides single dose protection against SARS-CoV-2 infection in hamsters // *Vaccine*. 2022. V. 40. № 23. P. 3182-3192.

133. Li L., Honda-Okubo Y., Huang Y., Jang H., Carlock M.A., Baldwin J., Piplani S., Bebin-Blackwell A.G., Forgacs D., Sakamoto K., et al. Immunisation of ferrets and mice with recombinant SARS-CoV-2 spike protein formulated with Advax-SM adjuvant protects against COVID-19 infection // *Vaccine*. 2021(a). V. 39. № 40. P. 5940-5953.

134. Li W., Shi Z., Yu M., Ren W., Smith C., Epstein J.H., Wang H., Crameri G., Hu Z., Zhang H., et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses // *Science*. 2005. V. 310. № 5748. P. 676-679.

135. Li Y., Ma M.-L., Lei Q., Wang F., Hong W., Lai D.-Y., Hou H., Xu Z.-W., Zhang B., Chen H., et al. Linear epitope landscape of the SARS-CoV-2 Spike protein constructed from 1,051 COVID-19 patients // *Cell Rep*. 2021(b). V. 34. № 13. P. 108915.

136. Liang J.G., Su D., Song T.-Z., Zeng Y., Huang W., Wu J., Xu R., Luo P., Yang X., Zhang X., et al. S-Trimer, a COVID-19 subunit vaccine candidate, induces protective immunity in nonhuman primates // *Nat Commun*. 2021. V. 12. № 1. P. 1346.

137. Lip K.-M., Shen S., Yang X., Keng C.-T., Zhang A., Oh H.-L., Li Z.-H., Hwang L.-A., Chou C.-F., Fielding B.C., et al. Monoclonal antibodies targeting the HR2 domain and the region immediately upstream of the HR2 of the S protein neutralize in vitro infection of severe acute respiratory syndrome coronavirus // *J Virol*. 2006. V. 80. № 2. P. 941-950.

138. Lista M.J., Winstone H., Wilson H.D., Dyer A., Pickering S., Galao R.P., De Lorenzo G., Cowton V.M., Furnon W., Suarez N., et al. The P681H Mutation in the Spike Glycoprotein of the Alpha Variant of SARS-CoV-2 Escapes IFITM Restriction and Is Necessary for Type I Interferon Resistance // *J Virol*. 2022. V. 96. № 23. P. e0125022.

139. Liu S.-J., Leng C.-H., Lien S.-P., Chi H.-Y., Huang C.-Y., Lin C.-L., Lian W.-C., Chen C.-J., Hsieh S.-L., Chong P. Immunological characterizations of the nucleocapsid protein based SARS vaccine candidates // *Vaccine*. 2006. V. 24. № 16. P. 3100-3108.

- 140.** Liu Y., Dai L., Feng X., Gao R., Zhang N., Wang B., Han J., Zou Q., Guo X., Zhu H., et al. Fast and long-lasting immune response to S-trimer COVID-19 vaccine adjuvanted by PIKA // *Mol Biomed*. 2021. V. 2. № 1. P. 29.
- 141.** Liu Y., Liu J., Johnson B.A., Xia H., Ku Z., Schindewolf C., Widen S.G., An Z., Weaver S.C., Menachery V.D., et al. Delta spike P681R mutation enhances SARS-CoV-2 fitness over Alpha variant // *Cell Rep*. 2022. V. 39. № 7. P. 110829.
- 142.** Lu Y., Wang J., Li Q., Hu H., Lu J., Chen Z. Advances in neutralization assays for SARS-CoV-2 // *Scand. J. Immunol*. 2021. V. 94. № 3. P. e13088.
- 143.** Lyngse F.P., Mortensen L.H., Denwood M.J., Christiansen L.E., Møller C.H., Skov R.L., Spiess K., Fomsgaard A., Lassaunière R., Rasmussen M., et al. Household transmission of the SARS-CoV-2 Omicron variant in Denmark // *Nat Commun*. 2022. V. 13. № 1. P. 5573.
- 144.** Ma C., Li Y., Wang L., Zhao G., Tao X., Tseng C.-T., Zhou Y., Du L., Jiang S. Intranasal vaccination with recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV spike protein induces much stronger local mucosal immune responses than subcutaneous immunization: Implication for designing novel mucosal MERS vaccines // *Vaccine*. 2014(a). V. 32. № 18. P. 2100-2108.
- 145.** Ma C., Wang L., Tao X., Zhang N., Yang Y., Tseng C.K., Li F., Zhou Y., Jiang S., Du L. Searching for an ideal vaccine candidate among different MERS coronavirus receptor-binding fragments--the importance of immunofocusing in subunit vaccine design // *Vaccine*. 2014(b). V. 32. № 46. P. 6170-6176.
- 146.** Ma X., Zou F., Yu F., Li R., Yuan Y., Zhang Y., Zhang X., Deng J., Chen T., Song Z., et al. Nanoparticle Vaccines Based on the Receptor Binding Domain (RBD) and Heptad Repeat (HR) of SARS-CoV-2 Elicit Robust Protective Immune Responses // *Immunity*. 2020. V. 53. № 6. P. 1315-1330.e9.
- 147.** Madhi S.A., Baillie V., Cutland C.L., Voysey M., Koen A.L., Fairlie L., Padayachee S.D., Dheda K., Barnabas S.L., Bhorat Q.E., et al. Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant // *N Engl J Med*. 2021. V. 384. № 20. P. 1885-1898.
- 148.** Mahase E. Covid-19: Novavax vaccine efficacy is 86% against UK variant and 60% against South African variant // *BMJ*. 2021. V. 372. P. n296.
- 149.** Malone B., Urakova N., Snijder E.J., Campbell E.A. Structures and functions of coronavirus replication-transcription complexes and their relevance for SARS-CoV-2 drug design // *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022. V. 23. № 1. P. 21-39.
- 150.** Martínez-Flores D., Zepeda-Cervantes J., Cruz-Reséndiz A., Aguirre-Sampieri S., Sampieri A., Vaca L. SARS-CoV-2 Vaccines Based on the Spike Glycoprotein and Implications of New Viral Variants // *Front Immunol*. 2021. V. 12. P. 701501.
- 151.** McCallum M., Walls A.C., Sprouse K.R., Bowen J.E., Rosen L.E., Dang H.V., De Marco A., Franko N., Tilles S.W., Logue J., et al. Molecular basis of immune evasion by the Delta and Kappa SARS-CoV-2 variants // *Science*. 2021. V. 374. № 6575. P. 1621-1626.

