

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ
ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Боргоякова Мария Борисовна

ДНК и ДНК/белковая вакцины для профилактики COVID-19

1.5.3 – молекулярная биология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор

Ильичев А.А.

Кольцово – 2023

Оглавление

Список используемых сокращений	5
Введение	8
Глава 1. Обзор литературы. Разработка вакцин против COVID-19	14
1.1. Значимость заболеваний, вызванных коронавирусом инфекциями	14
1.2. Подходы к разработке вакцин против COVID-19	15
1.2.1. Вакцины на основе целых вирусов	16
1.2.1.1. Инактивированные вакцины	16
1.2.1.2. Живые вакцины	19
1.2.2. Субъединичные вакцины	20
1.2.3. Векторные вакцины	25
1.2.3.1. Нереплицирующиеся векторные вакцины	26
1.2.3.2. Самореплицирующиеся вакцины	29
1.2.4. Нуклеиновые кислоты в качестве вакцин	30
1.2.4.1. мРНК-вакцины	31
1.2.4.2. ДНК-вакцины	34
1.3. Выводы по обзору литературы	41
Глава 2. Материалы и методы	42
2.1. Материалы	42
2.1.1. Олигонуклеотиды	42
2.1.2. Синтетические пептиды	42
2.1.3. Коммерческие наборы, ферменты, реактивы	44
2.1.4. Клеточные линии, штаммы бактерий и вирусов, плазмиды	47
2.1.5. Питательные среды	48
2.1.6. Растворы и буферы	49
2.2. Методы	51
2.2.1. Проектирование генов	51
2.2.2. Конструирование рекомбинантных плазмид	51
2.2.3. Трансформация <i>E. coli</i> Stb13 плазмидными ДНК	52
2.2.4. Нарботка препаративного количества рекомбинантных плазмид	52

2.2.5. Выделение и очистка плазмидной ДНК	53
2.2.6. Спектрофотометрический и рестрикционный анализ ДНК в агарозном геле	53
2.2.7. Магнитная трансфекция эукариотических клеток НЕК293Т целевыми плазмидами	53
2.2.8. Выделение тотальной РНК из клеток НЕК293Т, трансфицированных целевыми плазмидами	54
2.2.9. Постановка реакции ОТ-ПЦР	54
2.2.10. Выявление целевых белков с помощью иммуноблотинга	55
2.2.11. Нарботка белков S и RBD	55
2.2.12. Синтез полимерного конъюгата, состоящего из полиглюкина и спермидина	56
2.2.13. Конъюгация полиглюкин-спермидина с белком RBD (PGS-RBD)	57
2.2.14. Получение комплексов PGS и PGS-RBD с плазмидной ДНК	57
2.2.15. Исследование размеров полученных комплексов	57
2.2.16. Измерение кинетики связывания белка RBD в составе комплекса с помощью биослойной интерферометрии	58
2.2.17. Иммунизация лабораторных животных	58
2.2.18. Подготовка образцов крови и селезёнок для анализа	59
2.2.19. Иммуноферментный анализ	59
2.2.20. Тест вируснейтрализации	60
2.2.21. Исследование Т-клеточного ответа	60
2.2.21.1. методом ELISpot	60
2.2.21.2. методом ICS	61
2.2.22. Исследование протективного ответа на модели лабораторных животных	62
2.2.23. Графическая и статистическая обработка результатов	62
Глава 3. Результаты и обсуждение	64
3.1. Комбинированная ДНК-белковая вакцина	64
3.1.1. Конструирование ДНК-вакцины pVAXrbd	64

3.1.2. Оценка экспрессии целевого гена <i>in vitro</i>	65
3.1.3. Получение комплексов ДНК с полимерными конъюгатами и изучение их характеристик	66
3.1.3.1. Выбор и синтез полимерных конъюгатов	67
3.1.3.2. Сборка частиц	68
3.1.3.3. Измерение кинетики связывания RBD свободного и в составе частиц	70
3.1.4. Исследование иммуногенности полученных препаратов	71
3.1.4.1. Гуморальный иммунный ответ	72
3.1.4.2. Клеточный иммунный ответ	74
3.1.4.3. Оценка протективности	76
3.2. Искусственный Т-клеточный иммуноген	77
3.2.1. Дизайн рBSI-COV-Ub, кодирующей искусственный полиэпитопный иммуноген, содержащий эпитопы различных белков вируса SARS-CoV-2	77
3.2.2. Исследование экспрессии целевых генов	86
3.2.3. Исследование иммуногенности ДНК-вакцин, кодирующих искусственную полиэпитопную конструкцию	88
3.2.3.1. Клеточный иммунный ответ	88
3.2.3.2. Исследование протективности	90
3.2.4. Исследование иммуногенности комбинированной конструкции, содержащей ДНК-вакцину рBSI-COV-Ub и рекомбинантный белок RBD, конъюгированный с полиглокин-спермидином	92
3.2.4.1. Гуморальный иммунный ответ	92
3.2.4.2. Клеточный иммунный ответ	93
3.3. Заключение	95
Выводы	97
Список литературы	98

Список используемых сокращений

Ad – аденовирус;

APC – allophycocyanin – флуоресцентный краситель;

b.p., п.о. – пары оснований;

BSA – bovine serum albumin – бычий сывороточный альбумин;

BV – brilliant violet – флуоресцентный краситель с эмиссией в фиолетовой части спектра;

CD – кластер дифференцировки, маркерные молекулы клеток иммунной системы;

CMV – cytomegalovirus – цитомегаловирус;

Ct – threshold cycle – пороговые циклы;

CTL – cytotoxic T-lymphocyte – цитотоксические Т-лимфоциты;

DMG – myristoyl diglyceride – диглицерид миристиновой кислоты;

dNTP – дезоксинуклеотидтрифосфаты;

DOTAP – dioleoyl-3-trimethylammonium propane – диолеил-3-триметилпропиламмоний;

DSPC – 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine – дистеароилфосфатидилхолин;

ELISA, ИФА – enzyme-linked immunosorbent assay – иммуноферментный анализ;

ELISpot – enzyme-linked immunosorbent spot;

FBS – fetal bovine serum – fetal bovine serum – фетальная бычья сыворотка;

Fc – консервативный домен иммуноглобулинов;

FITC – fluorescein isothiocyanate – флуоресцентный краситель;

GFP – green fluorescent protein – зелёный флуоресцирующий белок;

HLA – human leucocyte antigen – человеческие лейкоцитарные антигены, главный комплекс совместимости тканей человека;

ICS – intracellular cytokine staining – внутриклеточное окрашивание цитокинов;

IEDB – Immune epitope Database – база данных для предсказания эпитопов;

IFN – интерферон;

IL – interleukin – интерлейкин;

kDa – кДа – килодальтон;

MERS-CoV – middle east respiratory syndrome coronavirus;

MHC – major histocompatibility complex – главный комплекс гистосовместимости;

MVA – Modified vaccinia Ankara – модифицированный вирус коровьей оспы Анкара;

NBT/BCIP – 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат/нитросиний тетразолий;

NDV – Newcastle disease – вирус болезни Ньюкасла;

NTD – N-terminal domain – N-концевой домен;

PADRE – pan HLA DR-binding epitope – универсальный HLA-DR связывающий эпитоп.

PE – phycoerythrin – флуоресцентный краситель;

PEG, ПЭГ – полиэтиленгликоль;

PGS – полиглюкин-спермидин;

PGS-RBD – конъюгат полиглюкин-спермидина с белком RBD;

RBD – receptor-binding domain – рецепторсвязывающий домен;

SARS-CoV, SARS-CoV-2 – severe acute respiratory syndrome coronavirus 1 and 2 – коронавирусы, вызывающие острый респираторный синдром;

SDS – sodium dodecyl sulfate – додецилсульфат натрия;

SFU – spot forming unit – спотообразующие единицы;

TAE – трис-ацетатный буфер с ЭДТА;

TEMED – tetramethylethylenediamine – тетраметилэтилендиамин;

Th – Т-хелперы;

TLR – toll-like receptor – толл-подобный рецептор;

TMB – 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine – тетраметилбензидин;

TNF – tumor necrosis factor – фактор некроза опухоли;

UTR – untranslated region – нетранслируемый регион;

VSV – vesicular stomatitis virus – вирус везикулярного стоматита;

АПК – антигенпрезентирующая клетка;

БВРС – ближневосточный респираторный синдром;

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека;

ВПЧ – вирусоподобные частицы;

ИД₅₀ – 50% инфекционная доза;

МКА – моноклональные антитела;

о.е. – оптические единицы;

ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ПАВ – поверхностно-активное вещество;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЦР-РВ – ПЦР в реальном времени;

УФ – ультрафиолет;

ФМА – форбол-12-миристан-13-ацетат;

ФСБ, PBS – фосфатно-солевой буфер;

ФСБТ – фосфатно-солевой буфер с 0,5% Tween-20;

ЦПД – цитопатическое действие вируса;

ЭДТА – этилендиаминтетрауксусная кислота;

Введение

Актуальность темы исследования

COVID-19 – острое вирусное заболевание, вызванное коронавирусом SARS-CoV-2, было впервые диагностировано в декабре 2019 г. в китайском городе Ухань, а уже в марте 2020 года ВОЗ присвоила вспышке данного заболевания статус пандемии. По состоянию на конец 2023 года в мире зарегистрировано свыше 700 млн случаев заболевания и около 7 млн летальных исходов, а дополнительная смертность, связанная с заболеванием, оценивается в 15 млн человек. Несмотря на то, что в мае 2023 года было объявлено, что COVID-19 больше не является чрезвычайной угрозой в области здравоохранения, ситуация сохраняет серьёзность угрозы здоровью населения планеты.

После объявления пандемии многие страны приняли ряд мер по ограничению распространения заболевания: ввели карантин, принудительную самоизоляцию, обязательное использование средств индивидуальной защиты и так далее. Несмотря на это заболеваемость очень быстро росла и реально ограничить её смогли лишь проведением массовой вакцинации, которая привела не только к снижению заболеваемости, но и к уменьшению проявления симптомов всех видов тяжести.

Необходимость срочного создания эффективных вакцин привела к беспрецедентному скачку в развитии различных платформ, ранее используемых для решения узких задач и опробованных на ранних стадиях клинических испытаний. Большое количество вакцин прошло чрезвычайно быстро через все степени одобрений и получило разрешение для массового использования. Помимо традиционных вакцин, основанных на инактивированных вирусах или рекомбинантных белках, широкое распространение получили мРНК-вакцины, а также вакцины на основе вирусных векторов. Во время пандемии также было получено одобрение для применения на людях первой в мире ДНК-вакцины, что является сигналом о перспективах данной платформы в создании средств вакцинопрофилактики.

Вакцины на основе ДНК обладают большими преимуществами: их быстро и легко создать, они безопасны, стабильны в широком температурном диапазоне, способны индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет, включая Т-хелперы и цитотоксические Т-лимфоциты (Kumru O.S. *et al*, 2014; Tebas P. *et al*, 2019; Tejeda-Mansir A. *et al*, 2019; Chavda V.P. *et al*, 2021). Определённым недостатком ДНК-вакцин является их низкая иммуногенность в случае инъекции в виде «голой» плазмидной ДНК (Kutzler M.A. & Weiner D.B., 2008; Hobernik D. & Bros M., 2018). Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин был опробован широкий спектр стратегий, включая упаковку в липосомы, использование адьювантных плазмид, кодирующих цитокины, а также доставку с помощью генной пушки, электропорации или инжектора. Эти способы помогают решить проблему иммуногенности, но при их применении иногда возникают некоторые проблемы безопасности, технологические сложности и увеличение стоимости разрабатываемой вакцины.

В данной работе были использованы как классические приёмы повышения иммуногенности ДНК-вакцин, заключающиеся в оптимизации нуклеотидных последовательностей, кодирующих иммуноген, и включении в состав различных сигнальных последовательностей, так и оригинальные подходы с использованием поликатионных конъюгатов.

Цель работы

Цель данной работы заключалась в разработке экспериментальных ДНК и ДНК/белковых вакцин для профилактики COVID-19 и в изучении их иммуногенных и протективных свойств на мышах линии BALB/c.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Сконструировать плазмидные ДНК, кодирующие иммуногены вируса SARS-CoV-2.
2. Исследовать экспрессию целевых генов *in vitro*.
3. Сконструировать комбинированные частицы, содержащие ДНК-вакцины в качестве ядра и рекомбинантный белок на поверхности.
4. Изучить физико-химические свойства созданных частиц.

5. Оценить иммуногенность и протективность созданных экспериментальных конструкций.

Научная новизна и практическая ценность работы

В данном исследовании получена плазида pVAXrbd, которая обеспечивает не только эффективный синтез белка RBD в эукариотических клетках, но и секрецию белка во внеклеточное пространство за счёт введения в состав иммуногена оригинальной сигнальной последовательности, представляющей из себя гибрид сигнальных последовательностей люциферазы и фиброина. Получен патент на изобретение РФ №2754230 от 30.08.2021 г.

Получена плазида pBSI-COV-Ub, которая обеспечивает синтез искусственного полиэпитопного иммуногена, разработанного Бажаном С.И. в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Данный иммуноген представляет из себя последовательность, собранную из эпитопов белков E, M, N, S вируса SARS-CoV-2, рестриктурируемых мышиными и человеческими МНС I и II класса. Плазмиды депонированы в банк Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Получены патенты на изобретение РФ: №2806556 и №2806590 от 01.11.2023 г.

Впервые для вакцины SARS-CoV-2 разработаны самособирающиеся частицы, представляющие из себя комплекс ДНК-вакцины и рекомбинантного белка RBD, конъюгированного с полиглюкин-спермидином. На изобретение был получен патент РФ №2781294 от 11.10.2022 г.

Практическая ценность работы заключается в получении ДНК-вакцин для профилактики COVID-19, которые могут стать компонентами более сложных конструкций и обеспечивать Т-клеточный ответ, очень важный для формирования защитного противовирусного иммунитета. Также было показано, что использование компьютерного подхода для проектирования искусственного полиэпитопного антигена, состоящего из разных белков вируса SARS-CoV-2, может обеспечить создание эффективной ДНК-вакциной конструкции для индукции Т-клеточного ответа.

Основные положения, выносимые на защиту

1. ДНК-конструкция pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2, обеспечивает экспрессию целевого гена, а также синтез и секрецию целевого белка в эукариотических клетках.

2. ДНК-конструкция pBSI-COV-Ub, кодирующая искусственный Т-клеточный иммуноген вируса SARS-CoV-2, обеспечивает экспрессию целевого гена, синтез целевого белка и его эффективное расщепление протеасомой.

3. ДНК-вакцина pVAXrbd как сама по себе, так и в комплексе с конъюгатами PGS и PGS-RBD, индуцирует у иммунизированных мышей гуморальный и Т-клеточный ответ, а также обеспечивает снижение вирусной нагрузки при заражении животных.

4. ДНК-вакцина pBSI-COV-Ub как сама по себе, так и в комплексе с конъюгатом PGS-RBD, индуцирует у иммунизированных мышей специфический гуморальный и Т-клеточный ответ.

Степень достоверности и апробация

Положения и выводы являются научно обоснованными. Достоверность результатов подтверждена статистической обработкой и воспроизводимостью в повторях. Результаты всех экспериментов получены с применением современных биохимических, молекулярно-биологических, иммунологических и биоинформационных методов исследования на сертифицированном оборудовании.

Результаты были представлены на международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Кольцово, Россия, в 2020 и 2021 году доклад занял первое место в конкурсе, участие в 2023 г.), международном онлайн-симпозиуме «Chronic viral infection and cancer, openings for vaccines» (онлайн, 2021 г.), VII внеочередном онлайн конгрессе Евро-азиатского общества по инфекционным болезням (онлайн, 2021 г.), Второй Санкт-Петербургской молодежной конференции «Актуальные вопросы эпидемиологии, иммунологии, профилактики и лечения COVID-19 (г. Санкт-Петербург, 2022 г., второе место за лучший доклад).

По материалам диссертации опубликовано шесть статей в российских и международных журналах, рекомендованных ВАК для защиты диссертаций, получено четыре патента на изобретения.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 127 страницах, включает 20 рисунков, 6 таблиц. Список литературы включает 275 источников.

Личный вклад автора

Основная часть экспериментов и анализ результатов выполнены лично автором или при его участии, включая конструирование, наработку и очистку рекомбинантных плазмид, исследование экспрессии целевых генов в составе полученных ДНК-вакцинных конструкций, трансфекцию клеток HEK293T, иммунизацию животных и забор органов, подготовку образцов к исследованию, оценку иммуногенности и специфической активности сконструированных рекомбинантных плазмид, статистическую обработку результатов, а также подготовку научных статей для публикации и докладов для выступления на конференциях.

Все работы с живым вирусом (анализ вируснейтрализации и протективности) проводили сотрудники отдела «Коллекция микроорганизмов» под руководством канд. биол. наук Пьянкова О.В. (ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), теоретический дизайн полиэпитопного иммуногена BSI-COV и расчёт пептидов проводил д-р биол. наук Бажан С.И. (теоретический отдел ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), секвенирование образцов ДНК, кодирующих целевые гены, осуществлялось в центре коллективного пользования «Геномика» (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН), рекомбинантные белки S и RBD получены сотрудниками лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии под руководством канд.биол.наук Щербакова Д.Н. (ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), синтез и очистку конъюгатов полиглюкин-спермидин и PGS с белком RBD, а также гель-

фильтрацию проводила канд.биол.наук Волосникова Е.А. (ИМБТ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), электронную микроскопию проводил канд. физ.-мат. наук Зайцев Б.Н. (отдел микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора), исследование кинетики связывания методом биослойной интерферометрии проводил канд.биол.наук Баранов К.О. (Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН), работы на проточном цитофлуориметре проводились совместно с коллегой Задорожным А.М. (магистрант НГУ).

1. Обзор литературы. Разработка вакцин против COVID-19.

1.1. Значимость заболеваний, вызванных коронавирусами инфекциями

За последние 20 лет человечество столкнулось с тремя вспышками острых респираторных инфекций, вызванных коронавирусами зоонозного происхождения. В 2002-2004 годах было зарегистрировано более 8000 случаев заболевания тяжёлым острым респираторным синдромом (в отечественных средствах массовой информации – атипичная пневмония), вызванным коронавирусом SARS-CoV. Считается, что природным очагом этого вируса являются подковоносые летучие мыши (Menachery V.D. *et al*, 2015; Hu B. *et al*, 2017), а передача человеку произошла через гималайских циветт, которых традиционно используют в китайской народной медицине. В 2012 году схожий вирус MERS-CoV стал причиной более 2000 случаев ближневосточного респираторного синдрома. Природным очагом также явились рукокрылые, но передача человеку произошла через одногорбых верблюдов (Azhar E.I. *et al*, 2014). В декабре 2019 года появилась информация о подтверждённых случаях респираторного заболевания, вызванного новым коронавирусом, который в последствии назвали SARS-CoV-2. Первая вспышка произошла в Китае, передача вируса – через мелких млекопитающих (в частности, панголин), продающихся на рынке г. Ухань, резервуаром считаются также рукокрылые (Zhou P. *et al*, 2020). К концу 2023 года число заболевших COVID-19 оценивается свыше 700 млн человек, а количество жертв превысило 6 млн (<https://covid19.who.int>). Такую высокую контагиозность специалисты связывают со способностью вируса передаваться через бессимптомных носителей (Rothe C. *et al*, 2020). За четыре года, прошедшие с начала пандемии, стало ясно, что для снижения будущих рисков, связанных с появлением новых вирусов, первостепенное значение имеет готовность к пандемии. В сочетании с программами эпидемиологического надзора, направленными на установление точного географического распределения зон эндемического риска, и инвестициями в диагностику для определения истинной серопревалентности и

заболеваемости у людей, решающее значение будет иметь продвижение ранней доклинической разработки широкого спектра вакцин-кандидатов (Coughlan L. *et al*, 2022).

1.2. Подходы к разработке вакцин против COVID-19

Введение в организм вакцины имеет целью активировать адаптивный иммунный ответ, элементы которого будут способны нарабатывать нейтрализующие антитела, которые смогут предотвращать заражение клеток вирусом (гуморальный ответ), и/или убивать заражённые клетки (цитотоксический ответ). Можно выделить четыре большие группы различных подходов к разработке вакцин: на основе самого вирусного агента, на основе известных и широко используемых вирусных векторов, на основе белков или нуклеиновых кислот (рис. 1).

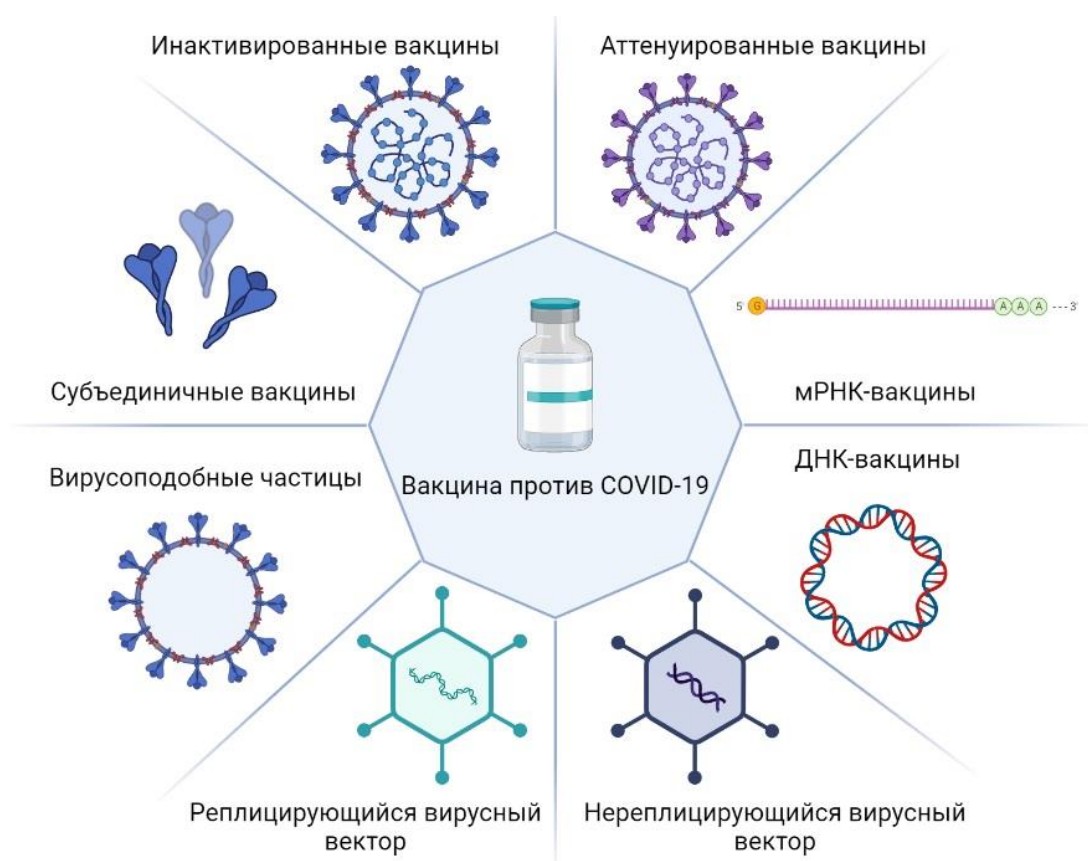


Рисунок 1. Основные типы платформ, использованных для разработки вакцин против COVID-19. Рисунок выполнен с использованием ресурса biorender.com.

В результате экстренной необходимости и стечения различных обстоятельств, обусловленных особенностями научных, этических, экономических и политических аспектов жизни современного человечества, такие платформы, как векторные вакцины и вакцины на основе нуклеиновых кислот, получили непревзойдённый толчок в развитии. Ранее данные платформы длительное время использовались для решения узкого ряда задач по созданию вакцин и не выходили на широкое применение, однако в большом количестве разрабатывались и проходили клинические испытания. Необходимость быстрого создания эффективной вакцины для ограничения распространения пандемии привела к выходу данных платформ на передний план, хотя и классические подходы также оказались реализованы в полной мере.

1.2.1. Вакцины на основе целых вирусов

Подход, использующий для иммунизации ослабленный или инактивированный вирус, давно внедрён в практику профилактической вакцинации против таких заболеваний, как корь и полиомиелит. Вакцины на основе инактивированного вируса достаточно дешёвы и безопасны, но для их производства необходимо наращивать в больших количествах живой вирус в условиях строгой биобезопасности. Существенным ограничением иммуногенности данных вакцин является то, что при инаktivации (формальдегидом, глутаровым альдегидом, ультрафиолетовым, гамма-излучением или высокой температурой) меняется структура иммуногенных белков, что может привести к неадекватному представлению эпитопов антигенов иммунной системе (DeZure A.D. *et al*, 2016).

1.2.1.1. Инактивированные вакцины

Инактивированные вакцины против COVID-19, разработанные в Китае и Индии (CoronaVac от Sinovac, Covaxin от Bharat Biotech, BBIBP-CorV и WIBP-CorV от Sinopharm), показали способность индуцировать наработку нейтрализующих антител у мышей, крыс, морских свинок, кроликов и обезьян без усиления инфекции (Wang H. *et al*, 2020; Yadav P.D. *et al*, 2021), вследствие чего вакцины были допущены к клиническим испытаниям, которые успешно

прошли и были разрешены к использованию на людях в большом количестве стран (Ella R. *et al*, 2021; Xia S. *et al*, 2021; Zhang Y. *et al*, 2021). По результатам III стадии клинических испытаний вакцина CoronaVac, представляющая из себя вирус SARS-CoV-2, инактивированный β -пропиолактоном, в общем показала 58,5% эффективность в предотвращении симптоматических проявлений COVID-19 для людей среднего возраста (Palacios R. *et al*, 2020; Jara A. *et al*, 2021; Li X.N. *et al*, 2021) и 47% – для людей старше 70 лет (Ranzani O.T. *et al*, 2021), а также 79% и 55% защиту от госпитализации в соответствующих возрастных группах.

Инактивацией β -пропиолактоном штамма NIV-2020-770, наработанного на клетках Vero, была получена также вакцина Covaxin производства индийской фирмы Bharat Biotech Limited. В испытаниях на животных данная вакцина показала индукцию высоких титров нейтрализующих антител и хороший профиль безопасности, а также исследователи утверждают, что Covaxin – первая инактивированная вакцина против SARS-CoV-2, которая индуцирует Т-хелперный ответ, смещённый в сторону Th1, что подтверждается повышенным соотношением IgG2a/IgG1 и повышенными уровнями IFN- γ + CD4+ Т-лимфоцитов (Ganneru B. *et al*, 2020; Ella R. *et al*, 2021; Sharma R. *et al*, 2021; Yadav P.D. *et al*, 2021). В исследованиях на людях Covaxin показала 77,8% эффективности против проявления симптомов COVID-19 (93,4% эффективности против развития тяжёлых форм), в том числе 65,2% – против штамма дельта.

Другая вакцина, произведённая в Китае государственной компанией Sinopharm на основе штаммов HB02 и WIV04 (BBIBP-CoV), также была получена инактивацией цельновирионных частиц β -пропиолактоном. Как и описанные выше Covaxin и CoronaVac, BBIBP-CoV использовали совместно с гидроокисью алюминия в качестве адъюванта. Общая эффективность данной вакцины против инфицирования COVID-19 составила 86% (79% против симптоматического течения болезни и госпитализации), демонстрируя снижение эффективности в 1,5 раза против штамма дельта (Wang H. *et al*, 2020; Xia S. *et al*, 2020; Jeewandara C. *et al*, 2022).

BBIBP-CoV, Covaxin и CoronaVac являются самыми распространёнными инактивированными вакцинами, зарегистрированными в мире, но среди вакцин данного вида есть также и более локально произведённые и испытанные вакцины. Например, вакцина VLA2001, разработанная французской компанией Valneva, инактивирована β -пропиолактоном, но помимо квасцов содержит также адъювант на основе CpG 1048 фирмы Dynavax. В ходе третьей фазы клинических испытаний данная вакцина показала способность индуцировать высокие титры нейтрализующих антител, а также существенный уровень IFN- γ -продуцирующих Т-клеток, реагирующих на белки S, M и N (Lazarus R. *et al*, 2022). Также VLA2001 продемонстрировала очень хороший профиль переносимости.

Вакцина TURKOVAC (на стадии разработки – ERUCOV-VAC), разработанная компанией Kosak Farma и институтами системы здравоохранения Турции, в сочетании с гидроксидом алюминия показала высокую иммуногенность на мышах линии BALB/c и значительные протективные свойства на трансгенных мышах K18-hACE2 и хорьках. Сейчас вакцина находится на третьей фазе клинических испытаний (Tanriover M.D. *et al*, 2022; Ozdarendeli A. *et al*, 2023), так же, как и иранская COVIran Barekat (Shifa Pharmed Industrial Group / Barkat Pharmaceutical Group), которая в настоящее время также дополняется инактивированной вакциной на основе коронавируса-2 штамма Омикрон в качестве третьей дозы (Abdoli A. *et al*, 2022; Mohraz M. *et al*, 2022).

Казахстанская вакцина QazVac, инактивированная формалином, вводилась двукратно с гидроксидом алюминия и показала 82% эффективность относительно не только штамма Ухань, но и Альфа, и Бета, однако информации об эффективности данной вакцины против штамма Омикрон нет (Khairullin V., 2022).

В России зарегистрирована инактивированная вакцина КовиВак, разработанная ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, которая показала способность индуцировать гуморальный иммунитет и защищала сирийских хомячков от

инфицирования живым вирусом (Kozlovskaya L.I. *et al*, 2021). В данное время она находится на третьей стадии клинических испытаний. Антон Барчук с соавторами в своём исследовании эффективности КовиВак против штаммов Дельта и Омикрон установили её на уровне 46% (Barchuk A. *et al*, 2022). Стоит отметить, что инактивированные вакцины не приводят к индукции долго длящегося иммунитета, поэтому их необходимо минимум ежегодно бустировать.

Разрабатываются другие способы инактивации, такие как использование псоралена, которое позволяет сохранить нативные белковые антигены в составе вакцины, инактивируя только нуклеиновую составляющую вируса. Такая вакцина против SARS-CoV-2 вызывала высокий гуморальный и клеточный ответ, смещённый в сторону Th1, у мышей линии BALB/c (Sundaram A.K. *et al*, 2021).

1.2.1.2. Живые вакцины

Живые аттенуированные вакцины получают путём генетического изменения вируса (делеция генов или внесение мутаций в гены, ответственные за вирулентность), они показывают самую высокую иммуногенность: их применение не требует дополнительного введения адъювантов, а также сложной схемы иммунизации – достаточного однократного введения. Но такой тип вакцин имеет серьёзные недостатки: нельзя гарантировать отсутствие возврата вируса к вирулентному типу, их транспортировка требует соблюдения холодной цепи, к тому же их не рекомендуется применять для вакцинации людей с ослабленным иммунитетом, детей и пожилых людей (Lauring A.S. *et al*, 2010). В связи с проблемой биобезопасности очень сложно получить одобрение регулирующих органов для применения подобных вакцин, однако разработки данной платформы могут быть так или иначе полезны. На данный момент только 1% от всех вакцин против COVID-19, проходящих клинические испытания, являются аттенуированными. Wang и др. ослабили вирус путём деоптимизации пар кодонов, в результате чего были введены 283 молчащих мутации (Wang Y. *et al*, 2021). Данная вакцина, COVI-VAC, имеющая интраназальную форму

применения, показала безопасность и эффективность на модели сирийских хомячков. Предварительные данные клинических испытаний говорят о её хорошей переносимости и стимуляции гуморального иммунного ответа, регистрируемого не только в сыворотке, но и на слизистой оболочке, что приводит к блокировке репликации вируса SARS-CoV-2 на эндотелии верхних дыхательных путей (Tasker S. *et al*, 2021).

1.2.2. Субъединичные вакцины.

Белковые вакцины считаются более безопасными, так как в них отсутствуют инфекционное начало агента, однако эти вакцины менее иммуногенны, поэтому часто вместе с ними необходимо применять адъюванты, а также разрабатывать более сложные схемы иммунизации: двух- и трёхкратное введение. Также белковые вакцины редко вызывают цитотоксический клеточный ответ, так как экзогенные белки презентуются в комплексе с МНС II, хотя частичный перекрёстный процессинг всё же происходит. В качестве антигенов для создания таких вакцин против SARS-CoV-2 используется поверхностный гликопротеин S или его домен RBD.

Вакцина NuvaXovid (NVX-CoV2373) создана на основе S-белка, в который внесено несколько стабилизирующих мутаций: 682-QQAQ-685 (для устойчивости к протеазному расщеплению) и K986P/V987P (для стабилизации третичной структуры) (Guebre-Xabier M. *et al*, 2020). Данный рекомбинантный белок нарабатывают в экспрессионной системе клеток насекомых, линии Sf9. 10 мкг белка, введённых совместно с адъювантом Matrix-M, представляющим из себя смесь сапонины, холестерина и фосфолипидов (Keech C. *et al*, 2020; Heath P.T. *et al*, 2021), вызывали сильный гуморальный и клеточный иммунитет на модели мышей и обезьян (Tian J.H. *et al*, 2021). Также в данном исследовании было показано, что использование адъюванта Matrix-M усиливает дифференцировку В-клеток зародышевого центра и фолликулярных Т-хелперов, которые играют важную роль в индукции длительного В-клеточного ответа, зависящего от хелперных Т-клеток. В клинических испытаниях приняли участие более 45000 человек старше 18 лет, и были показаны безопасность и высокая

эффективность вакцины, в том числе против штамма Омикрон после трёхкратной иммунизации (Keech C. *et al*, 2020; Heath P.T. *et al*, 2021; Bhiman J.N. *et al*, 2023).

