

РАЗРАБОТКА МУКОЗАЛЬНОГО АДЪЮВАНТА НА ОСНОВЕ МУТАНТНОГО ИММУНОГЛОБУЛИН-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА БЕЛКА A STAPHYLOCOCCUS AUREUS

**Волосникова Е.А.,
Есина Т.И.,
Волкова Н.В.,
Гайворонский С.И.,
Гогина Я.С.,
Рар А.А.,
Шими́на Г.Г.,
Даниленко Е.Д.,
Щербаков Д.Н**

ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор»
Роспотребнадзора (630559, р.п. Кольцово,
Новосибирская область, Россия)

Автор, ответственный за переписку:
**Волосникова Екатерина
Александровна,**
e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

РЕЗЮМЕ

Обоснование. Разработка эффективных и безопасных адъювантов для мукозальных вакцин остается одной из ключевых задач современной иммунологии, поскольку традиционные адъюванты (например, соли алюминия) не обеспечивают достаточной стимуляции местного иммунитета, включая продукцию секреторного IgA. В связи с этим, получение новых доступных и эффективных адъювантов является актуальной задачей.

Цель. Разработка рекомбинантного белка A4Z на основе Z-домена белка A *Staphylococcus aureus* и исследование возможности его использования в качестве мукозального адъюванта на модели субъединичной вакцины.

Материалы и методы. Методами генной инженерии был сконструирован синтетический ген, кодирующий белок A4Z, состоящий из четырех повторов мутантного Z-домена белка A (с аминокислотными заменами N3A, N6D, N23T для снижения токсичности) и C-концевой гексагистидиновой последовательности. Для наработки белка использовали *E. Coli* штамм BL21(DE3). Очистку проводили с помощью двухстадийной хроматографии: аффинной и ионообменной. Острую токсичность оценивали на мышах CD-1 при внутрибрюшинном введении доз до 2 г/кг. Адъювантные свойства изучали на мышах Balb/c при интраназальной иммунизации конъюгатом белка A4Z с RBD-доменом спайкового белка SARS-CoV-2. Иммуногенность оценивали по титрам специфических IgG-антител в ИФА.

Результаты. Показано, что белок A4Z является практически нетоксичным (4 класс опасности), не вызывая гибели животных или значительных токсических эффектов даже в дозе 2 г/кг. Интраназальное введение конъюгата A4Z с RBD индуцировало высокий уровень специфических IgG-антител, титры которых статистически не отличались от таковых при внутримышечной иммунизации и достоверно ($p < 0,05$) превосходили титры в группах контроля (RBD без адъюванта или в комплексе с хитозаном).

Заключение. Полученные данные свидетельствуют о перспективности использования белка A4Z в качестве мукозального адъюванта, способного усиливать гуморальный иммунитет. Дальнейшие исследования будут направлены на изучение его влияния на местный IgA-ответ и клеточный иммунитет.

Ключевые слова: мукозальные адъюванты, Z-домен белка A *Staphylococcus aureus*, интраназальная иммунизация, гуморальный иммунный ответ, RBD-домен SARS-CoV-2, малотоксичный адъювант

Статья поступила: 02.09.2025
Статья принята: 27.04.2026
Статья опубликована: 22.05.2026

Для цитирования: Волосникова Е.А., Есина Т.И., Волкова Н.В., Гайворонский С.И., Гогина Я.С., Рар А.А., Шими́на Г.Г., Даниленко Е.Д., Щербаков Д.Н. Разработка мукозального адъюванта на основе мутантного иммуноглобулин-связывающего домена белка A *Staphylococcus aureus*. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(2): 98-107. doi: 10.29413/ABS.2026-11.2.10

DEVELOPMENT OF MUCOSAL ADJUVANT BASED ON A MUTANT IMMUNOGLOBULIN BINDING DOMAIN OF PROTEIN A FROM *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