- 152.** Mesquita F.S., Abrami L., Sergeeva O., Turelli P., Qing E., Kunz B., Raclot C., Paz Montoya J., Abriata L.A., Gallagher T., et al. S-acylation controls SARS-CoV-2 membrane lipid organization and enhances infectivity // *Dev Cell*. 2021. V. 56. № 20. P. 2790-2807.e8.
- 153.** Mistry P., Barmania F., Mellet J., Peta K., Strydom A., Viljoen I.M., James W., Gordon S., Pepper M.S. SARS-CoV-2 Variants, Vaccines, and Host Immunity // *Front Immunol*. 2022. V. 12. P. 809244.
- 154.** Mountford A.P., Fisher A., Wilson R.A. The profile of IgG1 and IgG2a antibody responses in mice exposed to *Schistosoma mansoni* // *Parasite Immunol*. 1994. V. 16. № 10. P. 521-527.
- 155.** Nakagawa S., Miyazawa T. Genome evolution of SARS-CoV-2 and its virological characteristics // *Inflamm Regen*. 2020. V. 40. P. 17.
- 156.** Naqvi A.A.T., Fatima K., Mohammad T., Fatima U., Singh I.K., Singh A., Atif S.M., Hariprasad G., Hasan G.M., Hassan M.I. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach // *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2020. V. 1866. № 10. P. 165878.
- 157.** Nazarian S., Olad G., Abdolhamidi R., Motamedi M.J., Kazemi R., Kordbacheh E., Felagari A., Olad H., Ahmadi A., Bahirae A., et al. Preclinical study of formulated recombinant nucleocapsid protein, the receptor binding domain of the spike protein, and truncated spike (S1) protein as vaccine candidates against COVID-19 in animal models // *Mol Immunol*. 2022. V. 149. P. 107-118.
- 158.** Ni L., Ye F., Cheng M.-L., Feng Y., Deng Y.-Q., Zhao H., Wei P., Ge J., Gou M., Li X., et al. Detection of SARS-CoV-2-Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals // *Immunity*. 2020. V. 52. № 6. P. 971-977.e3.
- 159.** Nikitin N., Ksenofontov A., Trifonova E., Arkhipenko M., Petrova E., Kondakova O., Kirpichnikov M., Atabekov J., Dobrov E., Karpova O. Thermal conversion of filamentous potato virus X into spherical particles with different properties from virions // *FEBS Lett*. 2016. V. 590. № 10. P. 1543-1551.
- 160.** Nikitin N.A., Matveeva I.N., Trifonova E.A., Puhova N.M., Samuylenko A.Y., Gryn S.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. Spherical particles derived from TMV virions enhance the protective properties of the rabies vaccine // *Data Brief*. 2018(a). V. 21. P. 742-745.
- 161.** Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Assessment of structurally modified plant virus as a novel adjuvant in toxicity studies // *Regul Toxicol Pharmacol*. 2018(b). V. 97. P. 127-133.
- 162.** Nikitin N.A., Zenin V.A., Trifonova E.A., Ryabchevskaya E.M., Yurkova M.S., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., Karpova O.V. Data in support of toxicity studies of structurally modified plant virus to safety assessment // *Data Brief*. 2018(c). V. 21. P. 1504-1507.
- 163.** Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses // *Nat Rev Immunol*. 2008. V. 8. № 1. P. 34-47.