Другая вакцина, основанная на стабилизированной форме белка S, – MVC-COV1901 – одобрена для использования с гидроксидом алюминия и CpG 1018 в качестве адъювантов (Lien C.E. *et al*, 2021). Адъювантный эффект олигопептидов CpG основывается на их связывании с рецепторами на плазмоцитоидных дендритных клетках с последующей стимуляцией как CD4+, так и CD8+ Т-лимфоцитов (Campbell J.D., 2017). В доклинических испытаниях на хомяках было показано эффективное снижение вирусной нагрузки в лёгких в результате вакцинации (Lien C.E. *et al*, 2021), а в клинических испытаниях – способность индуцировать нейтрализующие антитела против штаммов Ухань, Альфа и Бета, однако эти антитела показали ограниченную активность относительно штамма Омикрон (Lien C.E. *et al*, 2022; Liu L.T. *et al*, 2022; Torales J. *et al*, 2022).

Внеклеточный домен белка S (ECD, extracellular domain), содержащий RBD (рецепторсвязывающий домен), был выбран в качестве иммуногена в составе вакцины COVAX-19 в сочетании с адъювантом Advax-CpG (Li L. *et al*, 2021; Tabunov K. *et al*, 2022) с расчетом на индукцию широкого спектра нейтрализующих антител. Безвредность COVAX-19 была показана на хорьках, мышах и обезьянах, а наибольшего уровня перекрёстной нейтрализации различных штаммов удалось добиться применением данной вакцины в качестве бустерной после первичной вакцинации другими типами вакцин (Tabarsi P. *et al*, 2022).

Вакцина RAZI-COV PARS представляет из себя коктейль из трёх рекомбинантных белков: полноразмерный тримеризованный S-белок, S1 (1-674 а.о. белка S) и S2 (685-1211 а.о. белка S) домены с пришитым Fc-хвостом для увеличения времени жизни белков. В качестве адъюванта данной вакцины используют RAS-01: эмульсию типа «масло в воде» на основе кунжутного, оливкового и соевого масел, а также неионогенного ПАВ Tween-80 (Banihashemi S.R. *et al*, 2022). Интересна схема применения данной вакцины: её вводят тремя

дозами, две из них внутримышечные, а одна – интраназальная. На животных моделях была показана очень высокая эффективность в индукции клеточного и гуморального иммунитета, вакцина была доведена до третьей стадии клинических испытаний и одобрена для применения на людях.

В качестве эффективного бустера ранее одобренных вакцин также успешно была использована субъединичная вакцина VAT00002, содержащая рекомбинантный S-белок вариантов Бета и D614 и адъювант AS03, представляющий из себя смесь α -токоферола, сквалена и полисорбата-80 (Garçon N. *et al*, 2012; de Bruyn G. *et al*, 2023). Исследования показали, что такая бустеризация позволяет индуцировать очень высокие титры нейтрализующих антител, активных против широкого спектра штаммов, включая Омикрон.

Помимо субъединичных вакцин, основанных на полноразмерном белке S или его усечённых вариантах S1/S2, ETD, разработаны вакцины на основе только рецепторсвязывающего домена, RBD, который является главной мишенью вируснейтрализующих антител, а следовательно очень важен для разработки терапевтических ингибиторов прикрепления вируса к клетке или профилактических вакцин (Hotez P.J. *et al*, 2020; Kleanthous H. *et al*, 2021; Yuan M. *et al*, 2021).

Во время предыдущих вспышек заболеваний, вызванных родственными SARS-CoV-2 бета-коронавирусами SARS-CoV и MERS-CoV, был описан подход, в котором субъединичная вакцина представлена в виде тандемного линейного повтора RBD (Dai L. *et al*, 2020). Такая димерная форма RBD стабильно нарабатывается в клетках CHO с большим выходом и способна индуцировать гораздо более сильный ответ нейтрализующих антител по сравнению с мономером. С использованием данной платформы была создана вакцина Zifivax (ZF2001), которая показала высокую иммуногенность при совместном применении с гидроокисью алюминия на животных моделях (An Y. *et al*, 2022), а также приемлемый профиль безопасности и эффективность в клинических испытаниях I-III фазы (Yang S. *et al*, 2021; Dai L. *et al*, 2022). Использование данной вакцины в качестве гетерологичного бустера после

инактивированной вакцины позволило увеличить титр нейтрализующих антител, активных не только против штамма-прототипа данных вакцин, но также и против семи вариантов штамма Омикрон (He Q. *et al*, 2022; Zhao X. *et al*, 2022).

Кубинская вакцина SOBERANA вводится по схеме, включающей три иммунизации с гидроокисью алюминия: первые две проводятся рекомбинантным RBD, сшитым со столбнячным анатоксином, а третья – димером RBD. В клинических испытаниях на разных возрастных когортах было показано формирование сбалансированного Th1/Th2 ответа с одновременной индукцией IL-4 и IFN- γ , а также сильный гуморальный ответ, выраженный в высоких титрах нейтрализующих антител, активных против широкого спектра штаммов. Эффективность данной вакцины варьировалась от 81 до 93 % (Toledo-Romani M.E. *et al*, 2022; Puga-Gómez R. *et al*, 2023; Toledo-Romani M.E. *et al*, 2023).

Поскольку нативная форма гликопротеина S представляет из себя тример, были спроектированы тримерные формы RBD для создания вакцины: одна содержала три последовательности RBD из одного штамма (homo-tri-RBD), другая – из трёх разных штаммов (multi-tri-RBD) (Liang Y. *et al*, 2022). Оба варианта показали способность индуцировать поствакцинальный иммунитет, однако нейтрализующие антитела, индуцированные multi-tri-RBD, проявляли более обширную нейтрализующую активность. Создатели отмечают удобство данной платформы, позволяющей менять последовательности RBD, входящие в состав мозаичного антигена, выпуская максимально актуальную вакцину. Очень высокую эффективность данная вакцина, содержащая RBD из штамма Омикрон, показала при использовании в качестве гетерологичного бустера после первичной вакцинации инактивированной вакциной BBIBP-CorV (Kaabi N.A. *et al*, 2022).

Есть подходы, позволяющие избежать использования адъювантов при вакцинации субъединичными вакцинами. Один из них – проектирование иммуногенов, сшитых с иммуномодуляторами, например, вакцина V-01 содержит белок RBD, несущий на N-конце интерферон альфа (IFN- α) и на C-

конце – димеризующий домен Fc-фрагмента IgG1 (Sun S. *et al*, 2021; Zhang J. *et al*, 2021). Модифицированная форма такой вакцины, содержащая вариант RBD с критическими мутациями, присутствующими в разных вариантах штамма Омикрон, оказалась очень эффективной в индукции иммунитета против данной линии штаммов (Zhang Z. *et al*, 2022).

Уникальная вакцина UB-612, произведённая United Biomedical Asia и Vaxxinity, Inc., представляет собой смесь рекомбинантного белка RBD, сшитого с Fc-фрагментом человеческого IgG1, пяти высоко консервативных Th/CTL пептидов из белков S2, M и N, универсального запатентованного Т-хелперного пептида UB1Th®1a с каркасным белком-носителем из вируса кори (Wang C.Y. *et al*, 2017), адъювантами CpG и фосфатом алюминия (Guirkhoo F. *et al*, 2021). Для такой вакцины была показана не только способность индуцировать нейтрализующие антитела широкого спектра действия, но и Т-клеточный ответ (Guirkhoo F. *et al*, 2022; Wang C.Y. *et al*, 2022).

Более продвинутой версией пептидных и в целом субъединичных вакцин являются вирусоподобные частицы (ВПЧ). Такие частицы представляют из себя антиген, собранный в полую частицу. Сборка происходит в основном за счёт использования белков, способных к мультимеризации после синтеза в клетке, как, например, ферритин, который образуется из 24 субъединиц. Присоединение к нему иммуногенов (S, RBD, RBD-NTD, S1) вируса SARS-CoV-2 привело к получению ВПЧ, после иммунизации которыми была показана индукция не только высоких титров нейтрализующих антител, активных против различных штаммов SARS-COV-2, но и Т-клеточного иммунитета, что не характерно для субъединичных вакцин (Carmen J.M. *et al*, 2021; Joyce M.G. *et al*, 2021; Kim S.A. *et al*, 2022; Yu J. *et al*, 2022). Также для создания ВПЧ-вакцины была использована система Tag/Catcher-AP205, которая способна экспонировать большое количество целевого антигена на поверхности частицы, представляющей из себя оболочку бактериофага AP205, поверхностный белок которого имеет Catcher, проявляющий большое сродство к последовательности Tag, которая обычно пришивается к целевому белку (Brune K.D. *et al*, 2016;

Thrane S. *et al*, 2016). После вакцинации такими ВПЧ в эмульсии сквален-вода (адъювант MF59) в ходе первой фазы клинических испытаний наблюдали очень высокий титр нейтрализующих антител, а также индукцию вирус-специфических IFN- γ -продуцирующих CD4⁺ Т-лимфоцитов (Smit M.J. *et al*, 2023).

Единственная вакцина, разработанная на платформе ВПЧ и одобренная для использования на людях, – CoVLP, или Covifenz. Вирусоподобные частицы, экспонирующие на поверхности белок S, формируются естественным образом в транзientной растительной культуре подобно вирусным частицам, только без генетического материала внутри. При особом способе экстракции на выходе получают большое количество сферических частиц размером примерно 22 нм в диаметре (D'Aoust M.A. *et al*, 2010). Введение данной вакцины с адъювантом AS03 (смесь α -токоферола, сквалена и полисорбата-80) показало эффективность и безопасность вакцины на всех трёх фазах клинических испытаний (Ward B.J. *et al*, 2021; Hager K.J. *et al*, 2022). Платформа использования транзientных систем экспрессии позволяет наработать вакцину быстро и в очень больших количествах, а также продолжать производство сколь угодно долгое время благодаря вегетативному размножению растительных продуцентов (Marillonnet S. *et al*, 2005; Tusé D. *et al*, 2020), что очень важно при возникновении эпидемий.

Исследования, включающие субъединичные вакцины, наиболее наглядно демонстрируют тот принцип, что относительно вируса SARS-CoV-2 наиболее выигрышной стратегией вакцинации является использование гетерологичных вакцин. Это могут быть вакцины разных типов против разных штаммов или одного типа, но содержащие иммуноген, относящийся к разным штаммам, так или иначе формируется иммунный ответ, направленный на более широкий спектр вирусных вариантов.

1.2.3. Векторные вакцины

В настоящее время для создания вакцин широко используются вирусные вектора. Существуют платформы, доказавшие свою безопасность и способность вызывать сильный клеточный и гуморальный иммунный ответ на продукт

встроенного гена, такие как аденовирус (Ad). Также изучаются возможности использования в качестве векторов таких вирусов, как парагрипп (An D. *et al*, 2021; Liu X. *et al*, 2021), вирусы Ньюкасла (Tcheou J. *et al*, 2021; Pitisuttithum P. *et al*, 2022), везикулярного стоматита (Madar-Balakirski N. *et al*, 2022), бешенства (Kurup D. *et al*, 2020; Kurup D. *et al*, 2021), кори (Launay O. *et al*, 2022), модифицированной осповакцины (Tscherne A. *et al*, 2021; Mooij P. *et al*, 2022) и т.д. Дефектные по репликации аденовирусные вакцины оказались наиболее востребованной платформой, использованной в ответ на пандемию SARS-CoV-2. Такие вакцины, основанные на трех типах Ad: человеческие HAdV-C5 (Ad5), HAdV-D26 (Ad26) и шимпанзе Y25 (ChAdOx1), получили разрешение на использование в чрезвычайных ситуациях в США, ЕС, Южной Америке, Азии, Африке и России. Аденовирусные векторы обладают рядом преимуществ: их легко, быстро и недорого произвести, они относительно безопасны и иммуногенны для человека и, что важно, не требуют специализированного соблюдения холодной цепи, что делает их подходящей платформой для глобального распределения или накопления запасов вакцины. Однако у них есть существенный недостаток – формирование иммунного ответа на вектор, соответственно возникает ограничение многократной вакцинации препаратами на основе одних и тех же векторных штаммов, а также уменьшение когорты людей, для которых вакцинация будет эффективной, в результате предсуществующего иммунного ответа на вектор после перенесения ОРВИ, вызываемых аденовирусами.

1.2.3.1. Нереплицирующиеся векторные вакцины

Считается, что векторная вакцина на основе аденовируса шимпанзе позволяет избежать предсуществующего иммунного ответа. Такой вектор был использован как основа для вакцины, разработанной AstraZeneca и Oxford University против COVID-19. Аденовирусный вектор ChAdY25 был получен из аденовируса шимпанзе серотипа Y25 с делетированным геном E1, необходимым для репликации вируса, а также с делетированным геном E3, что позволило увеличить ёмкость нового вектора (Dicks M.D. *et al*, 2012). Вакцина ChAdOx1-S

(она же AZD1222) кодирует полноразмерный поверхностный гликопротеин S и способна индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ, что было показано в большом количестве исследований на животных и людях (Folegatti P.M. *et al*, 2020; van Doremalen N. *et al*, 2020; Falsey A.R. *et al*, 2021; Voysey M. *et al*, 2021). В итоге ChAdOx1-S сейчас массово используется для профилактики COVID-19, а её вариант, разработанный против варианта Бета (B.1.351), – AZD2816 проходит 2/3 фазу клинических испытаний (Spencer A.J. *et al*, 2022), показав в доклинических исследованиях способность защищать сирийских хомяков от заражения вариантами Бета, Дельта и Омикрон (van Doremalen N. *et al*, 2022).

Другая вакцина на основе обезьяньего аденовируса разработана в Италии, и для её создания использовали аденовирус гориллы GRAd32 (Carone S. *et al*, 2021). Эта вакцина показала высокий профиль безопасности в первой фазе клинических испытаний и сейчас проходит совмещённую 2/3 фазу (Agrati C. *et al*, 2022). Несмотря на то, что через полгода после однократной иммунизации титры нейтрализующих антител у испытуемых сильно упали, Т-клеточный ответ оставался высоким весь период испытаний. Также данная вакцина хорошо подходит для гетерологичной бустеризации других вакцин, что показано в одном из исследований (Agrati C. *et al*, 2021).

Китайская фирма CanSino разработала и испытала векторную вакцину Convidecia на основе человеческого аденовируса 5 серотипа, предназначенную для одно- или двукратного введения (Zhu F.C. *et al*, 2020; Halperin S.A. *et al*, 2022), которая в настоящее время авторизована для использования в большом количестве стран Европы, Азии и Латинской Америки. Ингаляционная форма данной вакцины также успешно прошла клинические испытания и утверждена для использования в качестве бустерной вакцины в Китае (Wu S. *et al*, 2021; Tang R. *et al*, 2023). Convidecia, вводимая внутримышечно, подтвердила эффективность своего использования в качестве гетерологичного бустера для разнообразных вакцин, включая инактивированные и мРНК-вакцины (Li J. *et al*, 2022; Li J.X. *et al*, 2022; Pascuale C.A. *et al*, 2022; Tang R. *et al*, 2023).

Аналогичная вакцина, показавшая схожие с Convidecia результаты эффективности после однократной иммунизации (66 % при предотвращении симптомов, 85 % при предотвращении тяжелой формы COVID-19, 100 % в предотвращении смерти), разработана в Европе фирмой Janssen и разрешена для экстренного использования в странах Евросоюза и США (Sadoff J. *et al*, 2021; Stephenson K.E. *et al*, 2021). Данная вакцина основана на аденовирусе человека 26 серотипа и также считается эффективной, однако её применение ограничено из-за наличия редких побочных эффектов, связанных с риском смертельного тромбоза в сочетании с тромбоцитопенией, а также с риском развития синдрома Гийена-Барре.

Векторная вакцина «Спутник V», разработанная НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, была одной из первых вакцин, зарегистрированных в мире для использования в качестве средства вакцинопрофилактики COVID-19. Данная вакцина является гетерологичной, то есть первая доза вакцины – это рекомбинантный аденовирусный вектор на основе аденовируса человека 26 серотипа (rAd26), несущий ген S-белка вируса SARS-CoV-2; а вторая – вектор на основе аденовируса человека 5 серотипа (rAd5), также несущий ген S-белка вируса SARS-CoV-2. Такой подход позволяет обойти ранее приобретённый иммунитет как против первой дозы вакцины, так и в принципе против какого-либо из аденовирусов. Испытания вакцины показали высокий уровень её безопасности и эффективности (Logunov D.Y. *et al*, 2021), сыворотки вакцинированных добровольцев показывали способность нейтрализовать различные штаммы коронавируса SARS-CoV-2 (Gushchin V.A. *et al*, 2021; Ikegame S. *et al*, 2021). Лиофилизированная форма «Спутника V», которая может храниться при +4°C, также прошла испытания на безопасность и эффективность и является более простой в отношении организации её логистики. Также исследования показывают, что «Спутник V» очень эффективно (85,9 %) защищает от госпитализации с COVID-19 тех, кто получил две и более дозы вакцины (Shkoda A.S. *et al*, 2022). На данный момент «Спутник V» одобрен для

использования в 71 стране с общим населением 4 млрд человек (<https://sputnikvaccine.com/rus/about-vaccine>).

Модифицированный вирус осповакцины Анкара (MVA) является другим реплицирующимся вирусным вектором, использованным для создания вакцины против COVID-19 (Tscherne A. *et al*, 2021). Данная разработка была основана на опыте создания векторной вакцины против родственного вируса MERS-CoV, вызывающего ближневосточный респираторный синдром (БВРС). Рекомбинантный вирус MVA обеспечивал экспрессию белка шипа вируса MERS-CoV, в результате чего при иммунизации у животных формировался защитный иммунитет против летальной дозы вируса (Song F. *et al*, 2013; Veit S. *et al*, 2018). Вакцина MVA-MERS-S прошла первую стадию клинических испытаний, продемонстрировав способность индуцировать клеточный и гуморальный иммунитет против БВРС (Koch T. *et al*, 2020). Аналогичную вакцину, разработанную против COVID-19, также протестировали на животных, показав её безопасность, иммуногенность и протективность, и в настоящее время MVA-SARS-2-S находится на 2/3 стадии клинических испытаний (Tscherne A. *et al*, 2021; Pérez P. *et al*, 2022).

1.2.3.2. Самореплицирующиеся вакцины

Реплицирующиеся вирусные вектора отличаются тем, что у них удаляется только ген E3, в результате чего создаётся место для рекомбинации целевого гена. Область E1 остаётся в составе вектора и обеспечивает его репликацию. В связи с этим уменьшается его ёмкость, однако усиливается дозосберегающий эффект и индукция врождённого и адаптивного иммунитета (Chavda V.P. *et al*, 2022) за счёт саморепликации.

Так, вакцина DelNS1-2019-nCoV-RBD-ОПТ на основе вируса гриппа создана в виде спрея для назального применения и индуцирует антитела против обоих вирусов, что является уникальным преимуществом в использовании данной вакцины во время сезонных вспышек (Chen J. *et al*, 2022). Поверхностный белок вируса гриппа адаптируют к каждому сезону, что предотвращает влияние «противовекторного» иммунитета при проведении бустерной иммунизации.

Клинические исследования I и II фазы подтвердили, что указанная вакцина хорошо переносится и активирует множество иммунных реакций, включая мукозальный и системный иммунитет (Zhu F. *et al*, 2022).

BriLife – вакцина, созданная Израильским институтом биологических исследований на основе вируса везикулярного стоматита (VSV). Модификация вируса состоит из замены гена гликопротеина VSV на домен S1 белка шипа вируса SARS-CoV-2. Однократная иммунизация сирийских хомяков привела к формированию защитного иммунитета, обеспечивающего низкий уровень репликации живого вируса в лёгких (Malherbe D.C. *et al*, 2021). После подтверждения безопасности и иммуногенности вакцины на модели новозеландских кроликов BriLife была допущена к клиническим испытаниям, которые сейчас находятся на 2/3 стадии (Levin Y. *et al*, 2021; Rosner A. *et al*, 2022).

Ещё одна самореплицирующаяся векторная вакцина основана на вирусе болезни Ньюкасла (NDV): в вирусе делегирован белок слияния (F) и вместо него клонирован белок шипа коронавируса-2. Белок S, закодированный вакциной NDV-NXP-S, модифицировали так, чтобы он представлял из себя стабильную иммуногенную молекулу с высоким выходом при синтезе *in vitro* (Hsieh C.L. *et al*, 2020). В исследованиях на мышах, хомяках и крысах данная вакцина показала способность индуцировать сильный вирус-специфичный и защитный иммунитет (Sun W. *et al*, 2021; Tcheou J. *et al*, 2021), и была допущена до клинических испытаний в разных странах (Duc Dang A. *et al*, 2022; Pitisuttithum P. *et al*, 2022; Ponce-de-León S. *et al*, 2022). Данная платформа продолжает развиваться, а её создатели анонсировали новую форму вакцины, представляющую собой смесь векторов, кодирующих стабилизированный S-белок из трёх штаммов: Ухань, Бета и Дельта. Это существенно повышает уровень защиты на мышинной модели и уровень перекрёстно-нейтрализующих антител против филогенетически отдалённых вариантов, включая Омикрон (González-Domínguez I. *et al*, 2022).

1.2.4. Нуклеиновые кислоты в качестве вакцин.

Вакцины на основе нуклеиновых кислот в последние несколько лет активно разрабатываются как против онкологических, так и против

инфекционных заболеваний. Такие вакцины не имеют недостатка белковых препаратов по активации Т-клеточного иммунного ответа, поскольку при попадании в клетку они способствуют эндогенной наработке антигена, который затем презентуется в комплексе с МНС I, индуцируя цитотоксические Т-лимфоциты. Вакцины на основе нуклеиновых кислот не требуют сложных манипуляций при создании, безопасны и дешёвы в производстве (Ferraro V. *et al*, 2011).

1.2.4.1. мРНК-вакцины

Пандемия COVID-19 дала беспрецедентную возможность, которой воспользовались производители вакцин, и мРНК-вакцины стали одними из первых лицензированных для широкого использования при вакцинации в США и странах Евросоюза. Вакцины на основе мРНК имеют преимущество в том, что для их создания не требуется вовлечение живого вируса или бактерий, а производство быстро и дешёво. мРНК достаточно попасть в цитоплазму клетки, где с неё будут синтезированы антигены, которые индуцируют иммунный ответ. Однако, молекулы мРНК нестабильны и высокую эффективность показывают лишь при использовании липидных средств доставки, которые хоть и допущены к использованию в качестве компонентов вакцин, могут приводить к негативным побочным эффектам (Sedic M. *et al*, 2018). Известно, что катионные липосомы проявляют токсичность относительно макрофагов, макрофагоподобных и моноцитоподобных клеток, а также влияют на секрецию важных иммуномодуляторов (Filion M.C. & Phillips N.C., 1997; Aramaki Y. *et al*, 1999; Takano S. *et al*, 2003). Эффективность мРНК также ограничена такими явлениями, как нуклеазная деградация в условиях *in vivo* и врождённый иммунитет, распознающий одноцепочечные РНК как чужеродные. Данные ограничения преодолеваются заменой уридина на псевдоуридин, который отсутствует в вирусных РНК, зато есть в долгоживущих рибосомальных и транспортных РНК клеток (Karikó K. *et al*, 2008; Morais P. *et al*, 2021). мРНК-вакцина, не содержащая в своём составе псевдоуридин, показала лишь 47% эффективности в предотвращении симптоматики COVID-19 и провалила третью

фазу клинических испытаний (Baker N. & Dolgin E. *et al*, 2021; Kremsner P.G. *et al*, 2022). Также для мРНК-вакцин остаются актуальными проблемы логистики, так как нестабильная РНК может храниться только при очень низких температурах (-80°C).

В настоящее время две мРНК-вакцины, кодирующие S-белок SARS-CoV-2, применяются для вакцинопрофилактики и демонстрируют высокую эффективность (Walsh E.E. *et al*, 2020; Li J. *et al*, 2021), в том числе и при распространении новых штаммов SARS-CoV-2 (Abu-Raddad L.J. *et al*, 2021; Chung H. *et al*, 2021; Sheikh A. *et al*, 2021; Collie S. *et al*, 2022).

Вакцина Comirnaty является результатом активной коллаборации фирм Pfizer и BioNTech и одобрена в 149 странах мира. Данная мРНК-вакцина кодирует полноразмерный S-белок, содержит 5'-сар, 5'-нетранслируемую область (5'-UTR) из мРНК человеческого альфа-глобина, 3'-нетранслируемую область из наиболее высоко экспрессируемых и стабильных мРНК, а также поли(A)-хвост (30 и 70 остатков аденозина, разделённые 10-нуклеотидной линкерной последовательностью) и завернута в липидный комплекс, состоящий из ALC-0315, ПЭГирированного ALC-0159, фосфохолина (DSPC) и холестерина (Orlandini von Niessen A.G. *et al*, 2018; Walsh E.E. *et al*, 2020; Schoenmaker L. *et al*, 2021). В огромном множестве клинических исследований была продемонстрирована эффективность двукратной иммунизации в ограничении как симптоматического течения COVID-19, вызванного разными штаммами (Альфа – 92%, Бета и Гамма – 88%, Дельта – 83%, Омикрон – 88 %), так и госпитализаций (Альфа – 95%, Бета и Гамма – 100%, Дельта – 96%, Омикрон – 70%) (Abu-Raddad L.J. *et al*, 2021; Chung H. *et al*, 2021; Collie S. *et al*, 2021; Sheikh A. *et al*, 2021). На данный момент также бивалентные вакцины, содержащие мРНК, кодирующие помимо оригинального штамма Ухань штаммы Омикрон BA.1, BA.4/BA.5, одобрены в 35 странах и рекомендованы к использованию в качестве бустера для взрослых и детей старше 6 месяцев (Kawasuji H. *et al*, 2022; Rosenblum H.G. *et al*, 2022).

Другая вакцина, одобренная в 88 странах, основанная на платформе мРНК – Spikevax от фирмы Moderna. Она также кодирует стабилизированную форму белка S и содержит 3'- и 5'-UTR, дополнительные стоп-кодоны и поли(А)-хвост. Среди липидов, инкапсулирующих мРНК, используются DSPC, холестерин, ПЭГилованный DMG и SM-102 (Schoenmaker L. *et al*, 2021). В результате двукратной иммунизации вакциной Spikevax была продемонстрирована эффективность более 90% в предотвращении заболевания COVID-19 (Baden L.R. *et al*, 2021). В исследованиях иммунного ответа было показано смещение Т-хелперного ответа в сторону Th1, что ассоциируется с отсутствием эозинофильной лёгочной инфильтрации и соответствующей патологии лёгких при заболевании COVID-19, а также формирование Т-клеток памяти, особенно важных для социально значимых инфекций (Corbett K.S. *et al*, 2020). Аналогично вакцине Comirnaty, Spikevax в настоящее время выпускается в варианте бивалентной вакцины, половина дозы которой мРНК, кодирующая изначальный S-белок, а другая половина – мРНК, кодирующая S-белок Омикрон штаммов BA.1 или BA.4/BA.5 (Chalkias S. *et al*, 2022).

мРНК-вакцина, кодирующая RBD S-белка и завёрнутая в комплекс липидов lipid 9001, DSPC, DMG-PEG2000 и холестерин, была разработана в Китае и одобрена в качестве гетерологичного бустера для граждан, ранее вакцинированных инактивированной вакциной CoronaVac, показав хорошую переносимость и способность усиливать клеточный и гуморальный ответ (Liu X. *et al*, 2022).

Такое важное ограничение распространения мРНК-вакцин в липосомальной оболочке, как необходимость хранения их при -80°C , попытались преодолеть с помощью замены липидов на смесь сквалена и DOTAP в вакцине на основе самореплицирующейся мРНК GEMCOVAC-19. Сформированную таким образом вакцину можно лиофилизировать и хранить при 4°C без потери активности в течение минимум 21 месяца, а при комнатной температуре минимум 8 месяцев (Gerhardt A. *et al*, 2022; Voigt E.A. *et al*, 2022).

Данная вакцина одобрена в Индии, но оценка её эффективности представлена только в экспериментах на животных.

1.2.4.2. ДНК-вакцины

ДНК-вакцины являются более стабильными, нежели РНК, а также обладают всеми теми же преимуществами в виде быстрой и простой разработки, низкой стоимости производства и безопасности. Механизм действия ДНК-вакцины заложен в природе ДНК. Проникая в ядро клетки, она подвергается транскрипции и дальнейшей трансляции. Синтезированный белок может секретироваться во внеклеточное пространство и/или процессироваться, далее связываясь с МНС I (во всех клетках) и МНС II (в антигенпрезентирующих клетках), индуцируя как гуморальный, так и клеточный иммунитет.

Главным недостатком вакцин на основе ДНК является их низкая иммуногенность, показанная при применении на людях (Li L. *et al*, 2012). Большое количество исследований направлено на разработку стратегий, улучшающих иммуногенность ДНК-вакцин. Например, кодон-оптимизация стала рутинной процедурой при создании целевых генов в составе вакцинных плазмид (Megati S. *et al*, 2008; Fath S. *et al*, 2011), и существует большое количество коммерческих и общедоступных инструментов для оптимизации кодонов. Поскольку есть прецеденты, подтверждающие, что редкие кодоны не всегда ограничивают скорость транскрипции, а часто используемые кодоны не гарантируют увеличение производства белка, то рекомендуется проводить сравнение обоих вариантов (Li L. & Petrovsky N., 2016). Активное изучение влияния различных энхансеров и промоторов, способных обеспечить высокую экспрессию целевых генов, привело к включению немедленного раннего энхансера/промотора цитомегаловируса человека (CMV) в постоянный состав самых популярных вакцинных векторов pVAX1 и pcDNA3.1 (Garg S. *et al*, 2004; Vanniasinkam T. *et al*, 2006), несмотря на то, что работа вирусных промоторов может быть ограничена влиянием цитокинов, таких как IFN- γ и TNF- α (Qin L. *et al*, 1997). Включение в состав гена последовательности Козака и сигнала полиаденилирования приводит к повышению стабильности молекул мРНК и

усилению трансляции, добавление разнообразных лидерных последовательностей – к повышению секреции белкового продукта из клетки (Megati S. *et al*, 2008; Barrett L.W. *et al*, 2012). С помощью присоединения к целевому антигену сигнальных последовательностей, обеспечивающих процессинг белков в клетке, можно повысить эффективность презентации антигенов молекулами МНС I и МНС II (Gavali S. *et al*, 2021; Zhuo M. *et al*, 2015) и, следовательно, индукцию клеточно-опосредованного иммунитета.

Многие иммуностимулирующие молекулы используются в качестве «генетических адъювантов». Они могут быть закодированы в одной конструкции с целевым геном или введены с ним одновременно. Среди таких молекул лиганды рецепторов распознавания образов, в частности толл-подобных рецепторов (TLR). Например, полиинозиновая/полицитидиновая кислота (Poly(I:C)), которая является известным лигандом TLR3 и имитирует его взаимодействие с двуцепочечной молекулой РНК, часто встречающейся у вирусов (Hansen J. *et al*, 2012; Sajadian A. *et al*, 2014; Amaral M.P. *et al*, 2021), или упомянутый выше CpG, являющийся агонистом TLR9 (Ashkar A.A. & Rosenthal K.L., 2002; Charman R. *et al*, 2023) и активно используемый в качестве адъюванта также для субъединичных вакцин (Liu L.T. *et al*, 2022; Tabarsi P. *et al*, 2023), способны сильно увеличивать иммуногенность ДНК-вакцин. Также в качестве молекулярных адъювантов рассматривают лиганды RIG-1 и DAI, которые являются рецепторами регуляции врождённого иммунитета, реагирующими на двуцепочечную РНК или одноцепочечную ДНК (Lladser A. *et al*, 2011; Luke J.M. *et al*, 2011; Martínez-Gil L. *et al*, 2013; Imanishi T. *et al*, 2014; Kulkarni R.R. *et al*, 2014; Beljanski V. *et al*, 2015) и усиливающие специфический ответ на вводимый вместе с ними иммуноген.

В качестве «генетических адъювантов» часто используют гены цитокинов, которые включают непосредственно в состав ДНК-вакцин или вводят в составе дополнительной плазмиды. Среди цитокинов выбор обычно падает на молекулы, стимулирующие Т-лимфоциты, натуральные киллеры и дендритные клетки (ДК), такие как IL-2, IL-12, IL-15 и другие (Peng X. *et al*, 2016; Marx M. *et al*, 2018;

Huo S. *et al*, 2019; Foroutan M. *et al*, 2020; Vonderheide R.H. *et al*, 2021; Leroy L.A. *et al*, 2022). На первой стадии клинических испытаний находится вакцина против COVID-19 CORVax12, представляющая собой смесь плазмид, кодирующих S-белок вируса SARS-CoV-2 и IL-12. Постепенная и растянутая во времени экспрессия цитокиновых генов в месте инъекции помогает избежать негативных побочных эффектов, часто встречающихся при системном применении цитокинов. Активное изучение сигнальных путей иммунных реакций стало источником новых вариантов молекулярных адъювантов, представляющих из себя разнообразные сигнальные молекулы, участвующие во внутриклеточных процессах (Castaldello A. *et al*, 2010; Liniger M. *et al*, 2012; Chu D. *et al*, 2014; Chen S.M.Y. *et al*, 2022). Использование РНК-интерференции против генов-мишеней, которые ограничивают экспрессию генов в составе плазмиды, также является частью стратегии по повышению иммуногенности ДНК-вакцин. В этом случае последовательность, кодирующая интерференционные РНК, включается в состав отдельной плазмиды, или плазмиды, несущей целевой ген (Wang S.T. *et al*, 2010; Geiben-Lynn R. *et al*, 2011; Ahn Y.H. *et al*, 2015).