**Volosnikova E.A.,
Esina T.I.,
Volkova N.V.,
Gayvoronskiy S.I.,
Gogina Ya.S.,
Rar A.A.,
Shimina G.G.,
Danilenko E.D.,
Shcherbakov D.N.**

State Research Center of Virology and Biotechnology "VECTOR", Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being (Koltsovo, Novosibirsk region 630559, Russian Federation)

Corresponding author:
Ekaterina A. Volosnikova,
e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru

RESUME

Background. The development of efficient and safe adjuvants for mucosal vaccines remains one of the key challenges in modern immunology, as traditional adjuvants, such as aluminum salts, have been shown to be insufficient in stimulating local immunity, particularly the production of secretory immunoglobulin A (IgA). Therefore, the development of novel, potent and cost-effective adjuvants presents a significant opportunity.

The aim. Development of a recombinant A4Z protein based on the Z-domain of *Staphylococcus aureus* protein A and investigation of its potential use as a mucosal adjuvant in a subunit vaccine model.

Materials and methods. A synthetic gene encoding the A4Z protein was constructed using genetic engineering methods. The protein consists of four repeats of the mutant Z-domain of protein A (with N3A, N6D, N23T amino acid substitutions to reduce toxicity) and a C-terminal hexahistidine tag. The protein was expressed in the *E. coli* BL21(DE3) system. Purification was performed using a two-step chromatography process: affinity chromatography and ion-exchange chromatography. Acute toxicity was assessed in CD-1 mice following intraperitoneal administration of doses up to 2 g/kg. The adjuvant properties were studied in Balb/c mice via intranasal immunization with a conjugate of the A4Z protein and the SARS-CoV-2 spike protein's RBD domain. Immunogenicity was evaluated by measuring specific IgG antibody titers using ELISA.

Results. The A4Z protein was shown to be virtually nontoxic (hazard class 4), causing no animal mortality or significant toxic effects even at a dose of 2 g/kg. Intranasal administration of the A4Z conjugate with RBD induced high levels of specific IgG antibodies, the titers of which were not statistically different from those obtained with intramuscular immunization and significantly ($p < 0.05$) exceeded the titers in the control groups (RBD without adjuvant or in combination with chitosan).

Conclusions. These findings highlight the potential of A4Z as a promising mucosal adjuvant capable of enhancing humoral immunity. Further research should focus on investigating its effects on the local IgA response and cellular immunity.

Key words: mucosal vaccine adjuvants, Z-domain of *Staphylococcus aureus* protein A, intranasal immunization, humoral immune response, SARS-CoV-2 receptor-binding domain (RBD), low-toxicity, adjuvant

Received: 02.09.2025
Accepted: 27.04.2026
Published: 22.05.2026

For citation: Volosnikova E.A., Esina T.I., Volkova N.V., Gayvoronskiy S.I., Gogina Ya.S., Rar A.A., Shimina G.G., Danilenko E.D., Shcherbakov D.N. Development of mucosal adjuvant based on a mutant immunoglobulin binding domain of protein A from *Staphylococcus aureus*. *Acta biomedica scientifica*. 2026; 11(2): 98-107. doi: 10.29413/ABS.2026-11.2.10

ВВЕДЕНИЕ

Разработка эффективных и безопасных адъювантов для мукозальных вакцин остается одной из ключевых задач современной иммунологии. Традиционные адъюванты (например, соли алюминия) демонстрируют ограниченную эффективность при интраназальном введении, поскольку не способны индуцировать местный иммунный ответ, включая продукцию секреторного IgA – критического компонента защиты слизистых оболочек. В последние годы исследуются альтернативные подходы, включая использование производных бактериальных токсинов (LT-K63, В-субъединица холерного токсина) [1, 2], агонистов паттерн-распознающих рецепторов [3], природных полимеров (хитозан, глюканы, маннаны) [4, 5] и иммуностимулирующих белков [6]. Все большее количество работ посвящено адъювантам на основе полисахаридов и рекомбинантных белковых токсинов [7-10].