- 164.** Nyon M.P., Du L., Tseng C.K., Seid C.A., Pollet J., Naceanceno K.S., Agrawal A., Algaissi A., Peng B.-H., Tai W., et al. Engineering a stable CHO cell line for the expression of a MERS-coronavirus vaccine antigen // *Vaccine*. 2018. V. 36. № 14. P. 1853-1862.
- 165.** Ou X., Liu Y., Lei X., Li P., Mi D., Ren L., Guo L., Guo R., Chen T., Hu J., et al. Characterization of spike glycoprotein of SARS-CoV-2 on virus entry and its immune cross-reactivity with SARS-CoV // *Nat Commun*. 2020. V. 11. № 1. P. 1620.
- 166.** Paden C.R., Yusof M.F.B.M., Al Hammadi Z.M., Queen K., Tao Y., Eltahir Y.M., Elsayed E.A., Marzoug B.A., Bensalah O.K.A., Khalafalla A.I., et al. Zoonotic origin and transmission of Middle East respiratory syndrome coronavirus in the UAE // *Zoonoses Public Health*. 2018. V. 65. № 3. P. 322-333.
- 167.** Pallesen J., Wang N., Corbett K.S., Wrapp D., Kirchdoerfer R.N., Turner H.L., Cottrell C.A., Becker M.M., Wang L., Shi W., et al. Immunogenicity and structures of a rationally designed prefusion MERS-CoV spike antigen // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017. V. 114. № 35. P. E7348-E7357.
- 168.** Park W.B., Kwon N.J., Choi S.J., Kang C.K., Choe P.G., Kim J.Y., Yun J., Lee G.W., Seong M.W., Kim N.J., et al. Virus Isolation from the First Patient with SARS-CoV-2 in Korea // *J Korean Med Sci*. 2020. V. 35. № 7. P. e84.
- 169.** Petrovsky N., Cooper P.D. Advax™, a novel microcrystalline polysaccharide particle engineered from delta inulin, provides robust adjuvant potency together with tolerability and safety // *Vaccine*. 2015. V. 33. № 44. P. 5920-5926.
- 170.** Pollet J., Chen W.-H., Strych U. Recombinant protein vaccines, a proven approach against coronavirus pandemics // *Adv Drug Deliv Rev*. 2021(a). V. 170. P. 71-82.
- 171.** Pollet J., Chen W.-H., Versteeg L., Keegan B., Zhan B., Wei J., Liu Z., Lee J., Kundu R., Adhikari R., et al. SARS-CoV-2 RBD219-N1C1: A yeast-expressed SARS-CoV-2 recombinant receptor-binding domain candidate vaccine stimulates virus neutralizing antibodies and T-cell immunity in mice // *Hum Vaccin Immunother*. 2021(b). V. 17. № 8. P. 2356-2366.
- 172.** Rabaan A.A., Al-Ahmed S.H., Haque S., Sah R., Tiwari R., Malik Y.S., Dhama K., Yatoo M.I., Bonilla-Aldana D.K., Rodriguez-Morales A.J. SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-COV: A comparative overview // *Infez Med*. 2020. V. 28. № 2. P. 174-184.
- 173.** Rabaan A.A., Al-Ahmed S.H., Sah R., Alqumber M.A., Haque S., Patel S.K., Pathak M., Tiwari R., Yatoo M.I., Haq A.U., et al. MERS-CoV: epidemiology, molecular dynamics, therapeutics, and future challenges // *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2021. V. 20. № 1. P. 8.
- 174.** Rabdano S.O., Ruzanova E.A., Pletyukhina I.V., Saveliev N.S., Kryshen K.L., Katelnikova A.E., Belyukov P.P., Fakhretdinova L.N., Safi A.S., Rudakov G.O., et al. Immunogenicity and In Vivo Protective Effects of Recombinant Nucleocapsid-Based SARS-CoV-2 Vaccine Convacell® // *Vaccines (Basel)*. 2023. V. 11. № 4. P. 874.

175. Radzikowska U., Ding M., Tan G., Zhakparov D., Peng Y., Wawrzyniak P., Wang M., Li S., Morita H., Altunbulakli C., et al. Distribution of ACE2, CD147, CD26, and other SARS-CoV-2 associated molecules in tissues and immune cells in health and in asthma, COPD, obesity, hypertension, and COVID-19 risk factors // *Allergy*. 2020. V. 75. № 11. P. 2829-2845.

176. Rahbar Z., Nazarian S., Dorostkar R., Sotoodehnejadnematalahi F., Amani J. Recombinant expression of SARS-CoV-2 receptor binding domain (RBD) in *Escherichia coli* and its immunogenicity in mice // *Iran J Basic Med Sci*. 2022. V. 25. № 9. P. 1110-1116.

177. Raj V.S., Farag E.A., Reusken C.B., Lamers M.M., Pas S.D., Voermans J., Smits S.L., Osterhaus A.D., Al-Mawlawi N., Al-Romaihi H.E., et al. Isolation of MERS coronavirus from a dromedary camel, Qatar, 2014 // *Emerg Infect Dis*. 2014. V. 20. № 8. P. 1339-1342.