Однако все эти приёмы находятся на стадии разработки и еще не внедрены в клиническую практику в отличие от разработанных средств доставки нуклеиновых кислот. В то время, как доставка мРНК-вакцин ограничена использованием липидных составов, ДНК-вакцины имеют гораздо больший спектр приёмов, увеличивающих их эффективность. К таким приёмам относят не только «упаковку» ДНК в липосомы или другие полимеры, но и использование физических средств, таких как электропорация, генные пушки или безыгольные инъекторы.

Среди ДНК-вакцин против COVID-19, находящихся на стадии клинических испытаний только одна используется с липидной доставкой. Фирма Entos запатентовала состав Fusogenic, который представляет собой протеолипидную смесь, содержащую белки, способствующие слиянию частиц с мембраной клеток, и использует данный состав для доставки не только ДНК, но

и РНК, включая мРНК, малые интерферирующие РНК и другие (<https://www.entospharma.com/fusogenix>).

Большую часть ДНК-вакцин проводят через клинические испытания с применением электропорации как метода доставки. Суть метода заключается в том, что приложенное извне электрическое поле приводит к изменению локального трансмембранного напряжения и электропроводимости, что увеличивает проницаемость плазматических и ядерных клеточных мембран. Это временное увеличение проницаемости позволяет транспортировать ДНК и другие макромолекулы через клеточную мембрану (Broderick K.E. & Humeau L.M., 2015), приводя к увеличению эффективности трансфекции. Дополнительно электропорация приводит к локальному повреждению тканей, и воспалительный процесс стимулирует приток дендритных клеток, макрофагов и лимфоцитов в место инъекции, также увеличивая иммунный ответ (Sällberg M. *et al*, 2014).

Уже много лет фирма Inovio Pharmaceuticals занимается производством ДНК-вакцин и электропораторов и их внедрением в клинику (Diehl M.C. *et al*, 2013; Modjarrad K. *et al*, 2019; Tebas P. *et al*, 2019; Tebas P. *et al*, 2021; Vonderheide R.H. *et al*, 2021; Jacobson J.M. *et al*, 2023), поэтому она одна из первых после прочтения первого генома вируса SARS-CoV-2 получила прототип вакцины и приступила к её испытаниям. ДНК-вакцина INO-4800 кодирует полноразмерный S-белок и при введении с помощью прибора CELLECTRA® приводит к значительной индукции как гуморального, так и клеточного ответа, в особенности CD8⁺ Т-лимфоцитов (Smith T.R.F. *et al*, 2020; Kraynyak K.A. *et al*, 2022), эффективного и против более поздних вариантов вируса (Andrade V.M. *et al*, 2021). Также был создан вариант вакцины, кодирующей так называемый пан-SARS-CoV-2 антиген, представляющий из себя S-белок, содержащий самые актуальные на данный момент мутации, и показана его эффективность в качестве бустерной вакцины против линий B.1.351 и B.1.617.2 (Reed C.C. *et al*, 2021; Walters J.N. *et al*, 2022).

Ещё одна вакцина, COVID-eVax, кодирующая RBD, была выбрана среди других вариантов, кодирующих также полноразмерный белок S, его части и

рекомбинантный белок RBD-Fc, не только из-за способности индуцировать сильный ответ нейтрализующих антител, но и устойчивый Т-клеточный ответ, а также из-за отсутствия потенциального антителозависимого усиления инфекции (Conforti A. *et al*, 2022). Данная вакцина, вводимая с помощью электропорации, показала низкую токсичность и хорошую переносимость в доклинических и клинических испытаниях (Ramot Y. *et al*, 2021; Aurisicchio L. *et al*, 2023), а также рассматривается в качестве кандидата в бустерные вакцины после основной иммунизации мРНК-вакцинами или вакцинами на основе вирусных векторов.

Вакцина GX-19N, кодирующая RBD и N-белок и вводимая с использованием электропорации, продемонстрировала в клинических испытаниях безопасность и более сильный гуморальный и клеточный ответ по сравнению с вакциной GX-19, кодирующей лишь S-белок (Ahn J.Y. *et al*, 2022). Исследования иммуногенности данной вакцины показали, что для человека необходима очень большая доза антигена в форме ДНК (не менее 1,5 мг) для формирования сильного вирус-специфического иммунитета, даже несмотря на использование электропоратора. Однако это не представляется проблемой, поскольку сама наработка и хранение/транспортировка ДНК-вакцин достаточно дешевая. Данная вакцина хорошо себя показала также в качестве бустера после инактивированной вакцины и мРНК-вакцины (Seo Y.B. *et al*, 2021; Seo Y.B. *et al*, 2022).

Другое средство физической доставки ДНК-вакцин, позволяющее увеличивать их иммуногенность – безыгольная инъекция. Устройства для струйной инъекции последних поколений портативны, просты в эксплуатации и могут выполнять большое количество инъекций с помощью одноразовых «шприцов». Важным преимуществом использования данных устройств является дозосберегающий эффект, а также меньшие потери объема препарата в сравнении со стандартными шприцами с иглами (Alamri S.S. *et al*, 2021; Bashorun A.O. *et al*, 2022; Ledesma-Feliciano C. *et al*, 2023). Отсутствие игл в данной системе может уменьшить число отказов от вакцинации, вызванных боязнью игл, а также упростить утилизацию острых предметов и снизить риск случайной

передачи таких заболеваний, как вирусные гепатиты или ВИЧ, сотрудникам системы здравоохранения. Однако существует необходимость индивидуальной проверки целесообразности использования безыгольного инжектора для каждого конкретного иммуногена (Ledesma-Feliciano C. *et al*, 2023).

PharmaJet Tropis – один из двух безыгольных инжекторов, разрешённых для открытой продажи и использования US FDA (United States Food and Drug Administration), CE (Conformité Européenne) и ВОЗ, – используется для введения первой в мире одобренной для массового применения в Индии в целях иммунопрофилактики COVID-19 ДНК-вакцины ZyCoV-D (Mallapaty S., 2021). Данная вакцина состоит из векторной плазмиды pVAX1, несущей ген S-белка вируса SARS-CoV-2 с сигнальным пептидом из IgE, и вводится внутрикожно с помощью струйного инжектора PharmaJet Tropis. На животных моделях показана безопасность и эффективность данной вакцины: отсутствие встраивания рекомбинантной ДНК в геном, индукция обоих звеньев иммунитета (Dey A. *et al*, 2021; Yadav P.D. *et al*, 2023). В частности, введение 2 мг вакцины нечеловеческим приматам привело к увеличению популяции В-клеток и IL-8, что указывает на лимфоидную пролиферацию, индуцированную вакциной. Эффективность ZyCoV-D, по результатам клинических испытаний, составила 66,6% (Khobragade A. *et al*, 2022).

ДНК-вакцина AG0302 также кодирует S-белок вируса SARS-CoV-2 и в испытаниях на крысах показала способность индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет, однако при введении 0,2 и 0,4 мг людям с помощью инжектора с пиропроводом не привела к индукции ни специфических, ни нейтрализующих антител в рамках I/II фазы клинических испытаний (Hayashi H. *et al*, 2022; Nakagami H. *et al*, 2022). Но специфичный Т-клеточный ответ был зарегистрирован в обеих группах, поэтому создатели надеются найти способ дополнительно увеличить иммуногенность данной вакцины и в дальнейшем получить эффективную ДНК-вакцину.

Помимо электропорации и струйной инъекции для доставки ДНК-вакцины против COVID-19 было использовано устройство GeneDerm, которое

создаёт небольшое отрицательное давление (около 65 кПа) после внутрикожной инъекции вакцины по типу Манту (Lallow E.O. *et al*, 2021). Такой тип доставки позволил значительно увеличить иммуногенность бицистронной вакцины GLS-5310, кодирующей белок S и белок-продукт гена ORF3a вируса SARS-CoV-2, которая прошла первую фазу клинических испытаний и рассматривается как возможный бустер для других предшествующих вакцин (Kim W.J. *et al*, 2023).

Такие физические подходы, как использование микроигл или генная пушка не применялись для увеличения эффективности вакцин против COVID-19 (McCaffrey J. *et al*, 2015; Ledesma-Feliciano C. *et al*, 2023).

Стратегия сочетания различных видов вакцин в режиме прайм-буст позволяет преодолеть потенциальные недостатки разных подходов (Lu S., 2009), а также приводит к продолжительному усилению ослабевающего после первичной вакцинации иммунитета (Menni C. *et al*, 2022; Wang S. *et al*, 2022; He Q. *et al*, 2023).

Так, было показано, что праймирование ДНК с последующей иммунизацией белковым антигеном индуцирует наработку высоко аффинных антител, что активно используется для получения моноклональных антител в том числе для терапии (Vaine M. *et al*, 2010; Liu S. *et al*, 2016; Richetta M. *et al*, 2017; Liu S. *et al*, 2018; Chiang C.Y. *et al*, 2022; Chen Y. *et al*, 2021). Это связано с активацией ДНК-вакцинами преимущественно В-клеток зародышевого центра, которые продуцируют антитела с наиболее высоким сродством к антигену, особенно к его конформационным эпитопам (Hollister K. *et al*, 2014; Wu H. *et al*, 2016). Т-клеточный ответ, индуцированный ДНК-вакциной, также оказывается направлен на широкий спектр эпитопов, которые включают доминантные и субдоминантные цитотоксические эпитопы, а использование белкового бустера расширяет данные возможности (Hu X. *et al*, 2016).

Введение разных типов вакцин в режиме прайм-буст является логистически неудобным, так как для соблюдения схемы вакцинации необходимо отслеживать первичное и вторичное введение, в связи с чем совместное введение ДНК с субъединичной (или другой) вакциной

представляется более простым и удобным. Коиммунизация животных смесью ДНК, кодирующей стабилизированный S-белок вируса SARS-CoV-2, и белка RBD привела к формированию сильного специфического и, главное, протективного иммунитета на модели нечеловеческих приматов (Rosati M. *et al*, 2021). Схожий результат был получен при бустировании ДНК-вакцины, кодирующей спайковый белок, субъединицей S1 (Li Y. *et al*, 2021). Данные подходы продемонстрировали, что совместное введение ДНК и белка позволяет использовать преимущества обоих методов, которые заключаются в индукции гуморального ответа (для белковых вакцин) и Т-клеточного ответа (для ДНК-вакцин), при этом нивелируя их недостатки при использовании гомологичных иммунизаций.

1.3. Выводы по обзору литературы

Быстрое распространение SARS-CoV-2 по всему миру стимулировало беспрецедентное развитие различных платформ создания вакцин, в том числе вакцин на основе нуклеиновых кислот, что привело к одобрению первой в мире ДНК-вакцины для человека.

Несмотря на то, что сама по себе плазмидная ДНК не является высоко иммуногенной, в настоящее время существует большое количество подходов, позволяющих улучшить эффективность ДНК-вакцин. Некоторые из этих подходов, в частности, кодон-оптимизация, включение в состав антигена различных регуляторных и сигнальных последовательностей, а также использование катионных полимеров, были реализованы в рамках данной диссертационной работы.

2. Материалы и методы

2.1 Материалы

2.1.1. Олигонуклеотиды

Все олигонуклеотиды, использованные в работе, были синтезированы ООО «БИОССЕТ» (г. Новосибирск, Россия).

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→ 3'
SE-F	ТААТАСГАСТСАСТАТАГГСТАГССТ
SE-R	ААААААГСГГССГСТСАТТАГТТГААГТТСАСГСАТ ТТГТТСТТС
Ubi-PolyT-F	ttttCGTACGATGGCCAAGTTCGTGGCC
Ubi-PolyT-R	ТТАААСГГГСССТСАТТАГСГСА
pVAX-G2V2-F	ttttGAATTCCCGCCACCATGCAAAT

2.1.2. Синтетические пептиды

Для стимуляции спленоцитов, выделенных из иммунизированных животных, использовали пулы из пептидов, рестриктируемых молекулами главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I (H2-Dd, H-2-Kd, H-2-Ld) и класса II (H2-IAd, H2-IEd) мышей BALB/c из последовательностей белков S (включая RBD), N, M и E вируса SARS-CoV-2. Пептиды были рассчитаны с помощью инструментов IEDB Analysis Resource и синтезированы компанией AtaGenix Laboratories (Китай), чистота пептидов составила более 80% (табл. 2 и 3).

Таблица 2. Список пептидов, входящих в состав RBD SARS-CoV-2, использованных для стимуляции спленоцитов мышей BALB/c в ELISpot и ICS

№ п/п	Последовательность пептида	MHC рестрикция
1	VYAWNRRKRI	H-2-Kd
2	FERDISTEI	H-2-Ld
3	CGPKKSTNL	H2-Dd
4	RFASVYAWNRRKRISN	H2-IEd, H2-IAd
5	VGGNYNYLYRLFRKS	H2-IEd
6	GGNYNYLYRLFRKSN	H2-IEd
7	KNKCVNFNFENGLTGT	H2-IEd
8	YNYKLPDDFTGCVIA	H2-IEd
9	QPTESIVRF	H-2-Kd
10	VSPTKLNDL	H-2-Kd
11	LLHAPATVCGPKKST	H2-IEd
12	ASVYAWNRRKRISN	H2-IEd
13	YNYLYRLFRKSNL	H2-IEd

Таблица 3. Пептиды из различных белков вируса SARS-CoV-2, использованные для стимуляции спленоцитов мышей BALB/c в ELISpot и ICS.

№ п/п	Последовательность пептида	MHC рестрикция
1	AYSNNSIAI	H-2-Kd
2	QYIKWPWYI	H-2-Kd
3	LPPLLTDEM	H-2-Ld
4	SAPHGVVFL	H-2-Dd
5	WPWYIWLGF	H-2-Ld
6	VGGNYNYLYRLFRKS	H2-IEd
7	YNYKLPDDFTGCVIA	H2-IEd

8	YNYLYRLFRKSNL	H2-IEd
9	GGNYNYLYRLFRKSN	H2-IEd
10	YYRRATTRIRGGDGK	H2-IEd
11	GTWLTYTGAIKLDDK	H2-IEd
12	DDQIGYYRRATTRIR	H2-IEd
13	VKPSFYVYSRVKLN	H2-IEd
14	CFVLAAYRINWITG	H2-IEd
15	YYRRATTRRI	H-2-Kd
16	TPSGTWLTY	H-2-Ld
17	KHIDAYKTF	H-2-Kd
18	SPDDQIGYY	H-2-Ld

2.1.3. Коммерческие наборы, ферменты, реактивы

- ДНК-полимераза Q5 с прилагаемым буфером (New England Biolabs, США);
- Смесь dNTP (Сибэнзим, Россия);
- Высокоактивная ДНК-лигаза фага T4 с прилагаемым буфером (Сибэнзим, Россия);
- ДНКаза I с прилагаемым буфером (Jena Bioscience, Германия);
- Маркер молекулярного веса ДНК M12 (Сибэнзим, Россия);
- Эндонуклеазы рестрикции NheI, NotI, XbaI, ApaI, EcoRI, PstI, HinfI, VneI, Bsp19I с прилагаемыми буферами (Сибэнзим, Россия);
- Набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid miniprep (Евроген, Россия);
- Набор для выделения и очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей Cleanup Standard (Евроген, Россия);
- Набор для выделения и очистки плазмидной ДНК от эндотоксинов EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, Германия);

- Реагент MATRa-A для магнитной трансфекции клеток (IBA Lifesciences, Германия);
- Реагент для трансфекции эукариотических клеток Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США);
- Набор для выделения тотальной РНК с реагентом ЛИРА (Биолабмикс, Россия);
- Набор для проведения ОТ-ПЦР в одной пробирке БиоМастер ОТ-ПЦР – Color (Биолабмикс, Россия);
- Маркер молекулярной массы белка Precision Plus Protein Dual Color Standards 10-250 kDa (Bio-Rad Laboratories, США);
- Нитроцеллюлозная мембрана 0,45 мкм (Millipore, США);
- Сорбенты для гель-фильтрации: Sephadex G-25 (Cytiva, Швеция) и Sepharose CL-6B (Cytiva, Швеция);
- Сорбент для аффинной хроматографии Ni-NTA (Qiagen, Германия);
- Сорбенты для ионообменной хроматографии: SP Sepharose Fast FLow (Cytiva, Швеция) и Q Sepharose Fast FLow (Cytiva, Швеция);
- Буфер ФСБ в таблетках (Росмедбио, Россия);
- Tween-20 (Sigma Aldrich, США);
- Хромогенный субстрат для щелочной фосфатазы 1-Step NBT/BCIP Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific, США);
- Хромогенный субстрат для пероксидазы хрена 1-Step TMB ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific, США);
- Поликлональные антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cat. No 62-6520, Invitrogen, США);
- Поликлональные антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Cat. No A16069, Invitrogen, США);
- Моноклональные антитела 29F2 были любезно предоставлены Порываевой В. А.

- Моноклональные антитела против мышинных CD3, конъюгированные с Alexa Fluor 700 (клон 500A2, Biolegend, США);
- Моноклональные антитела против мышинных CD4, конъюгированные с BV785 (клон GK1.5, Biolegend, США);
- Моноклональные антитела против мышинных CD8, конъюгированные с FITC (клон 53-6.7, Biolegend, США);
- Моноклональные антитела против мышинного IFN- γ , конъюгированные с APC (клон XMG1.2, Biolegend, США);
- Моноклональные антитела против мышинного IL-2, конъюгированные с BV421 (клон JES6-5H4, Biolegend, США);
- Моноклональные антитела против мышинного TNF- α , конъюгированные с PE (клон MP6-XT22, Biolegend, США);
- Моноклональные антитела против мышинного IL-4, конъюгированные с BV 605 (клон 11B11, Biolegend, США);
- Брефельдин А (GolgiPlug BD Biosciences, США);
- Препараты белков S и RBD вируса SARS-CoV-2 были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии Щербаковым Д.Н., Меркульевой Ю.А., Исаевой А.А., Несмеяновой В.С., Шаньшиным Д.В., Волковой Н.В. и Беленькой С.В.;
- Набор Mouse IFN- γ ELISpot Plus (Mabtech, Швеция) для проведения ELISpot;
- Спермидин (Sigma, США);
- Декстран (MPBiomedicals, США);
- Буфер для лизиса эритроцитов АСК Lysing Buffer (BD, США);
- Параформальдегид (АО ЛенРеактив, Россия);
- Форбол-12-миристан-13-ацетат (AppliChem, Германия);
- Иономицин (Fisher BioReagents, США);
- Конканавалин А (ConA) (Medicago, Швеция);
- Агароза (Bio-Rad, США);

- Бромистый этидий (Serva, Германия);
- Ампициллин, 100 мг/мл (Биосинтез, Россия);
- Гентамицин, 40 мг/мл (Дальхимфарм, Россия);
- Пурамицин, 10 мг/мл (InivoGen, США);
- Фетальная бычья сыворотка, FBS (Gibco, США);
- Набор для выделения РНК из гомогенатов тканей «РИБО-преп» («Амплиценс», Россия);
- Набор для обратной транскрипции Реверта-L» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия);
- Набор для ПЦР-РВ «Вектор-ПЦРРВ-COVID19-RG» (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия).

2.1.4. Клеточные линии, штаммы бактерий и вирусов, плазмиды

Для генно-инженерных работ использовали клетки *E. coli* штамм NEB Stable (генотип: F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zsf::Tn10 (TetR) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Ф80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrrhsdRMS-mcrBC)) (New England Biolabs, США).

Для получения продуцентов рекомбинантных белков использовали перевиваемую клеточную линию СНО-К1 (клетки яичника китайского хомячка). Для исследования экспрессионной активности полученных в работе конструкций использовали перевиваемую клеточную линию НЕК293Т (клетки эмбриональной почки человека). Для анализа вируснейтрализующих свойств сывороток животных *in vitro* использовали перевиваемую клеточную линию Vero Еб (клетки почки африканской зеленой мартышки). Все клеточные линии получены из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, НСО, Россия).

Для анализа вируснейтрализующих свойств сывороток животных *in vitro* использовали штамм коронавируса SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020. Для анализа протективной активности вакцинных препаратов использовали штамм коронавируса SARS-CoV-2 hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021,

относящийся к линии Р.1 (Гамма-вариант). Все штаммы были получены из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, НСО, Россия).

В качестве матрицы-донора последовательности, кодирующей убиквитин, была использована плазида G2V2, предоставленная Орешковой С.Ф. В качестве вектора использовали плазмиду pVAX1 (Cat. № V26020, ThermoFisher Scientific, США). Для контроля трансфекции использовали плазмиду pGFP (Addgene, США), кодирующую зелёный флуоресцентный белок. Для создания продуцентов использовали плазмиду pCMV(CAT)T7-SB100 (Addgene, США), кодирующую транспозазу, а также интегративные плазмиды pVEAL2-S и pVEAL2-RBD, созданные в лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора под руководством Щербакова Д.Н.

2.1.5. Питательные среды

Для работ с бактериальными культурами использовали стандартные среды:

- LB (1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl);
- Агаризованный LB (LB, 1,5% агар);

Для работ с эукариотическими клеточными культурами использовали среды и реактивы:

- DMEM (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) с L-глутамином и гентамицином (50 мкг/мл);
- MEM (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) с L-глутамином и гентамицином (50 мкг/мл);
- RPMI-1640 (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) с L-глутамином и гентамицином (50 мкг/мл);
- 0,02% раствор версена (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия).

2.1.6. Растворы и буферы

- ТАЕ буфер для электрофореза ДНК в агарозном геле: 40 мМ Трис-(гидрокси метил) аминотан, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0;
- Буфер для электрофореза белков в SDS-ПААГ: 25 мМ Трис-(гидрокси метил) аминотан, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, рН 8,3;
- Разрешающий гель для SDS-ПААГ: 44% акриламид, 1,5 М Трис-НСl (рН=8,8), 50 мг персульфата аммония, 1 мкл/мл TEMED;
- Концентрирующий гель для SDS-ПААГ: 30% акриламид, 0,5 М Трис-НСl рН=6,8, 50 мг персульфата аммония, 1 мкл/мл TEMED;
- Буфер для загрузки образцов белка в полиакриламидный гель: 12% SDS, 0,06% бромфенолового синего, 47% глицерина, 60 мМ Трис-НСl рН 6,8;
- Раствор кумасси Brilliant Blue R-250 для окрашивания белков в SDS-ПААГ: 400 мг Кумасси R-250 растворяли в 20 мл 96% этилового спирта, добавляли 80 мл H₂O и 25 мл HClO₄, перемешивали на магнитной мешалке, после чего доводили 200 мл водой;
- Буфер для переноса белков на нитроцеллюлозу: 38 мМ Трис-НСl, 48 мМ глицин, 0,05% SDS, 20% этанол, рН 8,3;
- Базовый буфер для аффинной хроматографии: 30 мМ NaH₂PO₄, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол;
- Элюирующий буфер для аффинной хроматографии: 30 мМ NaH₂PO₄, 0,5 М NaCl, 0,5 М имидазол;
- Базовый буфер для ионообменной хроматографии: 20 мМ Трис-НСl, рН 8,2;
- Элюирующий буфер для ионообменной хроматографии: 1 М NaCl в 20мМ Трис-НСl, рН 8,2;
- Денатурирующий буфер для хромато-масс-спектрометрии: 7 М мочевины, 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0;
- Буфер ФСБТ: 0.1% Tween-20 в ФСБ;

- Блокирующий буфер для иммуноблоттинга: 3% бычьего сывороточного альбумина в буфере ФСБТ;
- Блокирующий буфер для ИФА: 1% казеина в буфере ФСБТ;
- 0,02% раствор генцианвиолета: 1 г генцианвиолета в 20 мл 96% этилового спирта, 120 мл 40% формалина и 350 мл раствора Хенкса;
- Буфер для трансформации *E. coli*: 50 мМ CaCl₂, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0;
- Буфер для окрашивания внутриклеточных цитокинов: 0,02% ЭДТА, 0,1% NaN₃, 2% инактивированной FBS в ФСБ;
- Буфер для фиксации клеток: 1% параформальдегид в ФСБ;
- Буфер для пермеабилзации клеток: 0,2% Tween-20 в ФСБ;

2.2 Методы

2.2.1. Проектирование генов

Для дизайна гена, кодирующего рецепторсвязывающий домен (RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2, воспользовались последовательностью, опубликованной в GenBank (MN908947). Оптимизацию кодонного состава последовательности проводили с помощью программы GeneOptimizer (<https://www.thermofisher.com/ru/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html>) для экспрессии в клетках млекопитающих.

Дизайн полиэпитопного иммуногена BSI-COV был произведён с использованием базы данных Immune Epitope Database 2.22 С. И. Бажаном. В его состав вошли фрагменты белков S, M, N и E вируса SARS-CoV-2, которые содержат наибольшее количество эпитопов, рестриктируемых человеческими и мышинными МНС I и II класса. К N-концу спроектированного белка-иммуногена добавили универсальный Т-хелперный эпитоп PADRE, а к С-концу – маркерный эпитоп EPFRDYVDRFYKTLR. Последовательность, кодирующую BSI-COV, оптимизировали с помощью программы Jcat (<http://www.jcat.de>) для экспрессии в клетках млекопитающих.

2.2.2. Конструирование рекомбинантных плазмид

Синтез спроектированных генов произведён фирмой ООО «ДНК-синтез» (Россия).

С помощью специфических праймеров (SE-F (5'-taatacgaactcactataggctagcct-3') и SE-R (5'-aaaaaagcggccgctcattagttgaagttcacgcattgttcttc-3')), матрицы, содержащей кодирующую последовательность, и ПЦР в состав гена, кодирующего RBD, была введена последовательность, кодирующая гибридную лидерную последовательность двух белков: фиброина и люциферазы (MMRTLILAVLLVYFCATVHC). Полученный ген был клонирован в вектор pVAX1 по сайтам рестрикции NheI и NotI. Плазмида, содержащая ген, кодирующий RBD с сигнальной последовательностью, была обозначена как pVAXrbid.

К гену, кодирующему искусственный иммуноген BSI-COV, с помощью специфических праймеров (Ubi-PolyT-F (прямой) – 5'-tttttCGTACGATGGCCAAGTTCGTGGCC-3', Ubi-PolyT-R (обратный) – 5'-TTAAACGGGCCCCTCATTAGCGCA-3'), матрицы, содержащей кодирующую последовательность, и ПЦР присоединили последовательность, кодирующую убиквитин. Полученный ген клонировали в вектор pVAX1 по сайтам XbaI/NheI и ApaI. Плазмида, содержащая ген, кодирующий искусственный иммуноген BSI-COV с убиквитином на N-конце, была обозначена pBSI-COV-Ub.

Структуры полученных конструкций подтверждали секвенированием по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» (Россия).

2.2.3. Трансформация *E. coli* Stb13 плазмидными ДНК

Подготовили компетентную культуру клеток *E. coli* Stb13 следующим образом: дневную клеточную культуру, достигшую оптической плотности $D_{600}=0,4-0,6$ о.е., центрифугировали 10 мин при 4000 об/мин и 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали ледяным 0,1М CaCl₂-буфером и инкубировали на льду 30 мин. После повторного центрифугирования ресуспендировали осадок в ледяном 0,1М CaCl₂ с 15% глицерина, хранили при -80°C.

Для трансформации компетентные клетки размораживали на льду и добавляли к ним плазмидную ДНК, инкубируя ещё 30 мин на льду. Затем проводили тепловой шок в течение 5 мин при 37°C, добавляли среду LB и оставляли при 37°C в течение одного часа. После 5 мин центрифугирования при 6000 об/мин сливали супернатант и в его остатке ресуспендировали осадок с дальнейшим высеиванием смеси в чашки Петри на агаризованную среду с добавлением ампициллина (100 мкг/мл). Чашки инкубировали ночь в термостате при 37°C.

2.2.4. Нарботка препаративного количества рекомбинантных плазмид

5 мл ночной культуры трансформированных плазмидами клеток *E. coli* Stb13 добавляли в 45 мл среды LB, содержащей 25 мкг/мл канамицина и наращивали при покачивании при 37°C до достижения ими оптической

плотности $D_{600} = 1,0$ о.е. После этого подготовленную культуру добавляли в 2,7 л среды LB с добавлением 25 мкг/мл канамицина и инкубировали ночь при 37°C и постоянном покачивании. После наращивания клетки осаждали центрифугированием 10 мин при 10000 об/мин при 4°C.

2.2.5. Выделение и очистка плазмидной ДНК

Плазмидную ДНК очищали с помощью набора EndoFree Plasmid Giga Kit согласно инструкции производителя. Данный набор позволяет очистить большие количества плазмидной ДНК от эндотоксинов, РНК и геномной бактериальной ДНК.

2.2.6. Спектрофотометрический и рестрикционный анализ ДНК в агарозном геле

Проверку чистоты и определение концентрации выделенных плазмид проводили измерением УФ-поглощения при длинах волн 220-300 нм с помощью спектрофотометра Nanodrop One.

Рестрикционный анализ для подтверждения структуры плазмид проводили с использованием эндонуклеаз рестрикции XbaI, EcoRI, PstI, HinfI, VneI и Bsp19I в присутствии соответствующих буферов и оптимальных условий максимальной активности ферментов с последующим электрофорезом в 1% агарозном геле, приготовленном на основе однократного буфера TAE с добавлением бромистого этидия (0,5 мкг/мл). Форез проводили с использованием горизонтальной камеры и блока питания Bio-Rad при 80 В в течение 1 часа.

2.2.7. Магнитная трансфекция эукариотических клеток НЕК293Т целевыми плазмидами

Клетки НЕК293Т культивировали в 12-луночных планшетах плотностью 4×10^5 клеток в 1,3 мл среды DMEM, содержащей 10% FBS, L-глутамин, 50 мкг/мл гентамицин, при 37°C в присутствии 5% CO₂ в течение суток. Для каждой лунки готовили смесь из 100 мкл DMEM, 0,6 мкл реагента MATra-A и 0,6 мкг плазмиды и инкубировали её в течение 20 мин. В лунках с клетками меняли клеточную среду на 1 мл среды DMEM, добавляли смесь для трансфекции и

помещали планшет на магнитную плату на 15 мин. Затем меняли среду на 1,5 мл полной DMEM и инкубировали трансфицированные клетки двое суток при 37°C в присутствии 5% CO₂.

В качестве агента для оценки эффективности трансфекции использовали плазмиду pGFP, кодирующую зелёный флуоресцирующий белок, который детектировали визуально с помощью микроскопа Olympus в УФ свете. После успешной трансфекции из лунок удаляли ростовую среду и добавляли 0,5 мл раствора Версена, инкубировали и нейтрализовали раствор 0,5 мл среды DMEM. Полученную клеточную суспензию переносили в пробирки типа Eppendorf и центрифугировали 5 мин при 1600 об/мин.

2.2.8. Выделение тотальной РНК из клеток HEK293T, трансфицированных целевыми плазмидами

Клеточные осадки ресуспендировали в 30 мкл PBS, и тотальная РНК была выделена из них набором фирмы «Биолабмикс» (Россия) с реагентом ЛИРА в соответствии с протоколом производителя. Препараты РНК обрабатывали ДНКазой 10 мин при 65°C, после чего помещали пробирки на лёд.

2.2.9. Постановка реакции ОТ-ПЦР

Для выявления целевой мРНК в тотальной РНК трансфицированных клеток использовали набор для обратной транскрипции с ПЦР в одной пробирке БиоМастер ОТ-ПЦР Color фирмы «Биолабмикс» (Россия). Реакцию проводили с использованием специфичных праймеров: SE-F (5'-taatacgaactcactataggctagcct-3') и SE-R (5'-aaaaaagcggccgctcattagtgaagttcacgcattgttcttc-3') для фрагмента *rbd* (750 kb), pVAX-G2V2-F (5'- ttttgAATTCCCGCCACCCATGcaaat-3') и Ubi-PolyT-R (5'-TTAAACGGGCCCTCATTAGCGCA-3') для *bsi-cov-ub* (1500 kb).

Используя Verity 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems, США), образцы сначала выдерживали 30 мин при 45°C, 5 мин при 95°C, а затем 30 циклов ПЦР, каждый цикл состоял из 15 сек при 95°C, 20 сек при 58°C и 2 мин при 72°C, завершали реакцию элонгацией в течение 5 мин при 72°C. ПЦР продукты анализировали в 1% агарозном геле.