Важным преимуществом использования адъювантов на основе рекомбинантных белков перед природными полимерами, такими, например, как хитозан, является их высокая степень стандартизации и воспроизводимости. Хитозан, будучи природным полисахаридом, представляет собой гетерогенную смесь молекул с вариабельной молекулярной массой, степенью деацетилирования и пространственной структурой, что существенно затрудняет стандартизацию конечного продукта и приводит к вариабельности его адъювантных свойств [5]. В отличие от этого, рекомбинантные белковые адъюванты обладают строго определенной первичной структурой и могут быть охарактеризованы с высокой точностью с помощью современных аналитических методов (масс-спектрометрия, круговой дихроизм, ЯМР). Кроме того, белковые адъюванты позволяют осуществлять направленный молекулярный дизайн – точечные мутации, делеции доменов или создание химерных конструкций, что невозможно для природных полимеров. Это открывает возможности для регуляции иммуностимулирующих свойств и минимизации побочных эффектов [3, 11, 12]. Важно и то, что для рекомбинантных белков отработаны технологии промышленного масштабирования, что критично для перехода от лабораторных исследований к клиническому применению.

Использование рекомбинантных белков бактериального происхождения в качестве адъювантов не лишено сложностей. Во-первых, многие бактериальные белки обладают сложной третичной структурой и требуют специфических посттрансляционных модификаций для сохранения функциональной активности, что зачастую трудно воспроизвести в гетерологичных системах экспрессии. Во-вторых, такие белки часто проявляют цитотоксичность по отношению к клеткам-продуцентам, что значительно снижает выход целевого продукта. Особую проблему представляет эндотоксиновое загрязнение препаратов при использовании грамотрицательных экспрессионных систем, таких как *Escherichia coli*, требующее дополнительных

стадий очистки. Кроме того, иммуностимулирующие белки бактерий могут вызывать нежелательные системные воспалительные реакции, что требует тщательного дизайна их рекомбинантных аналогов с сохранением адъювантных свойств при минимизации побочных эффектов [13].

В качестве кандидата для конструирования белкового адъюванта интерес представляет ассоциированный с клеточной стенкой белок *A Staphylococcus aureus* (SpA), способный взаимодействовать с Fc-областью антител и таким образом обеспечивать ускользание от В-клеточного ответа. В отличие от классических адъювантов, SpA демонстрирует уникальную способность усиливать как гуморальный, так и клеточный иммунитет, что было показано на моделях при системном введении [14].

В качестве модели для исследования адъювантных свойств в работе использовали белок RBD SARS-CoV-2. Такой выбор был обусловлен тем, что SARS-CoV-2 является примером респираторной инфекции и именно слизистые служат первым барьером на пути вируса. RBD является ключевой мишенью для нейтрализующих антител, поскольку именно этот домен непосредственно связывается с рецептором ACE2, обеспечивая проникновение вируса в клетки. Индукция устойчивого иммунного ответа против RBD на слизистых оболочках дыхательных путей может стать решающим фактором в предотвращении заражения SARS-CoV-2. Более того, формирование локального IgA-ответа в сочетании с системным иммунитетом критически важно для защиты не только от симптомного, но и от бессимптомного течения инфекции, что особенно ценно для контроля распространения патогена. Использование RBD в сочетании с мукозальным адъювантом открывает перспективы для создания вакцин нового поколения, способных блокировать передачу вируса на ранних этапах инфекционного процесса [15].

ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка рекомбинантного белка A4Z на основе Z-домена белка *A Staphylococcus aureus* и исследование возможности его использования в качестве мукозального адъюванта на модели субъединичной вакцины.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для конструирования рекомбинантной плазмиды pET-A4Z использовали рекомбинантный вектор pET21 и нуклеотидную последовательность гена 4Z кодирующего аминокислотную последовательность белка A4Z, включающего четыре мутантных Z-домена белка *A S. aureus*. Синтез нуклеотидной последовательности гена 4Z (в составе вектора pUC), а также олигонуклеотидных праймеров для ПЦР были проведены ООО «ДНК-Синтез» (Россия).

