

## ПОЛУЧЕНИЕ МАННАНОВ ИЗ КЛЕТОЧНЫХ СТенок ДРОЖЖЕЙ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* И ОЦЕНКА ИХ АДЪЮВАНТНОЙ СПОСОБНОСТИ НА МОДЕЛИ СУБЪЕДИНИЧНОЙ ВАКЦИНЫ

Есина Т.И.,  
Волосникова Е.А.,  
Щербаков Д.Н.,  
Волкова Н.В.,  
Зайковская А.В.,  
Шими́на Г.Г.,  
Даниленко Е.Д.

ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (630559, Новосибирская область, р.п. Кольцово, Россия)

Автор, ответственный за переписку:  
Есина Татьяна Игоревна,  
e-mail: esina\_ti@vector.nsc.ru

### РЕЗЮМЕ

**Обоснование.** Полисахариды обладают адъювантными свойствами, биodeградируемы и безопасны, а их производство не отличается трудоёмкостью. В связи с этим получение адъювантов на основе полисахаридов является актуальной задачей.

**Цель исследования.** Разработка способа получения маннанов из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и исследование их адъювантных свойств на модели субъединичной вакцины.

**Материалы и методы.** Препарат маннанов получали из клеточной стенки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* методами ферментативного и щелочного гидролиза. Адъювантные свойства исследовали на мышах линии BALB/c. Для иммунизации в качестве антигена использовали рекомбинантный белок RBD (рецептор-связывающий домен поверхностного S-белка коронавируса SARS-CoV-2, вариант B.1.617.2 (Delta)). В качестве антигенов для иммуноферментного анализа при определении титров специфических антител использовали рекомбинантный RBD (варианты (Wuhan-Hu-1) и B.1.617.2 (Delta)) и рекомбинантный спайковый белок (варианты (Wuhan-Hu-1), B.1.617.2 (Delta) и B.1.1.529 (Omicron)). Титр вируснейтрализующих антител определяли реакцией вируснейтрализации с использованием штаммов SARS-CoV-2 Wuhan – hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Wuhan-Hu-1), Delta – hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta (B.1.617.2)) и Omicron 1 – hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (Omicron (B.1.1.529)).

**Результаты.** Разработанная схема позволяет получать до 200 мг препарата маннанов из 10 г клеточного дебриса дрожжей. Двукратная, с интервалом 14 суток, иммунизация RBD в дозе 50 мкг с использованием маннанов в дозах 40 и 10 мкг вызывала наработку специфических антител в титрах от 1:2477330 до 1:188360. Титр нейтрализующих антител для штамма Delta – hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 при использовании маннанов в дозе 40 мкг/мышь составил 1:485. Исследование токсических свойств показало, что полученный препарат относится к группе малотоксичных веществ.

**Заключение.** Разработана схема получения малотоксичного препарата маннанов из дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Наибольшая адъювантная активность достигалась при использовании маннанов в дозе 40 мкг/мышь. Сыворотки, полученные от иммунизированных животных, нейтрализовали как гомологичные, так и гетерологичные штаммы SARS-CoV-2.

**Ключевые слова:** полисахариды, маннаны, адъюванты, RBD, SARS-CoV-2, антитела, токсичность

**Для цитирования:** Есина Т.И., Волосникова Е.А., Щербаков Д.Н., Волкова Н.В., Зайковская А.В., Шими́на Г.Г., Даниленко Е.Д. Получение маннанов из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и оценка их адъювантной способности на модели субъединичной вакцины. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(4): 221-229. doi: 10.29413/ABS.2024-9.4.24

Статья поступила: 01.04.2024

Статья принята: 04.07.2024

Статья опубликована: 25.09.2024

## MANNANS: OBTAINING FROM THE CELL WALLS OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE YEAST AND ASSESSING THEIR ADJUVANT PROPERTIES IN A SUBUNIT VACCINE MODEL

Esina T.I.,  
Volosnikova E.A.,  
Shcherbakov D.N.,  
Volkova N.V.,  
Zaykovskaya A.V.,  
Shimina G.G.,  
Danilenko E.D.

State Scientific Center for Virology  
and Biotechnology "Vector"  
of Rospotrebnadzor (Koltsovo 630559,  
Novosibirsk region, Russian Federation)

Corresponding author:  
Tatyana I. Esina,  
e-mail: esina\_ti@vector.nsc.ru

### ABSTRACT

**Background.** Polysaccharides are known to possess adjuvant properties, they are biodegradable, safe, and are of low-labor production. In this regard, the development of polysaccharide-based adjuvants is an urgent task.

**The aim.** To develop a method for obtaining mannans from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and to study their adjuvant properties using subunit vaccine model.

**Materials and methods.** The preparation of mannans was obtained from the *Saccharomyces cerevisiae* yeast by enzymatic and alkaline hydrolysis. Its adjuvant properties were assessed in BALB/c mice immunized with the recombinant receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 (S) protein (Delta (B.1.617.2)). The titers of specific antibodies in the blood sera were determined by ELISA assays using the recombinant RBD (Wuhan-Hu-1 and Delta), and the recombinant (S) protein (Wuhan-Hu-1, Delta and Omicron) as antigens. The titers of virus-neutralizing antibodies were determined using virus-neutralization tests with the SARS-CoV-2 virus strains Wuhan – hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Wuhan-Hu-1), Delta – hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta (B.1.617.2)), and Omicron 1 – hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (Omicron (B.1.1.529)).