2.2.10. Выявление целевых белков с помощью иммуноблотинга

Наличие продукции целевых белков исследовали с помощью вестерн-блотинга. После разделения трансфицированных клеток и культуральной среды в п. 2.2.7 клеточный осадок лизировали последовательными циклами заморозки/оттаивания. Клеточные лизаты и культуральная среда, в которой выращивались трансфицированные клетки, смешивали 1:1 с буфером для нанесения и инкубировали смесь 10 мин при 99°C. 20 мкл образцов наносили в лунки 12% полиакриламидного геля, после чего проводили форетическое разделение белков в камере Mini-PROTEAN (BioRad, США) при постоянном напряжении 150 V в течение 1-1,5 ч.

После разделения в SDS-ПААГ белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Hybond-C Extra, Великобритания) в буфере для переноса при постоянной силе тока 100 мА в течение 1 ч 20 мин на приборе для полусухого переноса Semi-dry (Bioclon, Russia). Иммуноблотинг проводили с помощью SNAP i.d.® 2.0 Protein Detection System (Merck, Германия). После установки в картридж производили блокировку мембраны фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1% Tween-20 и 1% BSA в течение 10 мин. Затем промывали 3 раза ФСБТ и инкубировали 10 мин с МКА 29F2 (1:200), специфическими к маркерному эпитопу EPFRDYVDRFYKTLR, или гипериммунной мышинной сывороткой (1:5000). После повторной промывки мембрану инкубировали 10 мин с антителами кролика против IgG мыши, конъюгированными с щелочной фосфатазой (Sigma, США), и затем после промывки анализировали с использованием субстратов BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate/nitro-blue tetrazolium) и системы обработки изображений IBright FL1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.11. Нарботка белков S и RBD

Белки S и RBD были наработаны в эукариотических продуцентах в лаборатории иммунохимии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Продуценты были получены путём трансфекции клеток CHO-K1 плазмидами pVEAL2-RBD или pVEAL2-S с помощью Lipofectamine 3000 (ThermoFisher, США) согласно

инструкции производителя. Для интеграции экспрессионной кассеты вектора в геном клеток совместно с целевой плазмидой добавляли плазмиду pCMV(CAT)T7-SB100, кодирующую транспозазу SB100. Через 3 дня в культуральную среду добавляли селективный антибиотик пурамицин (InvivoGen, США) в конечной концентрации 10 мкг/мл, ген устойчивости к которому входит в состав вектора pVEAL2. Селекцию устойчивых клонов проводили в течение трех суток. Клоны, показавшие наибольшую продуктивность, культивировали на роллерных установках и собирали культуральную среду.

Рекомбинантные белки выделяли из культуральной среды клеток CHO-K1. Для этого её центрифугировали, фильтровали (0,22 мкм) и проводили 2-х этапную хроматографическую очистку. Первый этап включал в себя металл-хелатную хроматографию на колонке с Ni-NTA (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. На следующем этапе проводили очистку ионообменной хроматографией на соединенных последовательно колонках с катионообменным (SP-сефароза) и анионообменным (Q-сефароза) сорбентами, уравновешенными 20мМ Трис-HCl, pH 8,2. Полученный белок диализовали против PBS и подвергали стерилизующей фильтрации через фильтры 0,22 мкм. Количественный анализ содержания белка проводили методом Лоури. Препарат белка RBD анализировали при помощи электрофореза в денатурирующих условиях в 15% ПААГ.

2.2.12. Синтез полимерного конъюгата, состоящего из полиглюкина и спермидина

На первом этапе для синтеза полиглюкин-спермидина (PGS) активировали декстран следующим образом: 1 моль декстрана 40 000 (MPBiomedicals™, США) обрабатывали 40 молями периодата натрия в течении 1 ч, после чего оставшийся окислитель удаляли из активированного декстрана методом гель-фильтрации на колонке с сефадексом G-25, уравновешенной 50 мМ карбонатным буфером (pH 8.6). Затем добавляли раствор спермидина (Sigma, США) из расчета на один моль декстрана 30 молей спермидина, инкубировали в течение 2 ч и добавляли в смесь

боргидрид натрия из расчета 80 молей боргидрида на 1 моль декстрана. После двухчасовой инкубации полученный конъюгат очищали от непрореагировавших компонентов гель-фильтрацией на сефадексе G-25, уравновешенном ФСБ. Препарат конъюгата стерильно фильтровали через фильтры 0,22 мкм.

2.2.13. Конъюгация полиглюкин-спермидина с белком RBD (PGS-RBD)

Активировали декстран указанным выше способом (п. 2.2.12), затем в раствор активированного декстрана добавляли белок RBD из расчёта на один моль декстрана один моль белка, смесь инкубировали 2 ч. Далее добавляли раствор спермидина и проводили процедуры, указанные в п. 2.2.12.

2.2.14. Получение комплексов PGS и PGS-RBD с плазмидной ДНК

Для формирования комплексов ДНК и полимера PGS смешивали плазмиду и полиглюкин-спермидин в массовом соотношении 1:10, инкубировали в течение 1 ч в холодильнике.

Для формирования комплексов ДНК и конъюгата PGS-RBD смешивали плазмиду из расчёта на две части ДНК одну часть белка (по массе), инкубировали 5 мин, затем добавляли 10 частей PGS на 1 часть ДНК (по массе) с последующей инкубацией в холодильнике в течение 1 ч.

Эффективность образования комплексов оценивали по изменению электрофоретической подвижности ДНК в 1% агарозном геле.

2.2.15. Исследование размеров полученных комплексов

Для оценки размера и формы полученных частиц их суспензии наносили на медные сетки для электронной микроскопии, покрытые стабилизированной углеродом пленкой из формвара. Препараты окрашивали 2% водным раствором уранилацетата и исследовали с использованием электронного микроскопа JEM-1400 (Jeol, Япония). Получение изображений, анализ и обработка изображений выполнялись с помощью цифровой камеры Veleta (SIS, Германия) и программного комплекса iTEM (SIS, Германия) в отделе микроскопических исследований ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Гель-фильтрацию проводили на колонке, заполненной Сефарозой CL-6B в объеме 10 мл в ФСБ (рН 7,4). Для определения свободного объема колонки использовали голубой декстран с молекулярной массой 2 кДа. Образцы исследуемых препаратов вносили в эквимольных количествах относительно нуклеотидного материала.

2.2.16. Измерение кинетики связывания белка RBD в составе комплекса с помощью биослойной интерферометрии

Измерение кинетики связывания RBD и частиц CCV-RBD с моноклональным антителом iB14 (Gorchakov A.A. *et al*, 2021), проводили на приборе Octet K2 (Pall Fortebio, США) с использованием биосенсоров в ИМКБ СО РАН. Все анализы выполнялись при перемешивании со скоростью 1000 об/мин в ФСБ. Конечный объем всех растворов составлял 200 мкл/лунку. Анализы проводили при 30°C в черных 96-луночных планшетах (Corning, США). Биосенсоры загружали антителом iB14 с константной областью человеческих IgG (30 мкг/мл), разведенным в ФСБ, в течение 300 сек. Промывку от несвязавшихся антител осуществляли в течение 60 сек в ФСБ. Ассоциацию антитела с антигенами (20 мкг/мл), разведенными в ФСБ, производили в течение 180 сек. Диссоциация взаимодействия составляла 320 сек. Корректировку дрейфа базовой линии выполняли путем вычитания среднего значения сдвигов, зарегистрированных сенсором, загруженным антителом без взаимодействия с антигенами. Данные обрабатывали при помощи программы Data Analysis HT 12.0.1.55.

2.2.17. Иммунизация лабораторных животных

Работы с животными проводили согласно «Руководству по уходу и использованию лабораторных животных» и принципам гуманности, изложенным в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации. Протоколы были одобрены на заседаниях Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (Разрешение ГНЦ ВБ «Вектор»/10-09.2020, утверждено протоколом Биоэтической комиссии №5 от

01.10.2020, Заявка ГНЦ ВБ «Вектор»/01-03.2023, утверждена протоколом Биоэтической комиссии №1 от 21.03.2023).

Для оценки иммуногенности созданных конструкций использовали самок мышей BALB/c массой 16–18 г. Животных иммунизировали дважды с интервалом три недели, дозы ДНК составляли 100 мкг, дозы белка – 50 мкг на животное. Каждая мышь получала 200 мкл инъекционного препарата в обе бедренные мышцы задних лап (по 100 мкл в каждую).

Спустя 10-14 дней у животных брали кровь для анализа гуморального ответа и селезёнки для анализа клеточного ответа.

2.2.18. Подготовка образцов крови и селезёнок для анализа

Кровь инкубировали 1 ч при 37°C и 2 ч при 4°C для формирования сгустка и отделяли сыворотки от клеточных элементов центрифугированием при 9000 g в течение 10 мин. Сыворотки прогревали 30 мин при 56°C и использовали сразу или замораживали при -20°C.

Селезёнки последовательно измельчали на нейлоновых фильтрах с диаметром пор 70 и 40 мкм (JET BIOFIL, Китай). После лизиса эритроцитов буфером ACK Lysing Buffer (ThermoFisherScientific, США) спленоциты дважды отмывали в полной среде RPMI и помещали в 1 мл среды RPMI с 2 mM L-глутамина, гентамицина (50 мкг/мл) и 10% фетальной бычьей сывороткой (FBS) (ThermoFisherScientific, США). Количество клеток подсчитывали с помощью автоматического счетчика клеток TC20™ (Bio-Rad, США).

2.2.19. Иммуноферментный анализ

Рекомбинантные белки S и RBD использовали в качестве иммуносорбентов для ИФА. Для этого их сорбировали на 96-луночные планшеты (Greiner Bio-One, Австрия) в концентрации 1 мкг/мл в 2M растворе мочевины в течение ночи при 4°C. На следующий день планшеты трижды промывали ФСБТ и блокировали 150 мкл/лунку 1% раствором казеина в течение 1,5 ч при Тк. Блокирующий раствор сбрасывали, затем инкубировали планшеты с трёхкратными серийными разведениями мышинных сывороток (в блокирующем буфере) в течение 1 ч при Тк. После промывки ФСБТ добавляли кроличьи

антитела против мышинных IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), разведённые в 3000 раз, инкубировали в течение 1 часа при Тк. Заключительную промывку производили 5-кратно, затем в лунки добавляли 50 мкл субстрата ТМВ (Amresco, США) и останавливали реакцию через 25 мин 1N соляной кислотой. Результаты анализировали спектрофотометрически при длине волны 450 нм с использованием Varioskan™ LUX (ThermoFisherScientific, США).

2.2.20. Тест вируснейтрализации

Для оценки ингибирования цитопатического действия вируса (ЦПД) на культуре клеток Vero E6 *in vitro* использовали штамм nCoV/Victoria/1/2020 (100 ЦПД₅₀), полученный в отделе «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор».

Клеточную культуру Vero E6 растили в 96-луночных планшетах до 100% монослоя. Готовили смеси из равных объёмов вирусной суспензии (100 ЦПД₅₀) и серийных двукратных разведений сывороток, затем инкубировали их в течение 1 ч при 37°C и добавляли к клеткам Vero. Планшеты инкубировали 4 сут при 37°C в атмосфере 5% CO₂, а затем окрашивали клетки 0,2% раствором генцианвиолета в течение 30 мин. Промывали лунки водой и оценивали результаты визуально с использованием светового микроскопа. Нейтрализующую активность сывороток иммунизированных животных оценивали по титру (разведению) сывороток, при котором регистрировали защиту клеток от ЦПД вируса в 50% лунок.

2.2.21. Исследование Т-клеточного ответа

2.2.21.1. методом ELISpot

Анализ ELISpot проводили с использованием набора Mouse IFN- γ ELISpot Plus (Mabtech, Швеция). Планшеты промывали 4 раза стерильным ФСБ и блокировали средой RPMI с добавлением 10% FBS в течение 30 мин при Тк. Спленоциты высевали в количестве $2,5 \times 10^5$ клеток в лунку. К клеткам добавляли смесь пептидов в концентрации 10 мкг/мл для каждого пептида, или среду для отрицательного контроля, или конканавалин А (ConA) для положительного

контроля. Клетки инкубировали 20 ч при 37°C в атмосфере 5% CO₂, затем плашки отмывали и добавляли первичные биотинилированные антитела против мышиногo IFN-γ, которые проявляли с помощью конъюгата стрептавидина с щелочной фосфатазой и субстрата BCIP/NBT, входящими в набор. При появления чётких спотов в лунке с положительным контролем останавливали окрашивание, промывая планшет дистиллированной водой. После высушивания планшет исследовали визуально с помощью ELISpot-ридера (Carl Zeiss, Германия).

Для стимуляции спленоцитов, выделенных из иммунизированных животных, использовали пулы из пептидов, рестриктируемых молекулами главного комплекса гистосовместимости (MHC) класса I (H2-Dd, H-2-Kd, H-2-Ld) и класса II (H2-IAd, H2-IEd) мышей BALB/c из последовательностей белков S (включая RBD), N, M и E вируса SARS-CoV-2. Пептиды были рассчитаны с помощью инструментов IEDB Analysis Resource и синтезированы компанией AtaGenix Laboratories (Китай), чистота пептидов составила более 80% (табл. 2 и 3).

2.2.21.2. методом ICS

Для исследования спленоцитов методом окрашивания внутриклеточных цитокинов (ICS) клетки высевали в 96-луночные круглодонные планшеты (JET BIOFIL, Китай) в количестве 5×10^5 клеток в лунку и добавляли смесь пептидов (20 мкг/мл для каждого пептида), или среду (для отрицательного контроля), или смесь митогенов (ФМА (30 нг/мл) и иономицин (1 мкг/мл) для положительного контроля).

Клетки инкубировали в течение 3 часов при 37°C в 5% CO₂ и в течение дополнительных 15 часов с брефельдином А (5 мкг/мл, GolgiPlug BD Biosciences). На следующий день клетки промывали и окрашивали анти-CD3 Alexa Fluor 700 (клон 500A2, Biolegend, США), анти-CD4 BV785 (клон GK1.5, Biolegend, США) и анти-CD8 FITC (клон 53-6.7, Biolegend, США). Фиксировали клетки с использованием 1% раствора параформальдегида в течение 10 мин (Тк), затем отмывали и повышали проницаемость клеток 0,2% раствором Tween-20 в

течение 10 мин (Тк). После проводили окрашивание цитокинов анти-IFN- γ APC (клон XMG1.2, Biolegend, США), анти-IL-2 BV 421 (клон JES6-5H4, Biolegend, США), анти-TNF- α PE (клон MP6-XT22, Biolegend, США) и анти-IL-4 BV 605 (клон 11B11, Biolegend, США). Спустя 20 мин клетки промывали, растворяли в 1% растворе параформальдегида и инкубировали 20 мин с последующим анализом на проточном цитофлуориметре ZE5 (Bio-Rad, США) с использованием программы Everest.

2.2.22. Исследование протективного ответа на модели лабораторных животных

На 35-й день после начала эксперимента проводили заражение животных интраназально дозой 50 ИД₅₀ вируса SARS-CoV-2 штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021, относящийся к линии P.1 (Гамма-вариант). На четвёртые сутки после заражения животных выводили из эксперимента и определяли вирусную нагрузку в тканях лёгких методом ПЦР-РВ. Для этого из тканей лёгких приготавливали 10% гомогенат в 1 мл среды DMEM, откуда отбирали аликвоты, из которых набором «РИБО-преп» («АмплиСенс», Россия) выделяли РНК с дальнейшим синтезом кДНК реагентами «Реверта-L» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Специфическую амплификацию фрагментов проводили с использованием набора «Вектор-ПЦРРВ-COVID19-RG» (ГНЦ ВБ «Вектор», Россия) в соответствии с рекомендациями производителя. Протективность оценивали по пороговому циклу обнаружения вирусной РНК в индивидуальных образцах.

2.2.23. Графическая и статистическая обработка результатов

Полученные данные были проанализированы с помощью программного обеспечения GraphPadPrism 6.0. Данные ИФА и вируснейтрализующего анализа представлены в виде медиан и средних значений обратных титров с полным разбросом. Данные ELISpot представлены в виде медиан и средних значений количества спотообразующих единиц на 1 млн спленоцитов с полным разбросом. Данные ICS представлены в виде медиан и средних значений процентов цитокин-продуцирующих CD4⁺ или CD8⁺ клеток среди Т-

лимфоцитов с полным разбросом. Данные вирусной нагрузки представлены как медианные и средние значения пороговых циклов обнаружения вирусной РНК с полным разбросом.

Статистические различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни, при $p < 0.05$ различия считали статистически значимыми.

Рисунки выполнены с использованием ресурса со свободным доступом biorender.com.

3. Результаты и обсуждение

Данный раздел представлен в виде двух частей. Первая часть посвящена конструированию комбинированной вакцины CCV-RBD, содержащей в качестве ядра плазмиду pVAXrbd, кодирующую рецепторсвязывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2, и рекомбинантный белок RBD на поверхности, а также изучению физико-химических и иммуногенных свойств данной конструкции и её компонентов. Вторая часть посвящена конструированию и исследованию свойств ДНК-вакцины, кодирующей искусственный полиэпитопный иммуноген, спроектированный на основе белков S, N, M и E вируса SARS-CoV-2.

3.1. Комбинированная ДНК/белковая вакцина

3.1.1. Дизайн pVAXrbd, кодирующей рецепторсвязывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2

Для дизайна первого иммуногена была использована использовали последовательность, кодирующую рецепторсвязывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2, опубликованную в GenBank (320V–542N, MN908947). Данный белок был выбран в качестве иммуногена, поскольку было показано, что большинство эпитопов нейтрализующих антител находится непосредственно в данном домене, что делает его и белок S (или спайковый белок, или белок шипа) в целом удобными мишенями для создания средств вакцинопрофилактики (Ju B. *et al*, 2020; Liu L. *et al*, 2020; Quinlan B.D. *et al*, 2020; Ravichandran S. *et al*, 2020; Rogers T.F. *et al*, 2020; Shi R. *et al*, 2020; Yu J. *et al*, 2020). Для обеспечения эффективного транспорта белка RBD из клетки в его состав была введена сигнальная последовательность, являющаяся гибридом лидерных последовательностей двух активно секретируемых белков: люциферазы и фиброина. Для оптимизации состава кодонов, а также вторичной структуры РНК для эффективной экспрессии в клетках млекопитающих использовали программу GeneOptimizer (<https://www.thermofisher.com/ru/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html>).

Полученную нуклеотидную последовательность синтезировали в ООО “ДНК-синтез” (Москва, Россия) и клонировали в составе вектора pVAX1 под ранний

промотор цитомегаловируса человека (CMV). После подтверждения структуры конструкции секвенированием по методу Сэнгера в ЦКП «Геномика» (Новосибирск, Россия) её обозначили как pVAXrbd (рис. 2).

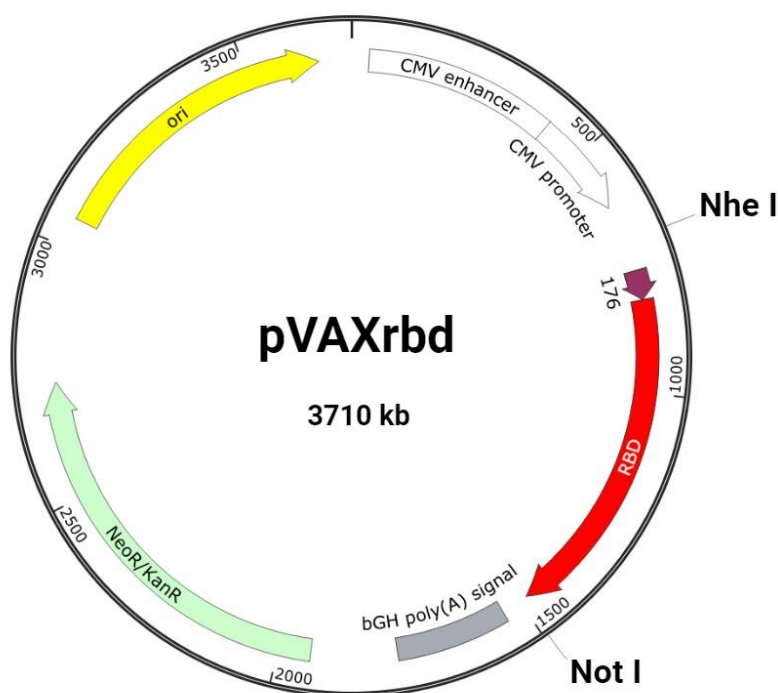


Рис. 2. Генетическая карта плазмиды pVAXrbd. Обозначения: ori – точка начала репликации; CMV enhancer/promoter – энхансер и промотор цитомегаловируса человека, обеспечивающие экспрессию белка в эукариотических клетках; bGH poly(A) (bovine growth hormone polyadenylation) – терминальная последовательность, обеспечивающая экспрессию белка в эукариотических клетках; NeoR/KanR – ген устойчивости к неомицину и канамицину; RBD – целевой ген; 176 – лидерная последовательность.

3.1.2. Оценка экспрессии целевого гена

Для оценки экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей RBD, в эукариотической системе трансфицировали полученной плазмидой клетки линии НЕК293Т. Наличие экспрессии определяли как на уровне мРНК с помощью ОТ-ПЦР, так и на уровне белка с помощью иммуноблотинга. Для проведения обратной транскрипции и ПЦР в одной пробирке из трансфицированных клеток НЕК293Т выделяли тотальную РНК и использовали набор фирмы Биолабмикс (Новосибирск, Россия), содержащий транскриптазу

M-MuLV-RN, лишённую активности РНКазы H, и HS-Taq ДНК-полимеразу. С помощью специфических праймеров была получен продукт, размер которого соответствовал размеру последовательности, кодирующей RBD (750 п.о.), см. рис. 3а. Для выявления белкового продукта лизаты трансфицированных клеток и культуральные среды, в которых они росли, исследовали с использованием сывороток мышей, иммунизированных вирусом SARS-CoV-2. Белок RBD был выявлен как в лизате клеток, так и в культуральной среде, что говорит о высокой степени продукции и секреции белка (рис. 3б).

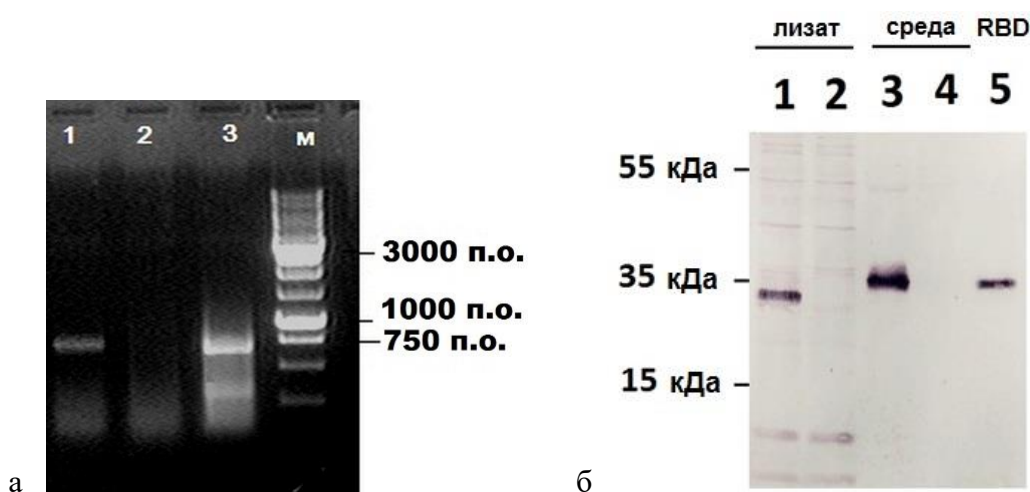


Рисунок 3. Оценка экспрессии целевого гена в эукариотической клеточной культуре НЕК293Т. (а) Электрофоретический анализ продуктов ОТ-ПЦР в 1%-ном агарозном геле. Дорожки 1 и 2 – продукты, полученные из суммарной РНК клеток, трансфицированных pVAXrbd и pVAX соответственно; дорожка 3 – продукт, полученный с помощью ПЦР из плазмиды pVAXrbd, кодирующей RBD, в качестве положительного контроля. М – маркер молекулярных масс ДНК М12 (“СибЭнзим”, Россия). (б) Анализ экспрессии белка RBD в клетках НЕК293Т, трансфицированных pVAXrbd и pVAX, методом вестерн-блота. Дорожки 1 и 2 – лизат клеток, трансфицированных pVAXrbd и pVAX соответственно; 3 и 4 – культуральная среда клеток, трансфицированных pVAXrbd и pVAX соответственно; 5 – рекомбинантный белок RBD.

3.1.3. Получение комплексов ДНК с полимерными конъюгатами и изучение их характеристик

Несмотря на то, что ДНК-вакцины демонстрируют способность индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет, основной проблемой их

использования является их низкая иммуногенность, особенно при применении на людях. Большое количество исследований направлено на разработку стратегий, улучшающих иммуногенность ДНК-вакцин. Помимо генной оптимизации и введения в состав иммуногена различных вспомогательных последовательностей, кодирующих к примеру «генетические адъюванты» или содержащих энхансеры и промоторы, для повышения иммуногенности ДНК-вакцин используется широкий спектр приёмов, включающих «упаковку» ДНК в липосомы или другие полимеры, а также применение физических устройств типа струйных инжекторов или электропораторов.

3.1.3.1. Выбор и синтез полимерных конъюгатов

Катионный полимер полиглюкин-спермидин был использован ранее в качестве средства доставки ДНК-вакцин против таких заболеваний, как Эбола и ВИЧ-1 (Karpenko L.I. *et al*, 2004; Karpenko L.I. *et al*, 2007; Karpenko L.I. *et al*, 2020). Полиглюкин-спермидин (PGS) готовится из декстрана, активированного по альдегидным группам, и спермидина, который является полиамином и ковалентно связывается с полиглюкином. Важно, что компоненты получаемого полимера биоразлагаемы и безопасны для человека, животных и окружающей среды. Полиглюкин – полимер глюкозы с молекулярной массой 40 000 – не токсичен для человека и является лицензированным плазмозамещающим препаратом гемодинамического действия, восстанавливающим объём циркулирующей крови. Спермидин — это природный полиамин, содержащийся во всех живых организмах; он важен для поддержания клеточного гомеостаза и участвует во многих биологических процессах, включая рост и пролиферацию клеток, стабилизацию ДНК и РНК, ферментативную модуляцию и регуляцию трансляции. Низкая стоимость, безопасность и возможность лиофилизации с длительным хранением при 4°C дают дополнительные технологические преимущества при производстве и транспортировке вакцинных препаратов, содержащих PGS (Bolhassani A. *et al*, 2014). Учитывая вышеперечисленное, полиглюкин-спермидин был выбран в качестве средства доставки ДНК-вакцины pVAXrbd.

Кроме того, активированные альдегиды декстрана способны ковалентно соединяться с аминокруппами в составе белковых молекул, благодаря чему был синтезирован конъюгат PGS с рекомбинантным белком RBD (PGS-RBD), который также использовали в качестве средства доставки ДНК-вакцины pVAXrbd. Присоединение белка к полиглюкин-спермидину наблюдали по изменению выхода фракции из гель-фильтрующей колонки и «размытию» бэнда белка в 15% PAGE электрофорезе в денатурирующих условиях (рис. 4а). Наличие белка в структуре также было подтверждено с помощью ультрафиолетовой (УФ) спектроскопии: белок RBD и конъюгат PGS-RBD имели характерный для белков пик поглощения при 280 нм (рис. 4б, стрелки 2 и 3).

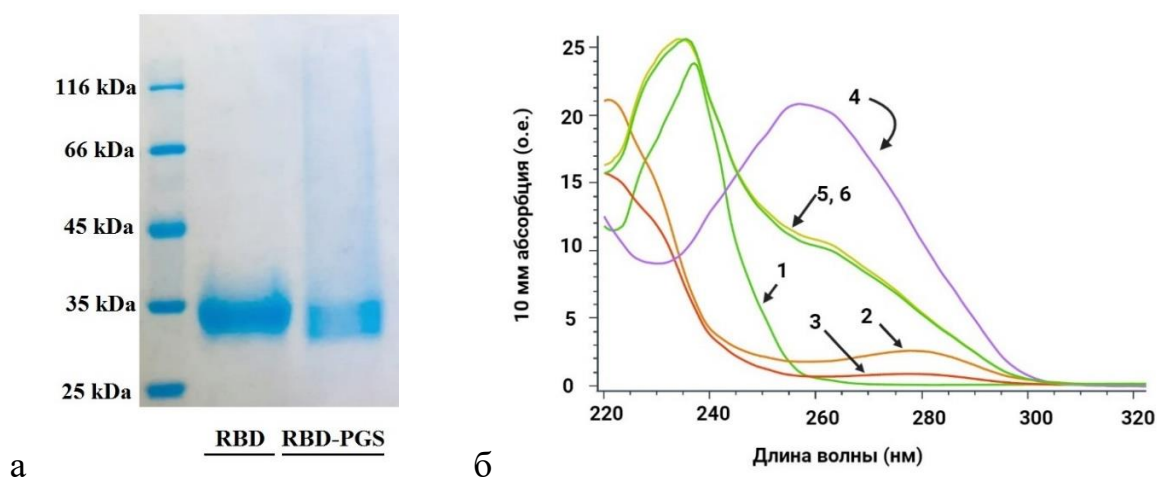


Рисунок 4. Исследование конъюгата PGS-RBD. (а) Электрофорез белка RBD и конъюгата PGS-RBD в 15% PAGE в денатурирующих условиях. (б) УФ-спектры комплексов CCV-RBD и pVAXrbd-PGS, а также их компонентов. 1 – PGS; 2 – белок RBD; 3 – PGS-RBD; 4 – плазида pVAXrbd; 5 и 6 – частицы CCV-RBD и pVAXrbd-PGS соответственно.

3.1.3.2. Сборка частиц

Оптимальное соотношение масс компонентов для формирования комплексов ДНК–полимер подбирали на основании результатов анализа степени комплексообразования, полученных ранее (Karpenko L.I. *et al*, 2020). Соотношение масс ДНК:PGS для образования комплексов (рис. 5а) составило 1:10. Для формирования комплексов, включающих pVAXrbd и PGS-RBD (далее такой комплекс будет называться CCV-RBD, что расшифровывается как CombiCoronaVac-RBD (рис. 5б)), сначала смешивали компоненты в массовом

соотношении ДНК:белок – 2:1, а затем добавляли избыток PGS в массовом соотношении 1:10 относительно ДНК. Формирование самоорганизующихся частиц оценивали по смещению их подвижности в агарозном геле: инкапсулированные плазмиды теряли свою подвижность в электрическом поле (рис. 5в).

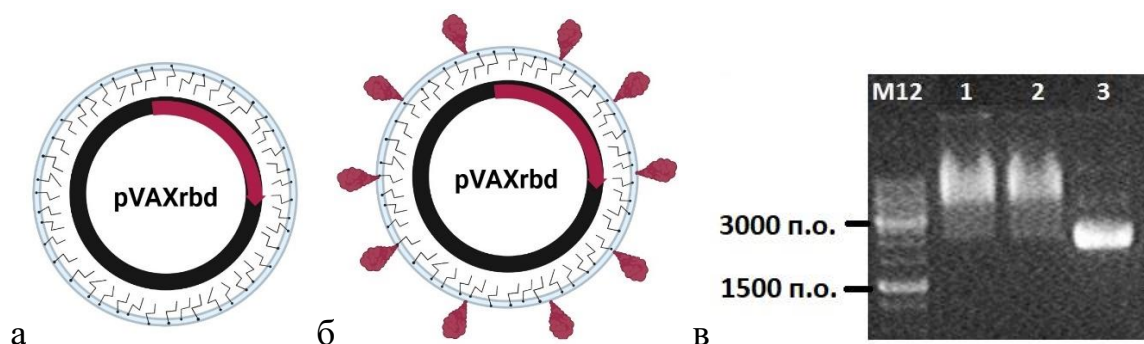


Рисунок 5. Сборка частиц. (а) Схематическое изображение частицы pVAXrbd-PGS. (б) Схематическое изображение частицы CCV-RBD. (в) Подтверждение инкапсуляции ДНК в оболочке PGS и PGS-RBD с помощью электрофореза в 1% агарозном геле: 1 – CCV-RBD; 2 – pVAXrbd-PGS; 3 – «голая» плаزمида pVAXrbd; M12 – маркер молекулярных масс ДНК M12 (“СибЭнзим”, Россия).

Сохранение структуры ДНК плазмиды в комплексах CCV-RBD и pVAXrbd-PGS также показано с помощью УФ-спектроскопии (рис. 4б, стрелки 4, 5 и 6 соответственно): спектры данных препаратов имеют характерный для ДНК пик при 260 нм.

Сравнительный размер сформированных частиц был проведён методом гель-фильтрации на колонке с Сефарозой CL-2В. На хроматограмме, представленной на рисунке 6а, видно, что наибольшим размером обладают частицы CCV-RBD, несущие на своей поверхности белок RBD. Показано, что конструкция pVAXrbd-PGS также обладает бóльшим размером по сравнению с исходной плазмидной ДНК (рис. 6а).

С помощью электронной микроскопии (рис. 6б) было показано, что размеры частиц находятся в диапазоне 50-200 нм.

Ряд исследователей предполагает, что наночастицы подобных размеров оптимальны для создания вакцин, поскольку они накапливаются в В-клеточных фолликулах и вызывают сильный иммунный ответ (Singh A., 2021).

