



ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-226>

© ЛАТЫШЕВ О.Е., ЗАЙКОВА О.Н., ЕЛИСЕЕВА О.В., САВОЧКИНА Т.Е., ЧЕРНОРЫЖ Я.Ю., СЫРОЕШКИН А.В., ПЕТРОВ Г.В., ВОРКУНОВА Г.К., ЛАРИЧЕВ В.Ф., ФЕДЯКИНА И.А., ЧЕРЕПУШКИН С.А., ЦИБЕЗОВ В.В., ЮЖАКОВА К.А., КУЛИКОВА Н.Ю., ЛЕБЕДЕВА В.В., ЯКУНИН Д.Ю., КОЗЛОВА А.А., БАРАНЕЦ М.С., ЮРЛОВ К.И., ЛЕСНОВА Е.И., ГРЕБЕННИКОВА Т.В., 2024

Разработка, получение и характеристика вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Orthocoronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus)

Латышев О.Е.¹, Зайкова О.Н.¹, Елисеева О.В.¹, Савочкина Т.Е.¹, Чернорыж Я.Ю.¹, Сыроешкин А.В.², Петров Г.В.², Воркунова Г.К.¹, Ларичев В.Ф.¹, Федякина И.Т.¹, Черепушкин С.А.¹, Цибезов В.В.¹, Южакова К.А.¹, Куликова Н.Ю.¹, Лебедева В.В.¹, Якунин Д.Ю.¹, Козлова А.А.¹, Баранец М.С.¹, Юрлов К.И.¹, Леснова Е.И.¹, Гребенникова Т.В.¹✉

¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

²ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», 117198, г. Москва, Россия

Резюме

Введение. Пандемия COVID-19, вызванная коронавирусом SARS-CoV-2, породила серьезные проблемы в здравоохранении по всему миру. Ученым в кратчайшие сроки пришлось решать задачи по разработке методов лечения и профилактики этого заболевания. Наиболее эффективным способом прерывания развивающихся новых эпидемических вспышек является вакцинация. Одним из современных и эффективных подходов при разработке вакцин является использование вирусоподобных частиц (Virus like particles, VLP). **Цель исследования** – разработать технологию получения VLP на основе рекомбинантных белков SARS-CoV-2 (E, M, N и S), продуцируемых в клетках насекомых, и дать их комплексную характеристику.

Материалы и методы. Источником вирусных белков послужили синтетические гены, кодирующие белки коронавируса E, M, N и S. Были разработаны VLP с разными поверхностными S-белками 4 штаммов коронавируса: подобный вирусу Ухань, Delta, Alpha и Omicron, клонированные в плазмиду rFastBac. Белки были синтезированы в бакуловирусной системе экспрессии и собраны в VLP в перевиваемой линии клеток *Trichoplusia ni* (T.ni). Синтез генов, клонирование в трансферные плазмиды и получение рекомбинантных бакуловирусов проводили стандартными методами. Наличие вставки в геноме бакуловируса определяли методом полимеразной цепной реакции. Для исследования антигенной активности VLP применяли иммуноферментный анализ, иммуноблоттинг. Очистку VLP проводили ультрацентрифугированием через 20% сахарозу. Оценку морфологии выполняли с помощью электронной микроскопии и методом динамического светорассеяния.

Результаты. Получены и охарактеризованы VLP, состоящие из рекомбинантных белков S, M, E и N, на основе консенсусных последовательностей, циркулирующих в мире геновариантов SARS-CoV-2. Показана специфичность антигенных детерминант синтезированных VLP антителам, формирующимся к белкам SARS-CoV-2, изучены иммуногенные свойства VLP.

Заключение. Разработаны способы получения и очистки VLP с универсальным набором поверхностных антигенов, способных к самосборке и индуцирующих специфический иммунитет против SARS-CoV-2.

Ключевые слова: вирусоподобные частицы; рекомбинантные вакцины; COVID-19; SARS-CoV-2; бакуловирусная система экспрессии

Для цитирования: Латышев О.Е., Зайкова О.Н., Елисеева О.В., Савочкина Т.Е., Чернорыж Я.Ю., Сыроешкин А.В., Петров Г.В., Воркунова Г.К., Ларичев В.Ф., Федякина И.Т., Черепушкин С.А., Цибезов В.В., Южакова К.А., Куликова Н.Ю., Лебедева В.В., Якунин Д.Ю., Козлова А.А., Баранец М.С., Юрлов К.И., Леснова Е.И., Гребенникова Т.В. Разработка, получение и характеристика вирусоподобных частиц SARS-CoV-2 (Coronaviridae: Orthocoronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus). *Вопросы вирусологии*. 2024; 69(2): 175–186. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-226> EDN: <https://elibrary.ru/gkxfed>

Финансирование. Работа финансирована Государственной тематикой Министерства здравоохранения Российской Федерации «Разработка прототипа вакцины на основе VLP для профилактики COVID-19» (регистрационный номер 121032600024-1).

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Этическое утверждение. Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с Consensus Author Guidelines for Animal Use (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 03/2021 от 14.09.2021).

ORIGINAL STUDY ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-226>

Development, production and characterization of SARS-CoV-2 virus-like particles (Coronaviridae: Orthocoronavirinae: Betacoronavirus: Sarbecovirus)

Oleg E. Latyshev¹, Olga N. Zaykova¹, Olesya V. Eliseeva¹, Tatyana E. Savochkina¹, Yana Yu. Chernoryzh¹, Anton V. Syroeshkin², Gleb V. Petrov², Galina K. Vorkunova¹, Victor F. Larichev¹, Irina T. Fediakina¹, Stanislav A. Cherepushkin¹, Valeriy V. Tsibezov¹, Ksenia A. Yuzhakova¹, Nadezhda Yu. Kulikova¹, Varvara V. Lebedeva¹, Dmitriy Yu. Yakunin¹, Alina A. Kozlova¹, Marina S. Baranets¹, Kirill I. Yurlov¹, Ekaterina I. Lesnova¹, Tatyana V. Grebennikova¹✉

¹National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation, 123098, Moscow, Russia;

²Peoples' Friendship University of Russia, 117198, Moscow, Russia

Abstract

Introduction. The COVID-19 pandemic caused by SARS-CoV-2 has created serious health problems worldwide. The most effective way to prevent the occurrence of new epidemic outbreaks is vaccination. One of the modern and effective approaches to vaccine development is the use of virus-like particles (VLPs).

The **aim of the study** is to develop a technology for production of VLP based on recombinant SARS-CoV-2 proteins (E, M, N and S) in insect cells.

Materials and methods. Synthetic genes encoding coronavirus proteins E, M, N and S were used. VLP with various surface proteins of strains similar to the Wuhan virus, Delta, Alpha and Omicron were developed and cloned into the pFastBac plasmid. The proteins were synthesized in the baculovirus expression system and assembled into VLP in the portable *Trichoplusia ni* cell. The presence of insertion in the baculovirus genome was determined by PCR. ELISA and immunoblotting were used to study the antigenic activity of VLP. VLP purification was performed by ultracentrifugation using 20% sucrose. Morphology was assessed using electron microscopy and dynamic light scattering.

Results. VLPs consisting of recombinant SARS-CoV-2 proteins (S, M, E and N) were obtained and characterized. The specific binding of antigenic determinants in synthesized VLPs with antibodies to SARS-CoV-2 proteins has been demonstrated. The immunogenic properties of VLPs have been studied.

Conclusion. The production and purification of recombinant VLPs consisting of full-length SARS-CoV-2 proteins with a universal set of surface antigens have been developed and optimized. Self-assembling particles that mimic the coronavirus virion induce a specific immune response against SARS-CoV-2.