**Results.** The developed scheme allowed for obtaining up to 200 mg of mannans from 10 g of yeast cell debris. Double, with a two-week interval, immunization with RBD (50 µg) in combination with mannans (40 µg and 10 µg) induced the production of specific antibodies in titers from 1:2477330 to 1:188360. The titer of virus-neutralizing antibodies to the Delta – hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 was 1:485 (40 µg of mannans per mouse).

**Conclusions.** We developed a scheme for obtaining a low-toxic preparation of mannans from the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The highest adjuvant activity was achieved when using mannans at the dose of 40 µg per mouse. Blood sera obtained from the immunized animals neutralized both homologous and heterologous SARS-CoV-2 strains.

**Key words:** polysaccharides, mannans, adjuvants, RBD, SARS-CoV-2, antibodies, toxicity

Received: 01.04.2024  
Accepted: 04.07.2024  
Published: 25.09.2024

**For citation:** Esina T.I., Volosnikova E.A., Shcherbakov D.N., Volkova N.V., Zaykovskaya A.V., Shimina G.G., Danilenko E.D. Mannans: Obtaining from the cell walls of *Saccharomyces cerevisiae* yeast and assessing their adjuvant properties in a subunit vaccine model. *Acta biomedica scientifica*. 2024; 9(4): 221-229. doi: 10.29413/ABS.2024-9.4.24

## АКТУАЛЬНОСТЬ

В настоящее время субъединичным вакцинам на основе рекомбинантных белков уделяется большое внимание в связи с их специфичностью, эффективностью и безопасностью [1]. Известно, что использование субъединичных вакцин предполагает совместное использование адъювантов для усиления иммунного ответа [2, 3].

Спайковый белок SARS-CoV-2 является ключевым элементом системы проникновения вируса в клетку и способен связываться с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) на поверхности клеток через рецептор-связывающий домен (RBD) [4, 5]. RBD спайкового белка SARS-CoV-2 является мишенью значительного числа нейтрализующих антител [6]. Блокирование взаимодействия RBD с ACE2 является стратегией разработки противовирусных агентов, и, таким образом, RBD может рассматриваться как потенциальный целевой антиген для разработки вакцин [7]. Однако показано, что в связи с невысокой иммуногенностью субъединичная вакцина на основе белка RBD должна содержать адъювант для активации иммунной системы [8, 9].

Соединения алюминия (гидроксид алюминия, аморфный гидроксифосфат алюминия, фосфат алюминия) входят в состав многих зарегистрированных вакцин [2, 10–12]. Помимо этого, широко представлена в составе вакцин группа адъювантов, относящихся к классу масляных эмульсий, таких как адъюванты Фрейнда («масло в воде») и монтаниды (стабилизированная эмульсия «вода в масле»). Полный адъювант Фрейнда (CFA, complete Freund's adjuvant) вызывает клеточный и гуморальный ответ за счёт убитых нагреванием микобактерий, содержащихся в нём, при этом его основным побочным эффектом является выраженное воспаление в месте введения. Неполный адъювант Фрейнда (IFA, incomplete Freund's adjuvant), имеющий тот же состав, что и CFA, за исключением отсутствия микобактерий, способствует стимуляции гуморального ответа, но при этом оказывает побочное действие, связанное с токсичностью масляных компонентов [13, 14]. Адъюванты на основе масляной эмульсии сквалена (MF59 и AS03) способствуют формированию более выраженного иммунитета, чем соли алюминия, но не до конца изучены [3, 14].

Механизм распознавания углеводных структур (маннаны, глюканы и хитины) Toll-подобным рецептором 4 (TLR4, Toll-like receptor 4), приводящий к индукции врождённого и адаптивного иммунитета, лежит в основе перспективного направления по разработке полисахаридных адъювантов [15]. Использование маннана как агониста TLR4 в составе вакцин приводит к повышению иммуногенности белкового антигена бактериальных вакцин [16] и повышению эффекта противоопухолевых вакцин [17]. Маннан из клеток дрожжей является биосовместимым и безопасным полисахаридным адъювантом, перспективным для мукозальных вакцин [18].

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Целью работы являлась разработка способа получения маннанов из клеточных стенок *Saccharomyces cerevisiae* и исследование их адъювантных свойств на модели субъединичной вакцины против COVID-19.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