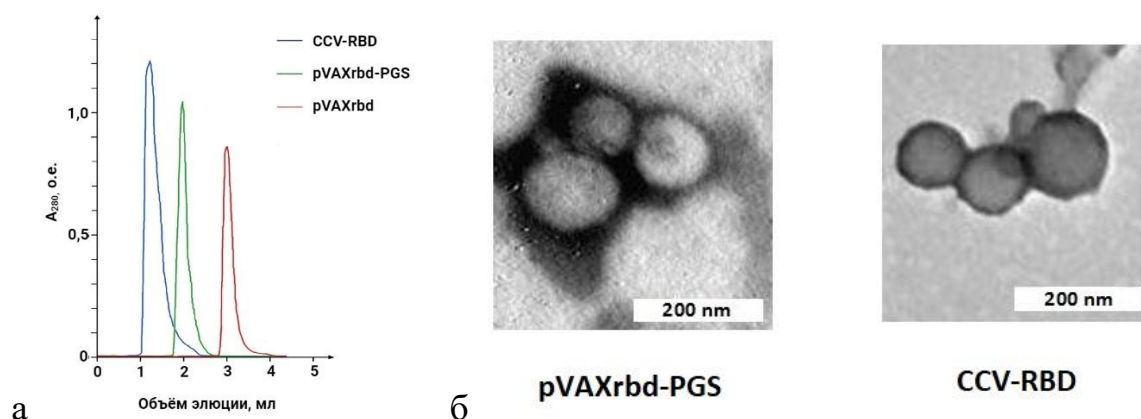


Рисунок 6. Оценка размеров частиц. (а) Гель-фильтрация на колонке Sepharose CL-6B (хроматографический профиль). Синяя линия – CCV-RBD; зеленая линия – pVAXrbd-PGS; красная линия – плазмида pVAXrbd. (б) Электронные микрофотография частиц pVAXrbd-PGS и CCV-RBD.

3.1.3.3. Измерение кинетики связывания RBD свободного и в составе частиц

Для оценки изменения кинетики связывания RBD в составе частиц CCV-RBD с известным МКА iB14 было проведено исследование с помощью биослойной интерферометрии, выполненной на приборе Octet K2 (Pall Fortebio, USA). Константы диссоциации RBD и частиц CCV-RBD с iB14 показали близкие значения ($1,47E-10$ М и $6,60E-11$ М). Это позволяет предполагать экспонирование белка на поверхности частиц (рис. 7), что потенциально может значительно усилить RBD-специфический гуморальный иммунный ответ.

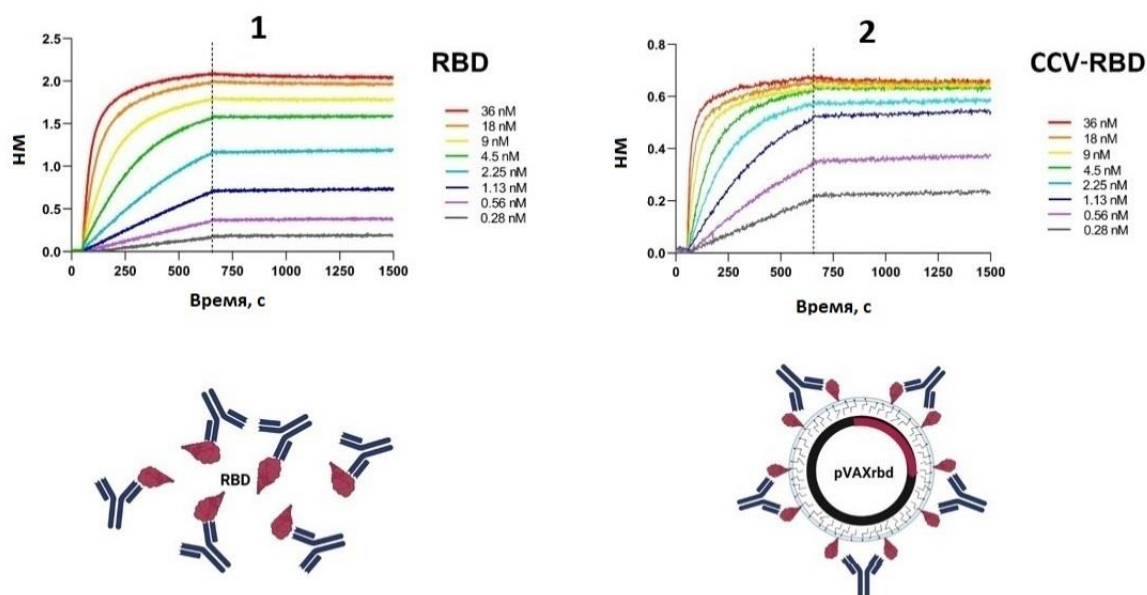


Рисунок 7. Связывание RBD (1) и CCV-RBD (2) с iB14, нейтрализующими SARS-CoV-2 антителам, в исследовании с помощью Octet K2. Внизу – схематическое представление взаимодействия белка RBD и частиц CCV-RBD с антителом iB14.

3.1.4. Исследование иммуногенности полученных препаратов

Для оценки иммуногенности созданных конструкций использовали самок мышей BALB/c массой 16–18 г. Мышей разделили на группы по 8 животных в каждой и иммунизировали следующим образом: группа CCV-RBD – комбинированной вакциной, содержащей 100 мкг ДНК и 50 мкг белка; группа pVAXrbd-PGS – 100 мкг плазмиды pVAXrbd, инкапсулированной в оболочку из PGS; группа pVAXrbd – 100 мкг «голой» ДНК-вакцины; группа RBD – 50 мкг белка RBD. В группе intact были не иммунизированные животные. Мышей иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом три недели в бедро задней конечности. Спустя 10 дней после второй иммунизации у животных были взяты кровь и селезёнки для исследования вирус-специфического иммунного ответа (рис. 8).

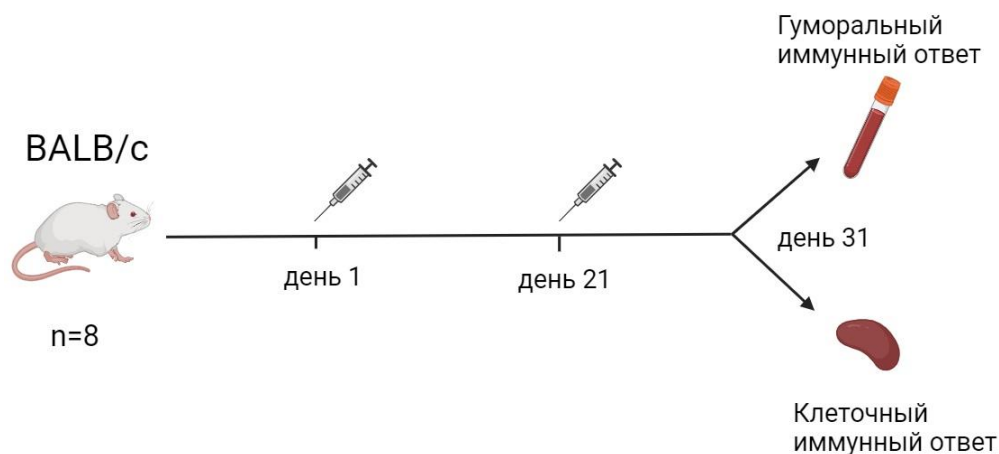


Рисунок 8. Схема проведения иммунизации и забора образцов. Нарисовано с помощью biorender.com

3.1.4.1. Гуморальный иммунный ответ

Сыворотки животных были исследованы с помощью ИФА с использованием двух антигенов: рекомбинантных белков RBD и S. В группе, иммунизированной ДНК-конструкцией pVAXrbd, титр специфических IgG составил 1:2617; в группе, которая получала плазмиду в комплексе с PGS, этот показатель достиг значения 1:43250, а в группе, получавшей комбинированный препарат, было показано наиболее высокое значение – 1:369900. Одна из контрольных групп получала белок RBD, среднее значение RBD-специфических титров для неё составило 1:23406 (рис. 9а). Таким образом, комбинирование ДНК- и белкового иммуногена привело к синергичному усилению RBD-специфического гуморального иммунного ответа по сравнению с введением отдельных компонентов: 17-кратно относительно только белка ($p < 0.01$), 140-кратно относительно «голой» ДНК ($p < 0.01$) и 8-кратно относительно ДНК, завернутой в PGS ($p < 0.05$). По результатам RBD-специфического ИФА в конечной точке эксперимента можно заключить, что использование конъюгата полиглокин-спермидина с белком RBD в качестве средства доставки ДНК-вакцины приводит к индукции высоких титров специфических антител у животных.

Данный эффект наблюдался также и при исследовании сывороток на специфичность к полноразмерному S-белку вируса SARS-CoV-2. Увеличение

титров S-специфичных антител в группе, получившей комбинированный препарат, составило 93-кратную разницу относительно группы, получившей белок RBD ($p < 0.01$), 686-кратную – относительно группы, иммунизированной «голой» ДНК ($p < 0.01$) и 24-кратную – относительно группы, получившей ДНК-конструкцию, завернутую в PGS ($p < 0.01$) (рис 9б).

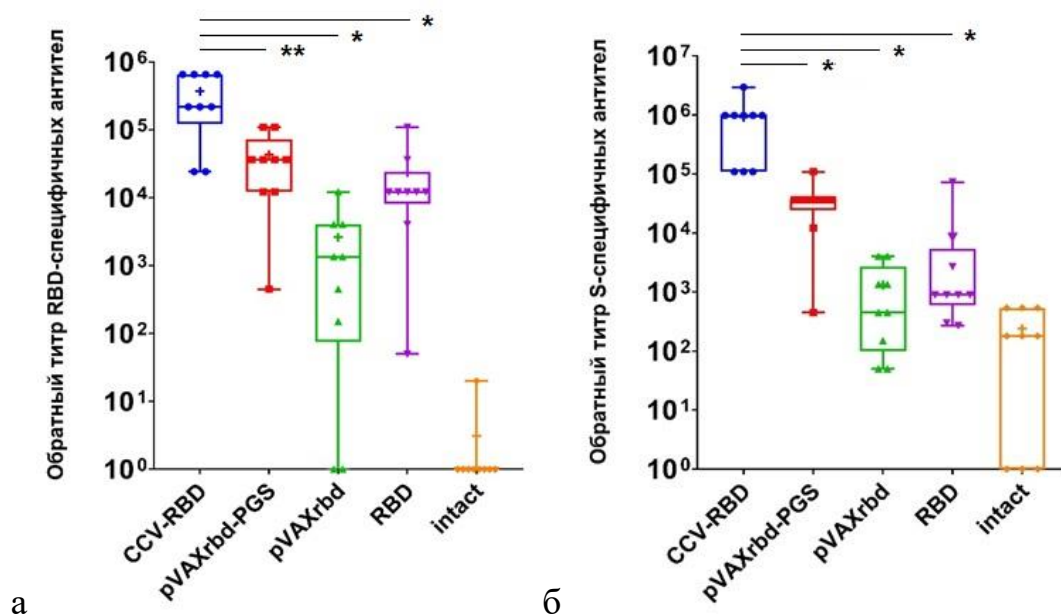


Рисунок 9. Титры специфических антител IgG к RBD (а) и S (б) SARS-CoV-2 в сыворотках мышей, иммунизированных CCV-RBD, pVAXrbd-PGS, pVAXrbd и белком RBD, определяли с помощью ИФА. Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

Ещё более ярко эффект синергизма проявился при исследовании вируснейтрализующей активности сывороток, которая считается одним из наиболее важных критериев эффективности вакцины. Сыворотки всех групп животных, кроме интактных мышей и мышей, иммунизированных «голой» pVAXrbd, продемонстрировали способность нейтрализовать штамм nCoV/Victoria/1/2020 вируса SARS-CoV-2 на культуре клеток *in vitro* в реакции вирус-нейтрализации. Однако в группе CCV-RBD средний нейтрализующий

титр составил 1:133, что достоверно выше титров, показанных в группах pVAXrbd-PGS и RBD (1:36 и 1:22) ($p < 0.05$) (рис. 10).

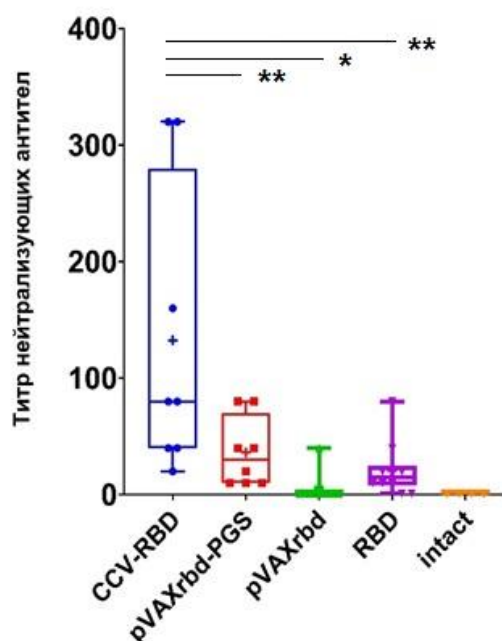


Рисунок 10. Вируснейтрализующую активность сывороток мышей, иммунизированных CCV-RBD, pVAXrbd-PGS, pVAXrbd и белком RBD, определяли с использованием штамма SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 (100 TCID₅₀). Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

Наблюдаемый эффект синергизма в отношении гуморального ответа может говорить об эффективном захвате АПК вирусоподобных частиц CCV, а также о стимуляции Т-хелперного ответа за счёт ДНК компонента. Многократное экспонирование белка RBD на поверхности частицы, видимо, также играет роль в усилении гуморального иммунного ответа на CCV-RBD.

Таким образом, было показано, что введение ДНК/белковой вакцины приводит к формированию более сильного гуморального ответа по сравнению с введением отдельных компонентов.

3.1.4.2. Клеточный иммунный ответ

С помощью метода ELISpot оценивали Т-клеточный ответ, выраженный в количестве спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на специфическую

стимуляцию пулом пептидов, входящих в состав белка RBD. Спленоциты были выделены из селезёнок экспериментальных животных. Было показано, что наиболее высокий уровень клеточного иммунитета был зарегистрирован в группах животных, иммунизированных ДНК-вакциной pVAXrbd и комплексом pVAXrbd-PGS (125 и 172 спотообразующих единиц (SFUs) на 1 млн спленоцитов соответственно, рис. 11). В группе, получавшей комбинированную конструкцию, Т-клеточный ответ был ниже: 41 SFUs на 1 млн спленоцитов. Самый низкий клеточный ответ наблюдали в группе мышей, иммунизированных белком RBD (7 SFUs на 1 млн спленоцитов). Полученные данные показывают, что иммунизация рекомбинантным белком RBD не вызывает формирование Т-клеточного ответа у мышей. Более низкий уровень Т-клеточного ответа в группе, получавшей комбинированную вакцину, по сравнению с группами, получавшими ДНК-вакцину, может быть связан с повышенным поглощением антигенпрезентирующими клетками комбинированных частиц и частичным разрушением плазмидной ДНК в лизосомах.

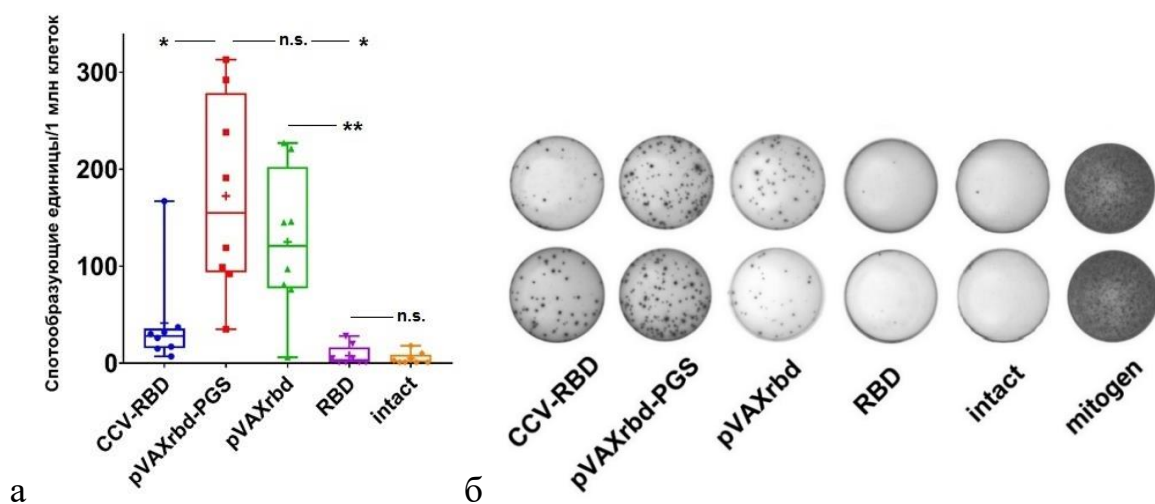


Рисунок 11. Оценка Т-клеточного ответа методом ELISpot. (а) Число спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на специфическую стимуляцию, на 10^6 клеток. Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни. (б) Типичный вид спотов для каждой группы иммунизированных животных.

3.1.4.3. Оценка протективности

Исследование протективности с использованием вируса SARS-CoV-2 штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021, относящийся к линии P.1 (Гамма-вариант), проводили среди мышей, иммунизированных ДНК-вакциной pVAXrbd, комбинированным препаратом, а также конъюгатом PGS-RBD. Заражение проводили через две недели после второй иммунизации, доза интраназального заражения составила 50 ИД₅₀. Через четверо суток после заражения животных выводили из эксперимента и определяли вирусную нагрузку в тканях лёгких. Значения пороговых циклов (Ct) представлены в графическом виде на рисунке 12. Так, в группах, иммунизированных CCV-RBD и pVAXrbd показано достоверное ($p < 0.01$) значительное снижение вирусной нагрузки по сравнению с контролем (3,43 lg и 3,18 lg, соответственно). В группе, иммунизированной белком, также показано снижение вирусной нагрузки, которое, однако, не является статистически значимым (2,79 lg, $p > 0.05$).

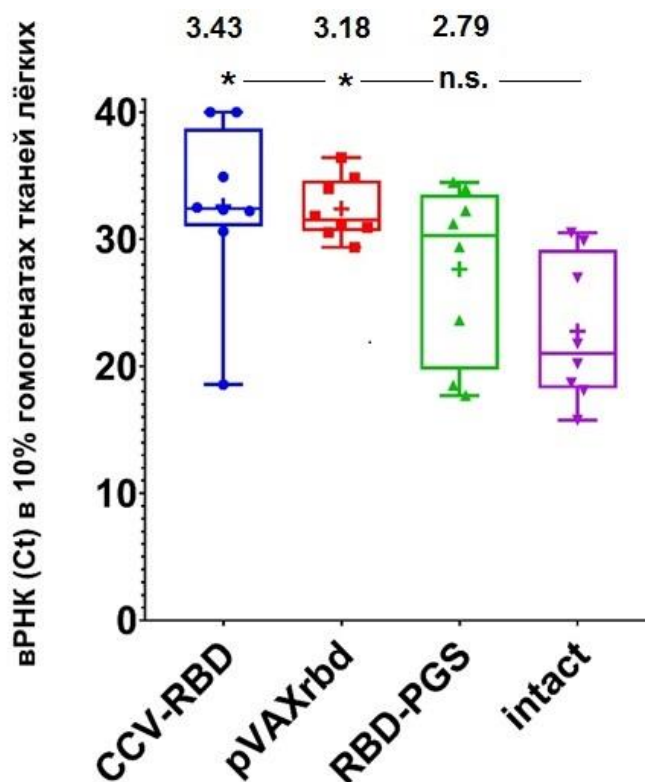


Рисунок 12. Вирусная нагрузка в тканях легких мышей BALB/c на 4-е сутки после заражения Гамма-вариантом SARS-CoV-2. Индивидуальные значения Ct в ПЦР-РВ

представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни, при $p < 0.05$ различия считали статистически значимыми.

Таким образом, кандидатная комбинированная вакцина CCV-RBD обладает несколькими уникальными свойствами. Она объединяет белок RBD и ДНК-вакцину в одной конструкции и представляет собой вирусоподобные частицы за счёт использования конъюгата белка RBD с полиглюкин-спермидином. Такая конструкция проявляет достоинства как ДНК-вакцины (способность индуцировать клеточный ответ), так и рекомбинантного белка (способность индуцировать гуморальный ответ). Иммунизация комбинированной конструкцией приводит к синергическому эффекту в отношении гуморального иммунного ответа. Уровень антител, в том числе нейтрализующих, оказывается выше в несколько раз, чем при иммунизации теми же дозами белка или ДНК отдельно. По-видимому, этот эффект обусловлен размером частиц, мультимерным экспонированием белка RBD на поверхности частицы и Т-хелперной поддержкой, обеспечиваемой ДНК-вакциной. Индуцируемый комбинированной вакциной иммунитет способен защитить животных от повышения вирусной нагрузки в нижних дыхательных путях, что говорит о перспективности подхода, основанного на включении целевых ДНК в состав противовирусных вакцин.

3.2. Искусственный Т-клеточный иммуноген

3.2.1. Дизайн рBSI-COV-Ub, кодирующей искусственный полиэпитопный иммуноген, содержащий эпитопы различных белков вируса SARS-CoV-2

Для дизайна второго иммуногена была применена стратегия, основанная на выборе таких фрагментов белков S, N, М и Е, чтобы они содержали кластеры перекрывающихся эпитопов. Предсказание Т-клеточных эпитопов было

выполнено с использованием программы NetMHCpan-4.1 и базы данных Immune Epitope Database 2.22, IEDB 2.22 (Табл. 4-6).

Для индукции Т-клеточного иммунитета кроме белка шипа S могут быть использованы такие белки, как мембранный белок М, оболочечный белок Е, нуклеопротеин N, неструктурный белок ORF3a (Grifoni A. *et al*, 2020; Tahir Ul Qamar M. *et al*, 2020; Khan M.T. *et al*, 2021; Khairkhah N. *et al*, 2022; Samad A. *et al*, 2022; Sun Z. *et al*, 2022). Поскольку белок шипа вируса SARS-CoV-2 (S-белок) находится под давлением отбора, он обладает изменчивостью, что приводит к быстрому формированию новых вариантов вируса, отличных по данному белку и способных более эффективно ускользать от поствакцинального гуморального иммунитета, направленного на классический вариант. Использование минорных белков может позволить создать продукт, не чувствительный к изменчивости вируса, так как данные белки отличаются более высокой консервативностью (Ferretti A.P. *et al*, 2020; Feng W. *et al*, 2022; Yue C. *et al*, 2023).

Таблица 4. Предсказанные с помощью инструмента IEDB 2.22 Th-эпитопы из белков вируса SARS-CoV-2, рестриктурируемые различными молекулами MHC II мыши BALB/c (чем ниже значение в крайнем правом столбике, тем более сильное связывание между молекулой MHC II и пептидом). В таблице указаны пептиды со значением Adjusted Rank не выше 10.5.

Аллель MHC II	Эпитоп	Adjusted Rank
H2-IEd	DDQIGYYRRATRRIR	0.11
H2-IEd	NYNYLYRLFRKSNLK	0.17
H2-IEd	VKPSFYVYSRVKLN	0.33
H2-IAd	EMIAQYTSALLAGTI	2.80
H2-IEd	ASAFFGMSRIGMEVT	4.35
H2-IEd	QYIKWPWYIWLGFIA	7.05
H2-IEd	CFVLAADVYRINWITG	7.30
H2-IEd	GTWLTYTGAIKLDDK	10.15

Таблица 5. Предсказанные с помощью инструмента NetMHCpan-4.1 CTL-эпитопы из белков вируса SARS-CoV-2, рестриктируемые различными молекулами МНС I мыши BALB/c (чем выше значение в крайнем правом столбике, тем более сильное связывание между молекулой МНС I и пептидом). В таблице указаны пептиды со значением Score выше 0.1.

Аллель МНС I	Эпитоп	Score
H-2-Kd	AYSNNSIAI	0.837637
H-2-Kd	QYIKWPWYI	0.738706
H-2-Kd	YYRRATTRRI	0.414253
H-2-Ld	LPPLLTDEM	0.384921
H-2-Dd	SAPHGVVFL	0.370438
H-2-Ld	WPWYIWLGF	0.355595
H-2-Kd	NWITGGIAI	0.347568
H-2-Ld	TPSGTWLTY	0.32614
H-2-Ld	FPQSAPHGV	0.282244
H-2-Dd	FAPSASAFF	0.242852
H-2-Kd	GFIAGLIAI	0.237561
H-2-Kd	QFAPSASAF	0.218262
H-2-Kd	KHIDAYKTF	0.172696
H-2-Ld	FPRGQGVPI	0.160547
H-2-Ld	NSIAIPTNF	0.148747
H-2-Kd	TWLTYTGAI	0.144436
H-2-Ld	SPDDQIGYY	0.126441
H-2-Ld, H-2-Kd	IAIPTNFTI	0.119486
H-2-Ld	QSAPHGVVF	0.159378
H-2-Kd	NFKDQVILL	0.113114
H-2-Ld	YNYKLPDDF	0.101053

Перечисленные в табл. 4 и 5 пептиды были проанализированы на консервативность для разных штаммов вируса SARS-CoV-2, в частности Ухань, Гамма, Дельта, Омикрон. Для каждого пептида была установлена более чем 87% гомологичность по отношению к белкам указанных штаммов SARS-CoV-2.

Таблица 6. Предсказанные с помощью инструмента NetMHCpan-4.1 CTL-эпитопы из белков вируса SARS-CoV-2, рестриктируемые различными молекулами HLA I. В таблице указаны пептиды со значением Score выше 0.3.

Аллель HLA I	Эпитоп	Фрагмент
HLA-A*03:01, HLA-A*30:01, HLA-A*11:01, HLA-A*31:01	RLFRKSNLK	S1 (418-465)
HLA-A*33:01, HLA-A*31:01	YNYLYRLFR	
HLA-A*02:06, HLA-A*02:01	KLPDDFTGC	
HLA-A*33:01	NYLYRLFRK	
HLA-A*24:02, HLA-A*23:01	NYNYLYRLF	
HLA-A*30:02	SKVGGNYNY	
HLA-A*30:02	VGGNYNYLY	
HLA-B*08:01	YRLFRKSNL	
HLA-B*51:01	LPDDFTGCV	
HLA-A*68:02, HLA-A*02:06, HLA-A*02:01	NIADYNYKL	
HLA-B*51:01, HLA-B*58:01, HLA-B*57:01, HLA-A*02:06,	IAIPTNFTI	S2 (691-720)
HLA-B*35:01, HLA-B*15:01, HLA-A*30:02	LGAENSVAY	
HLA-A*02:06, HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*68:02, HLA-A*32:01, HLA-B*08:01	SIIAYTMSL	
HLA-B*58:01, HLA-B*57:01, HLA-A*26:01, HLA-B*35:01, HLA-B*53:01	NSIAIPTNF	
HLA-A*68:02	SVAYSNNNSI	
HLA-A*01:01, HLA-A*30:02, HLA-B*35:01, HLA-B*58:01, HLA-A*26:01, HLA-B*57:01	LTDEMIAQY	S3 (857-893)

HLA-B*57:01, HLA-B*58:01, HLA-B*53:01	LAGTITSGW	
HLA-B*57:01, HLA-B*58:01, HLA-A*32:01, HLA-B*15:01	GTITSGWTF	
HLA-A*02:01, HLA-A*02:03	GLTVLPPLL	
HLA-B*35:01	LPPLLTDEM	
HLA-A*02:03, HLA-A*68:02, HLA-B*07:02, HLA-B*08:01	MIAQYTSAL	
HLA-B*08:01	AQYTSALLA	
HLA-A*11:01, HLA-A*03:01, HLA-A*68:01, HLA-A*30:01,	VTYVPAQEK	
HLA-B*51:01, HLA-B*07:02, HLA-B*35:01, HLA-B*53:01	FPQSAPHGV	
HLA-A*02:06, HLA-A*02:03, HLA-A*02:01, HLA-A*68:02, HLA-B*51:01	VVFLHVITYV	S4 (1048-1073)
HLA-A*02:03, HLA-A*02:01, HLA-A*02:06	HLMSFPQSA	
HLA-B*58:01, HLA-B*57:01, HLA-B*15:01, HLA-B*35:01, HLA-A*32:01	QSAPHGVVF	
HLA-B*15:01, HLA-A*30:02	GVVFLHVITY	
HLA-A*68:01	MSFPQSAPH	
HLA-B*44:03, HLA-B*44:02	QELGKYEYQY	
HLA-A*24:02, HLA-A*23:01	QYIKWPWYI	
HLA-B*44:03, HLA-B*44:02	YEQYIKWPW	S5 (1192-1233)
HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*02:01, HLA-A*68:02	FIAGLIAIV	
HLA-B*57:01, HLA-A*32:01	YIKWPWYIW	

HLA-A*02:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06	NLNESLIDL	E (50-75)
HLA-A*31:01, HLA-A*30:01, HLA-A*03:01, HLA-A*68:01, HLA-A*33:01	RVKNLNSSR	
HLA-B*08:01, HLA-A*02:03, HLA-A*02:06, HLA-A*02:01, HLA-A*68:02	YVYSRVKNL	
HLA-B*15:01, HLA-A*30:02, HLA-B*57:01, HLA-B*35:01, HLA-A*26:01, HLA-A*30:01, HLA-A*32:01	LVKPSFYVY	
HLA-A*02:01, HLA-A*02:06, HLA-A*02:03, HLA-A*68:02	SLVKPSFYV	
HLA-A*30:01	SFYVYSRVK	
HLA-A*30:01	SSRVPDLLV	
HLA-B*57:01, HLA-B*58:01, HLA-B*53:01	LAAVYRINW	M1 (61-90)
HLA-A*02:06, HLA-A*02:01	FVLAAVYRI	
HLA-A*33:01	CFVLAAVYR	
HLA-A*01:01, HLA-A*30:02, HLA-B*57:01, HLA-A*11:01, HLA-B*58:01, HLA-A*26:01, HLA-B*15:01, HLA-A*03:01	ATSRTLSTYY	M2 (166-196)
HLA-B*35:01, HLA-A*30:02, HLA-B*15:01, HLA-A*01:01, HLA-B*57:01, HLA-B*58:01	VATSRTLSTY	
HLA-A*30:01, HLA-A*11:01, HLA-A*68:01, HLA-A*31:01, HLA-A*03:01	TSRTLSTYYK	
HLA-A*01:01, HLA-A*30:02	AGDSGFAAY	
HLA-A*33:01, HLA-A*31:01	YYKLGASQR	

HLA-B*57:01, HLA-B*58:01	ITVATSRTL	
HLA-B*07:02, HLA-B*51:01, HLA-B*35:01	FPRGQGVPI	N1 (66-100)
HLA-B*35:01, HLA-A*01:01, HLA-B*53:01,	SPDDQIGYY	
HLA-A*01:01, HLA-A*26:01, HLA-A*30:02	SSPDDQIGY	
HLA-A*31:01, HLA-A*33:01	GYRRATR	
HLA-A*31:01, HLA-A*33:01	IGYYRRATR	
HLA-A*24:02	YYRRATRI	
HLA-A*11:01, HLA-A*03:01, HLA-A*30:01, HLA-A*31:01, HLA-A*68:01	KTFPPTEPK	
HLA-B*35:01, HLA-B*53:01	TPSGTWLTY	
HLA-B*44:03, HLA-B*44:02	MEVTPSGTW	
HLA-B*15:01, HLA-A*30:02, HLA-A*01:01	LLNKHIDAY	
HLA-A*11:01, HLA-A*68:01, HLA-A*31:01, HLA-A*03:01	ASAFFGMSR	
HLA-A*24:02, HLA-A*23:01, HLA-B*35:01, HLA-B*15:01	QFAPSASAF	
HLA-A*02:03, HLA-A*02:01	GMSRIGMEV	
HLA-B*51:01	DPNFKDQVI	
HLA-A*02:06, HLA-A*02:03	AQFAPSASA	
HLA-A*02:01, HLA-A*32:01	KLDDKDPNF	
HLA-B*51:01, HLA-A*68:02	SAFFGMSRI	
HLA-A*68:02	EVTPSGTWL	
HLA-A*23:01, HLA-A*24:02	KHIDAYKTF	

HLA-B*08:01	NFKDQVILL	
HLA-B*35:01	FAPSASAFF	
HLA-A*68:02	LTYTGAIKL	

Стоит отметить, что фрагменты, выбранные для включения в итоговую конструкцию, содержали также эпитопы, рестриктурируемые широким спектром HLA I и HLA II, подтвердившие иммунодоминантность в исследовании SARS-CoV-2-специфичного клеточного иммунитета у людей и являющиеся консервативными для разных вариантов вируса (Safavi A. *et al*, 2020; Bhattacharya M. *et al*, 2021; Mahajan S. *et al*, 2021). После объединения фрагментов в одну последовательность к её N-концу добавили универсальный Т-хелперный эпитоп PADRE, а к С-концу – маркерный эпитоп EPFRDYVDRFYKTLR из белка р24 ВИЧ-1, узнаваемый моноклональными антителами 29F2. Проектирование нуклеотидной последовательности, соответствующей сконструированной аминокислотной последовательности, получившей название BSI-COV (рис. 13), провели с учётом кодонов, обеспечивающих эффективную экспрессию в клетках млекопитающих, используя программу Jcat (<http://www.jcat.de>). Полученный ген был синтезирован и клонирован в составе векторной плазмиды pVAX1, конструкция получила название pBSI-COV (рис. 14a).