Keywords: *Virus-like particles; recombinant vaccines; COVID-19; SARS-CoV-2; baculovirus expression system*

For citation: Latyshev O.E., Zaykova O.N., Eliseeva O.V., Savochkina T.E., Chernoryzh Ya.Yu., Syroeshkin A.V., Petrov G.V., Vorkunova G.K., Larichev V.F., Fediakina I.T., Cherepushkin S.A., Tsibezov V.V., Yuzhakova K.A., Kulikova N.Yu., Lebedeva V.V., Yakunin D.Yu., Kozlova A.A., Baranets M.S., Yurlov K.I., Lesnova E.I., Grebennikova T.V. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2024; 69(2): 175–186. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-226> EDN: <https://elibrary.ru/gkxfed>

Funding. The study was funded by the Russian Ministry of Health State Project «Development of a prototype VLP-based vaccine for COVID-19 prophylaxis» (registration number 121032600024-1).

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Ethics approval. Authors confirm compliance with institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with Consensus author guidelines for animal use (IAVES 23 July 2010). The research protocol was approved by the Ethics Committee of the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya (Protocol No. 03/2021 dated 14 September 2021).

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, по состоянию на 8 ноября 2023 г. в мире зарегистрировано более 770 млн подтвержденных случаев COVID-19, включая 6,9 млн смертей. По со-

стоянию на 4 ноября 2023 г. было введено в общей сложности 13 534 474 309 доз вакцины¹. В России за 44 нед 2023 г. среди выявленного 34 191 случая COVID-19 было 22 993 случаев, закончившихся выздоровлением, 5042 случая потребовали госпитализации и 63 имели летальный исход².

¹World Health Organization. COVID-19. Available at: <https://covid19.who.int/>

²В России за неделю выздоровело 22 993 человека. Режим доступа: <https://объясняем.рф/stopkoronavirus/v-rossii-za-nedelyu-vyzdorovelo-22-993-cheloveka/>

Вакцинация является одним из наиболее эффективных и доступных медицинских вмешательств, которое ежегодно спасает миллионы жизней [1]. Несмотря на это, заболевания, которые удается предотвратить с помощью вакцин, возникают вновь, и уровень приемлемости вакцины остается неоптимальным как для плановых вакцинаций, так и для вакцинаций, не включенных в календарь прививок [2]. Существующие вакцины против SARS-CoV-2 – это векторные, вакцины на основе мРНК, инактивированные вакцины, а также вакцины на основе вирусоподобных частиц (Virus like particles, VLP) [3]. На эффективность вакцин влияет постоянное приобретение вирусных мутаций из-за присущей вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразе высокой частоты ошибок и существования сильноизменчивого мотива связывания с рецептором в S-белке [4].

Перспективный подход в создании эффективных вакцин – это разработка вакцин на основе VLP, которые представляют собой структурные белки вируса, способные к самосборке, имитирующие вирион, но не несущие в себе вирусного генома. В настоящее время вакцины на основе VLP проходят разные фазы клинических исследований – NVX-CoV2373 (Novavax) [5], Covifenz (Medicago) [6], ABNCoV2 (RadboudUniversity) [7] и LYB001 (Yantai Patronus Biotech Co Ltd) [8]. Однако в указанные вакцины включен только S-белок SARS-CoV-2. Представляется более перспективным разрабатывать вакцины на основе 4 структурных белков коронавируса для имитации вириона SARS-CoV-2.

SARS-CoV-2 относится к роду β -*Coronavirus* семейства *Coronaviridae* порядка *Nidovirales* [9]. Геном SARS-CoV-2 представлен РНК положительной полярности длиной около 30 тыс. нуклеотидов и имеет примерно 82% идентичности последовательностей с SARS-CoV и MERS-CoV и более 90% идентичности последовательностей основных ферментов и структурных белков. Вирион SARS-CoV-2 состоит из 4 структурных белков, которые включают белки шипа (S), оболочки (E), мембраны (M) и нуклеокапсида (N) [10, 11].

Белок N связывается с РНК вируса, образуя рибонуклеокапсид, находящийся внутри вирусной частицы. Белок N – наиболее консервативный белок коронавируса. Белки E и M – это относительно небольшие белки (75 aa и 222 aa соответственно), составляющие вирусную оболочку. Белок S составляет шип на поверхности вируса. Этот белок играет важнейшую роль в патогенезе вируса. Рецептор-связывающий домен (Receptor binding domain, RBD) – домен, входящий в состав этого белка, отвечает за связывание вирусной частицы и клеточного рецептора. Считается, что антитела, нейтрализующие вирус, вырабатываются именно против этого белка.

VLP содержат большое количество повторяющихся фрагментов вирусных поверхностных белков, представляющих собой конформационные вирусные эпитопы, которые способны вызывать Т-клеточный и В-клеточный иммунный ответ. При иммунизации

VLP стимулируют дендритные клетки, которые захватывают соответствующие антигены для презентации Т- и В-лимфоцитам [12].

Технология получения VLP позволяет при необходимости быстро менять их состав, согласно текущей эпидемической ситуации. Так как изначально ген, кодирующий белок коронавируса, находится в виде ДНК в плазмидном векторе, в его последовательность можно вносить изменения при помощи сайт-направленного мутагенеза и таким образом корректировать антигенный состав вакцины, обеспечивая образование широкого спектра антител против пандемически значимых вариантов SARS-CoV-2.

Цель исследования – разработать технологию получения и очистки VLP на основе рекомбинантных белков E, M, N и S SARS-CoV-2, собранных в клетках насекомых, и дать их комплексную характеристику.

Материалы и методы

Молекулярно-эпидемиологические исследования

После комплексных эпидемиологических исследований для определения актуальных эпидемически значимых штаммов вирусов подбирали и оптимизировали последовательности генов вируса для последующего клонирования в донорную плазмиду, а затем в бакмиду [13].

Получение рекомбинантных бакуловирусов

Кодирующие последовательности были получены синтетическим путем, частота использования кодонов была оптимизирована для экспрессии в культуре клеток насекомых. Для создания каждой генетической конструкции использовали систему экспрессии Bac-to-Bac. Для получения бакуловируса, экспрессирующего белки M, E, N и S актуальных штаммов коронавируса, применяли трансферный вектор pFastBac (донорную плазмиду). Данный вектор содержит экспрессионную кассету, в которой, помимо клонированных генов, находятся фланкирующие последовательности транспозона Tn7. Рекомбинантная трансферная плаزمиды используется для трансформации клеток DH10Bac *Escherichia coli*, которые содержат модифицированный бакуловирусный геном в виде бакмиды и вектор-помощник, кодирующий фермент транспозазу. Отбор рекомбинантных клонов DH10Bac осуществляли методом цветного теста. В выбранных колониях белого цвета перенос экспрессионной кассеты в бакуловирусный геном подтверждали методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами, один из которых специфичен к клонированной последовательности, а другой – к геному бакуловируса.

Получение и очистка VLP

Трансфекцию перевиваемой линии клеток *Spodoptera frugiperda* Sf-21 проводили очищенными препаратами бакмидной ДНК, содержащей кодон-оптимизированные последовательности генов коронавируса, с использованием катионного липосомного агента Cellfectin (Invitrogen, США), для каждой кон-

струкции использовали по два клон (посевная концентрация клеток 5×10^5 кл/мл на 10 мкл бакмиды). После трансфекции проводили еще два пассажа на клетках Sf-9.

VLP получали методом коинфекции – одновременного заражения перевиваемой линии клеток насекомых *Trichoplusia ni* (T.ni) различными сочетаниями рекомбинантных бакуловирусов. Перевиваемую культуру клеток насекомых T.ni культивировали в течение 4 сут после заражения.

После культивирования культуральную жидкость (КЖ) осветляли методом низкоскоростного центрифугирования для освобождения от клеток и клеточного дебриса при 1000 об/мин в течение 5 мин и при 6000 об/мин в течение 20 мин соответственно (4 °C, ротор Sorval SS34).