178. Redondo N., Zaldívar-López S., Garrido J.J., Montoya M. SARS-CoV-2 Accessory Proteins in Viral Pathogenesis: Knowns and Unknowns // *Front Immunol*. 2021. V. 12. P. 708264.

179. Richmond P., Hatchuel L., Dong M., Ma B., Hu B., Smolenov I., Li P., Liang P., Han H.H., Liang J., et al. Safety and immunogenicity of S-Trimer (SCB-2019), a protein subunit vaccine candidate for COVID-19 in healthy adults: a phase 1, randomised, double-blind, placebo-controlled trial // *Lancet*. 2021. V. 397. № 10275. P. 682-694.

180. Riley T.P., Chou H.-T., Hu R., Bzymek K.P., Correia A.R., Partin A.C., Li D., Gong D., Wang Z., Yu X., et al. Enhancing the Prefusion Conformational Stability of SARS-CoV-2 Spike Protein Through Structure-Guided Design // *Front Immunol*. 2021. V. 12. P. 660198.

181. Robbiani D.F., Gaebler C., Muecksch F., Lorenzi J.C.C., Wang Z., Cho A., Agudelo M., Barnes C.O., Gazumyan A., Finkin S., et al. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals // *Nature*. 2020. V. 584. № 7821. P. 437-442.

182. Rosano G.L., Ceccarelli E.A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges // *Front Microbiol*. 2014. V. 5. P. 172.

183. Royal J.M., Simpson C.A., McCormick A.A., Phillips A., Hume S., Morton J., Shepherd J., Oh Y., Swope K., DeBeauchamp J.L., et al. Development of a SARS-CoV-2 Vaccine Candidate Using Plant-Based Manufacturing and a Tobacco Mosaic Virus-like Nano-Particle // *Vaccines (Basel)*. 2021. V. 9. № 11. P. 1347.

184. Rudan I., Adeloye D., Sheikh A. COVID-19: vaccines, efficacy and effects on variants // *Curr Opin Pulm Med*. 2022. V. 28. № 3. P. 180-191.

185. Ryabchevskaya E.M., Evtushenko E.A., Granovskiy D.L., Ivanov P.A., Atabekov J.G., Kondakova O.A., Nikitin N.A., Karpova O.V. Two approaches for the stabilization of *Bacillus anthracis* recombinant protective antigen // *Hum Vaccin Immunother*. 2021. V. 17. № 2. P. 560-565.

186. Ryabchevskaya E.M., Granovskiy D.L., Evtushenko E.A., Ivanov P.A., Kondakova O.A., Nikitin N.A., Karpova O.V. Designing Stable *Bacillus*

anthracis Antigens with a View to Recombinant Anthrax Vaccine Development // *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. № 4. P. 806.

187. Sabir J.S., Lam T.T., Ahmed M.M., Li L., Shen Y., Abo-Aba S.E., Qureshi M.I., Abu-Zeid M., Zhang Y., Khiyami M.A., et al. Co-circulation of three camel coronavirus species and recombination of MERS-CoVs in Saudi Arabia // *Science*. 2016. V. 351. № 6268. P. 81-84.

188. Sarkar I., Garg R., van Drunen Littel-van den Hurk S. Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens // *Expert Rev Vaccines*. 2019. V. 18. № 5. P. 505-521.

189. Shah P., Canziani G.A., Carter E.P., Chaiken I. The Case for S2: The Potential Benefits of the S2 Subunit of the SARS-CoV-2 Spike Protein as an Immunogen in Fighting the COVID-19 Pandemic // *Front Immunol*. 2021. V. 12. P. 637651.

190. Shang J., Wan Y., Luo C., Ye G., Geng Q., Auerbach A., Li F. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020. V. 117. № 21. P. 11727-11734.

191. Shi X., Jarvis D.L. Protein N-glycosylation in the baculovirus-insect cell system // *Curr Drug Targets*. 2007. V. 8. № 10. P. 1116-1125.

192. Shirato K., Kawase M., Matsuyama S. Wild-type human coronaviruses prefer cell-surface TMPRSS2 to endosomal cathepsins for cell entry // *Virology*. 2018. V. 517. P. 9-15.

193. Shkoda A.S., Gushchin V.A., Ogarkova D.A., Stavitskaya S.V., Orlova O.E., Kuznetsova N.A., Keruntu E.N., Pochtovyi A.A., Pukhov A.V., Kleymenov D.A., et al. Sputnik V Effectiveness against Hospitalization with COVID-19 during Omicron Dominance // *Vaccines (Basel)*. 2022. V. 10. № 6. P. 938.

194. Sia S.F., Yan L.-M., Chin A.W.H., Fung K., Choy K.-T., Wong A.Y.L., Kaewpreedee P., Perera R.A.P.M., Poon L.L.M., Nicholls J.M., et al. Pathogenesis and transmission of SARS-CoV-2 in golden hamsters // *Nature*. 2020. V. 583. № 7818. P. 834-838.