Аmplификацию нуклеотидной последовательности гена 4Z для встройки в вектор pET21 проводили при помощи пары праймеров Zgene-F (5'-aaaaaCATATGGT GAAATATCATAAAAAGAAAAACATCTACAGCATTGCA-3') и Zgene-R (5'-aaaaaGCGGCCGCTTATTCTTGAACAGG-3'). В качестве матрицы выступала плазида pUC-4Z. Праймеры Zgene-F и Zgene-R фланкировали полную нуклеотидную последовательность гена 4Z и содержали в своем составе последовательности узнавания рестриктаз FauNDI и CciNI. Полученный ПЦП-продукт и вектор pET21 обрабатывали рестриктазами FauNDI и CciNI (ООО «СибЭнзайм», Россия). Далее продукты гидролиза смешивали и лигировали при помощи ДНК-лигазы бактериофага T4 (ООО «СибЭнзайм», Россия) в течение 30 минут при комнатной температуре. Трансформацию компетентных клеток *E. coli* штамм Stb13 (Invitrogen, США) продуктами лигирования проводили по методу Heat-shock. Соответствие встроеной последовательности теоретической подтверждали рестрикционным анализом и секвенированием по методу Сэнгера. После подтверждения наличия встройки плазмидой pET-A4Z трансформировали клетки *E. coli* штамм BL 21(DE3).

Культивирование штамма-продуцента *E. coli* DL21(DE3)/pET-A осуществляли в колбах Эрленмейера на среде LB (по Ленноксу) (1 % бактотриптона (BioFroxx, Германия), 0,5 % дрожжевого экстракта (ProCel 251MG, Франция), 0,5 % NaCl (Россия), pH 7,2) с добавлением ампициллина натриевой соли (neoFroxx, Германия) до концентрации 100 мкг/мл, с использованием шейкер-инкубатора (Excella E 25, Германия) при 37°C и скорости перемешивания 180 об/мин. Индукцию синтеза целевого белка осуществляли ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактозид (SuzhouYasoo Science Co.,Ltd., Китай) в конечной концентрации 0,1 мМ при достижении культурой оптической плотности $OP_{600} = 1,2-1,4$ о.е. Культивирование продолжали до стационарной фазы роста. После окончания культивирования клетки собирали центрифугированием в течение 15 минут при 7500 g, 4°C на центрифуге (Awel MF 48-R, Domel, Словения).

Биомассу штамма продуцента ресуспендировали в 10 мл лизирующего буфера (20 мМ Трис-HCl (Sigma-Aldrich, США), 1 мМ фенолметилсульфонилфторид (PMSF, GERBU, Германия), pH 8.0) на 1 г бактериальных клеток. Полученную суспензию обрабатывали ультразвуком в ледяной бане при 40 % амплитуде (Sonicator Q2000, Qsonica, США) интервалами по 5 секунд. Разрушение клеточных стенок вели до снижения оптической плотности на 47–53 % при длине волны 595 нм (ПЭ-5400УФ, Экросхим, Россия). Клеточный дебрис осаждали центрифугированием в течение 30 мин при 21 612 g, 4°C на центрифуге (Avanti J-30I, Beckman Coulter, США).