Для выделения и очистки синтезированных VLP осветленную КЖ наслаивали в ультрацентрифужные пробирки на слой 6 мл 20% раствора сахарозы (не допуская смешивания), приготовленного на буфере TNC (10 mM Tris-HCl, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂, pH 7,4). Центрифугировали в течение 2 ч при 28 000 об/мин (центрифуга Optima XE-100, ротор SW 32Ti, Beckman Coulter, +4 °C). Надосадочную жидкость удаляли, полученные осадки ресуспендировали в буфере TNC и хранили при температуре 4 °C.

Характеристика VLP

Электронная микроскопия. Очищенные VLP в объеме 3 мкл наносили на медную сетку, покрытую углеродной подложкой (Ted Pella, США) и обработанную в атмосфере тлеющего разряда. Инкубировали 30 с при комнатной температуре. Затем наносили каплю 2% раствора ацетата урана, инкубировали 30 с. Исследование производили в просвечивающем электронном микроскопе JEOL 2100 (JEOL, Япония), оборудованном катодом из гексаборита лантана, при ускоряющем напряжении 200 кВ. Изображения получали с увеличением $\times 25\,000$ с помощью ПЗС-камеры Gatan X100 с размером матрицы 2000×2000 пикселей (Gatan, США).

Физические размеры VLP. Физический размер и однородность распределения VLP в очищенной суспензии определяли методом динамического светорассеяния на установке Malvern Zeta Sizer NANO.

Определение концентрации белка. Концентрацию общего белка в готовых очищенных препаратах VLP определяли с помощью коммерческого набора BCA Protein Assay Kit (Thermo, США).

Вестерн-блот. Анализ структурных белков VLP проводили методом электрофореза в 12% полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН) по методу Laemmli (1970) на приборе Mini-PROTEAN II (Bio-Rad, США) согласно инструкции производителя. После проведения электрофореза белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0,45 мкм, Schleicher & Schuell, Германия) в мини-ячейке Mini Trans-Blot (Bio-Rad, cat. № 170-3930) согласно методике производителя. Мембраны инкубировали с положительными сыворотками кро-

ви лиц, переболевших COVID-19, и отрицательными сыворотками, полученными за 20 лет до пандемии, в разведении 1 : 50. Антитела, провзаимодействовавшие с белками из VLP, на мембране инкубировали с антителами к IgG человека, конъюгированными с пероксидазой хрена («Сорбент», Россия) в разведении 1 : 200, и после инкубации проявляли с использованием Super Signal West Femto Maximum (Thermo Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Для детекции сигнала хемилюминесценции на мембране экспонировали зеленочувствительную рентгеновскую фотопленку (cat. №126041, Carestream, США). Пленку проявляли с использованием проявителя и фиксажа фирмы «ВИПС-МЕД» (Россия) согласно методике фирмы-производителя.

Реакция нейтрализации с сыворотками крови лиц, перенесших COVID-19. Клетки Vero E6 заражали SARS-CoV-2, при появлении цитопатического действия вируса (ЦПД) флакон замораживали, оттаивали, КЖ центрифугировали при 3000 об/мин, аликвотировали и замораживали. Титр вируса определяли методом конечных разведений, для чего КЖ добавляли к монослою клеток Vero E6 в разведениях от 10^{-1} до 10^{-8} . Титром вируса считали последнее разведение, где обнаруживалось ЦПД. Пятидесятипроцентную тканевую цитопатическую инфекционную дозу (ТЦИД₅₀) рассчитывали по методу Рида и Менча. При постановке реакции нейтрализации (РН) использовали разведение КЖ, содержащее 100 ТЦИД₅₀ в 100 мкл.

Из сывороток крови лиц, перенесших коронавирусную инфекцию, готовили разведения от 1 : 10 до 1 : 1280 и вносили по 100 мкл в лунки 96-луночного планшета. К разведениям сывороток добавляли по 100 мкл вирусосодержащей суспензии и инкубировали смесь в течение 1 ч при 37 °C. Затем смесь переносили в 96-луночный планшет с монослоем клеток Vero E6. Через 72 ч реакцию учитывали, просматривая лунки планшета в микроскоп. Если в сыворотке крови присутствуют нейтрализующие вирус антитела, вирус не будет вызывать ЦПД клеток. Титром сыворотки крови (последним нейтрализующим разведением) считали разведение, при котором обеспечивается 100% защита клеток (отсутствует ЦПД).

Специфическая активность. Идентичность антигенов в VLP антигенам в вирусной частице SARS-CoV-2 оценивали с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) по взаимодействию с антителами к SARS-CoV-2 в сыворотках лиц, переболевших COVID-19, охарактеризованных ранее в РН. В лунки планшета сорбировали VLP в течение 18 ч при 4 °C. Затем в лунки с сорбированными VLP вносили сыворотки здоровых лиц (отрицательный контроль) и лиц, перенесших COVID-19, в разведении 1 : 100, инкубировали 1 ч при 37 °C. Затем добавляли антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США). После инкубации в течение 15 мин (20–25 °C) останавливали реакцию 1 M H₂SO₄. Интенсивность окраски в лунках определяли на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

Уровень синтеза VLP оценивали по количественному содержанию RBD белка S методом ИФА. В качестве «захватывающих» и детектирующих антител использовали моноклональные антитела (МКА) к RBD, полученные и охарактеризованные ранее в лаборатории. Лунки иммунологических планшетов сорбировали МКА в концентрации 10 мкг/мл в течение 18 ч при 4 °С. Затем вносили рекомбинантный RBD в концентрациях 15,6; 31,25; 62,5; 125; 250; 500; 1000 нг/мл для построения калибровочной кривой и исследуемые образцы VLP в разведении 1 : 200–1 : 400. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С добавляли пероксидазный конъюгат МКА и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем вносили хромоген-субстратную смесь с тетраметилбензидином («Хема», Россия). Инкубировали 15 мин (20–25 °С), останавливали реакцию 1 М H₂SO₄. Интенсивность окраски в лунках определяли на спектрофотометре при длине волны 450 нм. Количественное содержание VLP выражали в концентрации RBD, которую вычисляли по величине оптической плотности, используя калибровочную кривую, по следующей формуле:

$$C_{\text{RBD}} = (A_{450}/k) \times n,$$

где: k – угол наклона калибровочной кривой;

n – кратность разведения исследуемой пробы VLP.

Иммуногенность VLP

Для оценки иммуногенности VLP изучали формирование гуморального (РН и непрямой ИФА, как описано выше) и клеточного иммунного ответа (реакция бласттрансформации лимфоцитов, РБТЛ) после 3-кратной иммунизации золотистых хомяков (*Mesocricetus auratus*) при внутримышечном введении VLP в концентрации 40 мкг на животное.

Реакция бласттрансформации лимфоцитов

Все манипуляции выполняли в стерильных условиях. У хомяков извлекали селезенки и гомогенизировали в 3 мл чистой среды RPMI-1640 в стерильном гомогенизаторе. Суспензию клеток центрифугировали на одноступенчатом градиенте плотности фикола-пака (HistoPaque-1077, Sigma, США), выделяли фракцию мононуклеарных клеток, отмывали дважды в чистой среде RPMI-1640 и помещали в 96-луночные культуральные панели с концентрацией 10⁵ клеток в 100 мкл в лунку. Антигены-стимуляторы добавлялись по 100 мкл в лунку к клеткам до конечных концентраций. В качестве положительного контроля служили спленоциты, активированные конканавалином А (КонаА 12,5 мг, «ПанЭко», Россия). В качестве отрицательных контролей использовали: спленоциты из селезенки неиммунизированных хомяков; спленоциты без стимуляции антигенами, а также спленоциты, стимулированные неспецифическим антигеном (вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки, *Cribean-Congo hemorrhagic fever*). Клетки культивировали в полноростовой среде RPMI-1640, с 20% эмбриональной телячьей сывороткой, 2 мМ глутамин, 4,5 г/л глюкозы, 50 мкг/мл гентамицина, 0,2 ед/мл инсулина при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. Пролифе-

рацию спленоцитов оценивали в реакции бласттрансформации через 4–5 сут с помощью инвертированного микроскопа (×400). Результаты РБТЛ выражали в виде индекса стимуляции пролиферации (ИСП) – отношения среднего числа бластов в присутствии стимуляторов к среднему числу бластов в отсутствие стимуляторов. Положительным считали результат, если ИСП превышает 2.