195. Siniavin A.E., Streltsova M.A., Nikiforova M.A., Kudryavtsev D.S., Grinkina S.D., Gushchin V.A., Mozhaeva V.A., Starkov V.G., Osipov A.V., Lummis S.C.R., et al. Snake venom phospholipase A2s exhibit strong virucidal activity against SARS-CoV-2 and inhibit the viral spike glycoprotein interaction with ACE2 // *Cell Mol Life Sci*. 2021. V. 78. № 23. P. 7777-7794.

196. Song H.C., Seo M.-Y., Stadler K., Yoo B.J., Choo Q.-L., Coates S.R., Uematsu Y., Harada T., Greer C.E., Polo J.M., et al. Synthesis and characterization of a native, oligomeric form of recombinant severe acute respiratory syndrome coronavirus spike glycoprotein // *J Virol*. 2004. V. 78. № 19. P. 10328-10335.

197. Song J.Y., Choi W.S., Heo J.Y., Lee J.S., Jung D.S., Kim S.-W., Park K.-H., Eom J.S., Jeong S.J., Lee J., et al. Safety and immunogenicity of a SARS-CoV-2 recombinant protein nanoparticle vaccine (GBP510) adjuvanted with AS03: A randomised, placebo-controlled, observer-blinded phase 1/2 trial // *EClinicalMedicine*. 2022. V. 51. P. 101569.

- 198.** Sridhar S., Joaquin A., Bonaparte M.I., Bueso A., Chabanon A.-L., Chen A., Chicz R.M., Diemert D., Essink B.J., Fu B., et al. Safety and immunogenicity of an AS03-adjuvanted SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine (CoV2 preS dTM) in healthy adults: interim findings from a phase 2, randomised, dose-finding, multicentre study // *Lancet Infect Dis.* 2022. V. 22. № 5. P. 636-648.
- 199.** Srivastava S., Kamthania M., Kumar Pandey R., Kumar Saxena A., Saxena V., Kumar Singh S., Kumar Sharma R., Sharma N. Design of novel multi-epitope vaccines against severe acute respiratory syndrome validated through multistage molecular interaction and dynamics // *J Biomol Struct Dyn.* 2019. V. 37. № 16. P. 4345-4360.
- 200.** Srivastava S., Kamthania M., Singh S., Saxena A.K., Sharma N. Structural basis of development of multi-epitope vaccine against Middle East respiratory syndrome using in silico approach // *Infect Drug Resist.* 2018. V. 11. P. 2377-2391.
- 201.** Stadler K., Rappuoli R. SARS: understanding the virus and development of rational therapy // *Curr Mol Med.* 2005. V. 5. № 7. P. 677-697.
- 202.** Sun G., Xue L., He Q., Zhao Y., Xu W., Wang Z. Structural insights into SARS-CoV-2 infection and therapeutics development // *Stem Cell Res.* 2021(a). V. 52. P. 102219.
- 203.** Sun J., He W.-T., Wang L., Lai A., Ji X., Zhai X., Li G., Suchard M.A., Tian J., Zhou J., et al. COVID-19: Epidemiology, Evolution, and Cross-Disciplinary Perspectives // *Trends Mol Med.* 2020. V. 26. № 5. P. 483-495.
- 204.** Sun S., Cai Y., Song T.-Z., Pu Y., Cheng L., Xu H., Sun J., Meng C., Lin Y., Huang H., et al. Interferon-armed RBD dimer enhances the immunogenicity of RBD for sterilizing immunity against SARS-CoV-2 // *Cell Res.* 2021(b). V. 31. № 9. P. 1011-1023.
- 205.** Swanson P.A. 2nd, Padilla M., Hoyland W., McGlinchey K., Fields P.A., Bibi S., Faust S.N., McDermott A.B., Lambe T., Pollard A.J., et al. AZD1222/ChAdOx1 nCoV-19 vaccination induces a polyfunctional spike protein-specific T_H1 response with a diverse TCR repertoire // *Sci Transl Med.* 2021. V. 13. № 620. P. eabj7211.
- 206.** Tabarsi P., Anjidani N., Shahpari R., Mardani M., Sabzvari A., Yazdani B., Roshanzamir K., Bayatani B., Taheri A., Petrovsky N., et al. Safety and immunogenicity of SpikoGen®, an Advax-CpG55.2-adjuvanted SARS-CoV-2 spike protein vaccine: a phase 2 randomized placebo-controlled trial in both seropositive and seronegative populations // *Clin Microbiol Infect.* 2022. V. 28. № 9. P. 1263-1271.
- 207.** Tabarsi P., Anjidani N., Shahpari R., Mardani M., Sabzvari A., Yazdani B., Kafi H., Fallah N., Ebrahimi A., Taheri A., et al. Evaluating the efficacy and safety of SpikoGen®, an Advax-CpG55.2-adjuvanted severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 spike protein vaccine: a phase 3 randomized placebo-controlled trial // *Clin Microbiol Infect.* 2023. V. 29. № 2. P. 215-220.
- 208.** Tai W., Zhao G., Sun S., Guo Y., Wang Y., Tao X., Tseng C.K., Li F., Jiang S., Du L., et al. A recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV in

trimeric form protects human dipeptidyl peptidase 4 (hDPP4) transgenic mice from MERS-CoV infection // *Virology*. 2016. V. 499. P. 375-382.