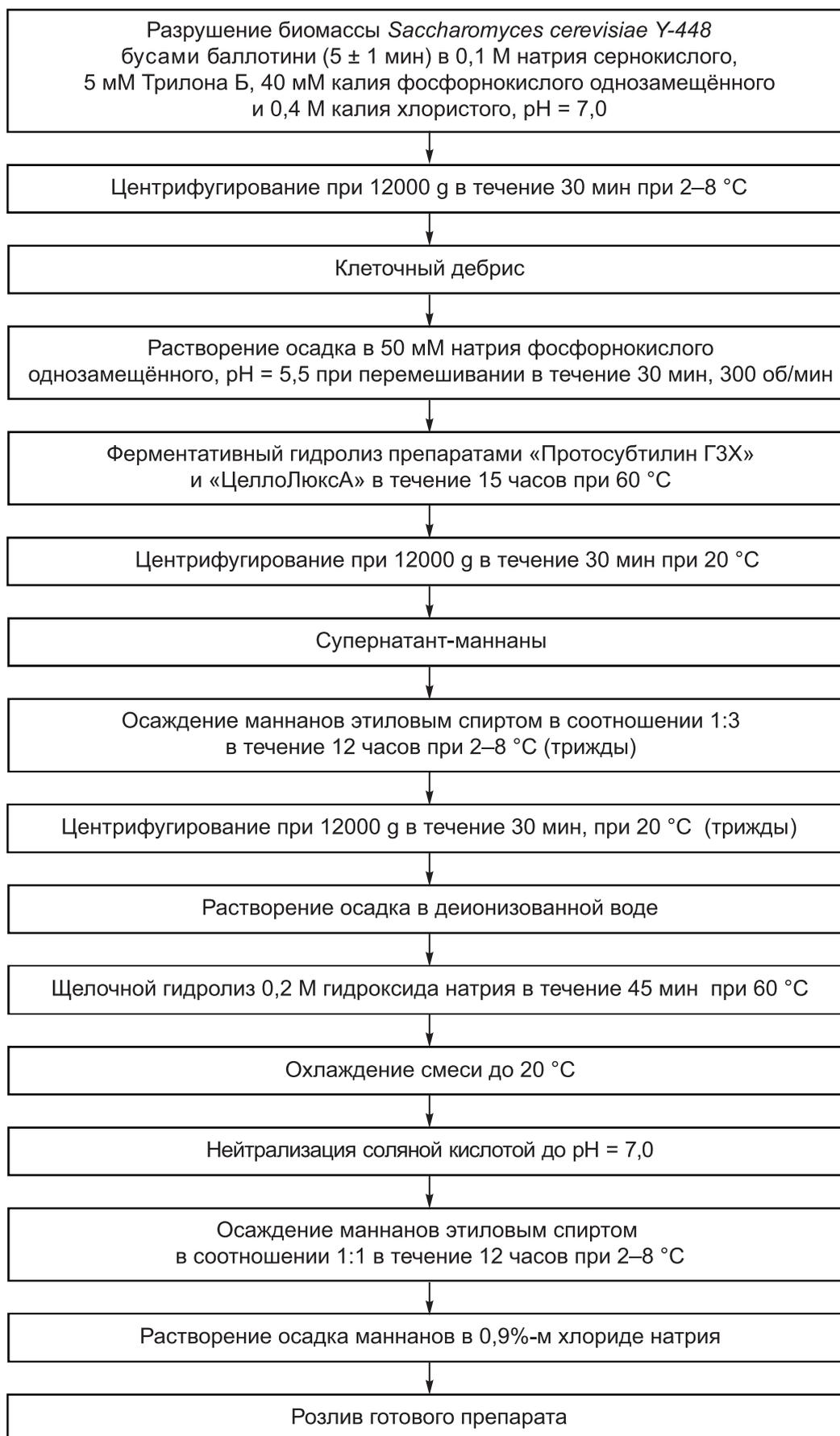
### Получение субстанции маннанов

Субстанцию маннанов получали из биомассы клеток *Saccharomyces cerevisiae* Y-448, которые разрушали механически бусами баллотини ( $5 \pm 1$  мин), в буфере, содержащем 0,1 М натрия серноокислого, 5 мМ Трилона Б, 40 мМ калия фосфорнокислого однозамещённого и 0,4 М калия хлористого, pH = 7,0. Разрушенные клетки растворяли в 50 мМ натрия фосфорнокислого однозамещённого, pH = 5,5. Ферментативный гидролиз проводили препаратами «Протосубтилин ГЗХ» и «ЦеллоЛюксА» (ООО ПО «Сиббиофарм», Бердск) (15 ч при 60 °С). Смесь после гидролиза охлаждали и центрифугировали (12000 г, 20 мин, 20 °С). К раствору супернатанта добавляли спирт этиловый для осаждения маннанов в соотношении 3:1 и центрифугировали (12000 г, 20 мин, 20 °С). Осадок подвергали водно-спиртовой отмывке до осветления промывных вод. Щелочной гидролиз проводили 0,2 М гидроксидом натрия (45 мин, 60 °С), смесь охлаждали до 20 °С, pH доводили до 7,0 соляной кислотой. Полученный полупродукт осаждали 100 мл этилового спирта в соотношении 1:1 и растворяли в 0,9%-м растворе хлорида натрия. Технологическая схема получения препарата маннанов представлена на рисунке 1.

### Иммунизация животных

Для иммунизации использовали рекомбинантный белок RBD (рецептор-связывающий домен поверхностного S-белка коронавируса SARS-CoV-2, вариант B.1.617.2 (Delta)), полученный в ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Исследование адъювантных свойств проводили на самцах мышей линии BALB/c массой 16–18 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской области), объединённых в группы по 10 голов, иммунизированных белком RBD. Эксперименты были выполнены в соответствии с Федеральным законом «Об ответственном обращении с животными и о внесении изменений в отдельные законодательные акты Российской Федерации» от 27.12.2018 № 498-ФЗ. Эксперименты были одобрены Биоэтической комиссией ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (ГНЦ ВБ «Вектор»/10-09.2020, утверждён протоколом Биоэтической комиссии № 5 от 01.10.2020).

Первой группе мышей вводили внутримышечно RBD в дозе 50 мкг, второй и третьей – RBD (50 мкг) с препаратом маннанов в дозе 40 мкг или 10 мкг/мышь (в объёме



**РИС. 1.**  
Технологическая схема получения маннанов из клеток *Saccharomyces cerevisiae*

**FIG. 1.**  
Technological diagram for obtaining mannans from *Saccharomyces cerevisiae* cells

200 мкл) соответственно. Препараты вводили внутримышечно двукратно с интервалом 14 суток. В качестве положительного контроля использовали мышей, которым по той же схеме вводили RBD и 250 мкг гидроксида алюминия  $Al(OH)_3$ ; в качестве отрицательного контроля – мышей, получавших физиологический раствор в эквивалентном объёме. Через 10 суток после второй иммунизации из ретроорбитального синуса брали образец крови для определения титров специфических антител и вируснейтрализующих антител [19].