Оценку гуморального иммунного ответа проводили методами непрямого ИФА и РН с сыворотками хомяков после 2-й и 3-й иммунизации. Оценку клеточного иммунитета (РБТЛ) проводили после 1-й и 2-й иммунизации.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием программ Prizm Graphpad 8.4.3 (Graph Pad Software, США) и Statistica 12.6 (Stat Soft Inc., США). Результаты считали статистически достоверными при $p < 0,05$.

Результаты

Молекулярно-эпидемиологические исследования и получение рекомбинантных бакуловирусов

В результате проведенных молекулярно-эпидемиологических исследований [13] для получения рекомбинантных белков как антигенов вакцины были выбраны гены S-белка 4 актуальных штаммов, наиболее распространенных в Российской Федерации и Европе – подобный вирусу Ухань, Delta, Alpha и Omicron и гены белков E, M и N SARS-CoV-2. Выбранные аминокислотные последовательности были

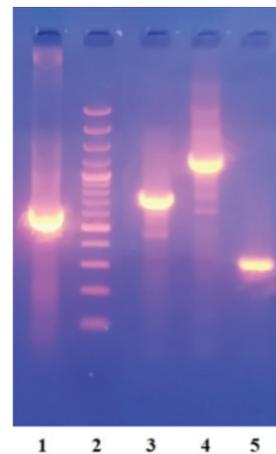


Рис. 1. Вставки генов соответствующего размера в рекомбинантных бакуловирусах, полученные в результате ПЦР.

1 – диагностический фрагмент гена белка S (597 п.н.); 2 – маркер молекулярных масс; 3 – вставка, содержащая ген белка M (768 п.н.); 4 – вставка, содержащая ген белка N (1359 п.н.); 5 – вставка, содержащая ген белка E (327 п.н.).

Fig. 1. Gene inserts of the appropriate size in recombinant baculoviruses obtained as a result of PCR.

1 – diagnostic fragment of the S protein gene (597 bp); 2 – marker of molecular weights; 3 – insert containing the M protein gene (768 bp); 4 – insert containing the N protein gene (1359 bp); 5 – an insert containing the E protein gene (327 bp).

оптимизированы для наработки в клетках насекомых и клонированы в трансферный вектор pFastBacDual. Получили рекомбинантные бакуловирусы, несущие гены белка S 4 разных штаммов, а также белков E, M и N SARS-CoV-2. Наличие вставок генов в рекомбинантных бакуловирусах было подтверждено методом ПЦР (рис. 1).

Для оптимизации условий получения белков SARS-CoV-2 был использован 3-й пассаж рекомбинантных бакуловирусов, которым заражали перевиваемую культуру клеток насекомых T.ni. Оценку накопления целевых продуктов выполняли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле, а также методом ИФА, в котором в качестве материала для исследования использовали лизат клеток насекомых, инфицированных рекомбинантными бакуловирусами в разных дозах, с учетом длительности инкубации (2–5 сут после заражения клеток). В качестве детектирующих антител использовали МКА к RBD S-белка SARS-CoV-2. В результате проведенной работы были установлены оптимальные клоны для каждой конструкции, а также длительность инкубации культуры клеток насекомых, инфицированных различными рекомбинантными бакуловирусами. Полученные данные были использованы при проведении опытов, направленных на оптимизацию параметров коинфекции – одновременного заражения перевиваемой линии клеток насекомых T.ni различными сочетаниями рекомбинантных бакуловирусов. На 1-м этапе рекомбинантные бакуловирусы использовали в одинаковой дозе заражения (0,02 ТЦД₅₀). В результате были сконструированы 4 различные VLP, содержащие на своей поверхности разные S-белки SARS-CoV-2: на поверхности каждой частицы был один из 4 S-белков актуальных клонированных, а также белки E, M и N, что было подтверждено методом иммуноблоттинга (рис. 2).

Таким образом, с использованием вестерн-блота было доказано, что учитываемые белковые полосы в образцах рекомбинантных белков VLP являются

специфическими и соответствуют спайковому (S) гликопротеину, гликопротеину малой оболочки (E), мембранному (M) гликопротеину и нуклеокапсидному (N) белку.

Характеристика очищенных препаратов VLP

Морфологию, физический размер и однородность распределения очищенных VLP определяли с помощью электронной микроскопии, а также методом динамического светорассеяния на установке Malvern Zeta Sizer NANO (рис. 3).

Специфичность и уровень синтеза очищенных VLP оценивали по концентрации общего белка и по концентрации RBD белка S. Полученные VLP считали специфически активными при содержании RBD больше 5 мкг/мл. Исходя из данных электронной микроскопии, если более 90% полученных VLP собраны правильно и не разрушены, то концентрацию общего белка в очищенных препаратах VLP можно принять за концентрацию VLP. В табл. 1 представлены средние значения содержания VLP, полученные из 1 л КЖ.

Иммуноспецифичность VLP с использованием сывороток крови здоровых людей и людей, переболевших новой коронавирусной инфекцией

Синтезированные и очищенные VLP имитируют структуру вириона SARS-CoV-2, при этом антигенные детерминанты представлены аналогично таковым у SARS-CoV-2. Результаты исследования иммуноспецифичности (рис. 4) с сыворотками крови лиц, переболевших COVID-19, свидетельствуют о специфичности полученных VLP.

Таким образом, полученные VLP эффективно «узнаются» специфическими антителами из сывороток крови лиц, перенесших COVID-19. При этом наблюдается корреляция между титром в реакции нейтрализации и оптической плотностью при ИФА, что доказывает наличие специфически взаимодействующих антител с VLP.

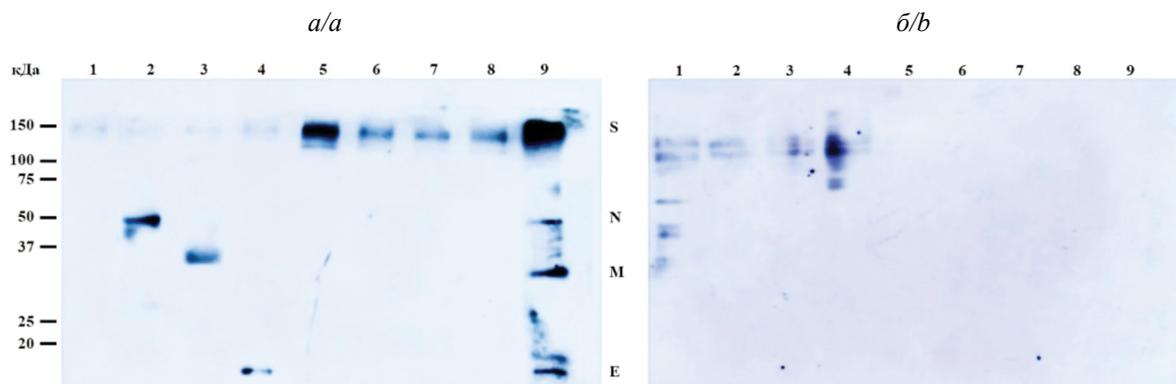


Рис. 2. Вестерн-блот рекомбинантных белков VLP после обработки положительной (а) и отрицательной сывороткой (б).