209. Tan H.-X., Juno J.A., Lee W.S., Barber-Axthelm I., Kelly H.G., Wragg K.M., Esterbauer R., Amarasena T., Mordant F.L., Subbarao K., et al. Immunogenicity of prime-boost protein subunit vaccine strategies against SARS-CoV-2 in mice and macaques // *Nat Commun*. 2021. V. 12. № 1. P. 1403.

210. Tang J., Zhang N., Tao X., Zhao G., Guo Y., Tseng C.-T., Jiang S., Du L., Zhou Y. Optimization of antigen dose for a receptor-binding domain-based subunit vaccine against MERS coronavirus // *Hum Vaccin Immunother*. 2015. V. 11. № 5. P. 1244-1250.

211. Tarke A., Sidney J., Kidd C.K., Dan J.M., Ramirez S.I., Yu E.D., Mateus J., da Silva Antunes R., Moore E., Rubiro P., et al. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases // *Cell Rep Med*. 2021. V. 2. № 2. P. 100204.

212. Tay M.Z., Poh C.M., Rénia L., MacAry P.A., Ng L.F.P. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention // *Nat Rev Immunol*. 2020. V. 20. № 6. P. 363-374.

213. Telenti A., Hodcroft E.B., Robertson D.L. The Evolution and Biology of SARS-CoV-2 Variants // *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2022. V. 12. № 5. P. a041390.

214. Thuluva S., Paradkar V., Gunneri S., Yerroju V., Mogulla R., Suneetha P.V., Turaga K., Kyasani M., Manoharan S.K., Adabala S., et al. Immunogenicity and safety of Biological E's CORBEVAX™ vaccine compared to COVISHIELD™ (ChAdOx1 nCoV-19) vaccine studied in a phase-3, single blind, multicentre, randomized clinical trial // *Hum Vaccin Immunother*. 2023. V. 19. № 1. P. 2203632.

215. Thuluva S., Paradkar V., Gunneri S.R., Yerroju V., Mogulla R., Turaga K., Kyasani M., Manoharan S.K., Medigeshi G., Singh J., et al. Evaluation of safety and immunogenicity of receptor-binding domain-based COVID-19 vaccine (Corbevax) to select the optimum formulation in open-label, multicentre, and randomised phase-1/2 and phase-2 clinical trials // *EBioMedicine*. 2022. V. 83. P. 104217.

216. Tian J.-H., Patel N., Haupt R., Zhou H., Weston S., Hammond H., Logue J., Portnoff A.D., Norton J., Guebre-Xabier M., et al. SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice // *Nat Commun*. 2021. V. 12. № 1. P. 372.

217. Tilocca B., Soggiu A., Sanguinetti M., Musella V., Britti D., Bonizzi L., Urbani A., Roncada P. Comparative computational analysis of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein epitopes in taxonomically related coronaviruses // *Microbes Infect*. 2020. V. 22. № 4-5. P. 188-194.

218. Toledo-Romaní M.E., García-Carmenate M., Valenzuela-Silva C., Baldoquín-Rodríguez W., Martínez-Pérez M., Rodríguez-González M., Paredes-Moreno B., Mendoza-Hernández I., González-Mujica Romero R., Samón-Tabio O., et al. Safety and efficacy of the two doses conjugated protein-based SOBERANA-02 COVID-19 vaccine and of a heterologous three-dose combination with

SOBERANA-Plus: a double-blind, randomised, placebo-controlled phase 3 clinical trial // *Lancet Reg Health Am.* 2023. V. 18. P. 100423.

219. Tregoning J.S., Brown E.S., Cheeseman H.M., Flight K.E., Higham S.L., Lemm N.-M., Pierce B.F., Stirling D.C., Wang Z., Pollock K.M. Vaccines for COVID-19 // *Clin Exp Immunol.* 2020. V. 202. № 2. P. 162-192.

220. Trifonova E., Nikitin N., Gmyl A., Lazareva E., Karpova O., Atabekov J. Complexes assembled from TMV-derived spherical particles and entire virions of heterogeneous nature // *J Biomol Struct Dyn.* 2014. V. 32. № 8. P. 1193-1201.

221. Trifonova E.A., Zenin V.A., Nikitin N.A., Yurkova M.S., Ryabchevskaya E.M., Putlyaev E.V., Donchenko E.K., Kondakova O.A., Fedorov A.N., Atabekov J.G., et al. Study of rubella candidate vaccine based on a structurally modified plant virus // *Antiviral Res.* 2017. V. 144. P. 27-33.

222. Tripathi N.K., Shrivastava A. Recent Developments in Bioprocessing of Recombinant Proteins: Expression Hosts and Process Development // *Front Bioeng Biotechnol.* 2019. V. 7. P. 420.

223. Tyrrell D.A., Bynoe M.L. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures // *Br Med J.* 1965. V. 1. № 5448. P. 1467-1470.