Рисунок 13. Аминокислотные фрагменты белков вируса SARS-CoV-2, выбранные для включения в последовательность полиэпитопного иммуногена BSI-COV.

В ряде исследований было показано, что присоединение убиквитина к белковому иммуногену способствует нацеливанию его на протеасому, что приводит к эффективному процессингу, высвобождению пептидов-эпитопов, которые презентуются МНС I на поверхности антигенпрезентирующей клетки и способствуют активации цитотоксических Т-лимфоцитов (Wang Q. *et al*, 2012; Reguzova A. *et al*, 2015; Zhuo M. *et al*, 2015), а также в результате кросс-презентации активируют Т-хелперы. Таким образом, индуцируется вирус-специфический клеточный иммунный ответ, опосредованный CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитами. С помощью ДНК-матрицы, содержащей последовательность, кодирующую убиквитин, специфических праймеров и ПЦР в состав иммуногена был введён убиквитин, соответствующая плаزمиды была названа pBSI-COV-Ub (карта представлена на рис. 146).

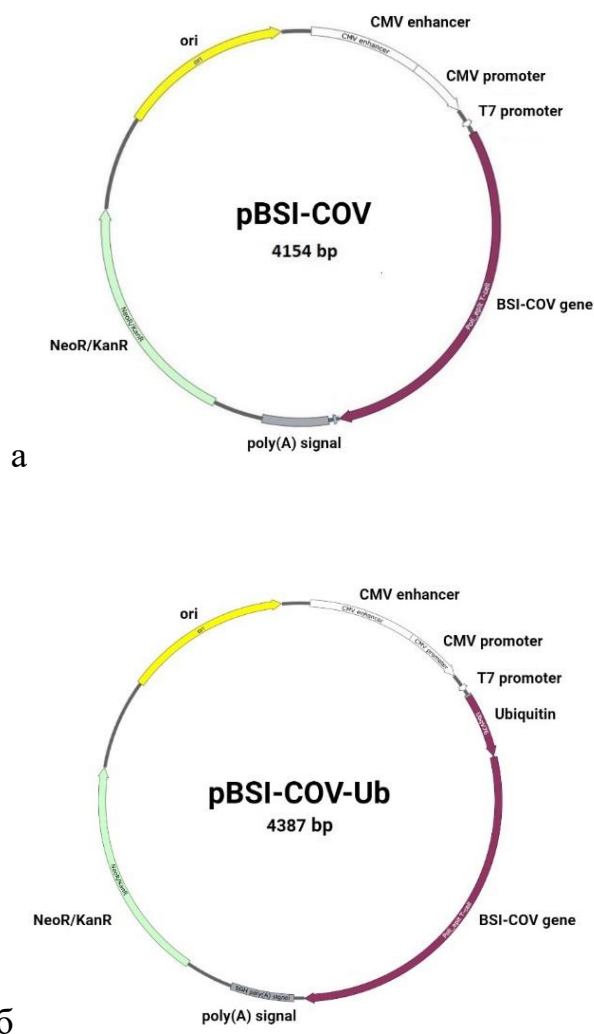


Рис. 14. Генетические карты плазмид pBSI-COV (а) и pBSI-COV-Ub (б). Обозначения: ori – точка начала репликации; CMV enhancer/promoter – энхансер и промотор цитомегаловируса человека, обеспечивающие экспрессию белка в эукариотических клетках; bGH poly(A) (bovine growth hormone polyadenylation) – терминальная последовательность, обеспечивающая экспрессию белка в эукариотических клетках; NeoR/KanR – ген устойчивости к неомицину и канамицину; BSI-COV – целевой ген, кодирующий полиэпитопный иммуноген; ubiquitin – последовательность, кодирующая убиквитин.

3.2.2. Исследование экспрессии целевых генов

Исследование экспрессии целевых генов проводили с использованием клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами pBSI-CoV и pBSI-CoV-Ub. Через 48 часов после трансфекции из клеток выделяли общую РНК и анализировали на наличие целевой мРНК с помощью ОТ-ПЦР с использованием специфических праймеров к гену bsi-cov. Клеточные лизаты исследовали на

наличие целевых белков с помощью иммуноблотинга. Результаты ОТ-ПЦР представлены на электрофореграмме (рис. 15а), из которой следует, что размеры амплифицированных фрагментов составляют примерно 1250 и 1500 п.о., что соответствует теоретически рассчитанным фрагментам при использовании специфических праймеров. Результаты иммуноблотинга с использованием МКА к маркерному эпитопу представлены на рис. 15б. Полосы, соответствующие белкам с наибольшим весом, соответствуют теоретически рассчитанным продуктам генов *bsi-cov* и *bsi-cov-ub* (46 и 54,5 кДа соответственно). Наличие лесенки из дискретных белков свидетельствует об эффективном процессинге Т-клеточных иммуногенов в клетке.

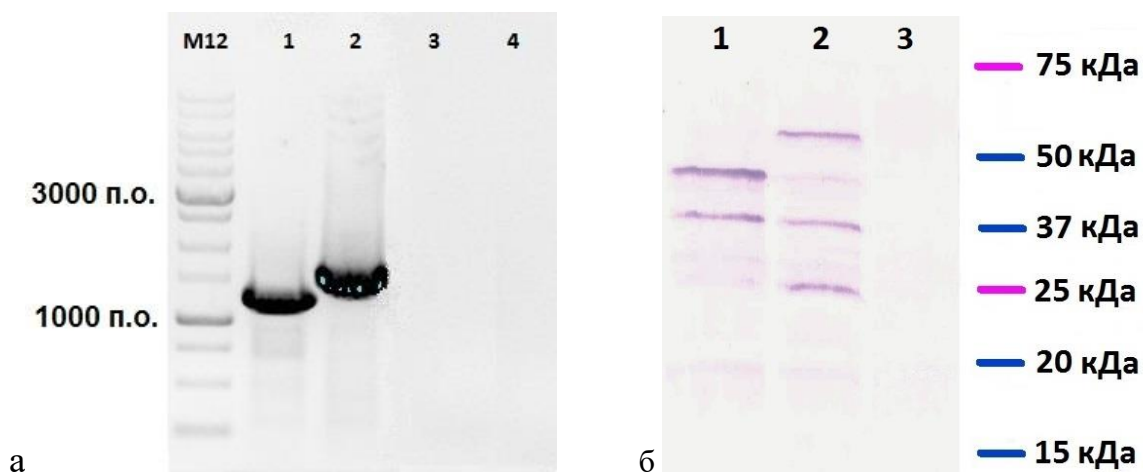


Рисунок 15. Анализ экспрессии целевых генов *pBSI-COV* и *pBSI-COV-Ub* после трансфекции клеток HEK293Т. (а) Продукты ОТ-ПЦР с использованием тотальной РНК клеток HEK-293Т, трансфицированных плазмидами *pBSI-COV* (1) и *pBSI-COV-Ub* (2) (электрофорез в 1% агарозном геле). На дорожках 3 и 4 – продукты ПЦР, поставленных на препаратах тотальной РНК без обратной транскрипции. (б) Белковые продукты, выявленные в клетках HEK293Т, трансфицированных плазмидами *pBSI-COV* (1) и *pBSI-COV-Ub* (2), методом иммуноблота с использованием МКА 29F2 к маркерному эпитопу. На дорожку 3 был нанесён лизат не трансфицированных клеток HEK293Т.

Таким образом, нами были получены две генетические конструкции, кодирующие искусственный полиэпитопный иммуноген с N-концевым убиквитином и без него.

3.2.3. Исследование иммуногенности ДНК-вакцин, кодирующих искусственную полиэпитопную конструкцию

Исследование иммуногенности проводили двумя разными методами определения клеточного ответа: ELISpot и ICS. Животных (мыши BALB/c) разделили на три группы по 7 животных в каждой и иммунизировали следующим образом: группа pBSI-COV – 100 мкг плазмиды pBSI-COV в 50 мкл физиологического раствора; группа pBSI-COV-Ub – 100 мкг плазмиды pBSI-COV-Ub в 50 мкл физиологического раствора; группа intact – не иммунизированные мыши. Мышей иммунизировали дважды внутримышечно (в верхнюю часть бедра задней конечности) в дни 0 и 21 с помощью электропорации. Электропорацию проводили с использованием электропоратора CUY21 EDIT II и электродов-пинцетов LF650P5 диаметром 5 мм (BEX CO, LTD., Япония) с предваряющей общей анестезией 2,5% изофлураном. Спустя 10 дней после второй иммунизации у животных были взяты селезёнки для исследования иммунного ответа. Исследование гуморального иммунного ответа не проводили, поскольку искусственный иммуноген BSI-COV не содержит В-клеточных эпитопов.

3.2.3.1. Клеточный иммунный ответ

Т-клеточный иммунный ответ оценивали с помощью двух методов: ELISpot и ICS. Данные IFN- γ -ELISpot показали, что после двукратной иммунизации наблюдается формирование Т-клеточного иммунитета у мышей, которым вводили вакцинные конструкции. Так, в группе, иммунизированной pBSI-COV, среднее количество Т-лимфоцитов, секретирующих IFN- γ , в расчёте на 10^6 спленоцитов составляло 315, а в группе, иммунизированной pBSI-COV-Ub, – 375 (рис.16). Значения в опытных группах достоверно отличались от значений в контрольной группе.

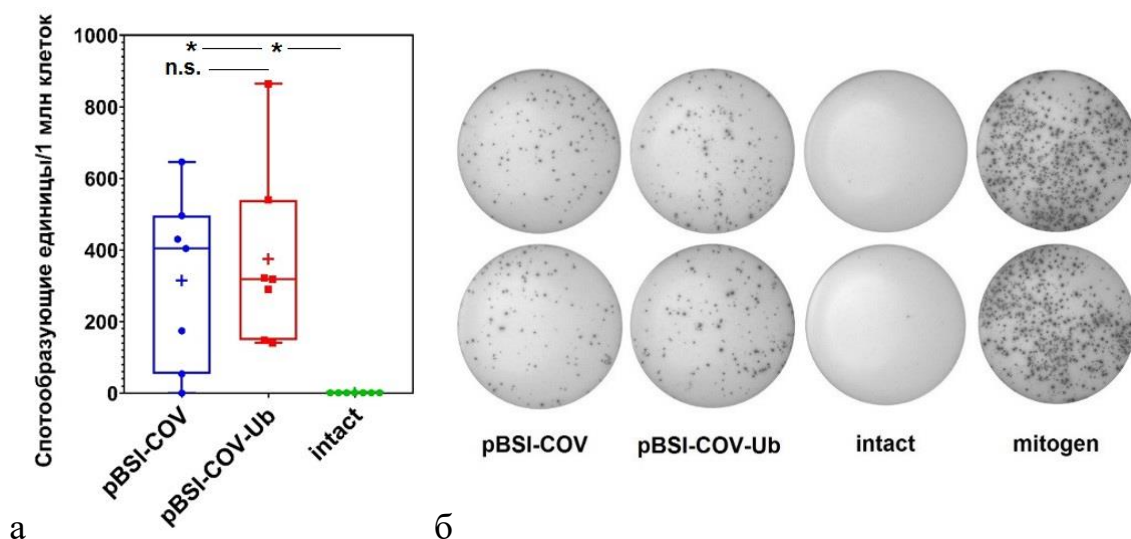


Рисунок 16. Оценка Т-клеточного ответа методом ELISpot. (а) Число спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на специфическую стимуляцию, на 10^6 клеток. Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни. (б) Типичный вид спотов для каждой группы иммунизированных животных.

Анализ Т-клеточного ответа с помощью метода ICS показал, что при иммунизации мышей ДНК-вакцинами pBSI-COV и pBSI-COV-Ub формируются как CD3⁺/CD8⁺, так и CD3⁺/CD4⁺ лимфоциты, способные продуцировать IFN- γ после стимуляции вирусными пептидами (рис. 17). Этот факт свидетельствует о формировании выраженного вирус-специфического Т-клеточного ответа. Значения в опытных группах достоверно отличались от контрольной группы. Сравнивая ответы на pBSI-COV и pBSI-COV-Ub, можно заметить, что наиболее высокий процент IFN- γ -продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток наблюдается в группе, иммунизированной pBSI-COV-Ub, что коррелирует с данными ELISpot. Однако эти различия между группами не достоверны. Повышение продукции после стимуляции пептидами было показано и для цитокинов IL-2, IL-4 и TNF- α , что свидетельствует о формировании сбалансированного вирус-специфического Т-клеточного ответа, очень важного для противовирусной защиты.

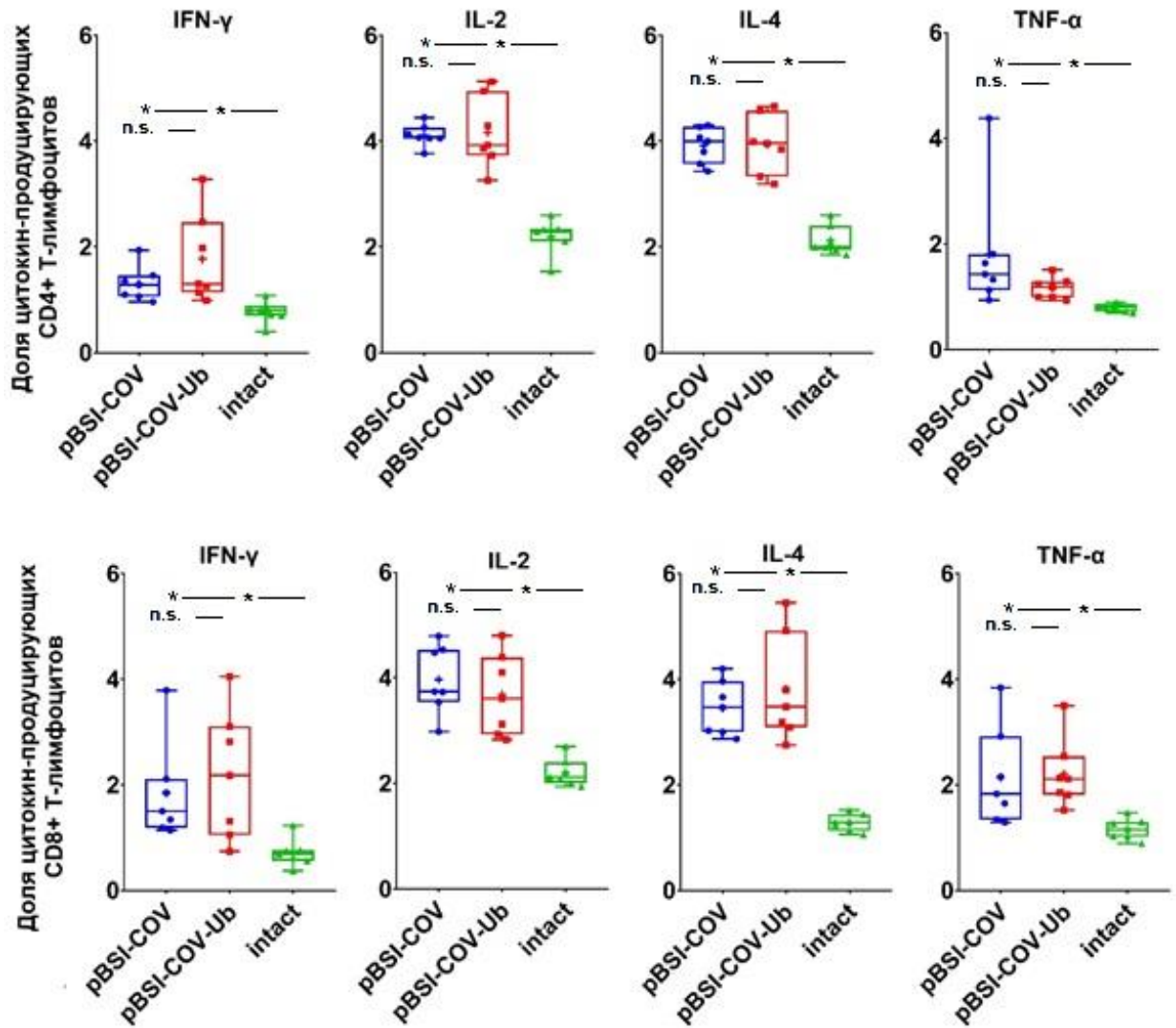


Рисунок 17. Процент SARS-CoV-2-специфических цитокин-продуцирующих CD4+ и CD8+ Т-клеток анализировали с помощью ISC и проточной цитометрии. Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

3.2.3.2. Исследование протективности

Для исследования протективности мышей иммунизировали конструкцией, кодирующей искусственный полиэпитопный иммуноген с убиквитином на N-конце. В исследовании использовался штамм hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 вируса SARS-CoV-2, относящийся к линии P.1 (Гамма-вариант). Заражение проводили через две недели после второй иммунизации, доза интраназального заражения составила 50 ИД₅₀. Через четверо суток после

заражения животных выводили из эксперимента и определяли вирусную нагрузку в тканях лёгких. Значения пороговых циклов (Ct) представлены в графическом виде на рисунке 18. В группе, иммунизированной рBSI-COV-Ub показано достоверное ($p < 0.01$) значительное снижение вирусной нагрузки по сравнению с контролем (3,45 Ig).

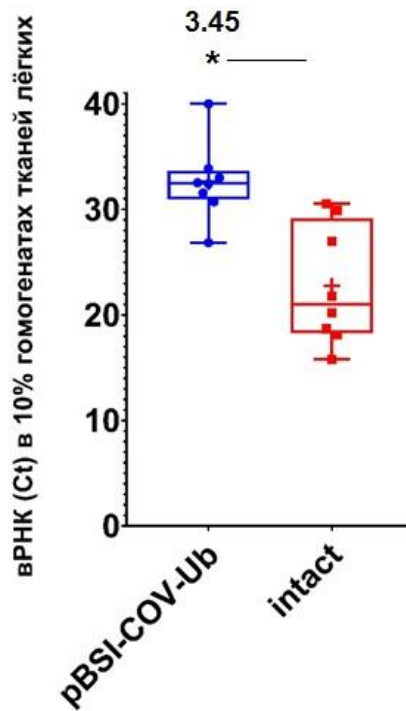


Рисунок 18. Вирусная нагрузка в тканях легких мышей BALB/c на 4-е сутки после заражения Гамма-вариантом SARS-CoV-2. Индивидуальные значения Ct в ПЦР-РВ представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

Таким образом, несмотря на смену антигенного профиля при появлении нового штамма и уменьшение нейтрализующей активности антител, можно надеяться, что Т-клеточный ответ, индуцированный искусственным иммуногеном, составленным из консервативных эпитопов различных белков вируса, будет оставаться вирус-специфичным. Поэтому ДНК-вакцина рBSI-COV-Ub, кодирующая ген *bsi-cov-ub*, может быть полезна для разработки универсальной вакцины для профилактики COVID-19.

3.2.4. Исследование иммуногенности комбинированной конструкции, содержащей ДНК-вакцину рBSI-COV-Ub и рекомбинантный белок RBD, конъюгированный с полиглюкин-спермидином.

Для оценки иммуногенности конструкции CCV-BSI использовали самок мышей BALB/c массой 16–18 г. Мышей разделили на группы по 8 животных в каждой и иммунизировали следующим образом: группа CCV-BSI – комбинированной вакциной, содержащей 100 мкг ДНК и 50 мкг белка; группа рBSI-COV-Ub – 100 мкг плазмиды рBSI-COV-Ub; группа PGS-RBD – 50 мкг белка RBD, конъюгированного с полиглюкин-спермидином. В группе intact были не иммунизированные животные. Мышей иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом три недели в бедро задней конечности. Спустя две недели после второй иммунизации у животных были взяты сыворотки и селезёнки для исследования вирус-специфического иммунного ответа.

3.2.4.1. Гуморальный иммунный ответ

С помощью RBD-специфического ИФА было показано, что иммунизация комбинированной конструкцией CCV-BSI приводит к формированию высокого уровня гуморального иммунитета. В группе, иммунизированной CCV-BSI, титр специфических IgG составил 1:2477679, а в группе, получавшей конъюгат PGS-RBD, – 1:1456250 (рис. 19а). Достоверного отличия между группами не было обнаружено.

Данные, полученные при исследовании вируснейтрализующей активности сывороток, также не показали наличия достоверного отличия между группами, получавшими CCV-BSI и PGS-RBD. Титры нейтрализующих антител в сыворотках мышей данных групп составили 1:309 и 1:537 (рис. 19б).

Сыворотки группы, получавшей плазмиду рBSI-COV-Ub, не проявили специфической и нейтрализующей активности.

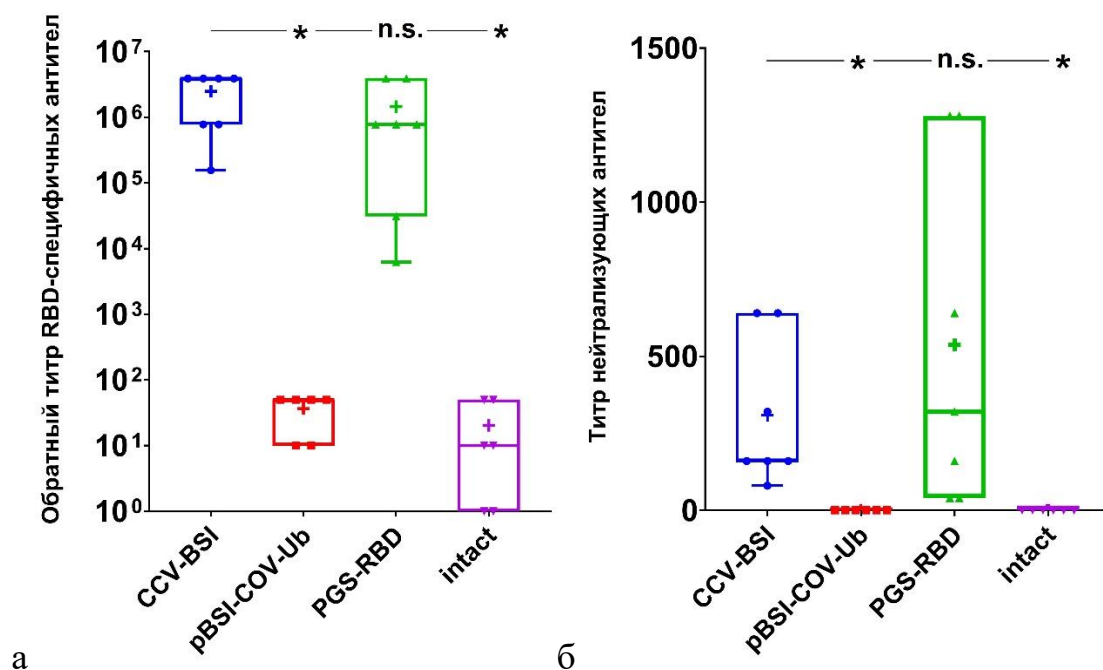


Рисунок 19. Гуморальный иммунный ответ у мышей, иммунизированных CCV-BSI, pBSI-COV-Ub и конъюгатом PGS-RBD. (а) Титры специфических антител IgG к RBD определяли с помощью ИФА. (б) Вируснейтрализующую активность сывороток мышей определяли с использованием штамма SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 (100 TCID₅₀). Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

3.2.4.2. Клеточный иммунный ответ

С помощью метода ELISpot оценивали количество спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на специфическую стимуляцию пулом пептидов, входящих в состав иммуногенов SARS-CoV-2. Было показано, что в группах, получавших ДНК-конструкцию pBSI-COV-Ub и комбинированную ДНК/белковую вакцину, формируется эквивалентный клеточный иммунитет : 105 и 93 SFUs на 1 млн спленоцитов, соответственно (рис. 20). В группе, получавшей белок, конъюгированный с полиглокин-спермидином, и в интактной группе формирование Т-клеточного иммунитета не было зарегистрировано.

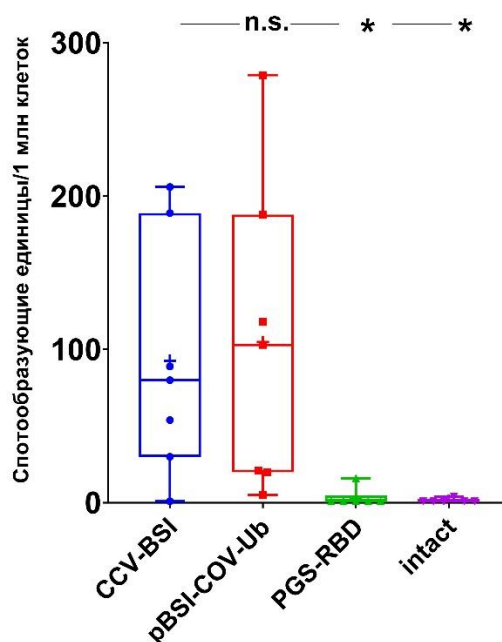


Рисунок 20. Оценка Т-клеточного ответа методом ELISpot. Число спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на специфическую стимуляцию, на 10^6 клеток. Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами.

Таким образом, кандидатная комбинированная вакцина CCV-BSI объединяет белок RBD и ДНК-вакцину rBSI-COV-Ub в одной конструкции и представляет собой вирусоподобные частицы за счёт использования конъюгата белка RBD с полиглюкин-спермидином. Такая конструкция объединяет достоинства как ДНК-вакцины (способность индуцировать клеточный ответ), так и рекомбинантного белка (способность индуцировать гуморальный ответ). Иммунизация комбинированной конструкцией приводит к формированию высоких значений гуморального и клеточного иммунитета. Консервативность эпитопов, входящих в состав иммуногена BSI-COV-Ub, позволяет рассматривать данную конструкцию как универсальную компоненту для комбинированных препаратов. Белковую часть таких конструкций можно менять в соответствии с циркулирующим вариантом вируса.

3.3 Заключение

Быстрое распространение SARS-CoV-2 по всему миру привело к беспрецедентному развитию различных платформ для создания вакцин, таких как вакцины на основе нуклеиновых кислот и векторные вакцины, а также к одобрению первой ДНК-вакцины для человека – ZyCoV-D. Однако проблемы, в том числе низкая иммуногенность ДНК-вакцин, все еще требуют решения.

В нашей работе мы предложили ряд стратегий повышения иммуногенности ДНК-вакцин против COVID-19. Одна из конструкций (pVAXrbd) кодирует рецептор-связывающий домен белка S, а другая (pBSI-COV-Ub) – искусственный полиэпитопный Т-клеточный иммуноген вируса SARS-CoV-2.

Присоединение секреторного домена к RBD (в pVAXrbd) обеспечивало высокий уровень секреции белкового продукта из клетки и, как следствие, уровень гуморального иммунитета. Добавление убиквитина к искусственному полиэпитопному иммуногену (в pBSI-COV-Ub) обеспечивало эффективный процессинг продукта внутри клетки и его презентацию МНС I.

Использование катионного полимера полиглюкин-спермидин для доставки ДНК-вакцины pVAXrbd привело к повышению ее иммуногенности, особенно в отношении гуморального ответа. Оболочка PGS защищает ДНК от деградации нуклеазами, а частицы, образующиеся при взаимодействии ДНК и PGS, более эффективно поглощаются антигенпрезентирующими клетками. Наночастицы, состоящие из таких полимеров, демонстрируют хорошую биосовместимость, растворимость в воде, биоразлагаемость, отсутствие токсичности, а также их легко и недорого производить, и они стабильны в широком диапазоне температур.

Частицы, полученные с использованием конъюгата полиглюкин-спермидин-RBD, содержащего pVAXrbd/pBSI-COV-Ub внутри и белок RBD на поверхности, продемонстрировали высокую иммуногенность. Присоединение белка RBD к поликатионной оболочке привело к синергетическому усилению гуморального иммунного ответа по сравнению с его отдельными компонентами,

а также к формированию защитного иммунитета у мышей, что позволило существенно снизить вирусную нагрузку в легких животных после заражения вирусом.

В целом полученные результаты показали, что применение различных стратегий, улучшающих иммуногенность ДНК-вакцин, будь то оптимизация кодонного состава, присоединение к иммуногену различных сигнальных последовательностей или использование различных средств доставки, приводят к созданию вакцинных препаратов, способных индуцировать иммунный ответ, позволяющий значительно снизить вирусную нагрузку в лёгких при заражении лабораторных животных живым вирусом.

Выводы

1. Сконструирована экспериментальная ДНК-вакцина pVAXrbd, несущая ген, кодирующий рецепторсвязывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2; показано, что иммунизация мышей линии BALB/c ДНК-вакциной pVAXrbd, индуцирует формирование вирус-специфического клеточного и гуморального ответа.

2. Получена и охарактеризована физико-химическими методами кандидатная комбинированная вакцина CCV-RBD, представляющая собой наночастицы, в центре которых находится ДНК-вакцина pVAXrbd, покрытая конъюгатом спермидин-полиглокин–RBD. Размер частиц составил 50-200 нм.

3. Показано, что иммунизация мышей линии BALB/c комбинированной вакциной CCV-RBD приводит к усилению вирус-специфического гуморального иммунного ответа по сравнению с отдельными ее компонентами и к формированию Т-клеточного ответа, что вызывает достоверное снижение вирусной нагрузки в органе-мишени (легких) животных более, чем в 1000 раз.

4. Сконструированы две экспериментальные ДНК-вакцины pBSI-COV-Ub и pBSI-COV, несущие ген, кодирующий искусственный Т-клеточный полиэпитопный иммуноген с убиквитином (Ub) и без него, содержащий фрагменты белков S, N, М и Е вируса SARS-CoV-2. Иммунизация мышей линии BALB/c обеими ДНК-вакцинами приводит к формированию вирус-специфического клеточного иммунитета. Присоединение Ub к полиэпитопному белку-иммуногену не приводит к заметному усилению клеточного ответа. Иммунный ответ на ДНК-вакцину pBSI-COV-Ub обеспечивал снижение вирусной нагрузки в легких мышей линии BALB/c.

5. Показано, что иммунизация мышей линии BALB/c комбинированной вакциной CCV-BSI (pBSI-COV-Ub/RBD) приводит к формированию вирус-специфического гуморального и клеточного иммунного ответа.

Список литературы

1. Abdoli A., Aalizadeh R., Aminianfar H., *et al.* Safety and potency of BIV1-CovIran inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2: A preclinical study // *Rev Med Virol.* – 2022. – V. 32. – N. 3. – P. e2305.
2. Abu-Raddad L.J., Chemaitelly H., Butt A.A.; National Study Group for COVID-19 Vaccination. Effectiveness of the BNT162b2 Covid-19 Vaccine against the B.1.1.7 and B.1.351 Variants // *N Engl J Med.* – 2021. – V. 385. – N. 2. – P. 187-189.
3. Agrati C., Capone S., Castilletti C., *et al.* Strong immunogenicity of heterologous prime-boost immunizations with the experimental vaccine GRAd-COV2 and BNT162b2 or ChAdOx1-nCOV19 // *NPJ Vaccines.* – 2021. – V. 6. – N. 1. – P. 131.
4. Agrati C., Castilletti C., Battella S., *et al.* Safety and immune response kinetics of GRAd-COV2 vaccine: phase 1 clinical trial results // *NPJ Vaccines.* – 2022. – V. 7. – N. 1. – P. 111.
5. Ahn J.Y., Lee J., Suh Y.S., *et al.* Safety and immunogenicity of two recombinant DNA COVID-19 vaccines containing the coding regions of the spike or spike and nucleocapsid proteins: an interim analysis of two open-label, non-randomised, phase 1 trials in healthy adults // *Lancet Microbe.* – 2022. – V. 3. – N. 3. – P. e173-e183.
6. Ahn Y.H., Hong S.O., Kim J.H., *et al.* The siRNA cocktail targeting interleukin 10 receptor and transforming growth factor- β receptor on dendritic cells potentiates tumour antigen-specific CD8(+) T cell immunity // *Clin Exp Immunol.* – 2015. – V. 181. – N. 1. – P. 164-178.
7. Alamri S.S., Alluhaybi K.A., Alhabbab R.Y., *et al.* Synthetic SARS-CoV-2 Spike-Based DNA Vaccine Elicits Robust and Long-Lasting Th1 Humoral and Cellular Immunity in Mice // *Front Microbiol.* – 2021. – V. 12. – P. 727455.
8. Amaral M.P., Coirada F.C., de Souza Apostolico J., *et al.* Prime-boost with Chikungunya virus E2 envelope protein combined with Poly (I:C) induces specific humoral and cellular immune responses // *Curr Res Immunol.* – 2021. – V. 2. – P. 23-31.