#### Анализ титров специфических антител

Титры специфических антител в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве антигенов использовали рекомбинантный RBD поверхностного белка SARS-CoV-2 (варианты (Wuhan-Hu-1) и B.1.617.2 (Delta)) и рекомбинантный спайковый белок (варианты (Wuhan-Hu-1), B.1.617.2 (Delta) и B.1.1.529 (Omicron)). Сорбцию антигенов (200 нг/лунка) проводили в буфере, содержащем 0,1 М  $NaHCO_3$ , pH = 9,6. Планшеты инкубировали в течение 16 ч при температуре 4 °С, раствор белка удаляли стряхиванием, в лунки добавляли по 150 мкл блокирующего буфера (1%-й раствор бычьего сывороточного альбумина (BSA, bovine serum albumin), на забуференном физиологическом растворе (PBS, phosphate-buffered saline), pH = 7,4, продолжали инкубацию в течение 1 ч при 37 °С. После удаления блокирующего буфера проводили трёхкратную промывку раствором PBS с 0,5%-м Tween-20. Далее в лунки добавляли сыворотки крови (разведённые в 10 раз, далее титровали с шагом 20) иммунизированных животных в объёме 50 мкл/лунка в блокирующем буфере и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После трёхкратной отмывки лунок раствором PBS с 0,5%-м Tween-20 в лунки добавляли по 100 мкл конъюгатов антимышиных антител с пероксидазой хрена (Sigma-Aldrich, США) в рабочем разведении 1:2000, инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После трёхкратной отмывки лунок раствором PBS с 0,5%-м Tween-20 добавляли 50 мкл жидкого субстрата на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ) и ацетатного буфера (100 мМ Na ацетат, pH = 4,5), содержащего  $H_2O_2$  в рабочей концентрации 1 %, инкубировали в течение 15 мин при 20 °С в защищённом от света месте. Реакцию блокировали добавлением 50 мкл 1 М HCl в каждую лунку. Оптическую плотность измеряли на мультимодальном ридере Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 450 нм. Титр определяли по значению максимального разведения, при котором сигнал оптической плотности превышал значение оптической плотности лунок с отрицательным контролем в три раза.

#### Анализ титров вируснейтрализующих антител

Титр вируснейтрализующих антител определяли при помощи реакции вируснейтрализации. С этой целью были использованы штаммы вируса SARS-CoV-2 Wuhan – hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Wuhan-Hu-1), Delta – hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta (B.1.617.2)) и Omicron 1 – hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021

(Omicron (B.1.1.529)), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Вирусосодержащий материал хранился при температуре –70 °С. Концентрация вируса в наработанном для анализа препарате составляла  $5 \times 10^6$  ТЦД50/мл (50%-я тканевая цитопатическая доза на миллилитр).

Определение нейтрализующих титров сывороток проводили путём учёта неповреждённого монослоя культуры клеток Vero-E6 в лунках 96-луночного планшета (Corning, США). Культуру клеток выращивали в ростовой питательной среде DMEM с добавлением 10%-й бычьей фетальной сыворотки и антибиотиков. Заражение клеток вирусами проводили в дозе 100 ТЦД50/лунку. Исследуемые образцы сыворотки крови разводили последовательно в среде DMEM (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия) с глутамином и антибиотиками с 2-кратным шагом, начиная с разведения 1:10 до 1:2560. К сывороткам в разных разведениях добавляли вирус в равной пропорции 1:1 и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. Затем смесь вируса и сыворотки наносили в дублях на монослой культуры клеток в объёме 100 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4 сут. при 37 °С во влажной атмосфере 5 %  $CO_2$ . Для окрашивания в каждую лунку планшета вносили 100 мкл 0,2%-го раствора генцианвиолета. Через 4 сут. жидкость из лунок удаляли и промывали лунки водой. Учёт результатов проводили визуально. Любое специфическое поражение культуры клеток в лунке учитывали как цитопатическое действие (ЦПД). Титром считали последнее разведение, при котором регистрировали защиту монослоя культуры клеток в лунках от ЦПД вируса. В качестве положительного контроля использовали 20-кратное разведение образца сыворотки крови реконвалесцента COVID-19 с ранее установленным титром 1:80. В качестве отрицательного контроля использовали питательную среду.

#### Метод определения параметров летальных доз при однократном внутрибрюшинном введении

Исследование проведено на 24 самцах аутбредных мышей CD-1 возрастом 8 недель с массой тела 18–21 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской области). Исследование проводили экспресс-методом определения средней эффективной дозы и её ошибки по методу Прозоровского [20]. Были взяты 14 последовательных доз препарата (от 3,98 до 95,0 мг/кг). Доза 95,0 мг/кг была максимальной возможной для введения. Животные были распределены случайным образом на 14 групп по 3 особи на каждую дозу. В течение первых суток и 1 раз в день в течение 7 суток после внутрибрюшинного введения животных взвешивали (весы электронные SCOUT II, OHAUS, США) и проводили клинический осмотр.

#### Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения Prism 8.0 (GraphPad,

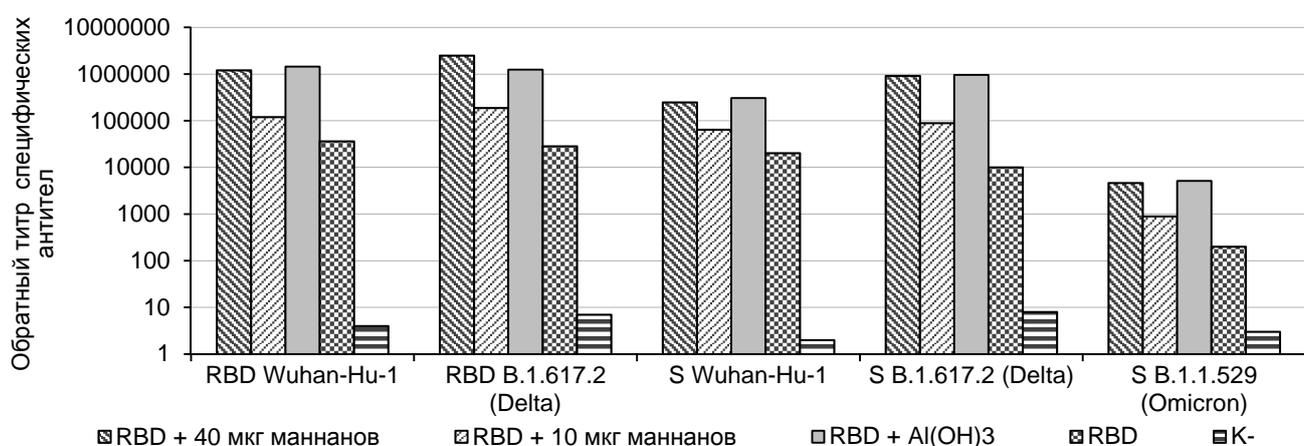
США), при этом  $p < 0,05$  считали показателем статистической значимости. Статистическую значимость различий среди разных групп животных определяли с помощью двустороннего непараметрического U-критерия Манна – Уитни с 95%-м доверительным интервалом или критерия Краскела – Уоллиса (для более чем двух групп).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

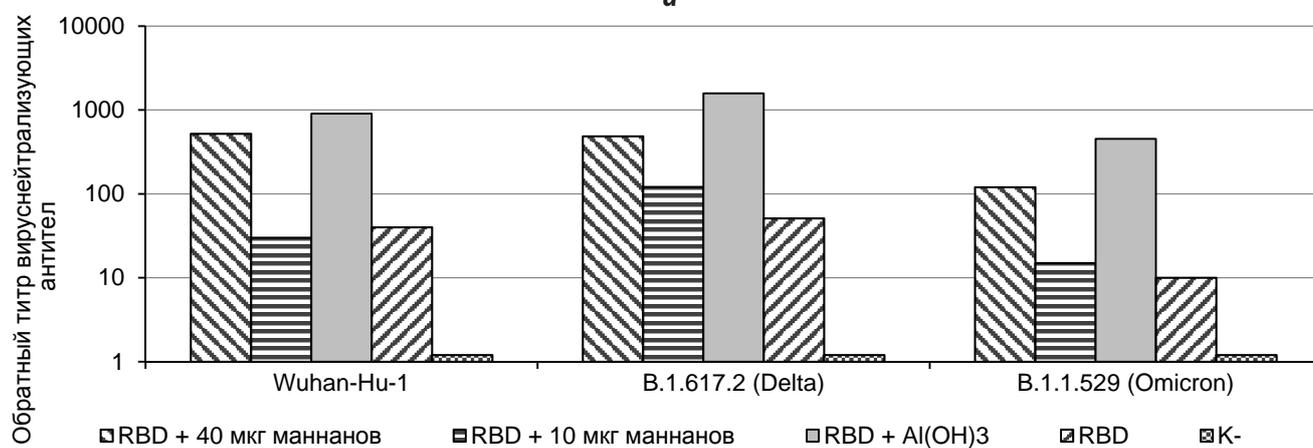
Разработанный нами способ предполагает получение маннанов из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с использованием ферментных комплексов, содержащих кселаназу, целлюлазу и про-

теазу. Совокупность технологических решений позволяет получать препарат маннанов, минимально загрязнённый примесными белками и другими балластными веществами. Выход по разработанной схеме целевого продукта из 10 г клеточного дебриса *Saccharomyces cerevisiae* составлял до 200 мг маннанов, обладающих высокой степенью чистоты.

При изучении параметров летальных доз максимальной возможной дозы препарата, которую нам удалось ввести самцам мышей, составила 95 мг/кг. Внутривентриальное введение препарата самцам мышей CD-1 во всех использованных дозах не вызывало гибели животных, изменения их внешнего вида, подвижности, поведенческих реакций, потребления пищи и воды, не наблюдалось и снижения массы тела мышей. В соответствии



**a**



**б**

**РИС. 2.**

Анализ гуморального ответа мышей после двукратной иммунизации RBD в комплексе с маннанами. **a** – обратный титр специфических антител; в качестве антигенов использованы RBD вариантов Wuhan-Hu-1 и Delta (B.1.617.2) и спайковые S-белки вариантов Wuhan-Hu-1, Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529). **б** – обратный титр вируснейтрализующих антител против штаммов вируса SARS-CoV-2: Wuhan – hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Wuhan-Hu-1), Delta – hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta (B.1.617.2)) и Omicron 1 – hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (Omicron (B.1.1.529))

**FIG. 2.**

Analysis of humoral response in mice after a double immunization with RBD in combination with mannans. **a** – reciprocal titers of the specific antibodies; RBD of Wuhan-Hu-1 and Delta (B.1.617.2), and Spike (S) proteins of Wuhan-Hu-1, Delta (B.1.617.2) and Omicron (B.1.1.529) are used as antigens. **б** – reciprocal titers of the virus-neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 virus strains: Wuhan – hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (Wuhan-Hu-1), Delta – hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta (B.1.617.2)), and Omicron 1 – hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (Omicron (B.1.1.529))

с классификацией по К.К. Сидорову [21, 22], препарат относится к группе малотоксичных веществ.