224. Usach I., Martinez R., Festini T., Peris J.-E. Subcutaneous Injection of Drugs: Literature Review of Factors Influencing Pain Sensation at the Injection Site // *Adv Ther.* 2019. V. 36. № 11. P. 2986-2996.

225. Valdes-Balbin Y., Santana-Mederos D., Quintero L., Fernández S., Rodriguez L., Sanchez Ramirez B., Perez-Nicado R., Acosta C., Méndez Y., Ricardo M.G., et al. SARS-CoV-2 RBD-Tetanus Toxoid Conjugate Vaccine Induces a Strong Neutralizing Immunity in Preclinical Studies // *ACS Chem Biol.* 2021. V. 16. № 7. P. 1223-1233.

226. Vangelista L., Secchi M. Prepare for the Future: Dissecting the Spike to Seek Broadly Neutralizing Antibodies and Universal Vaccine for Pandemic Coronaviruses // *Front Mol Biosci.* 2020. V. 7. P. 226.

227. V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 // *Nat Rev Microbiol.* 2021. V. 19. № 3. P. 155-170.

228. Waldo G.S., Standish B.M., Berendzen J., Terwilliger T.C. Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein // *Nat Biotechnol.* 1999. V. 17. № 7. P. 691-695.

229. Walls A.C., Fiala B., Schäfer A., Wrenn S., Pham M.N., Murphy M., Tse L.V., Shehata L., O'Connor M.A., Chen C., et al. Elicitation of Potent Neutralizing Antibody Responses by Designed Protein Nanoparticle Vaccines for SARS-CoV-2 // *Cell.* 2020. V. 183. № 5. P. 1367-1382.e17.

230. Wan Y., Shang J., Sun S., Tai W., Chen J., Geng Q., He L., Chen Y., Wu J., Shi Z., et al. Molecular Mechanism for Antibody-Dependent Enhancement of Coronavirus Entry // *J Virol.* 2020. V. 94. № 5. P. e02015-19.

231. Wang C.Y., Hwang K.-P., Kuo H.-K., Peng W.-J., Shen Y.-H., Kuo B.-S., Huang J.-H., Liu H., Ho Y.-H., Lin F., et al. A multitope SARS-CoV-2 vaccine

provides long-lasting B cell and T cell immunity against Delta and Omicron variants // *J Clin Invest.* 2022(a). V. 132. № 10. P. e157707.

232. Wang P., Casner R.G., Nair M.S., Wang M., Yu J., Cerutti G., Liu L., Kwong P.D., Huang Y., Shapiro L., et al. Increased Resistance of SARS-CoV-2 Variant P.1 to Antibody Neutralization // *Cell Host Microbe.* 2021(a). V. 29. № 5. P. 747-751.e4.

233. Wang Q., Zhang L., Kuwahara K., Li L., Liu Z., Li T., Zhu H., Liu J., Xu Y., Xie J., et al. Immunodominant SARS Coronavirus Epitopes in Humans Elicited both Enhancing and Neutralizing Effects on Infection in Non-human Primates // *ACS Infect Dis.* 2016. V. 2. № 5. P. 361-376.

234. Wang S., Wang C.Y., Kuo H.-K., Peng W.-J., Huang J.-H., Kuo B.-S., Lin F., Liu Y.-J., Liu Z., Wu H.-T., et al. A novel RBD-protein/peptide vaccine elicits broadly neutralizing antibodies and protects mice and macaques against SARS-CoV-2 // *Emerg Microbes Infect.* 2022(b). V. 11. № 1. P. 2724-2734.

235. Wang X., Xia S., Zhu Y., Lu L., Jiang S. Pan-coronavirus fusion inhibitors as the hope for today and tomorrow // *Protein Cell.* 2021(b). V. 12. № 2. P. 84-88.

236. Wang X.-Y., Mahmood S.F., Jin F., Cheah W.K., Ahmad M., Sohail M.A., Ahmad W., Suppan V.K., Sayeed M.A., Luxmi S., et al. Efficacy of heterologous boosting against SARS-CoV-2 using a recombinant interferon-armed fusion protein vaccine (V-01): a randomized, double-blind and placebo-controlled phase III trial // *Emerg Microbes Infect.* 2022(c). V. 11. № 1. P. 1910-1919.

237. Watanabe Y., Allen J.D., Wrapp D., McLellan J.S., Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike // *Science.* 2020. V. 369. № 6501. P. 330-333.

238. Watterson D., Wijesundara D.K., Modhiran N., Mordant F.L., Li Z., Avumegah M.S., McMillan C.L., Lackenby J., Guilfoyle K., van Amerongen G., et al. Preclinical development of a molecular clamp-stabilised subunit vaccine for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 // *Clin Transl Immunology.* 2021. V. 10. № 4. P. e1269.