Дорожки: 1 – отрицательный контроль (клетки T.ni); 2 – N; 3 – M; 4 – E; 5 – S (подобный вирусу Ухань), 6 – S (Omicron); 7 – S (Delta); 8 – S (Alpha); 9 – положительный контроль (SARS-CoV-2).

Fig. 2. Western blot of recombinant VLP proteins after treatment with positive (a) and negative serum (b).

Tracks: 1 – negative control (cells T.ni); 2 – N; 3 – M; 4 – E; 5 – S (Wuhan-like virus); 6 – S (Omicron); 7 – S (Delta); 8 – S (Alpha); 9 – positive control (SARS-CoV-2).

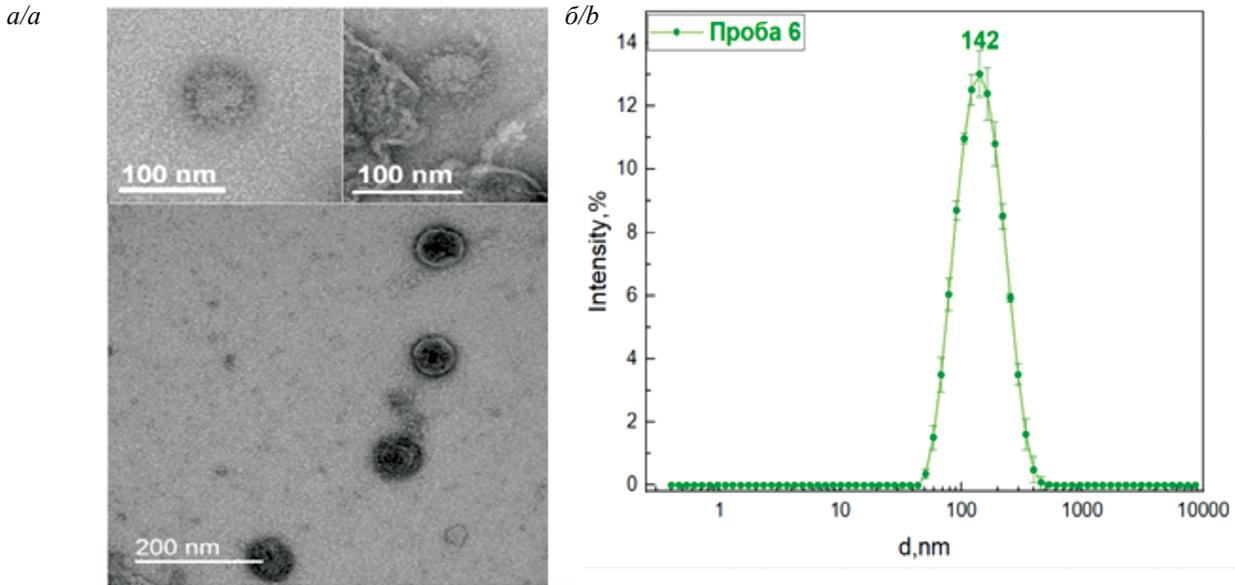


Рис. 3. Морфология и физические размеры очищенных VLP.

a – электронная микроскопия VLP; *б* – гистограмма распределения VLP по размеру.

Fig. 3. Morphology and physical dimensions of purified VLPs.

a – electron microscopy of VLP; *b* – histogram of VLP size distribution.

Таблица 1. Эффективность синтеза VLP, содержащих S-белок 4 штаммов коронавируса: подобный вирусу Ухань, Delta, Alpha и Omicron

Table 1. Efficiency of VLP synthesis of 4 coronavirus strains containing S protein: similar to the Wuhan-like virus, Delta, Alpha and Omicron

VLP SARS-CoV-2	Содержание общего белка в очищенных VLP, полученных из 1 л КЖ, мг (<i>n</i> = 10) Total protein content in purified VLPs obtained from 1 liter of culture fluid, mg (<i>n</i> = 10)
Подобный вирусу Ухань / Wuhan-like virus (<i>n</i> = 8)	5,6 ± 1,9
Delta (<i>n</i> = 11)	5,9 ± 1,7
Alpha (<i>n</i> = 11)	6,2 ± 1,2
Omicron (<i>n</i> = 8)	5,5 ± 1,9

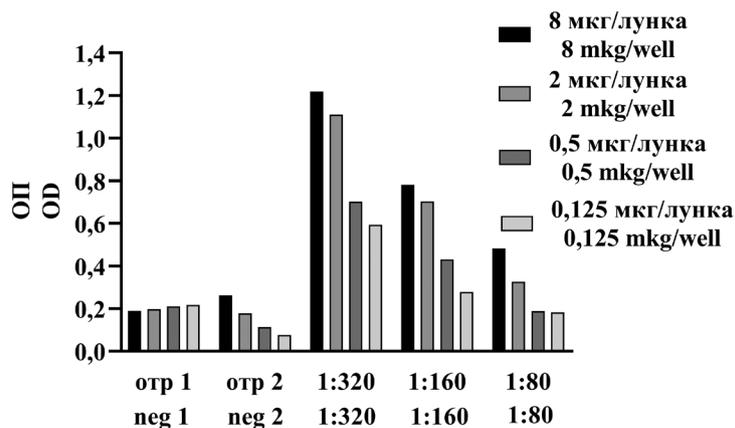


Рис. 4. Результаты исследования иммуноспецифичности VLP в ИФА с сыворотками крови лиц, охарактеризованных в РН.

По оси абсцисс представлены сыворотки крови, охарактеризованные в РН; по оси ординат – оптическая плотность при длине волны 450 нм, легенда – VLP в концентрациях 8, 2, 0,5 и 0,125 мкг/лунку: отр 1 – сыворотка, отрицательная в РН; отр 2 – сыворотка, отрицательная в РН, взятая более 20 лет назад; 1 : 320 – сыворотка, положительная в РН, титр 1 : 320; 1 : 160 – сыворотка, положительная в РН, титр 1 : 160; 1 : 80 – сыворотка, положительная в РН, титр 1 : 80.

Fig. 4. Results of a study of the immune specificity of VLP in ELISA with human sera characterized by NT.

The X-axis shows human sera characterized in NT; the Y-axis shows optical density at a wavelength of 450 nm, legend – VLP at concentrations of 8, 2, 0.5 and 0.125 micrograms/well: отр 1 – serum negative in NT; отр 2 – serum negative in NT collected more than 20 years ago; 1 : 320 – serum positive in NT, titer 1 : 320; 1 : 160 – serum positive in NT, titer 1 : 160; 1 : 80 – serum positive in NT, titer 1 : 80.

Таблица 2. Результаты наличия специфических IgG, нейтрализующих антител и ИСП в сыворотке крови и крови золотистых хомячков, иммунизированных внутримышечно VLP в концентрации 40 мкг/доза, $M \pm SEM$

Table 2. Results of the presence of specific IgG, neutralizing antibodies and LPAs in the serum and blood of golden hamsters immunized intramuscularly with VLP at a concentration of 40 μg /dose, $M \pm SEM$

Иммунизация Immunization	ИСП LPA	Иммунизация Immunization	РН, обр.зн. NT, val.	ИФА, опт.пл. ELISA, opt.dens.	ИФА, обр.зн. титра ELISA, Reciprocal titer value
1	0,4 \pm 0,01	2	340 \pm 173	1,094 \pm 0,26	12,800
2	8,9 \pm 0,91*	3	1280 \pm 0*	1,613 \pm 0,01	12,800

Примечание. * – значения, достоверно отличающиеся от значения предыдущей вакцинации ($p < 0,05$).

Note. * – values significantly different from the value of the previous immunization ($p < 0.05$).