В экспериментах на мышах, иммунизированных белком RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 (вариант Delta), показано, что препараты маннанов обладают способностью усиливать выработку специфических и вируснейтрализующих антител. Иммунизация RBD в дозе 50 мкг с использованием препарата маннанов в двух дозах (40 и 10 мкг) вызывала выработку специфических антител, средний титр которых против гомологичного антигена (RBD, вариант Delta) составил 1:2477330 и 1:188360 соответственно (рис. 2а); для RBD Wuhan-Hu-1 значения титров статистически значимо не отличались ( $p > 0,05$ ). При использовании в качестве антигенов рекомбинантных спайковых белков титры антител сывороток крови иммунизированных животных были статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ). Так, для тримера спайкового белка варианта Delta титр составил 1:980000 и 1:96800 для дозы маннанов 40 и 10 мкг соответственно. Титры специфических антител в отношении рекомбинантного спайкового белка варианта Omicron были статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ).

Среднее значение обратного титра вируснейтрализующих антител для группы мышей, иммунизированных RBD с препаратом маннанов в дозе 10 мкг, было статистически значимо меньше ( $p < 0,05$ ) титра антител в группе, иммунизированной RBD с  $Al(OH)_3$ : 30 и 905 для варианта Wuhan-Hu-1; 121 и 1575 для варианта Delta (B.1.617.2); 15 и 452 для варианта Omicron (B.1.1.529). В то же время в группе животных, которым маннаны вводили в дозе 40 мкг (рис. 2б), эти значения статистически значимо не отличались ( $p > 0,05$ ): 520, 485 и 120 для Wuhan-Hu-1, Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529) соответственно.

Наиболее высокие значения обратных титров нейтрализующих антител (рис. 2б) были получены в отношении штаммов hCoV-19/Australia/MC01/2020 (Wuhan) и hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (Delta), в то время как в отношении hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (Omicron) они были статистически значимо ниже ( $p < 0,05$ ).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Необходимость разработки и внедрения в медицинскую практику новых вакцинных адъювантов неуклонно растёт. Это связано в первую очередь с тем, что классические адъюванты на основе солей алюминия обладают низкой эффективностью в индукции клеточного ответа и, кроме того, вызывают воспалительные и токсические реакции [23].

Маннаны представляют собой полисахариды или полимеры маннозы, узнаваемой рецепторами пектинов С-типа, такими как рецептор маннозы (CD206) и DC-SIGN (CD209). Показано, что маннаны, полученные из клеточной стенки дрожжей, усиливают иммунные реакции [24].

В литературе описаны способы получения маннанов с использованием методов щелочной экстракции

из стенок дрожжевых клеток, депротеинизации по методу Севага, метода изоэлектрической точки [25, 26]. В случае депротеинизации по методу Севага применяются агрессивные органические растворители, такие как хлороформ и бутанол, использование которых нежелательно при производстве иммунобиологических препаратов, вводимых людям. Помимо этого, нежелательным является использование метода экстракции серной кислотой, как описано в ряде работ [27, 28]. Известны способы получения маннанов из клеточных стенок дрожжей с использованием ферментативных препаратов, таких как Зимолитин [29].

Разработанный нами способ получения маннанов из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* позволяет получать высокоочищенный малотоксичный продукт.

Анализ адъювантной активности полученного препарата маннанов в экспериментах на животных показал, что препарат усиливает выработку специфических и вируснейтрализующих антител. Средний титр антител против гомологичного антигена (RBD, вариант Delta) достигал 1:2477330, что сравнимо со значением, полученным для группы положительного контроля, в которой использовали адъювант на основе гидроокиси алюминия. Результаты теста вируснейтрализации в целом коррелировали с результатами ИФА.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате данной работы была разработана схема получения препарата маннанов из клеточных стенок дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* с использованием комплексных ферментативных препаратов.

Показано, что использование в качестве адъювантов маннанов, полученных предложенным способом, приводит к увеличению выработки специфических антител. Наибольшая адъювантная активность полисахаридных адъювантов достигалась при использовании маннанов в дозе 40 мкг/мышь. Причём сыворотки, полученные от иммунизированных животных, нейтрализовали как гомологичные, так и гетерологичные штаммы SARS-CoV-2. В ходе исследования токсических свойств было показано, что полученный препарат маннанов относится к малотоксичным веществам. Таким образом, использование маннанов в качестве адъюванта может быть альтернативой применению традиционного адъюванта на основе гидроксида алюминия.

### Финансирование

Работа выполнена в рамках Государственного задания, тема ГЗ-1/22 «Поиск и фармако-токсикологическое исследование новых вакцинных адъювантов».

### Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

## ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Sharma O, Sultan AA, Ding H, Triggler CR. A review of the progress and challenges of developing a vaccine for COVID-19. *Front Immunol.* 2020; 11: 585354. doi: 10.3389/fimmu.2020.585354
2. Алпатова Н.А., Авдеева Ж.И., Лыскова С.Л., Головинская О.В., Гайдерова Л.А. Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 1). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2020; 20(4): 245-256. [Alpatova NA, Avdeeva ZhI, Lysikova SL, Golovinskaya OV, Gayderova LA. General characteristics of adjuvants and their mechanism of action (part 1). *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2020; 20(4): 245-256. (In Russ.)]. doi: 10.30895/2221-996X-2020-20-4-245-256
3. Алпатова Н.А., Авдеева Ж.И., Лыскова С.Л., Головинская О.В., Гайдерова Л.А., Бондарев В.П. Общая характеристика адъювантов и механизм их действия (часть 2). *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021; 21(1): 20-30. [Alpatova NA, Avdeeva ZhI, Lysikova SL, Golovinskaya OV, Gayderova LA, Bondarev VP. General characteristics of adjuvants and their mechanisms of action (part 2). *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2021; 21(1): 20-30. (In Russ.)]. doi: 10.30895/2221-996X-2021-21-1-20-30
4. Kadam SB, Sukhrmani GS, Bishnoi P, Pable AA, Barvkar VT. SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *J Basic Microbiol.* 2021; 61(3): 180-202. doi: 10.1002/jobm.202000537
5. Arya R, Kumari S, Pandey B, Mistry H, Bihani SC, Das A, et al. Structural insights into SARS-CoV-2 proteins. *J Mol Biol.* 2021; 433(2): 166725. doi: 10.1016/j.jmb.2020.11.024
6. Yang J, Wang W, Chen Z, Lu S, Yang F, Bi Z, et al. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity. *Nature.* 2020; 586(7830): 572-577. doi: 10.1038/s41586-020-2599-8
7. Chiuppesi F, Salazar MD, Contreras H, Nguyen VH, Martinez J, Park Y, et al. Development of a multi-antigenic SARS-CoV-2 vaccine candidate using a synthetic poxvirus platform. *Nat Commun.* 2020; 11(1): 6121. doi: 10.1038/s41467-020-19819-1
8. Kleanthous H, Silverman JM, Makar KW, Yoon IK, Jackson N, Vaughn DW. Scientific rationale for developing potent RBD-based vaccines targeting COVID-19. *NPJ Vaccines.* 2021; 6(1): 128. doi: 10.1038/s41541-021-00393-6
9. He Y, Yu W, Shen L, Yan W, Xiao L, Qi J, et al. A SARS-CoV-2 vaccine based on conjugation of SARS-CoV-2 RBD with IC28 peptide and mannan. *Int J Biol Macromol.* 2022; 222(Pt A): 661-670. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2022.09.180
10. Alving CR, Matyas GR, Torres O, Jalah R, Beck Z. Adjuvants for vaccines to drugs of abuse and addiction. *Vaccine.* 2014; 32(42): 5382-5389. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.07.085
11. Danielsson R, Eriksson H. Aluminium adjuvants in vaccines – A way to modulate the immune response. *Semin Cell Dev Biol.* 2021; 115: 3-9. doi: 10.1016/j.semcdb.2020.12.008
12. Laera D, HogenEsch H, O'Hagan DT. Aluminum adjuvants – 'Back to the future'. *Pharmaceutics.* 2023; 15(7): 1884. doi: 10.3390/pharmaceutics15071884
13. Facciola A, Visalli G, Laganà A, Di Pietro A. An overview of vaccine adjuvants: Current evidence and future perspectives. *Vaccines.* 2022; 10(5): 819. doi: 10.3390/vaccines10050819
14. Fan J, Jin S, Gilmartin L, Toth I, Hussein WM, Stephenson RJ. Advances in infectious disease vaccine adjuvants. *Vaccines.* 2022; 10(7): 1120. doi: 10.3390/vaccines10071120
15. Bashiri S, Koirala P, Toth I, Skwarczynski M. Carbohydrate immune adjuvants in subunit vaccines. *Pharmaceutics.* 2020; 12(10): 965. doi: 10.3390/pharmaceutics12100965
16. Yu W, Shen L, Qi J, Hu T. Conjugation with loxoribine and mannan improves the immunogenicity of *Mycobacterium tuberculosis* CFP10-TB10.4 fusion protein. *Eur J Pharm Biopharm.* 2022; 172: 193-202. doi: 10.1016/j.ejpb.2022.02.011
17. Xu Y, Ma S, Zhao J, Chen H, Si X, Huang Z, et al. Mannan-decorated pathogen-like polymeric nanoparticles as nanovaccine carriers for eliciting superior anticancer immunity. *Biomaterials.* 2022; 284: 121489. doi: 10.1016/j.biomaterials.2022.121489
18. Stambas J, Pietersz G, McKenzie I, Cheers C. Oxidised mannan as a novel adjuvant inducing mucosal IgA production. *Vaccine.* 2002; 20(7-8): 1068-1078. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00456-X
19. Дьякон А.В., Хрыкина И.С., Хегай А.А., Дьяченко И.А., Мурашев А.Н., Ивашев М.Н. Метод забора крови у животных. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований.* 2013; 11(2): 84-85. [Dyakon AV, Khrykina IS, Khagai AA, Dyachenko IA, Murashev AN, Ivashhev MN. Method of blood sampling in animals. *International Journal of Applied and Fundamental Research.* 2013; 11(2): 84-85. (In Russ.)].
20. Прозоровский В.Б., Прозоровская Н.П., Демченко В.И. Экспресс-метод определения средней эффективной дозы и ее ошибки. *Фармакология и токсикология.* 1978; 41(4): 497-502. [Prozorovsky VB, Prozorovskaya NP, Demchenko VM. A rapid method for determining the median effective dose and its errors. *Farmakologiya i toksikologiya.* 1978; 41(4): 497-502. (In Russ.)]
21. Оценка токсичности и опасности дезинфицирующих средств: Методические указания МУ 1.2.1105-02. М.; 2002. [Evaluation of the toxicity and hazards of disinfectants: Guidelines MU 1.2.1105-02. Moscow; 2002. (In Russ.)].
22. Измеров Н.Ф., Саночкин И.В., Сидоров К.К. *Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии: справочник.* М.: Медицина; 1977. [Izmerov NF, Sanotskii IV, Sidorov KK. *Parameters of toxicometry of industrial poisons with a single exposure: Reference book.* Moscow: Meditsina; 1977. (In Russ.)].
23. Исаенко Е.Ю., Бабич Е.М., Елисеева И.В., Ждамарова Л.А., Белозерский В.И., Колпак С.А. Адъюванты в современной вакцинологии. *Annals of Mechnikov Institute.* 2013; (4): 5-21. [Isaenko YeYu, Babych YeM, Yelyseyeva IV, Zhdamarova LA, Belozersky VI, Kolpak SA. Adjuvants in modern vaccinology. *Annals of Mechnikov Institute.* 2013; (4): 5-21. (In Russ.)].
24. Stambas J, Pietersz G, McKenzie I, Cheers C. Oxidised mannan as a novel adjuvant inducing mucosal IgA production. *Vaccine.* 2002; 20(7-8): 1068-1078. doi: 10.1016/s0264-410x(01)00456-x
25. Faustino M, Durão J, Pereira CF, Pintado ME, Carvalho AP. Mannans and mannan oligosaccharides (MOS) from *Saccharomyces cerevisiae* – A sustainable source of functional ingredients. *Carbohydr Polym.* 2021; 272: 118467. doi: 10.1016/j.carbpol.2021.118467
26. Huang GL. Extraction of two active polysaccharides from the yeast cell wall. *Z Naturforsch C J Biosci.* 2008; 63(11-12): 919-921. doi: 10.1515/znc-2008-11-1224