9. An D., Li K., Rowe D.K., *et al.* Protection of K18-hACE2 mice and ferrets against SARS-CoV-2 challenge by a single-dose mucosal immunization with a parainfluenza virus 5-based COVID-19 vaccine // *Sci Adv.* – 2021. – V. 7. – N. 27. – P. eabi5246.
10. An Y., Li S., Jin X., *et al.* A tandem-repeat dimeric RBD protein-based covid-19 vaccine zf2001 protects mice and nonhuman primates // *Emerg Microbes Infect.* – 2022. – V. 11. – N. 1. – P. 1058-1071.
11. Andrade V.M., Christensen-Quick A., Agnes J., *et al.* INO-4800 DNA vaccine induces neutralizing antibodies and T cell activity against global SARS-CoV-2 variants // *NPJ Vaccines.* – 2021. – V. 6. – N. 1. – P. 121.
12. Aramaki Y., Takano S., Tsuchiya S. Induction of apoptosis in macrophages by cationic liposomes // *FEBS Lett.* – 1999. – V. 460. – N. 3. – P. 472-476.
13. Ashkar A.A., Rosenthal K.L. Toll-like receptor 9, CpG DNA and innate immunity // *Curr Mol Med.* – 2002. – V. 2. – N. 6. – P. 545-556.
14. Aurisicchio L., Brambilla N., Cazzaniga M.E., *et al.* A first-in-human trial on the safety and immunogenicity of COVID-eVax, a cellular response-skewed DNA vaccine against COVID-19 // *Mol Ther.* – 2023. – V. 31. – N. 3. – P. 788-800.
15. Azhar E.I., El-Kafrawy S.A., Farraj S.A., *et al.* Evidence for camel-to-human transmission of MERS coronavirus // *N Engl J Med.* – 2014. – V. 370. – N. 26. – P. 2499-2505.
16. Baden L.R., El Sahly H.M., Essink B., *et al.* Efficacy and Safety of the mRNA-1273 SARS-CoV-2 Vaccine // *N Engl J Med.* – 2021. – V. 384. – N. 5. – P. 403-416.
17. Baker N., Dolgin E. Coronapod: CureVac disappoints in COVID vaccine trial // *Nature.* – 2021, Jun 18.
18. Banihashemi S.R., Es-Haghi A., Fallah Mehrabadi M.H., *et al.* Safety and Efficacy of Combined Intramuscular/Intranasal RAZI-COV PARS Vaccine Candidate Against SARS-CoV-2: A Preclinical Study in Several Animal Models // *Front Immunol.* – 2022. – V. 13. – P. 836745.
19. Barchuk A., Bulina A., Cherkashin M., *et al.* Gam-COVID-Vac, EpiVacCorona, and CoviVac effectiveness against lung injury during Delta and Omicron variant surges

- in St. Petersburg, Russia: test-negative case-control study // *BMC Respir Res.* – 2022. – V. 23. – N. 1. – P. 276.
20. Barrett L.W., Fletcher S., Wilton S.D. Regulation of eukaryotic gene expression by the untranslated gene regions and other non-coding elements // *Cell Mol Life Sci.* – 2012. – V. 69. – N. 21. – P. 3613-3634.
21. Bashorun A.O., Badjie Hydera M., Adigweme I., *et al.* Intradermal administration of fractional doses of the inactivated poliovirus vaccine in a campaign: a pragmatic, open-label, non-inferiority trial in The Gambia // *Lancet Glob Health.* – 2022. – V. 10. – N. 2. – P. e257-e268.
22. Beljanski V., Chiang C., Kirchenbaum G.A., *et al.* Enhanced Influenza Virus-Like Particle Vaccination with a Structurally Optimized RIG-I Agonist as Adjuvant // *J Virol.* – 2015. – V. 89. – N. 20. – P. 10612-10624.
23. Bhattacharya M., Sharma A.R., Ghosh P., Lee S.S., Chakraborty C. A Next-Generation Vaccine Candidate Using Alternative Epitopes to Protect against Wuhan and All Significant Mutant Variants of SARS-CoV-2: An Immunoinformatics Approach // *Aging Dis.* – 2021. – V. 12. – N. 8. – P. 2173-2195.
24. Bhiman J.N., Richardson S.I., Lambson B.E., *et al.* Novavax NVX-COV2373 triggers neutralization of Omicron sub-lineages // *Sci Rep.* – 2023. – V. 13. – N. 1. – P. 1222.
25. Bolhassani A., Javan zad S., Saleh T., *et al.* Polymeric nanoparticles: potent vectors for vaccine delivery targeting cancer and infectious diseases // *Hum Vaccin Immunother.* – 2014. – V. 10. – N. 2. – P. 321-332.
26. Broderick K.E., Humeau L.M. Electroporation-enhanced delivery of nucleic acid vaccines // *Expert Rev Vaccines.* – 2015. – V. 14. – N. 2. – P. 195-204.
27. Brune K.D., Leneghan D.B., Brian I.J., *et al.* Plug-and-Display: decoration of Virus-Like Particles via isopeptide bonds for modular immunization // *Sci Rep.* – 2016. – V. 6. – P. 19234.
28. Campbell J.D. Development of the CpG Adjuvant 1018: A Case Study // *Methods Mol Biol.* – 2017. – V. 1494. – P. 15-27.

29. Capone S., Raggioli A., Gentile M., *et al.* Immunogenicity of a new gorilla adenovirus vaccine candidate for COVID-19 // *Mol Ther.* – 2021. – V. 29. – N. 8. – P. 2412-2423.
30. Carmen J.M., Shrivastava S., Lu Z., *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. – N. 1. – P. 151.
31. Castaldello A., Sgarbanti M., Marsili G., *et al.* Interferon regulatory factor-1 acts as a powerful adjuvant in tat DNA based vaccination // *J Cell Physiol.* – 2010. – V. 224. – N. 3. – P. 702-729.
32. Chalkias S., Eder F., Essink B., *et al.* Safety, immunogenicity and antibody persistence of a bivalent Beta-containing booster vaccine against COVID-19: a phase 2/3 trial // *Nat Med.* – 2022. – V. 28. – N. 11. – P. 2388-2397.
33. Chapman R., van Diepen M., Douglass N., *et al.* Needle-Free Devices and CpG-Adjuvanted DNA Improve Anti-HIV Antibody Responses of Both DNA and Modified Vaccinia Ankara-Vectored Candidate Vaccine // *Vaccines (Basel).* – 2023. – V. 11. – N. 2. – P. 376.
34. Chavda V.P., Bezbaruah R., Athalye M., *et al.* Replicating Viral Vector-Based Vaccines for COVID-19: Potential Avenue in Vaccination Arena // *Viruses.* – 2022. – V. 14. – N. 4. – P. 759.
35. Chavda V.P., Pandya R., Apostolopoulos V. DNA vaccines for SARS-CoV-2: toward third-generation vaccination era // *Expert Rev Vaccines.* – 2021. – V. 20. – N. 12. – P. 1549-1560.
36. Chen J., Wang P., Yuan L., *et al.* A live attenuated virus-based intranasal COVID-19 vaccine provides rapid, prolonged, and broad protection against SARS-CoV-2 // *Sci Bull (Beijing).* – 2022. – V. 67. – N. 13. – P. 1372-1387.
37. Chen S.M.Y., Wong Y.C., Yim L.Y., *et al.* Enhanced Cross-Reactive and Polyfunctional Effector-Memory T Cell Responses by ICVAX-a Human PD1-Based Bivalent HIV-1 Gag-p41 Mosaic DNA Vaccine // *J Virol.* – 2022. – V. 96. – N. 7. – P. e0216121.

38. Chen Y., Zhu L., Huang W., *et al.* Potent RBD-specific neutralizing rabbit monoclonal antibodies recognize emerging SARS-CoV-2 variants elicited by DNA prime-protein boost vaccination // *Emerg Microbes Infect.* – 2021. – V. 10. – N. 1. – P. 1390-1403.
39. Chiang C.Y., Chen M.Y., Hsu C.W., *et al.* Induction of high affinity monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 variant infection using a DNA prime-protein boost strategy // *J Biomed Sci.* – 2022. – V. 29. – N. 1. – P. 37.
40. Chu D., Moroda M., Piao L.X., Aosai F. CTL induction by DNA vaccine with *Toxoplasma gondii*-HSP70 gene // *Parasitol Int.* – 2014. – V. 63. – N. 2. – P. 408-416.
41. Chung H., He S., Nasreen S., *et al.* Effectiveness of BNT162b2 and mRNA-1273 covid-19 vaccines against symptomatic SARS-CoV-2 infection and severe covid-19 outcomes in Ontario, Canada: test negative design study // *BMJ.* – 2021. – V. 374. – P. n1943.
42. Collie S., Champion J., Moultrie H., Bekker L.G., Gray G. Effectiveness of BNT162b2 Vaccine against Omicron Variant in South Africa // *N Engl J Med.* – 2022. – V. 386. – N. 5. – P. 494-496.
43. Conforti A., Marra E., Palombo F., *et al.* COVID-eVax, an electroporated DNA vaccine candidate encoding the SARS-CoV-2 RBD, elicits protective responses in animal models // *Mol Ther.* – 2022. – V. 30. – N. 1. – P. 311-326.
44. Corbett K.S., Flynn B., Foulds K.E., *et al.* Evaluation of the mRNA-1273 Vaccine against SARS-CoV-2 in Nonhuman Primates // *N Engl J Med.* – 2020. – V. 383. – N. 16. – P. 1544-1555.
45. Coughlan L., Kremer E.J., Shayakhmetov D.M. Adenovirus-based vaccines-a platform for pandemic preparedness against emerging viral pathogens // *Mol Ther.* – 2022. – V. 30. – N. 5. – P. 1822-1849.
46. Dai L., Gao L., Tao L., *et al.* Efficacy and Safety of the RBD-Dimer-Based Covid-19 Vaccine ZF2001 in Adults // *N Engl J Med.* – 2022. – V. 386. – N. 22. – P. 2097-2111.
47. Dai L., Zheng T., Xu K., *et al.* A Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID-19, MERS, and SARS // *Cell.* – 2020. – V. 182. – N. 3. – P. 722-733.

48. D'Aoust M.A., Couture M.M., Charland N., *et al.* The production of hemagglutinin-based virus-like particles in plants: a rapid, efficient and safe response to pandemic influenza // *Plant Biotechnol J.* – 2010. – V. 8. –N. 5. – P. 607-619.
49. de Bruyn G., Wang J., Purvis A., *et al.* Safety and immunogenicity of a variant-adapted SARS-CoV-2 recombinant protein vaccine with AS03 adjuvant as a booster in adults primed with authorized vaccines: a phase 3, parallel-group study // *EClinicalMedicine.* – 2023. – V. 62. – P. 102109.
50. Dey A., Chozhavel Rajanathan T.M., Chandra H., *et al.* Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models // *Vaccine.* – 2021. – V. 39. – N. 30. – P. 4108-4116.
51. DeZure A.D., Berkowitz N.M., Graham B.S., Ledgerwood J.E. Whole-Inactivated and Virus-Like Particle Vaccine Strategies for Chikungunya Virus // *J Infect Dis.* – 2016. – V. 214. – S. 5. – P. S497-S499.
52. Dicks M.D., Spencer A.J., Edwards N.J., *et al.* A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – N. 7. – P. e40385.
53. Diehl M.C., Lee J.C., Daniels S.E., *et al.* Tolerability of intramuscular and intradermal delivery by CELLECTRA(®) adaptive constant current electroporation device in healthy volunteers // *Hum Vaccin Immunother.* – 2013. – V. 9. – N. 10. – P. 2246-2252.
54. Duc Dang A., Dinh Vu T., Hai Vu H., *et al.* Safety and immunogenicity of an egg-based inactivated Newcastle disease virus vaccine expressing SARS-CoV-2 spike: Interim results of a randomized, placebo-controlled, phase 1/2 trial in Vietnam // *Vaccine.* – 2022. – V. 40. – N. 26. – P. 3621-3632.
55. Ella R., Reddy S., Blackwelder W., *et al.* Efficacy, safety, and lot-to-lot immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (BBV152): interim results of a randomised, double-blind, controlled, phase 3 trial // *Lancet.* – 2021. – V. 398. – N. 10317. – P. 2173-2184.
56. Ella R., Reddy S., Jogdand H., *et al.* Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: interim results from a double-blind,

- randomised, multicentre, phase 2 trial, and 3-month follow-up of a double-blind, randomised phase 1 trial // *Lancet Infect Dis.* – 2021. – V. 21. – N. 7. – P. 950-961.
57. Falsey A.R., Sobieszczyk M.E., Hirsch I., *et al.* Phase 3 Safety and Efficacy of AZD1222 (ChAdOx1 nCoV-19) Covid-19 Vaccine // *N Engl J Med.* – 2021. – V. 385. – N. 25. – P. 2348-2360.
58. Fath S., Bauer A.P., Liss M., *et al.* Multiparameter RNA and codon optimization: a standardized tool to assess and enhance autologous mammalian gene expression // *PLoS One.* – 2011. – V. 6. – N. 3. – P. e17596.
59. Feng W., Xiang Y., Wu L., *et al.* Nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 is a potential target for developing new generation of vaccine // *J Clin Lab Anal.* – 2022. – V. 36. – N. 6. – P. e24479.
60. Ferraro B., Morrow M.P., Hutnick N.A., *et al.* Clinical applications of DNA vaccines: current progress // *Clin Infect Dis.* – 2011. V. 53. – N. 3. – P. 296-302.
61. Ferretti A.P., Kula T., Wang Y., *et al.* Unbiased Screens Show CD8+ T Cells of COVID-19 Patients Recognize Shared Epitopes in SARS-CoV-2 that Largely Reside outside the Spike Protein // *Immunity.* – 2020. – V. 53. – N. 5. – P. 1095-1107.e3.
62. Filion M.C., Phillips N.C. Toxicity and immunomodulatory activity of liposomal vectors formulated with cationic lipids toward immune effector cells // *Biochim Biophys Acta.* – 1997. – V. 1329 – N. 2. – P. 345-356.
63. Folegatti P.M., Ewer K.J., Aley P.K., *et al.* Safety and immunogenicity of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine against SARS-CoV-2: a preliminary report of a phase 1/2, single-blind, randomised controlled trial // *Lancet.* – 2020. – V. 396. – N. 10249. – P. 467-478.
64. Foroutan M., Barati M., Ghaffarifar F. Enhancing immune responses by a novel multi-epitope ROP8 DNA vaccine plus interleukin-12 plasmid as a genetic adjuvant against acute *Toxoplasma gondii* infection in BALB/c mice // *Microb Pathog.* – 2020. – V. 147. – P. 104435.
65. Ganneru B., Jogdand H., Dharam V.K., *et al.* Evaluation of Safety and Immunogenicity of an Adjuvanted, TH-1 Skewed, Whole Virion Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine - BBV152 // *bioRxiv.* – 2020. – P. 2020-09.

66. Garçon N., Vaughn D.W., Didierlaurent A.M. Development and evaluation of AS03, an Adjuvant System containing α -tocopherol and squalene in an oil-in-water emulsion // *Expert Rev Vaccines*. – 2012. – V. 11. – N. 3. –P. 349-366.
67. Garg S., Oran A.E., Hon H., Jacob J. The hybrid cytomegalovirus enhancer/chicken beta-actin promoter along with woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances the protective efficacy of DNA vaccines // *J Immunol*. – 2004. – V. 173. – N. 1. – P. 550-558.
68. Gavali S., Liu J., Li X., Paolino M. Ubiquitination in T-Cell Activation and Checkpoint Inhibition: New Avenues for Targeted Cancer Immunotherapy // *Int J Mol Sci*. – 2021. – V. 22. – N. 19. – P. 10800.
69. Geiben-Lynn R., Frimpong-Boateng K., Letvin N.L. Modulation of plasmid DNA vaccine antigen clearance by caspase 12 RNA interference potentiates vaccination // *Clin Vaccine Immunol*. – 2011. – V. 18. – N. 4. – P. 533-538.
70. Gerhardt A., Voigt E., Archer M., *et al.* A flexible, thermostable nanostructured lipid carrier platform for RNA vaccine delivery // *Mol Ther Methods Clin Dev*. – 2022. – V. 25. – P. 205-214.
71. González-Domínguez I., Martínez J.L., Slamanig S., *et al.* Trivalent NDV-HXP-S Vaccine Protects against Phylogenetically Distant SARS-CoV-2 Variants of Concern in Mice // *Microbiol Spectr*. – 2022. – V. 10. – N. 3. – P. e0153822.
72. Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Guselnikov S.V., *et al.* Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern // *Cell Discov*. – 2021. – V. 7. – N. 1. – P. 96.
73. Grifoni A., Sidney J., Zhang Y., *et al.* A Sequence Homology and Bioinformatic Approach Can Predict Candidate Targets for Immune Responses to SARS-CoV-2 // *Cell Host Microbe*. – 2020. – V. 27. – N. 4. – P. 671-680.e2.
74. Guebre-Xabier M., Patel N., Tian J.H., *et al.* NVX-CoV2373 vaccine protects cynomolgus macaque upper and lower airways against SARS-CoV-2 challenge // *Vaccine*. – 2020. – V. 38. – N. 50. – P. 7892-7896.
75. Guirakhoo F., Wang S., Wang C.Y., *et al.* High Neutralizing Antibody Levels Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Omicron BA.1 and BA.2

- After UB-612 Vaccine Booster // *J Infect Dis.* – 2022. – V. 226. – N. 8. – P. 1401-1406.
76. Guirkhoo F., Kuo L., Peng J., *et al.* A Novel SARS-CoV-2 Multitope Protein/Peptide Vaccine Candidate is Highly Immunogenic and Prevents Lung Infection in an AAV hACE2 Mouse Model and non-human primates // *bioRxiv.* – 2021. – P. 2021-10.
77. Gushchin V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., *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. – N. 7. – P. 779.
78. Hager K.J., Pérez Marc G., Gobeil P., *et al.* Efficacy and Safety of a Recombinant Plant-Based Adjuvanted Covid-19 Vaccine // *N Engl J Med.* – 2022. – V. 386. – N. 22. – P. 2084-2096.
79. Halperin S.A., Ye L., MacKinnon-Cameron D., *et al.* Final efficacy analysis, interim safety analysis, and immunogenicity of a single dose of recombinant novel coronavirus vaccine (adenovirus type 5 vector) in adults 18 years and older: an international, multicentre, randomised, double-blinded, placebo-controlled phase 3 trial // *Lancet.* – 2022. – V. 399. – N. 10321. – P. 237-248.
80. Hansen J., Lindenstrøm T., Lindberg-Levin J., *et al.* CAF05: cationic liposomes that incorporate synthetic cord factor and poly(I:C) induce CTL immunity and reduce tumor burden in mice // *Cancer Immunol Immunother.* – 2012. – V. 61. – N. 6. – P. 893-903.
81. Hayashi H., Sun J., Yanagida Y., *et al.* Preclinical study of a DNA vaccine targeting SARS-CoV-2 // *Curr Res Transl Med.* – 2022. – V. 70. – N. 4. – P. 103348.
82. He Q., Liu S., Liang Z., *et al.* Mouse study of combined DNA/protein COVID-19 vaccine to boost high levels of antibody and cell mediated immune responses // *Emerg Microbes Infect.* – 2023. – V. 12. – N. 1. – P. 2152388.
83. He Q., Mao Q., Peng X., *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of a recombinant protein subunit vaccine and an inactivated vaccine against SARS-CoV-2

- variants in non-human primates // *Signal Transduct Target Ther.* – 2022. – V. 7. – N. 1. – P. 69.
84. Heath P.T., Galiza E.P., Baxter D.N., *et al.* Safety and Efficacy of NVX-CoV2373 Covid-19 Vaccine // *N Engl J Med.* – 2021. – V. 385. – N. 13. – P. 1172-1183.
85. Hobernik D., Bros M. DNA Vaccines-How Far From Clinical Use? // *Int J Mol Sci.* – 2018. – V. 19. – N. 11. – P. 3605.
86. Hollister K., Chen Y., Wang S., *et al.* The role of follicular helper T cells and the germinal center in HIV-1 gp120 DNA prime and gp120 protein boost vaccination // *Hum Vaccin Immunother.* – 2014. – V. 10. – N. 7. – P. 1985-1992.
87. Hotez P.J., Corry D.B., Bottazzi M.E. COVID-19 vaccine design: the Janus face of immune enhancement // *Nat Rev Immunol.* – 2020. – V. 20. – N. 6. – P. 347-348.
88. Hsieh C.L., Goldsmith J.A., Schaub J.M., *et al.* Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes // *Science.* – 2020. – V. 369. – N. 6510. – P. 1501-1505.
89. Hu B., Zeng L.P., Yang X.L., *et al.* Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus // *PLoS Pathog.* – 2017. – V. 13. – N. 11. – e1006698.
90. Hu X., Valentin A., Dayton F., *et al.* DNA Prime-Boost Vaccine Regimen To Increase Breadth, Magnitude, and Cytotoxicity of the Cellular Immune Responses to Subdominant Gag Epitopes of Simian Immunodeficiency Virus and HIV // *J Immunol.* – 2016. – V. 197. – N. 10. – P. 3999-4013.
91. Huo S., Zhang J., Fan J., *et al.* Co-Expression of Chicken IL-2 and IL-7 Enhances the Immunogenicity and Protective Efficacy of a VP2-Expressing DNA Vaccine against IBDV in Chickens // *Viruses.* – 2019. – V. 11. – N. 5. – P. 476.
92. Ikegame S., Siddiquey M.N.A., Hung C.T., *et al.* Neutralizing activity of Sputnik V vaccine sera against SARS-CoV-2 variants // *Nat Commun.* – 2021. – V. 12. – N. 1. – P. 4598.
93. Imanishi T., Ishihara C., Badr Mel S., *et al.* Nucleic acid sensing by T cells initiates Th2 cell differentiation // *Nat Commun.* – 2014. – V. 5. – P. 3566.

94. Jacobson J.M., Zahrieh D., Strand C.A., *et al.* Phase I Trial of a Therapeutic DNA Vaccine for Preventing Hepatocellular Carcinoma from Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Infection // *Cancer Prev Res (Phila)*. – 2023. – V. 16. – N. 3. – P. 163-173.
95. Jara A., Undurraga E.A., González C., *et al.* Effectiveness of an Inactivated SARS-CoV-2 Vaccine in Chile // *N Engl J Med*. – 2021. – V. 385. – N. 10. – P. 875-884.
96. Jeewandara C., Aberathna I.S., Pushpakumara P.D., *et al.* Immune responses to Sinopharm/BBIBP-CorV in individuals in Sri Lanka // *Immunology*. – 2022. – V. 167. – N. 2. – P. 275-285.
97. Joyce M.G., Chen W.H., Sankhala R.S., *et al.* SARS-CoV-2 ferritin nanoparticle vaccines elicit broad SARS coronavirus immunogenicity // *Cell Rep*. – 2021. – V. 37. – N. 12. – P. 110143.
98. Ju B., Zhang Q., Ge J., *et al.* Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection // *Nature*. – 2020. – V. 584. – N. 7819. – P. 115-119.
99. Kaabi N.A., Yang Y.K., Du L.F., *et al.* Safety and immunogenicity of a hybrid-type vaccine booster in BBIBP-CorV recipients in a randomized phase 2 trial // *Nat Commun*. – 2022. – V. 13. – N. 1. – P. 3654.
100. Karikó K., Muramatsu H., Welsh F.A., *et al.* Incorporation of pseudouridine into mRNA yields superior nonimmunogenic vector with increased translational capacity and biological stability // *Mol Ther*. – 2008. – V. 16. – N. 11. – P. 1833-1840.
101. Karpenko L.I., Apartsin E.K., Dudko S.G., *et al.* Cationic Polymers for the Delivery of the Ebola DNA Vaccine Encoding Artificial T-Cell Immunogen // *Vaccines (Basel)*. – 2020. – V. 8. – N. 4. – P. 718.
102. Karpenko L.I., Ilyichev A.A., Eroshkin A.M., *et al.* Combined virus-like particle-based polyepitope DNA/protein HIV-1 vaccine design, immunogenicity and toxicity studies // *Vaccine*. – 2007. – V. 25. – N. 21. – P. 4312-4323.
103. Karpenko L.I., Nekrasova N.A., Ilyichev A.A., *et al.* Comparative analysis using a mouse model of the immunogenicity of artificial VLP and attenuated Salmonella

strain carrying a DNA-vaccine encoding HIV-1 polyepitope CTL-immunogen // *Vaccine*. – 2004. – V. 22. – N. 13-14. – P. 1692-1699.

104. Kawasuji H., Morinaga Y., Tani H., *et al.* Neutralizing Antibody Response of the Wild-Type/Omicron BA.1 Bivalent Vaccine as the Second Booster Dose against Omicron BA.2 and BA.5 // *Microbiol Spectr*. – 2023. – V. 11. – N. 2. – P. e0513122.

105. Keech C., Albert G., Cho I., *et al.* Phase 1-2 Trial of a SARS-CoV-2 Recombinant Spike Protein Nanoparticle Vaccine // *N Engl J Med*. – 2020. – V. 383. – N. 24. – P. 2320-2332.

106. Khairkhah N., Bolhassani A., Agi E., Namvar A., Nikyar A. Immunological investigation of a multiepitope peptide vaccine candidate based on main proteins of SARS-CoV-2 pathogen // *PLoS One*. – 2022. – V. 17. – N. 6. – P. e0268251.

107. Khairullin B., Zakarya K., Orynbayev M., *et al.* Efficacy and safety of an inactivated whole-virion vaccine against COVID-19, QazCovid-in®, in healthy adults: A multicentre, randomised, single-blind, placebo-controlled phase 3 clinical trial with a 6-month follow-up // *EClinicalMedicine*. – 2022. – V. 50. – P. 101526.

108. Khan M.T., Islam M.J., Parihar A., *et al.* Immunoinformatics and molecular modeling approach to design universal multi-epitope vaccine for SARS-CoV-2 // *Inform Med Unlocked*. – 2021. – V. 24. – P. 100578.

109. Khobragade A., Bhate S., Ramaiah V., *et al.* Efficacy, safety, and immunogenicity of the DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): the interim efficacy results of a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study in India // *Lancet*. – 2022. – V. 399. – N. 10332. – P. 1313-1321.

110. Kim S.A., Kim S., Kim G.B., *et al.* A Multivalent Vaccine Based on Ferritin Nanocage Elicits Potent Protective Immune Responses against SARS-CoV-2 Mutations // *Int J Mol Sci*. – 2022. – V. 23. – N. 11. – P. 6123.

111. Kim W.J., Roberts C.C., Song J.Y., *et al.* Safety and immunogenicity of the bicistronic GLS-5310 COVID-19 DNA vaccine delivered with the GeneDerm suction device // *Int J Infect Dis*. – 2023. – V. 128. – P. 112-120.

112. Kleanthous H., Silverman J.M., Makar K.W. Scientific rationale for developing potent RBD-based vaccines targeting COVID-19 // *NPJ Vaccines*. – 2021. – V. 6. – N. 1. – P. 128.
113. Koch T., Dahlke C., Fathi A., *et al.* Safety and immunogenicity of a modified vaccinia virus Ankara vector vaccine candidate for Middle East respiratory syndrome: an open-label, phase 1 trial // *Lancet Infect Dis*. – 2020. – V. 20. – N. 7. – P. 827-838.
114. Kozlovskaya L.I., Pinaeva A.N., Ignatyev G.M., *et al.* Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies // *Emerg Microbes Infect*. – 2021. – V. 10. – N. 1. – P. 1790-1806.
115. Kraynyak K.A., Blackwood E., Agnes J., *et al.* SARS-CoV-2 DNA Vaccine INO-4800 Induces Durable Immune Responses Capable of Being Boosted in a Phase 1 Open-Label Trial // *J Infect Dis*. – 2022. – V. 225. – N. 11. – P. 1923-1932.
116. Kremsner P.G., Ahuad Guerrero R.A., Arana-Arri E., *et al.* Efficacy and safety of the CVnCoV SARS-CoV-2 mRNA vaccine candidate in ten countries in Europe and Latin America (HERALD): a randomised, observer-blinded, placebo-controlled, phase 2b/3 trial // *Lancet Infect Dis*. – 2022. – V. 22. – N. 3. – P. 329-340.
117. Kulkarni R.R., Rasheed M.A., Bhaumik S.K., *et al.* Activation of the RIG-I pathway during influenza vaccination enhances the germinal center reaction, promotes T follicular helper cell induction, and provides a dose-sparing effect and protective immunity // *J Virol*. – 2014. – V. 88. – N. 24. – P. 13990-14001.
118. Kumru O.S., Joshi S.B., Smith D.E., *et al.* Vaccine instability in the cold chain: mechanisms, analysis and formulation strategies // *Biologicals*. – 2014. – V. 42. – N. 5. – P. 237-259.
119. Kurup D., Malherbe D.C., Wirblich C., *et al.* Inactivated rabies virus vectored SARS-CoV-2 vaccine prevents disease in a Syrian hamster model // *PLoS Pathog*. – 2021. – V. 17. – N. 3. – P. e1009383.
120. Kurup D., Wirblich C., Ramage H., Schnell M.J. Rabies virus-based COVID-19 vaccine CORAVAX™ induces high levels of neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 // *NPJ Vaccines*. – 2020. – V. 5. – P. 98.

121. Kushnir A., Mueller S., Tasker S., Coleman J.R. COVI-VAC™, a Live Attenuated COVID-19 Vaccine, Provides Single Dose Protection Against Heterologous Challenge with SARS-CoV-2 Beta (B.1.351) in the Syrian Golden Hamster Model // *Open Forum Infectious Diseases*. – 2021. – V. 8. – S. 1. – P. S390.
122. Kutzler M.A., Weiner D.B. DNA vaccines: ready for prime time? // *Nat Rev Genet*. – 2008. – V. 9. – N. 10. – P. 776-788.
123. Lallow E.O., Jhumur N.C., Ahmed I., *et al.* Novel suction-based in vivo cutaneous DNA transfection platform // *Sci Adv*. – 2021. – V. 7. – N. 45. – P. eabj0611.
124. Launay O., Artaud C., Lachâtre M., *et al.* Safety and immunogenicity of a measles-vectored SARS-CoV-2 vaccine candidate, V591 / TMV-083, in healthy adults: results of a randomized, placebo-controlled Phase I study // *EBioMedicine*. – 2022. – V. 75. – P. 103810.
125. Luring A.S., Jones J.O., Andino R. Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines // *Nat Biotechnol*. – 2010. – V. 28. – N. 6. – P. 573-579.
126. Lazarus R., Querton B., Corbic Ramljak I., *et al.* Immunogenicity and safety of an inactivated whole-virus COVID-19 vaccine (VLA2001) compared with the adenoviral vector vaccine ChAdOx1-S in adults in the UK (COV-COMPARE): interim analysis of a randomised, controlled, phase 3, immunobridging trial // *Lancet Infect Dis*. – 2022. – V. 22. – N. 12. – P. 1716-1727.
127. Lazarus R., Taucher C., Brown C., *et al.* Safety and immunogenicity of the inactivated whole-virus adjuvanted COVID-19 vaccine VLA2001: A randomized, dose escalation, double-blind phase 1/2 clinical trial in healthy adults // *J Infect*. – 2022. – V. 85. – N. 3. – P. 306-317.
128. Ledesma-Feliciano C., Chapman R., Hooper J.W., *et al.* Improved DNA Vaccine Delivery with Needle-Free Injection Systems // *Vaccines (Basel)*. – 2023. – V. 11. – N. 2. – P. 280.
129. Leroy L.A., Mac Donald A., Kandlur A., *et al.* Cytokine Adjuvants IL-7 and IL-15 Improve Humoral Responses of a SHIV LentiDNA Vaccine in Animal Models // *Vaccines (Basel)*. – 2022. – V. 10. – N. 3. – P. 461.

130. Levin Y., Balakirski N.M., Caraco Y., *et al.* Ethics and execution of developing a 2nd wave COVID vaccine - Our interim phase I/II VSV-SARS-CoV2 vaccine experience // *Vaccine*. – 2021. – V. 39. – N. 21. – P. 2821-2823.
131. Li J., Hou L., Guo X., *et al.* Heterologous AD5-nCOV plus CoronaVac versus homologous CoronaVac vaccination: a randomized phase 4 trial // *Nat Med*. – 2022. – V. 28. – N. 2. – P. 401-409.
132. Li J., Hui A., Zhang X., *et al.* Safety and immunogenicity of the SARS-CoV-2 BNT162b1 mRNA vaccine in younger and older Chinese adults: a randomized, placebo-controlled, double-blind phase 1 study // *Nat Med*. – 2021. – V. 27. – N. 6. – P. 1062-1070.
133. Li J.X., Wu S.P., Guo X.L., *et al.* Safety and immunogenicity of heterologous boost immunisation with an orally administered aerosolised Ad5-nCoV after two-dose priming with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in Chinese adults: a randomised, open-label, single-centre trial // *Lancet Respir Med*. – 2022. – V. 10. – N. 8. – P. 739-748.
134. Li L., Honda-Okubo Y., Huang Y., *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. – V. 39. – N. 40. – P. 5940-5953.
135. Li L., Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity // *Expert Rev Vaccines*. – 2016. – V. 15. – N. 3. – P. 313-329.
136. Li L., Saade F., Petrovsky N. The future of human DNA vaccines // *J Biotechnol*. – 2012. – V. 162. – N. 2-3. – P. 171-182.
137. Li X.N., Huang Y., Wang W., *et al.* Effectiveness of inactivated SARS-CoV-2 vaccines against the Delta variant infection in Guangzhou: a test-negative case-control real-world study // *Emerg Microbes Infect*. – 2021. – V. 10. – N. 1. – P. 1751-1759.
138. Li Y., Bi Y., Xiao H., *et al.* A novel DNA and protein combination COVID-19 vaccine formulation provides full protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques // *Emerg Microbes Infect*. – 2021. – V. 10. – N. 1. – P. 342-355.