Иммуногенность VLP

Для оценки иммуногенности VLP изучали формирование гуморального (РН и ИФА) после 2-й и 3-й иммунизации и клеточного иммунитета (РБТЛ) после 1-й и 2-й иммунизации золотистых хомячков (*Mesocricetus auratus*) при внутримышечном введении VLP в концентрации 40 мкг/доза. С помощью комплекса методов были получены результаты, представленные в виде среднего значения и среднеквадратического отклонения ($M \pm SEM$) в табл. 2.

Показано, что для формирования клеточного иммунитета достаточна двукратная иммунизация. После 2-й иммунизации происходит статистически значимое, почти 20-кратное увеличение ИСП (8,9 \pm 0,91) по сравнению с 1-й иммунизацией (0,4 \pm 0,01) ($p < 0,05$). При исследовании гуморального иммунитета установлено, что специфические вируснейтрализующие антитела IgG обнаруживаются после 2-й и 3-й иммунизации хомячков. При этом уровень IgG не меняется в зависимости от количества иммунизаций (оптическая плотность: 1,094 \pm 0,26 и 1,613 \pm 0,01 после 2-й и 3-й иммунизации соответственно) ($p > 0,05$). При этом отмечается достоверное увеличение вируснейтрализующих антител после 3-й иммунизации почти в 4 раза по сравнению со 2-й иммунизацией (обр.зн. 1280 \pm 0 и 340 \pm 173 после 2-й и 3-й иммунизации соответственно) ($p < 0,05$). Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о формировании специфического гуморального и клеточного ответа у всех исследуемых иммунизированных хомячков в ответ на внутримышечное введение VLP в концентрации 40 мкг/доза.

Обсуждение

Пандемия COVID-19 привела к серьезным экономическим и социальным последствиям во всем мире. С самого начала коронавирус SARS-CoV-2, возбудитель COVID-19, постоянно менялся и продолжает эволюционировать до настоящего времени. На сегодняшний день в разных регионах мира зарегистрировано множество геновариантов SARS-CoV-2. Существуют серьезные опасения по вопросу эффективности имеющихся вакцин против новых вариантов вируса. С учетом вышесказанного, крайне актуальной остается проблема разработки новых вакцинных препаратов, которые не только вызывают эффективный иммунный ответ, но и индуцируют перекрестно-реак-

тивный иммунитет, обеспечивая защиту от новых вариантов SARS-CoV-2 [14]. Результаты исследования циркулирующих в Европе и в Российской Федерации уникальных геновариантов SARS-CoV-2 показали, какие антигенные детерминанты необходимо учитывать при разработке вакцинного препарата. Был проведен анализ изменчивости генома SARS-CoV-2 в процессе распространения COVID-19.

В настоящей работе получены VLP, имитирующие вирион SARS-CoV-2, содержащие 4 структурных белка – E, M, N и S SARS-CoV-2. При этом поверхностные детерминанты представлены S-белками актуальных клонированных – подобный штамму Ухань (19A), индийский (Delta), британский (Alpha) и Omicron. Таким образом, вакцина на основе полученных VLP обеспечивает образование антител широкого спектра и позволит предотвратить инфекцию, вызванную разными штаммами SARS-CoV-2, а также формировать иммунный ответ, аналогичный тому, который индуцируется при естественной инфекции [15]. Весомым преимуществом VLP-вакцин является отсутствие генетического материала, что исключает возможность репликации вирусного генома. Кроме того, антигены, представленные на поверхности VLP в их нативной конформации, более стабильны, чем в форме субъединиц, что приводит к использованию меньших доз антигена, необходимых для запуска защитного иммунного ответа.

Между штаммами Ухань и Omicron эпитопы Т-клеток высоко консервативны, в то время как многие эпитопы нейтрализующих антител находятся в вариативных областях спайк-тримера, а субварианты Omicron BA.1–BA.5 имеют мутации в RBD, что снижает нейтрализующую способность антител, формируемых современными вакцинами [15, 16]. Это подчеркивает необходимость использования новых подходов в разработке вакцин и добавления других антигенов, таких как E, M, N-белки, которые менее мутированы, чем белок S, в составе вакцин против COVID-19. Поскольку антитела менее эффективны к новым вариантам вируса, чем Т-клетки, вакцина, которая индуцирует как клеточный иммунитет, так и гуморальный, может иметь значительное преимущество.

Таким образом, синтезированные VLP, имитирующие вирион SARS-CoV-2, содержащие 4 структурных белка – E, M, N и S SARS-CoV-2 актуальных клонированных

стимулирующие формирование гуморального и клеточного иммунитета, являются перспективным антигеном для дальнейшей разработки вакцины на основе VLP, которая позволит обеспечить эффективную защиту от SARS-CoV-2 [15, 16].

Использованная в настоящей работе бакуловирусная система экспрессии в клетках насекомых для создания VLP имеет ряд преимуществ: бакуловирусы не инфицируют человека, что делает работу безопасной; клетки насекомых растут в бессывороточной среде, не содержащей животных продуктов, ретровирусов и не являются онкогенными; синтез VLP в бакуловирусной системе экспрессии может быть масштабирован и оптимизирован для промышленного производства иммунобиологических препаратов.

На сегодняшний день одобренные и доступные на коммерческом рынке вакцины на основе VLP включают вакцины против вируса папилломы человека (Cervarix Gardasil, Gardasil 9), против вируса гепатита В (Energix Glaxo Smith Kline, Recombivax) [17]. Против инфекции COVID-19 показала иммуногенные и протективные свойства у мышей, крыс и хорьков VLP-вакцина бр-VLP-58-1023-A1-K3 с адьювантом CpG ODN/alum, экспрессирующая все 4 структурных белковых антигена SARS-CoV-2 [18]. Эта вакцина прошла I фазу клинических исследований с участием человека [19].

Заключение

Была оптимизирована система синтеза и очистки вирусоподобных частиц – VLP из рекомбинантных белков, синтезированных в бакуловирусной системе экспрессии. В результате исследований получены устойчивые VLP, состоящие из 4 рекомбинантных белков SARS-CoV-2 – E, M, N и S, имитирующие вирион SARS-CoV-2, способные индуцировать специфический иммунный ответ против SARS-CoV-2. Доказана специфичность полученных VLP. Разработанные VLP могут быть использованы в качестве антигена в иммунобиологическом лекарственном препарате для профилактики COVID-19.

ЛИТЕРАТУРА

- Rappuoli R., Pizza M., Del Giudice G., De Gregorio E. Vaccines, new opportunities for a new society. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014; 111(34): 12288–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402981111>
- Omer S.B., Salmon D.A., Orenstein W.A., deHart M.P., Halsey N. Vaccine refusal, mandatory immunization, and the risks of vaccine-preventable diseases. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(19): 1981–8. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa0806477>
- Li M., Wang H., Tian L., Pang Z., Yang Q., Huang T., et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct. Target Ther.* 2022; 7(1): 146. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00996-y>
- Lou F., Li M., Pang Z., Jiang L., Guan L., Tian L., et al. Understanding the secret of SARS-CoV-2 variants of concern/interest and immune escape. *Front. Immunol.* 2021; 12: 744242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744242>
- Heath P.T., Galiza E.P., Baxter D.N., Boffito M., Browne D., Burns F., et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 385(13): 1172–83. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>
- Chhibber S., Jain D. Plant-based vaccines to combat COVID-19: strategies, status and prospects. *Purva Mimaansa*. 2022; 13: 25–30.