Для выделения белка супернатант разрушенной клеточной суспензии наносили на колонку IMAC Sep-life FF (Sunresin New Materials, Китай), иммобилизованную ионами Ni^{2+} и уравновешенную буфером (20 мМ Трис-HCl, 300 мМ NaCl (х.ч., ГОСТ 4233-77, Россия), pH 8.0), используя хроматографическую систему среднего давления Akta pure 150 с программным

обеспечением Unicorn 7.6 (Cytiva, Швеция). Объем сорбента подбирали из расчета 3 мл сорбента на 1 г биомассы бактериальных клеток. После нанесения сорбент промывали двумя объемами колонки (CV) этого же буфера с объемной долей неионогенного детергента Tergitol 15-S-9 (neoFroxx, Германия), 0,5 % для удаления остаточных белков клетки-хозяина и эндотоксинов [16, 17]. Элюцию целевого белка вели восходящим линейным градиентом концентрации имидазола (PanReac AppliChem ITW Reagents, Германия) от 0 до 300 мМ в буфере (20 мМ Трис-HCl, 300 мМ NaCl, pH 8.0). Фракции элюата, содержащие целевой белок, объединили и диализовали (SID 9652, Sigma, США) против буфера (20 мМ Трис-HCl, 50 мМ NaCl, pH 8.0) при 2–8°C в течение 18–22 часов.

Объединенную фракцию после диализа наносили на последовательно соединенные колонки с SP Seplife FF (Sunresin New Materials, Китай) и Q Seplife FF (Sunresin New Materials, Китай), уравновешенные буфером (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0). После нанесения промывали колонки двумя CV буфера (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0). Колонку с SP Seplife FF отсоединяли. Сорбирувавшийся на колонке с Q Seplife FF белок А элюировали линейным градиентом концентрации хлористого натрия от 0 до 1 М в буфере (20 мМ Трис-HCl, pH 8.0). Чистоту целевого белка в полученных фракциях элюата определяли методом SDS-ПААГ электрофореза в денатурирующих условиях. Фракции, содержащие целевой белок, с чистотой более 95 % объединяли и диализовали (SID 9652, Sigma, США) против буфера (20 мМ Трис-HCl, 100 мМ NaCl, pH 8.0) при 2–8°C в течение 18–22 часов. Раствор белка подвергали стерилизующей фильтрации через шприцевой фильтр с мембраной из полиэфирсульфона (PES) и размером пор 0,22 мкм (Jet Biofil, Китай), и хранили при температуре 2–8°C.

Анализ содержания целевого белка проводили методом электрофореза в денатурирующих условиях в 12 % полиакриламидном геле (ПААГ) с додецилсульфатом натрия (SDS) (A-1502, AppliChem, Германия), гель окрашивали раствором кумасси R-250 (D6104592, AppliChem, Германия). Содержание целевого белка в бактериальных клетках, чистоту полупродуктов и конечного препарата оценивали денситометрией гелей с использованием системы визуализации GelDoc Go с программным обеспечением Image Lab ("Bio-Rad Laboratories", США).

Количественное определение белка проводили методом Лоури без предварительного осаждения белка по ГФ XIV, том 1, ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка» (Метод 2, колориметрический).

Исследование параметров летальных доз проводили на 23 самцах аутбредных мышей CD-1 возрастом 9 недель, с массой тела 20–22 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово Новосибирской области). Препарат вводили внутрибрюшинно в объеме 1 мл на мышь в дозах 0,1; 1; 10; 50; 100; 140 мг/кг по три животных на каждую дозу. Пяти животным была введена максимально возможная доза – 2 г/кг (80 мг/мышь) в объеме

0,5 мл [18]. Содержание и манипуляции с животными осуществляли с соблюдением принципов гуманного отношения к лабораторным животным согласно Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета европейского союза по охране животных, используемых в научных целях. В течение первых суток и один раз в день в течение 7 суток после введения препаратов животных взвешивали (весы электронные SCOUTII, OHAUS, США), проводили клинический осмотр.