139. Liang Y., Zhang J., Yuan R.Y., *et al.* Design of a mutation-integrated trimeric RBD with broad protection against SARS-CoV-2 // *Cell Discov.* – 2022. – V. 8. – N. 1. – P. 17.
140. Lien C.E., Kuo T.Y., Lin Y.J., *et al.* Evaluating the Neutralizing Ability of a CpG-Adjuvanted S-2P Subunit Vaccine Against Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Variants of Concern // *Clin Infect Dis.* – 2022. – V. 74. – N. 11. – P. 1899-1905.
141. Lien C.E., Lin Y.J., Chen C., *et al.* CpG-adjuvanted stable prefusion SARS-CoV-2 spike protein protected hamsters from SARS-CoV-2 challenge // *Sci Rep.* – 2021. – V. 11. – N. 1. – P. 8761.
142. Liniger M., Summerfield A., Ruggli N. MDA5 can be exploited as efficacious genetic adjuvant for DNA vaccination against lethal H5N1 influenza virus infection in chickens // *PLoS One.* – 2012. – V. 7. – N. 12. – P. e49952.
143. Liu L., Wang P., Nair M.S., *et al.* Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike // *Nature.* – 2020. – V. 584. – N. 7821. – P. 450-456.
144. Liu L.T., Chiu C.H., Chiu N.C., *et al.* Safety and immunogenicity of SARS-CoV-2 vaccine MVC-COV1901 in Taiwanese adolescents: a randomized phase 2 trial // *NPJ Vaccines.* – 2022. – V. 7. – N. 1. – P. 165.
145. Liu S., Wang S., Lu S. DNA immunization as a technology platform for monoclonal antibody induction // *Emerg Microbes Infect.* – 2016. – V. 5. – N. 4. – P. e33.
146. Liu S., Wang S., Lu S. Using DNA Immunization to Elicit Monoclonal Antibodies in Mice, Rabbits, and Humans // *Hum Gene Ther.* – 2018. – V. 29. – N. 9. – P. 997-1003.
147. Liu X., Li Y., Wang Z., *et al.* Safety and superior immunogenicity of heterologous boosting with an RBD-based SARS-CoV-2 mRNA vaccine in Chinese adults // *Cell Res.* – 2022. – V. 32. – N. 8. – P. 777-780.
148. Liu X., Luongo C., Matsuoka Y., *et al.* A single intranasal dose of a live-attenuated parainfluenza virus-vectored SARS-CoV-2 vaccine is protective in hamsters // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2021. – V. 118. – N. 50. – P. e2109744118.

149. Lladser A., Mougiakakos D., Tufvesson H., *et al.* DAI (DLM-1/ZBP1) as a genetic adjuvant for DNA vaccines that promotes effective antitumor CTL immunity // *Mol Ther.* – 2011. – V. 19. – N. 3. – P. 594-601.
150. Logunov D.Y., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V., *et al.* Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia // *Lancet.* – 2021. – V. 397. – N. 10275. – P. 671-681.
151. Lu S. Heterologous prime-boost vaccination // *Curr Opin Immunol.* – 2009. – V. 21. – N. 3. – P. 346-351.
152. Luke J.M., Simon G.G., Söderholm J., *et al.* Coexpressed RIG-I agonist enhances humoral immune response to influenza virus DNA vaccine // *J Virol.* – 2011. – V. 85. – N. 3. – P. 1370-1383.
153. Madar-Balakirski N., Rosner A., Melamed S., *et al.* Preliminary nonclinical safety and immunogenicity of an rVSV- Δ G-SARS-CoV-2-S vaccine in mice, hamsters, rabbits and pigs // *Arch Toxicol.* – 2022. – V. 96. – N. 3. – P. 859-875.
154. Mahajan S., Kode V., Bhojak K., *et al.* Immunodominant T-cell epitopes from the SARS-CoV-2 spike antigen reveal robust pre-existing T-cell immunity in unexposed individuals // *Sci Rep.* – 2021. – V. 11. – N. 1. – P. 13164.
155. Malherbe D.C., Kurup D., Wirblich C., *et al.* A single dose of replication-competent VSV-vectored vaccine expressing SARS-CoV-2 S1 protects against virus replication in a hamster model of severe COVID-19. *NPJ Vaccines.* 2021 Jul 22;6(1):91.
156. Mallapaty S. India's DNA COVID vaccine is a world first - more are coming // *Nature.* – 2021. – V. 597. – N. 7875. – P. 161-162.
157. Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V., Gleba Y. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants // *Nat Biotechnol.* – 2005. – V. 23. – N. 6. – P. 718-723.
158. Martínez-Gil L., Goff P.H., Hai R., *et al.* A Sendai virus-derived RNA agonist of RIG-I as a virus vaccine adjuvant // *J Virol.* – 2013. – V. 87. – N. 3. – P. 1290-1300.

159. Marx M., Zumpe M., Troschke-Meurer S., *et al.* Co-expression of IL-15 enhances anti-neuroblastoma effectivity of a tyrosine hydroxylase-directed DNA vaccination in mice // *PLoS One*. – 2018. – V. 13. – N. 11. – P. e0207320.
160. McCaffrey J., Donnelly R.F., McCarthy H.O. Microneedles: an innovative platform for gene delivery // *Drug Deliv Transl Res*. – 2015. – V. 5. – N. 4. – P. 424-437.
161. Megati S., Garcia-Hand D., Cappello S., *et al.* Modifying the HIV-1 env gp160 gene to improve pDNA vaccine-elicited cell-mediated immune responses // *Vaccine*. – 2008. – V. 26. – N. 40. – P. 5083-5094.
162. Menachery V.D., Yount B.L. Jr, Debbink K., *et al.* A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence // *Nat Med*. – 2015. – V. 21. – N. 12. – P. 1508-1513.
163. Menni C., May A., Polidori L., *et al.* COVID-19 vaccine waning and effectiveness and side-effects of boosters: a prospective community study from the ZOE COVID Study // *Lancet Infect Dis*. – 2022. – V. 22. – N. 7. – P. 1002-1010.
164. Modjarrad K., Roberts C.C., Mills K.T., *et al.* Safety and immunogenicity of an anti-Middle East respiratory syndrome coronavirus DNA vaccine: a phase 1, open-label, single-arm, dose-escalation trial // *Lancet Infect Dis*. – 2019. – V. 19. – N. 9. – P. 1013-1022.
165. Mohraz M., Salehi M., Tabarsi P., *et al.* Safety and immunogenicity of an inactivated virus particle vaccine for SARS-CoV-2, BIV1-CovIran: findings from double-blind, randomised, placebo-controlled, phase I and II clinical trials among healthy adults // *BMJ Open*. – 2022. – V. 12. – N. 4. – P. e056872.
166. Mooij P., García-Arriaza J., Pérez P., *et al.* Poxvirus MVA Expressing SARS-CoV-2 S Protein Induces Robust Immunity and Protects Rhesus Macaques From SARS-CoV-2 // *Front Immunol*. – 2022. – V. 13. – P. 845887.
167. Morais P., Adachi H., Yu Y.T. The Critical Contribution of Pseudouridine to mRNA COVID-19 Vaccines // *Front Cell Dev Biol*. – 2021. – V. 9. – P. 789427.
168. Nakagami H., Hayashi H., Sun J., *et al.* Phase I Study to Assess the Safety and Immunogenicity of an Intradermal COVID-19 DNA Vaccine Administered Using a

- Pyro-Drive Jet Injector in Healthy Adults // *Vaccines* (Basel). – 2022. – V. 10. – N. 9. – P. 1427.
169. Orlandini von Niessen A.G., Poleganov M.A., Rechner C., *et al.* Improving mRNA-Based Therapeutic Gene Delivery by Expression-Augmenting 3' UTRs Identified by Cellular Library Screening // *Mol Ther.* – 2019. – V. 27. – N. 4. – P. 824-836.
170. Ozdarendeli A., Sezer Z., Pavel S.T.I., *et al.* Safety and immunogenicity of an inactivated whole virion SARS-CoV-2 vaccine, TURKOVAC, in healthy adults: Interim results from randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 and 2 trials // *Vaccine.* – 2023. – V. 41. – N. 2. – P. 380-390.
171. Palacios R., Patiño E.G., de Oliveira Piorelli R., *et al.* Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Phase III Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of treating Healthcare Professionals with the Adsorbed COVID-19 (Inactivated) Vaccine Manufactured by Sinovac - PROFISCOV: A structured summary of a study protocol for a randomised controlled trial // *Trials.* – 2020. – V. 21. – N. 1. – P. 853.
172. Pascuale C.A., Varese A., Ojeda D.S., *et al.* Immunogenicity and reactogenicity of heterologous immunization against SARS CoV-2 using Sputnik V, ChAdOx1-S, BBIBP-CorV, Ad5-nCoV, and mRNA-1273 // *Cell Rep Med.* – 2022. – V. 3. – N. 8. – P. 100706.
173. Peng X., Fang X., Li J., *et al.* Enhancing immune responses of EV71 VP1 DNA vaccine by co-inoculating plasmid IL-12 or GM-CSF expressing vector in mice // *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand).* – 2016. – V. 62. – N. 4. – P. 35-41.
174. Pérez P., Lázaro-Frías A., Zamora C., *et al.* A Single Dose of an MVA Vaccine Expressing a Prefusion-Stabilized SARS-CoV-2 Spike Protein Neutralizes Variants of Concern and Protects Mice from a Lethal SARS-CoV-2 Infection // *Front Immunol.* – 2022. – V. 12. – P. 824728.
175. Pitisuttithum P., Luvira V., Lawpoolsri S., *et al.* Safety and immunogenicity of an inactivated recombinant Newcastle disease virus vaccine expressing SARS-CoV-2 spike: Interim results of a randomised, placebo-controlled, phase 1 trial // *EClinicalMedicine.* – 2022. – V. 45. – P. 101323.

176. Ponce-de-León S., Torres M., Soto-Ramírez L.E., *et al.* Safety and immunogenicity of a live recombinant Newcastle disease virus-based COVID-19 vaccine (Patria) administered via the intramuscular or intranasal route: Interim results of a non-randomized open label phase I trial in Mexico // *medRxiv.* – 2022. – P. 2022.02.08.22270676.
177. Puga-Gómez R., Ricardo-Delgado Y., Rojas-Iriarte C., *et al.* Open-label phase I/II clinical trial of SARS-CoV-2 receptor binding domain-tetanus toxoid conjugate vaccine (FINLAY-FR-2) in combination with receptor binding domain-protein vaccine (FINLAY-FR-1A) in children // *Int J Infect Dis.* – 2023. – V. 126. – P. 164-173.
178. Qin L., Ding Y., Pahud D.R., *et al.* Promoter attenuation in gene therapy: interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha inhibit transgene expression // *Hum Gene Ther.* – 1997. – V. 8. – N. 17. – P. 2019-2029.
179. Quinlan B.D., Mou H., Zhang L., *et al.* The SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicits a potent neutralizing response without antibody-dependent enhancement // *bioRxiv.* – 2020. – P. 2020.04.10.036418.
180. Ramot Y., Caselli G., Aurisicchio L., *et al.* Toxicity and Local Tolerance of COVID- eVax, a Plasmid DNA Vaccine for SARS-CoV-2, Delivered by Electroporation // *Toxicol Pathol.* – 2021. – V. 49. – N. 7. – P. 1255-1268.
181. Ranzani O.T., Hitchings M.D.T., Dorion M., *et al.* Effectiveness of the CoronaVac vaccine in older adults during a gamma variant associated epidemic of covid-19 in Brazil: test negative case-control study // *BMJ.* – 2021. – V. 374. – n2015.
182. Ravichandran S., Coyle E.M., Klenow L., *et al.* Antibody signature induced by SARS-CoV-2 spike protein immunogens in rabbits // *Sci Transl Med.* – 2020. – V. 12. – N. 550. – P. eabc3539.
183. Reed C.C., Schultheis K., Andrade V.M., *et al.* Design, immunogenicity and efficacy of a Pan-SARS-CoV-2 synthetic DNA vaccine // *bioRxiv.* – 2021. – P. 2021.05.11.443592.
184. Reguzova A., Antonets D., Karpenko L., Ilyichev A., Maksyutov R., Bazhan S. Design and evaluation of optimized artificial HIV-1 poly-T cell-epitope immunogens // *PLoS One.* – 2015. – V. 10. – N. 3. – P. e0116412.

185. Richetta M., Gómez E., Lucero M.S., *et al.* Comparison of homologous and heterologous prime-boost immunizations combining MVA-vectored and plant-derived VP2 as a strategy against IBDV // *Vaccine*. – 2017. – V. 35. – N. 1. – P. 142-148.
186. Rogers T.F., Zhao F., Huang D., *et al.* Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model // *Science*. – 2020. – V. 369. – N. 6506. – P. 956-963.
187. Rosati M., Agarwal M., Hu X., *et al.* Control of SARS-CoV-2 infection after Spike DNA or Spike DNA+Protein co-immunization in rhesus macaques // *PLoS Pathog.* – 2021. – V. 17. – N. 9. – P. e1009701.
188. Rosenblum H.G., Wallace M., Godfrey M., *et al.* Interim Recommendations from the Advisory Committee on Immunization Practices for the Use of Bivalent Booster Doses of COVID-19 Vaccines - United States, October 2022 // *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* – 2022. – V. 71. – N. 45. – P. 1436-1441.
189. Rosner A., Steiner M., Melamed S., *et al.* rVSV- Δ G-SARS-CoV-2-S vaccine: repeated intramuscular (IM) toxicity, local tolerance, immunogenicity and biodistribution study in NZW rabbits // *Arch Toxicol.* – 2022. – V. 96. – N. 8. – P. 2329-2339.
190. Rothe C., Schunk M., Sothmann P., *et al.* Transmission of 2019-nCoV Infection from an Asymptomatic Contact in Germany // *N Engl J Med.* – 2020. – V. 382. – N. 10. – P. 970-971.
191. Sadoff J., Gray G., Vandebosch A., *et al.* Safety and Efficacy of Single-Dose Ad26.COV2.S Vaccine against Covid-19 // *N Engl J Med.* – 2021. – V. 384. – N. 23. – P. 2187-2201.
192. Safavi A, Kefayat A, Mahdevar E, Abiri A, Ghahremani F. Exploring the out of sight antigens of SARS-CoV-2 to design a candidate multi-epitope vaccine by utilizing immunoinformatics approaches // *Vaccine*. – 2020. – V. 38. – V. 48. – P. 7612-7628.
193. Sajadian A., Tabarraei A., Soleimanjahi H., *et al.* Comparing the effect of Toll-like receptor agonist adjuvants on the efficiency of a DNA vaccine // *Arch Virol.* – 2014. – V. 159. – N. 8. – P. 1951-1960.

194. Sällberg M., Frelin L., Ahlén G., Sällberg-Chen M. Electroporation for therapeutic DNA vaccination in patients // *Med Microbiol Immunol.* – 2015. – V. 204. – N. 1. – P. 131-135.
195. Samad A., Ahammad F., Nain Z., *et al.* Designing a multi-epitope vaccine against SARS-CoV-2: an immunoinformatics approach // *J Biomol Struct Dyn.* – 2022. – V. 40. – N. 1. – P. 14-30.
196. Schoenmaker L., Witzigmann D., Kulkarni J.A., *et al.* mRNA-lipid nanoparticle COVID-19 vaccines: Structure and stability // *Int J Pharm.* – 2021. – V. 601. – P. 120586.
197. Sedic M., Senn J.J., Lynn A., *et al.* Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey // *Vet Pathol.* – 2018. – V. 55. – N. 2. – P. 341-354.
198. Seo Y.B., Ko A., Shin D., *et al.* Potentiating the cross-reactive IFN- γ T cell and polyfunctional T cell responses by heterologous GX-19N DNA booster in mice primed with either a COVID-19 mRNA vaccine or inactivated vaccine // *bioRxiv.* – 2022. – 2022.05.29.493923.
199. Seo Y.B., Shin D., Suh Y.S., *et al.* Marked enhancement of neutralizing antibody and IFN- γ T-cell responses by GX-19N DNA booster in mice primed with inactivated vaccine // *bioRxiv.* – 2021. – 2021.11.02.467026.
200. Sharma R., Tiwari S., Dixit A. Covaxin: An overview of its immunogenicity and safety trials in India // *Bioinformation.* – 2021. – V. 17. – N. 10. – P. 840-845.
201. Sheikh A., McMenamain J., Taylor B., Robertson C.; Public Health Scotland and the EAVE II Collaborators. SARS-CoV-2 Delta VOC in Scotland: demographics, risk of hospital admission, and vaccine effectiveness // *Lancet.* – 2021. – V. 397. – N. 10293. – P. 2461-2462.
202. Shi R., Shan C., Duan X., *et al.* A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2 // *Nature.* – 2020. – V. 584. – N. 7819. – P. 120-124.

203. Shkoda A.S., Gushchin V.A., Ogarkova D.A., *et al.* Sputnik V Effectiveness against Hospitalization with COVID-19 during Omicron Dominance // *Vaccines (Basel)*. – 2022. – V. 10. – N. 6. – P. 938.
204. Singh A. Eliciting B cell immunity against infectious diseases using nanovaccines // *Nat Nanotechnol.* – 2021. – V. 16. – N. 1. – P. 16-24.
205. Smit M.J., Sander A.F., Ariaans M.B.P.A., *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. – V. 4. – N. 3. – P. e140-e148.
206. Smith T.R.F., Patel A., Ramos S., *et al.* Immunogenicity of a DNA vaccine candidate for COVID-19 // *Nat Commun.* – 2020. – V. 11. – N. 1. – P. 2601.
207. Song F., Fux R., Provacica L.B., *et al.* Middle East respiratory syndrome coronavirus spike protein delivered by modified vaccinia virus Ankara efficiently induces virus-neutralizing antibodies // *J Virol.* – 2013. – V. 87. – N. 21. – P. 11950-11954.
208. Spencer A.J., Morris S., Ulaszewska M., *et al.* The ChAdOx1 vectored vaccine, AZD2816, induces strong immunogenicity against SARS-CoV-2 beta (B.1.351) and other variants of concern in preclinical studies // *EBioMedicine*. – 2022. – V. 77. – P. 103902.
209. Stephenson K.E., Le Gars M., Sadoff J., *et al.* Immunogenicity of the Ad26.COV2.S Vaccine for COVID-19 // *JAMA*. – 2021. – V. 325. – N. 15. – P. 1535-1544.
210. Sun S., Cai Y., Song T.Z., *et al.* Interferon-armed RBD dimer enhances the immunogenicity of RBD for sterilizing immunity against SARS-CoV-2 // *Cell Res.* – 2021. – V. 31. – N. 9. – P. 1011-1023.
211. Sun W., Liu Y., Amanat F., *et al.* A Newcastle disease virus expressing a stabilized spike protein of SARS-CoV-2 induces protective immune responses // *Nat Commun.* – 2021. – V. 12. – N. 1. – P. 6197.

212. Sun Z., Wu T., Xie H., *et al.* The Role of Cellular Immunity in the Protective Efficacy of the SARS-CoV-2 Vaccines // *Vaccines (Basel)*. – 2022. – V. 10. – N. 7. – P. 1103.
213. Sundaram A.K., Ewing D., Liang Z., *et al.* Immunogenicity of Adjuvanted Psoralen-Inactivated SARS-CoV-2 Vaccines and SARS-CoV-2 Spike Protein DNA Vaccines in BALB/c Mice // *Pathogens*. – 2021. – V. 10. – N. 5. – P. 626.
214. Tabarsi P., Anjidani N., Shahpari R., *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. – N. 2. – P. 215-220.
215. Tabarsi P., Anjidani N., Shahpari R., *et al.* Immunogenicity and safety of SpikoGen®, an adjuvanted recombinant SARS-CoV-2 spike protein vaccine as a homologous and heterologous booster vaccination: A randomized placebo-controlled trial // *Immunology*. – 2022. – V. 167. – N. 3. – P. 340-353.
216. Tabarsi P., Anjidani N., Shahpari R., *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. – N. 9. – P. 1263-1271.
217. Tabynov K., Turebekov N., Babayeva M., *et al.* An adjuvanted subunit SARS-CoV-2 spike protein vaccine provides protection against Covid-19 infection and transmission // *NPJ Vaccines*. – 2022. – V. 7. – N. 1. – P. 24.
218. Tahir Ul Qamar M., Shahid F., Aslam S., *et al.* Reverse vaccinology assisted designing of multiepitope-based subunit vaccine against SARS-CoV-2 // *Infect Dis Poverty*. – 2020. – V. 9. – N. 1. – P. 132.
219. Takano S., Aramaki Y., Tsuchiya S. Physicochemical properties of liposomes affecting apoptosis induced by cationic liposomes in macrophages // *Pharm Res*. – 2003. – V. 20. – N. 7. – P. 962-968.
220. Tang R., Zheng H., Wang B.S., *et al.* Safety and immunogenicity of aerosolised Ad5-nCoV, intramuscular Ad5-nCoV, or inactivated COVID-19 vaccine CoronaVac given as the second booster following three doses of CoronaVac: a multicentre, open-

- label, phase 4, randomised trial // *Lancet Respir Med.* – 2023. – V. 11. – N. 7. – P. 613-623.
221. Tanriover M.D., Aydin O.A., Guner R., *et al.* Efficacy, Immunogenicity, and Safety of the Two-Dose Schedules of TURKOVAC versus CoronaVac in Healthy Subjects: A Randomized, Observer-Blinded, Non-Inferiority Phase III Trial // *Vaccines (Basel).* – 2022. – V. 10. – N. 11. – P. 1865.
222. Tasker S., Bendel D., Bevan M., *et al.* Phase 1 Placebo-Controlled Trial of COVI-VAC™, an Intranasal, Live Attenuated COVID-19 Vaccine. // *Open Forum Infectious Diseases.* – 2021. – V. 8. – S. 1. – P. S394.
223. Tcheou J., Raskin A., Singh G., *et al.* Safety and Immunogenicity Analysis of a Newcastle Disease Virus (NDV-HXP-S) Expressing the Spike Protein of SARS-CoV-2 in Sprague Dawley Rats // *Front Immunol.* – 2021. – V. 12. – P. 791764.
224. Tebas P., Kraynyak K.A., Patel A., *et al.* Intradermal SynCon® Ebola GP DNA Vaccine Is Temperature Stable and Safely Demonstrates Cellular and Humoral Immunogenicity Advantages in Healthy Volunteers // *J Infect Dis.* – 2019. – V. 220. – N. 3. – P. 400-410.
225. Tebas P., Roberts C.C., Muthumani K., *et al.* Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine // *N Engl J Med.* – 2021. – V. 385. – N. 12. – P. e35.
226. Tejada-Mansir A., García-Rendón A., Guerrero-Germán P. Plasmid-DNA lipid and polymeric nanovaccines: a new strategic in vaccines development // *Biotechnol Genet Eng Rev.* – 2019. – V. 35. – N. 1. – P. 46-68.
227. Thrane S., Janitzek C.M., Matondo S., *et al.* Bacterial superglue enables easy development of efficient virus-like particle based vaccines // *J Nanobiotechnology.* – 2016. – V. 14. – P. 30.
228. Tian J.H., Patel N., Haupt R., *et al.* SARS-CoV-2 spike glycoprotein vaccine candidate NVX-CoV2373 immunogenicity in baboons and protection in mice // *Nat Commun.* – 2021. – V. 12. – N. 1. – P. 372.
229. Toledo-Romaní M.E., García-Carmenate M., Valenzuela-Silva C., *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.

230. Toledo-Romani M.E., García-Carmenate M., Verdecia-Sánchez L., *et al.* Safety and immunogenicity of anti-SARS-CoV-2 heterologous scheme with SOBERANA 02 and SOBERANA Plus vaccines: Phase IIb clinical trial in adults // *Med.* – 2022. – V. 3. – N. 11. – P. 760-773.

231. Torales J., Cuenca-Torres O., Barrios L., *et al.* An evaluation of the safety and immunogenicity of MVC-COV1901: Results of an interim analysis of a phase III, parallel group, randomized, double-blind, active-controlled immunobridging study in Paraguay // *Vaccine.* – 2023. – V. 41. – N. 1. – P. 109-118.

232. Tscherne A., Schwarz J.H., Rohde C., *et al.* Immunogenicity and efficacy of the COVID-19 candidate vector vaccine MVA-SARS-2-S in preclinical vaccination // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2021. – V. 118. – N. 28. – P. e2026207118.

233. Tusé D., Nandi S., McDonald K.A., Buyel J.F. The Emergency Response Capacity of Plant-Based Biopharmaceutical Manufacturing-What It Is and What It Could Be // *Front Plant Sci.* – 2020. – V. 11. – P. 594019.

234. Vaine M., Wang S., Hackett A., Arthos J., Lu S. Antibody responses elicited through homologous or heterologous prime-boost DNA and protein vaccinations differ in functional activity and avidity // *Vaccine.* – 2010. – V. 28. – N. 17. – P. 2999-3007.

235. van Doremalen N., Lambe T., Spencer A., *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 vaccination prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques // *bioRxiv.* – 2020. – P. 2020.05.13.093195.

236. van Doremalen N., Schulz J.E., Adney D.R., *et al.* ChAdOx1 nCoV-19 (AZD1222) or nCoV-19-Beta (AZD2816) protect Syrian hamsters against Beta Delta and Omicron variants // *Nat Commun.* – 2022. – V. 13. – N. 1. – P. 4610.

237. Vanniasinkam T., Reddy S.T., Ertl H.C. DNA immunization using a non-viral promoter // *Virology.* – 2006. – V. 344. – N. 2. – P. 412-420.

238. Veit S., Jany S., Fux R., Sutter G., Volz A. CD8+ T Cells Responding to the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Protein Delivered by Vaccinia Virus MVA in Mice // *Viruses.* – 2018. – V. 10. – N. 12. P. 718.

239. Voigt E.A., Gerhardt A., Hanson D., *et al.* A self-amplifying RNA vaccine against COVID-19 with long-term room-temperature stability // *NPJ Vaccines*. – 2022. – V. 7. – N. 1. – P. 136.
240. Vonderheide R.H., Kraynyak K.A., Shields A.F., *et al.* Phase 1 study of safety, tolerability and immunogenicity of the human telomerase (hTERT)-encoded DNA plasmids INO-1400 and INO-1401 with or without IL-12 DNA plasmid INO-9012 in adult patients with solid tumors // *J Immunother Cancer*. – 2021. – V. 9. – N. 7. – P. e003019.
241. Voysey M., Clemens S.A.C., Madhi S.A., *et al.* Safety and efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 vaccine (AZD1222) against SARS-CoV-2: an interim analysis of four randomised controlled trials in Brazil, South Africa, and the UK // *Lancet*. – 2021. – V. 397. – N. 10269. – P. 99-111.
242. Walsh E.E., Frenck R.W. Jr, Falsey A.R., *et al.* Safety and Immunogenicity of Two RNA-Based Covid-19 Vaccine Candidates // *N Engl J Med*. – 2020. – V. 383. – N. 25. – P. 2439-2450.
243. Walters J.N., Schouest B., Patel A., *et al.* Prime-boost vaccination regimens with INO-4800 and INO-4802 augment and broaden immune responses against SARS-CoV-2 in nonhuman primates // *Vaccine*. – 2022. – V. 40. – N. 21. – P. 2960-2969.
244. Wang C.Y., Hwang K.P., Kuo H.K., *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. – V. 132. – N. 10. – P. e157707.
245. Wang C.Y., Wang P.N., Chiu M.J., *et al.* UB-311, a novel UBITH® amyloid β peptide vaccine for mild Alzheimer's disease // *Alzheimers Dement (N Y)*. – 2017. – V. 3. – N. 2. – P. 262-272.
246. Wang H., Zhang Y., Huang B., *et al.* Development of an Inactivated Vaccine Candidate, BBIBP-CorV, with Potent Protection against SARS-CoV-2 // *Cell*. – 2020. – V. 182. – N. 3. – P. 713-721.
247. Wang Q., Lei C., Wan H., Liu Q. Improved cellular immune response elicited by a ubiquitin-fused DNA vaccine against *Mycobacterium tuberculosis* // *DNA Cell Biol*. – 2012. – V. 31. – N. 4. – P. 489-95.

248. Wang S., Yates N.L., Pollara J., *et al.* Broadly binding and functional antibodies and persisting memory B cells elicited by HIV vaccine PDPHV // *NPJ Vaccines*. – 2022. – V. 7. – N. 1. – P. 18.
249. Wang S.T., Chang C.C., Yen M.C., *et al.* RNA interference-mediated silencing of Foxo3 in antigen-presenting cells as a strategy for the enhancement of DNA vaccine potency // *Gene Ther.* – 2011. – V. 18. – N. 4. – P. 372-383.
250. Wang Y., Yang C., Song Y., *et al.* Scalable live-attenuated SARS-CoV-2 vaccine candidate demonstrates preclinical safety and efficacy // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2021. – V. 118. – N. 29. – P. e2102775118.
251. Ward B.J., Gobeil P., Séguin A., *et al.* Phase 1 randomized trial of a plant-derived virus-like particle vaccine for COVID-19 // *Nat Med*. – 2021. – V. 27. – N. 6. – P. 1071-1078.
252. Wu H., Chen Y., Liu H., *et al.* Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice // *Eur J Immunol*. – 2016. – V. 46. – N. 5. – P. 1152-1161.
253. Wu S., Huang J., Zhang Z., *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of an aerosolised adenovirus type-5 vector-based COVID-19 vaccine (Ad5-nCoV) in adults: preliminary report of an open-label and randomised phase 1 clinical trial // *Lancet Infect Dis*. – 2021. – V. 21. – N. 12. – P. 1654-1664.
254. Xia S., Zhang Y., Wang Y., *et al.* Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBIBP-CorV: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 trial // *Lancet Infect Dis*. – 2021. – V. 21. – N. 1. – P. 39-51.
255. Yadav P.D., Ella R., Kumar S., *et al.* Immunogenicity and protective efficacy of inactivated SARS-CoV-2 vaccine candidate, BBV152 in rhesus macaques // *Nat Commun*. – 2021. – V. 12. – N. 1. – P. 1386.
256. Yadav P.D., Kumar S., Agarwal K., *et al.* Needle-free injection system delivery of ZyCoV-D DNA vaccine demonstrated improved immunogenicity and protective efficacy in rhesus macaques against SARS-CoV-2 // *J Med Virol*. – 2023. – V. 95. – N. 2. – P. e28484.

257. Yang S., Li Y., Dai L., *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. – N. 8. – P. 1107-1119.
258. Yu J., Thomas P.V., McMahan K., *et al.* Protection against SARS-CoV-2 Omicron BA.1 variant challenge in macaques by prime-boost vaccination with Ad26.COV2.S and SpFN // *Sci Adv.* – 2022. – V. 8. – N. 47. – P. eade4433.
259. Yu J., Tostanoski L.H., Peter L., *et al.* DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques // *Science.* – 2020. – V. 369. – N. 6505. – P. 806-811.
260. Yuan M., Liu H., Wu N.C., Wilson I.A. Recognition of the SARS-CoV-2 receptor binding domain by neutralizing antibodies // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2021. – V. 538. – P. 192-203.
261. Yue C., Wang P., Tian J., *et al.* Seeing the T cell Immunity of SARS-CoV-2 and SARS-CoV: Believing the Epitope-Oriented Vaccines // *Int J Biol Sci.* – 2023. – V. 19. – N. 13. – P. 4052-4060.
262. Zhang J., Hu Z., He J., *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. – N. 1. – P. 1589-1597.
263. Zhang Y., Zeng G., Pan H., *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial // *Lancet Infect Dis.* – 2021. – V. 21. – N. 2. – P. 181-192.
264. Zhang Z., He Q., Zhao W., *et al.* A Heterologous V-01 or Variant-Matched Bivalent V-01D-351 Booster following Primary Series of Inactivated Vaccine Enhances the Neutralizing Capacity against SARS-CoV-2 Delta and Omicron Strains // *J Clin Med.* – 2022. – V. 11. – N. 14. – P. 4164.
265. Zhao X., Zhang R., Qiao S., *et al.* Omicron SARS-CoV-2 Neutralization from Inactivated and ZF2001 Vaccines // *N Engl J Med.* – 2022. – V. 387. – N. 3. – P. 277-280.

266. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., *et al.* A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin // *Nature*. – 2020. – V. 579. – N. 7798. – P. 270-273.
267. Zhu F., Zhuang C., Chu K., *et al.* Safety and immunogenicity of a live-attenuated influenza virus vector-based intranasal SARS-CoV-2 vaccine in adults: randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 and 2 trials // *Lancet Respir Med*. – 2022. – V. 10. – N. 8. – P. 749-760.
268. Zhu F.C., Guan X.H., Li Y.H., *et al.* Immunogenicity and safety of a recombinant adenovirus type-5-vectored COVID-19 vaccine in healthy adults aged 18 years or older: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial // *Lancet*. – 2020. – V. 396. – N. 10249. – P. 479-488.
269. Zhuo M., Song L., Tang Y., *et al.* Vaccination with ubiquitin-hepatitis B core antigen-cytoplasmic transduction peptide enhances the hepatitis B virus-specific cytotoxic T-lymphocyte immune response and inhibits hepatitis B virus replication in transgenic mice // *Mol Med Rep*. – 2015. – V. 12. – N. 3. – P. 3591-3598.
270. <http://www.jcat.de>
271. <https://covid19.who.int>
272. <https://sputnikvaccine.com/rus/about-vaccine>
273. <https://www.biorender.com>
274. <https://www.entospharma.com/fusogenix>
275. <https://www.thermofisher.com/ru/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html>