- Smit M.J., Sander A.F., Ariaans M.B.P.A., Fougereux C., Heinzl C., Fendel R., et al. First-in-human use of a modular capsid virus-like vaccine platform: an open-label, non-randomised, phase 1 clinical trial of the SARS-CoV-2 vaccine ABNCoV2. *Lancet Microbe*. 2023; 4(3): e140–8. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00337-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00337-8)
- Li Y., Zhang Y., Zhou Y., Li Y., Xu J., Ai Y., et al. An RBD virus-like particle vaccine for SARS-CoV-2 induces cross-variant antibody responses in mice and macaques. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2023; 8(1): 173. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01425-4>
- V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021; 19(3): 155–70. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
- Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022; 23(1): 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021; 19(3): 141–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Eggenhuizen P.J., Ng B.H., Chang J., Fell A.L., Cheong R.M.Y., Wong W.Y., et al. BCG vaccine derived peptides induce SARS-CoV-2 T cell cross-reactivity. *Front. Immunol.* 2021; 12: 692729. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.692729>
- Ожмегова Е.Н., Савочкина Т.Е., Прилипов А.Г., Тихомиров Е.Е., Ларичев В.Ф., Сайфуллин М.А. и др. Молекулярно-эпидемиологический анализ геновариантов SARS-CoV-2 на территории Москвы и Московской области. *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(6): 496–505. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-146> <https://elibrary.ru/cgiwkw>
- Rambaut A., Holmes E.C., O'Toole Á., Hill V., McCrone J.T., Ruis C., et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 to assist genomic epidemiology. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(11): 1403–7. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
- Choi S.J., Kim D.U., Noh J.Y., Kim S., Park S.H., Jeong H.W., et al. T cell epitopes in SARS-CoV-2 proteins are substantially conserved in the Omicron variant. *Cell. Mol. Immunol.* 2022; 19(3): 447–8. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00838-5>
- Syed A.M., Ciling A., Taha T.Y., Chen I.P., Khalid M.M., Sreekumar B., et al. Omicron mutations enhance infectivity and reduce antibody neutralization of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2022; 119(31): e2200592119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2200592119>
- Hemmati F., Hemmati-Dinarvand M., Karimzade M., Rutkowska D., Eskandari M.H., Khanizadeh S., et al. Plant-derived VLP: a worthy platform to produce vaccine against SARS-CoV-2. *Bio-technol. Lett.* 2022; 44(1): 45–57. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03211-0>
- Yilmaz I.C., Ipekoglu E.M., Bulbul A., Turay N., Yildirim M., Evcili L., et al. Development and preclinical evaluation of virus-like particle vaccine against COVID-19 infection. *Allergy*. 2022; 77(1): 258–70. <https://doi.org/10.1111/all.15091>
- National Library of Medicine. Study of a severe acute respiratory syndrome CoV-2 (SARS-CoV-2) virus-like particle (VLP) vaccine in healthy adults (COVID-19); 2022. Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04818281>

REFERENCES

- Rappuoli R., Pizza M., Del Giudice G., De Gregorio E. Vaccines, new opportunities for a new society. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2014; 111(34): 12288–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402981111>
- Omer S.B., Salmon D.A., Orenstein W.A., deHart M.P., Halsey N. Vaccine refusal, mandatory immunization, and the risks of vaccine-preventable diseases. *N. Engl. J. Med.* 2009; 360(19): 1981–8. <https://doi.org/10.1056/NEJMsa0806477>
- Li M., Wang H., Tian L., Pang Z., Yang Q., Huang T., et al. COVID-19 vaccine development: milestones, lessons and prospects. *Signal Transduct. Target Ther.* 2022; 7(1): 146. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-00996-y>
- Lou F., Li M., Pang Z., Jiang L., Guan L., Tian L., et al. Understanding the secret of SARS-CoV-2 variants of concern/interest and immune escape. *Front. Immunol.* 2021; 12: 744242. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.744242>

5. Heath P.T., Galiza E.P., Baxter D.N., Boffito M., Browne D., Burns F., et al. Safety and efficacy of NVX-CoV2373 COVID-19 vaccine. *N. Engl. J. Med.* 2021; 385(13): 1172–83. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2107659>
6. Chhibber S., Jain D. Plant-based vaccines to combat COVID-19: strategies, status and prospects. *Purva Mimaansa.* 2022; 13: 25–30.
7. Smit M.J., Sander A.F., Ariaans M.B.P.A., Fougereux C., Heinzl C., Fendel R., et al. First-in-human use of a modular capsid virus-like vaccine platform: an open-label, non-randomised, phase 1 clinical trial of the SARS-CoV-2 vaccine ABNCov2. *Lancet Microbe.* 2023; 4(3): e140–8. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00337-8](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00337-8)
8. Li Y., Zhang Y., Zhou Y., Li Y., Xu J., Ai Y., et al. An RBD virus-like particle vaccine for SARS-CoV-2 induces cross-variant antibody responses in mice and macaques. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2023; 8(1): 173. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01425-4>
9. V'kovski P., Kratzel A., Steiner S., Stalder H., Thiel V. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021; 19(3): 155–70. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>
10. Jackson C.B., Farzan M., Chen B., Choe H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2022; 23(1): 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
11. Hu B., Guo H., Zhou P., Shi Z.L. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat. Rev. Microbiol.* 2021; 19(3): 141–54. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
12. Eggenhuizen P.J., Ng B.H., Chang J., Fell A.L., Cheong R.M.Y., Wong W.Y., et al. BCG vaccine derived peptides induce SARS-CoV-2 T cell cross-reactivity. *Front. Immunol.* 2021; 12: 692729. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.692729>
13. Ozhmegova E., Savochkina T.E., Prilipov A.G., Tikhomirov E.E., Larichev V.F., Sayfullin M.A., et al. Molecular epidemiological analysis of SARS-CoV-2 genovariants in Moscow and Moscow region. *Voprosy virusologii.* 2022; 67(6): 496–505. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-146> <https://elibrary.ru/ergiwk> (in Russian)
14. Rambaut A., Holmes E.C., O'Toole Á., Hill V., McCrone J.T., Ruis C., et al. A dynamic nomenclature proposal for SARS-CoV-2 to assist genomic epidemiology. *Nat. Microbiol.* 2020; 5(11): 1403–7. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0770-5>
15. Choi S.J., Kim D.U., Noh J.Y., Kim S., Park S.H., Jeong H.W., et al. T cell epitopes in SARS-CoV-2 proteins are substantially conserved in the Omicron variant. *Cell. Mol. Immunol.* 2022; 19(3): 447–8. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00838-5>
16. Syed A.M., Ciling A., Taha T.Y., Chen I.P., Khalid M.M., Sreekumar B., et al. Omicron mutations enhance infectivity and reduce antibody neutralization of SARS-CoV-2 virus-like particles. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 2022; 119(31): e2200592119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2200592119>
17. Hemmati F., Hemmati-Dinarvand M., Karimzade M., Rutkowska D., Eskandari M.H., Khanizadeh S., et al. Plant-derived VLP: a worthy platform to produce vaccine against SARS-CoV-2. *Biotechnol. Lett.* 2022; 44(1): 45–57. <https://doi.org/10.1007/s10529-021-03211-0>
18. Yilmaz I.C., Ipekoglu E.M., Bulbul A., Turay N., Yildirim M., Evcili I., et al. Development and preclinical evaluation of virus-like particle vaccine against COVID-19 infection. *Allergy.* 2022; 77(1): 258–70. <https://doi.org/10.1111/all.15091>
19. National Library of Medicine. Study of a severe acute respiratory syndrome CoV-2 (SARS-CoV-2) virus-like particle (VLP) vaccine in healthy adults (COVID-19); 2022. Available at: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04818281>

Информация об авторах:

Латышев Олег Евгеньевич – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: oleglat80@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Зайкова Ольга Николаевна – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: zaykova_o_n@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

Елисеева Олеся Васильевна – канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: olesenka80@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Савочкина Татьяна Евгеньевна – младший научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: tasavochkina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4366-8476>