Получение конъюгатов рекомбинантного белка A4Z и рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) спайкового белка SARS-CoV-2 (вариант B.1.617.2 (Delta), полученного в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, проводили с помощью сульфосукцинимидил-4-[N-малеимидометил]-циклогексан-1-карбоксилата (Sulfo-SCMM, Thermo Fisher Scientific, США). При проведении реакции конъюгирования к субстанции белка RBD добавляли Sulfo-SCMM в соотношении 1 : 1 моль/моль, инкубировали смесь в течение 2 часов при 2–8°C, после чего добавляли субстанцию рекомбинантного белка А в количестве 1 : 1 моль/моль, инкубировали смесь в течение 2 часов при 2–8°C. Амидные группы восстанавливали добавлением боргидрида натрия (Sigma-Aldrich, США) в соотношении 1 : 10 моль/моль (белок RBD : боргидрид натрия). Непрореагировавшие компоненты удаляли с помощью гель-фильтрации на сефакриле S-200 (Cytiva, Швеция).

Получение конъюгатов рекомбинантного RBD с хитозаном проводили с использованием 1-этил-3-[3-диметиламинопропил]карбодимид гидрохлорида (EDC, Thermo Fisher Scientific, США). При проведении реакции конъюгирования к субстанции белка RBD добавляли сшивающий агент EDC в соотношении 1 : 1 моль/моль, инкубировали смесь в течение 2 часов при 2–8°C, после чего добавляли водорастворимый хитозан (ООО «БИО-ПРОГРЕСС», Россия) в соотношении 1 : 1 моль/моль и продолжали инкубацию в течение 2 часов при 2–8°C. Непрореагировавшие компоненты удаляли с помощью гель-фильтрации на сефакриле S-200.

Исследование иммуногенности проведено на 50 самках мышей линии Balb/c возрастом 6 недель, с массой тела 18–22 г, полученных из питомника ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Животные были распределены случайным образом на группы по 10 особей в каждой. Для индукции иммунного ответа мышам опытных групп вводили интраназально двукратно с интервалом 14 суток конъюгат белка RBD с белком А в количестве 50 мкг (по RBD) в суммарном объеме 20 мкл/мышь. Мыши группы сравнения получали инъекции RBD внутримышечно в тех же дозах в объеме 200 мкл/мышь по аналогичной схеме. Мышам контрольной группы вводили физиологический раствор интраназально в объеме 20 мкл.

Забор крови у мышей проводили на 10 день после второй иммунизации пастеровской пипеткой из ретроорбитального синуса в объёме 0,5 мл. Процедура выполнялась на анестезированных с помощью углекислого газа животных [19]. Полученные сыворотки

крови хранили при температуре (6 ± 2) °C не более 7 дней. Для более длительного хранения сыворотки замораживали при температуре -20°C. После забора крови мышей подвергали эвтаназии путём цервикальной дислокации. В работе соблюдены этические принципы, предъявляемые Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации (1964, 2024 ред.). Протокол исследования (№ 2 от 14 февраля 2024 г.) одобрен Комитетом по биоэтике ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Титры специфических антител в сыворотках крови определяли методом иммуноферментного анализа. В качестве антигена использовали RBD (вариант B.1.617.2 (Delta)). Сорбцию антигенов (200 нг/лунку) проводили в буфере 0,1 M NaHCO₃. Для выявления антител использовали конъюгат антимишинных антител с пероксидазой хрена в рабочем разведении 1:2000 (Sigma–Aldrich, США). Для регистрации уровня оптической плотности после добавления хромогенного субстрата TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) и остановки реакции добавлением 1M соляной кислоты использовали мультимодальный ридер Thermo Scientific Variskin LUX при длине волны 450 нм. Титр определяли по значению максимального разведения, при котором сигнал оптической плотности превышал значение оптической плотности лунок с отрицательным контролем более, чем в три раза.