239. Wijaya L., Tham C.Y.L., Chan Y.F.Z., Wong A.W.L., Li L.T., Wang L.-F., Bertoletti A., Low J.G. An accelerated rabies vaccine schedule based on toll-like receptor 3 (TLR3) agonist PIKA adjuvant augments rabies virus specific antibody and T cell response in healthy adult volunteers // *Vaccine.* 2017. V. 35. № 8. P. 1175-1183.

240. Wong A.C.P., Li X., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Global Epidemiology of Bat Coronaviruses // *Viruses.* 2019. V. 11. № 2. P. 174.

241. Woo P.C.Y., de Groot R.J., Haagmans B., Lau S.K.P., Neuman B.W., Perlman S., Sola I., van der Hoek L., Wong A.C.P., Yeh S.-H. ICTV Virus Taxonomy Profile: *Coronaviridae* 2023 // *J Gen Virol.* 2023. V. 104. № 4. P. 001843.

242. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.-L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation // *Science.* 2020. V. 367. № 6483. P. 1260-1263.

- 243.** Wu C., Liu Y., Yang Y., Zhang P., Zhong W., Wang Y., Wang Q., Xu Y., Li M., Li X., et al. Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods // *Acta Pharm Sin B*. 2020(a). V. 10. № 5. P. 766-788.
- 244.** Wu C.-Y., Monie A., Pang X., Hung C.-F., Wu T.-C. Improving therapeutic HPV peptide-based vaccine potency by enhancing CD4⁺ T help and dendritic cell activation // *J Biomed Sci*. 2010. V. 17. № 1. P. 88.
- 245.** Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.-M., Wang W., Song Z.-G., Hu Y., Tao Z.-W., Tian J.-H., Pei Y.-Y., et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China // *Nature*. 2020(b). V. 579. № 7798. P. 265-269.
- 246.** Yadav T., Srivastava N., Mishra G., Dhama K., Kumar S., Puri B., Saxena S.K. Recombinant vaccines for COVID-19 // *Hum Vaccin Immunother*. 2020. V. 16. № 12. P. 2905-2912.
- 247.** Yang J., Wang W., Chen Z., Lu S., Yang F., Bi Z., Bao L., Mo F., Li X., Huang Y., et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity // *Nature*. 2020. V. 586. № 7830. P. 572-577.
- 248.** Yang S., Li Y., Dai L., Wang J., He P., Li C., Fang X., Wang C., Zhao X., Huang E., et al. Safety and immunogenicity of a recombinant tandem-repeat dimeric RBD-based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials // *Lancet Infect Dis*. 2021. V. 21. № 8. P. 1107-1119.
- 249.** Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia // *N Engl J Med*. 2012. V. 367. № 19. P. 1814-1820.
- 250.** Zhang J., Hu Z., He J., Liao Y., Li Y., Pei R., Fang X., Zeng P., Fan R., Ou Z., et al. Safety and immunogenicity of a recombinant interferon-armed RBD dimer vaccine (V-01) for COVID-19 in healthy adults: a randomized, double-blind, placebo-controlled, Phase I trial // *Emerg Microbes Infect*. 2021. V. 10. № 1. P. 1589-1597.
- 251.** Zhang N., Channappanavar R., Ma C., Wang L., Tang J., Garron T., Tao X., Tasneem S., Lu L., Tseng C.-T., et al. Identification of an ideal adjuvant for receptor-binding domain-based subunit vaccines against Middle East respiratory syndrome coronavirus // *Cell Mol Immunol*. 2016. V. 13. № 2. P. 180-190.
- 252.** Zhao H., Lu L., Peng Z., Chen L.-L., Meng X., Zhang C., Ip J.D., Chan W.-M., Chu A.W., Chan K.-H., et al. SARS-CoV-2 Omicron variant shows less efficient replication and fusion activity when compared with Delta variant in TMPRSS2-expressed cells // *Emerg Microbes Infect*. 2022. V. 11. № 1. P. 277-283.
- 253.** Zheng N., Xia R., Yang C., Yin B., Li Y., Duan C., Liang L., Guo H., Xie Q. Boosted expression of the SARS-CoV nucleocapsid protein in tobacco and its immunogenicity in mice // *Vaccine*. 2009. V. 27. № 36. P. 5001-5007.
- 254.** Zhou H., Chen X., Hu T., Li J., Song H., Liu Y., Wang P., Liu D., Yang J., Holmes E.C., et al. A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein // *Curr Biol*. 2020(a). V. 30. № 11. P. 2196-2203.e3.

- 255.** Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.-R., Zhu Y., Li B., Huang C.-L., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // *Nature*. 2020(b). V. 579. № 7798. P. 270-273.
- 256.** Zost S.J., Gilchuk P., Chen R.E., Case J.B., Reidy J.X., Trivette A., Nargi R.S., Sutton R.E., Suryadevara N., Chen E.C., et al. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein // *Nat Med*. 2020. V. 26. № 9. P. 1422-1427.
- 257.** Zumla A., Chan J.F., Azhar E.I., Hui D.S., Yuen K.-Y. Coronaviruses - drug discovery and therapeutic options // *Nat Rev Drug Discov*. 2016. V. 15. № 5. P. 327-347.