Чернорыж Яна Юрьевна – канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: revengeful_w@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9848-8515>

Сыроешкин Антон Владимирович – д-р биол. наук, профессор, заведующий кафедрой фармацевтической и токсикологической химии РУДН. E-mail: syroeshkin-av@rudn.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3279-7520>

Петров Глеб Владимирович – аспирант 3-го года обучения, ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии РУДН. E-mail: petrov-gv@rudn.ru; <https://orcid.org/0009-0004-1123-7393>

Воркунова Галина Константиновна – д-р биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: g.k.vorkunova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1346-3744>

Ларичев Виктор Филиппович – д-р мед. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: vlarichev@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

Федякина Ирина Тимофеевна – канд. биол. наук, заведующая лабораторией экологии вирусов, ведущий научный сотрудник отдела экологии вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: irfed2@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>

Черепушкин Станислав Андреевич – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: cherepushkin1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1734-5369>

Цибезов Валерий Владимирович – канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории средств специфической профилактики вирусных болезней, ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: tsibezov@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Южакова Ксения Андреевна – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: chekh-ks@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3130-5029>

Куликова Надежда Юрьевна – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: nad007@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3008-3383>

Лебедева Варвара Викторовна – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: lebedevavv@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3088-0403>

Якунин Дмитрий Юрьевич – аспирант лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: yud364@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0009-4531-5739>

Козлова Алина Александровна – канд. биол. наук, научный сотрудник лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: mailinkakozlova88@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2749-3258>

Баранец Марина Сергеевна – канд. мед. наук, научный сотрудник лаборатории биологии и индикации арбовирусов ФГБУ «НИЦЭМ

им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: shizotorex@mai.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3466-3588>

Юрлов Кирилл Иванович – научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: kir34292@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4694-2445>

Леснова Екатерина Ивановна – научный сотрудник лаборатории молекулярной диагностики ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: wolf252006@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>

Гребенникова Татьяна Владимировна [✉] – д-р биол. наук, профессор, чл.-корр. РАН, заместитель директора по научной работе подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского, руководитель Испытательного центра ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия. E-mail: t_grebennikova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Участие авторов: Латышев О.Е. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Зайкова О.Н. – проведение экспериментов, подготовка текста; Елисеева О.В. – концепция и дизайн исследований, анализ и интерпретация данных; Савочкина Т.А. – проведение экспериментов, подготовка текста; Чернорыж Я.В. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Сыроешкин А.В. – проведение экспериментов; Петров Г.В. – проведение экспериментов; Воркунова Г.К. – проведение экспериментов; Ларичев В.Ф. – проведение экспериментов, анализ и интерпретация данных, подготовка текста; Федякина И.Т. – проведение экспериментов; Черепушкин С.А. – проведение экспериментов, подготовка текста; Цибезов В.В. – проведение экспериментов, подготовка текста; Южакова К.А. – проведение экспериментов; Куликова Н.Ю. – проведение экспериментов; Лебедева В.В. – анализ и интерпретация данных; Якунин Д.Ю. – анализ и интерпретация данных; Козлова А.А. – проведение экспериментов; Юрлов К.И. – проведение экспериментов; Леснова Е.И. – проведение экспериментов, подготовка текста; Гребенникова Т.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста, одобрение окончательного варианта статьи для публикации.

Поступила 03.02.2024

Принята в печать 02.04.2024

Опубликована 27.04.2024

Information about the authors:

Tatyana V. Grebennikova [✉] – Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member RAS, deputy Director for Science of the Division of the Ivanovsky Virology Institute Head of the Control Center of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: t_grebennikova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Oleg E. Latyshev – PhD, Senior Scientist, Laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: oleglat80@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-5757-3809>

Olga N. Zaykova – Researcher at the Laboratory of Molecular Diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: zaykova_o_n@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4708-2069>

Olesya V. Eliseeva – PhD, Senior Scientist, Laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: olesenka80@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-0723-9749>

Tatyana E. Savochkina – Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: tasavochkina@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4366-8476>

Yana Yu. Chernoryzh – Candidate of Medical Sciences, Researcher, laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: revengeful_w@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9848-8515>

Anton V. Syroeshkin – Doctor of Biological Sciences, Professor, Head of the Department of Pharmaceutical and Toxicological chemistry at Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia. E-mail: syroeshkin-av@rudn.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3279-7520>

Gleb V. Petrov – 3rd year PhD Student, Assistant at the Department of Pharmaceutical and Toxicological chemistry at Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia. E-mail: petrov-gv@rudn.ru; <https://orcid.org/0009-0004-1123-7393>

Galina K. Vorkunova – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: g.k.vorkunova@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-1346-3744>

Victor F. Larichev – Doctor of Med. Sci, Leading Researcher, laboratory of biology and indication of arbovirus infections National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: vlaritchev@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-8262-5650>

Irina T. Fediakina – PhD, Lead Researcher of laboratory of viral ecology, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: irfed2@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6421-9632>

Stanislav A. Cherepushkin – Researcher of laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: cherepushkin1@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0002-1734-5369>

Valeriy V. Tsibezov – PhD, Leading Researcher of laboratory of specific virus prevention products, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: tsibezov@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2150-5764>

Ksenia A. Yuzhakova – Researcher of laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: chekh-ks@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-3130-5029>

Nadezhda Yu. Kulikova – Researcher of laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: nad007@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3008-3383>

Varvara V. Lebedeva – Researcher of laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: lebedevavv@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3088-0403>

Dmitriy Yu. Yakunin – Graduate student of laboratory of molecular diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: yd364@mail.ru; <https://orcid.org/0009-0009-4531-5739>

Alina A. Kozlova – PhD, researcher, laboratory of biology and indication of arbovirus infections, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: malinkakozlova88@gmail.com; <https://orcid.org/0000-0003-2749-3258>

Marina S. Baranets – PhD, researcher, laboratory of biology and indication of arbovirus infections, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: shizotorex@mai.ru; <https://orcid.org/0000-0002->

3466-3588

Kirill I. Yurlov – Researcher, laboratory of cellular engineering, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: kir34292@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4694-2445>

Ekaterina I. Lesnova – Researcher, laboratory of Molecular Diagnostics, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: wolf252006@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>

Tatyana V. Grebennikova – Doctor of Biological Sciences, Professor, Corresponding Member RAS, deputy Director for Science of the Division of the Ivanovsky Virology Institute Head of the Control Center of National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after Honorary Academician N.F. Gamaleya, Moscow, Russia. E-mail: t_grebennikova@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0002-6141-9361>

Contribution: Latyshev O.E. – performing the experiments, data analysis and interpretation, text preparation; Zaikova O.N. – performing the experiments, text preparation; Eliseeva O.V. – concept and design of research, data analysis and interpretation; Savochkina T.A. – performing the experiments, text preparation; Chernoryzh Ya.Yu. – performing the experiments, analysis and interpretation data, text preparation; Syroeshkin A.V. – performing the experiments; Petrov G.V. – performing the experiments; Vorkunova G.K. – performing the experiments; Larichev V.F. – performing the experiments, analyzing and interpreting data, preparing text; Fedyakina I.T. – performing the experiments; Cherepushkin S.A. – performing the experiments, preparing text; Tsibezov V.V. – performing the experiments, preparing text; Yuzhakova K.A. – performing the experiments; Kulikova N.Yu. – performing the experiments; Lebedeva V.V. – analysis and interpretation of data; Yakunin D.Yu. – analysis and interpretation of data; Kozlova A.A. – performing the experiments; Yurlov K.I. – performing the experiments; Lesnova E.I. – performing the experiments, preparing text; Grebennikova T.V. – the concept and design of the study, analysis and interpretation of data, preparation of the text, approval of the final version of the article for publication.

Received 06 February 2024
Accepted 02 April 2024
Published 27 April 2024