27. François JM. A simple method for quantitative determination of polysaccharides in fungal cell walls. *Nat Protoc.* 2006; 1(6): 2995-3000. doi: 10.1038/nprot.2006.457

28. Schiavone M, Vax A, Formosa C, Martin-Yken H, Dague E, François JM. A combined chemical and enzymatic method to determine quantitatively the polysaccharide components in the cell wall

of yeasts. *FEMS Yeast Res.* 2014; 14(6): 933-947. doi: 10.1111/1567-1364.12182

29. Li J, Karboune S. A comparative study for the isolation and characterization of mannoproteins from *Saccharomyces cerevisiae* yeast cell wall. *Int J Biol Macromol.* 2018; 119: 654-661. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.102

#### Сведения об авторах

**Есина Татьяна Игоревна** – научный сотрудник лаборатории получения и анализа биосубстанций отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, e-mail: esina\_ti@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9006-8313>

**Волосникова Екатерина Александровна** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией получения и анализа биосубстанций, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, e-mail: volosnikova\_ea@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

**Щербakov Дмитрий Николаевич** – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией иммунохимии, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, e-mail: dshcherbakov@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

**Волкова Наталья Вячеславовна** – кандидат биологических наук, научный сотрудник лаборатории иммунохимии, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, e-mail: volkova\_nv@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5010-9424>

**Зайковская Анна Владимировна** – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела «Коллекция микроорганизмов», ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, e-mail: zaykovskaya\_av@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>

**Шимина Галина Григорьевна** – научный сотрудник отдела биологических испытаний, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, e-mail: shimina\_gg@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1078-7033>

**Даниленко Елена Дмитриевна** – кандидат биологических наук, директор Института медицинской биотехнологии, ФБУН «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, e-mail: danilenko\_ed@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

#### Information about the authors

**Tatiana I. Esina** – Research Officer at the Laboratory of Obtaining and Analyzing Biosubstances, Department of Technology Development and Pilot Production of Biopreparations, State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, e-mail: esina\_ti@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9006-8313>

**Ekaterina A. Volosnikova** – Cand. Sc. (Biol.), Leading Research Officer, Head of the Laboratory of Obtaining and Analyzing Biosubstances, State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, e-mail: volosnikova\_ea@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

**Dmitry N. Shcherbakov** – Cand. Sc. (Biol.), Leading Research Officer, Head of the Laboratory of Immunochemistry, State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, e-mail: dshcherbakov@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>

**Natalia V. Volkova** – Cand. Sc. (Biol.), Research Officer at the Laboratory of Immunochemistry, State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, e-mail: volkova\_nv@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5010-9424>

**Anna V. Zaykovskaya** – Cand. Sc. (Biol.), Senior Research Officer at the Department "Collection of Microorganisms", State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, e-mail: zaykovskaya\_av@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-0450-5212>

**Galina G. Shimina** – Research Officer at the Biological Testing Department, State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, e-mail: shimina\_gg@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0002-1078-7033>

**Elena D. Danilenko** – Cand. Sc. (Biol.), Director of the Institute of Medical Biotechnology, State Scientific Center for Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor, e-mail: danilenko\_ed@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>