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0, 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% доверительным интервалом.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В нашей работе за основу было решено взять аминокислотную последовательность Z-домена белка *A. S. aureus* размером 58 а.о. Для увеличения иммуногенности в структуру финального белка ввели 4 повтора этого домена (VDNKFNEQQNAFYEILHLPNLNNEEQ RNAFIQSLKDDPSQSANLLAEAKKLNDQAQPK), разделенных линкерами состава QAPKVDKFD из 10 а.о. Кроме того, для снижения токсичности в последовательность Z-домена вносили ряд аминокислотных замен – остатки аспарагина в позициях 3, 6, и 23 в каждом Z-домене заменили на остатки аланина, аспарагиновой кислоты и треонина соответственно (рис. 1а). Помимо этого, на C-конце белка была заложена последовательность из шести гистидинов для последующей очистки при помощи металл-хелатной хроматографии. Далее, для получения рекомбинантного белка в прокариотической системе экспрессии, была синтезирована полная нуклеотидная последовательность спроектированного гена, кодирующая все четыре мутантных Z-домена. После синтеза, полученный ген был использован для ПЦР-амплификации и клонирования

в составе вектора рЕТ21, с целью получения экспрессионной плазмиды рЕТ-А4Z (рис. 16).

Разработанной плазмидой рЕТ-А4Z, трансформировали *E. coli* штамма BL21(DE3). Анализ биомассы клеток клонов-трансформантов при помощи электрофореза в ПААГ показал наличие белка, совпадающего по массе с расчётной (примерно 31–34 кДа) (рис. 2).

Культивирование

Культивирование штамма-продуцента *E. coli* BL 21(DE3)/рЕТ-А4Z после добавления индуктора изопропил-D-1-тиогаляктопиранозида (ИПТГ) в концентрации 0,1 мМ в течение 6–7 ч обеспечило накопление целевого белка в биомассе клеток. По данным электрофореза, уровень экспрессии белка А4Z достигал 22–23 % от суммы клеточных белков (рис. 2а), при этом выход влажной биомассы составлял 5,2–5,4 г с 1 л культуральной жидкости.

Содержание целевого белка в бесклеточном экстракте на стадии лизиса свидетельствует о том, что подобранные условия культивирования обеспечивают синтез растворимой формы белка А4Z.

Очистка рекомбинантного белка А4Z

Наличие последовательности из шести остатков гистидина (6His) на С-конце белка позволило провести очистку белка металл-хелатной аффинной хроматографией, при этом элюция целевого белка наблюдалась при низкой концентрации имидазола в подвижной фазе (от 0 до 200 мМ), что обуславливает полное отсутствие имидазола в уравнивающем буфере. При других условиях целевой белок частично не связывался с сорбентом и был обнаружен в потоке жидкости, проходящей через колонку.

В ходе ионообменной хроматографии белок А4Z сорбировался на анионообменной Q Sephlife FF, тогда как примесные белки удерживались на катионообменной SP Sephlife FF либо не связывались с сорбентами.

В результате двухстадийной хроматографической очистки была получена субстанция белка А4Z с чистотой 98,4 % (определено электрофоретически) (рис. 2б). Конечную концентрацию белка определяли методом Лоури. Удельный выход целевого белка составляет 10 ± 0,5 мг с 1 г биомассы.

Определение параметров летальных доз при однократном внутрибрюшинном введении

Для оценки токсичности рекомбинантного белка А4Z проводили внутрибрюшинное введение полученного белка самцам мышей CD-1. Было показано, что в диапазоне доз от 0,1–140 мг/кг белок не вызывал гибели животных, проявления внешних признаков интоксикации, снижения массы тела (данные не представлены).

При введении препарата в дозе 2 г/кг у двух животных из пяти зафиксировано незначительное снижение массы тела на первые сутки (на 6,0–6,5 %). Других признаков интоксикации не обнаружено. Ко вторым суткам масса мышей начала нарастать и на третьи сутки была выше исходной.

Индивидуальные данные показателей динамики массы тела мышей, которым вводили препарат в максимальной дозе 2 г/кг, приведены в таблице 1.

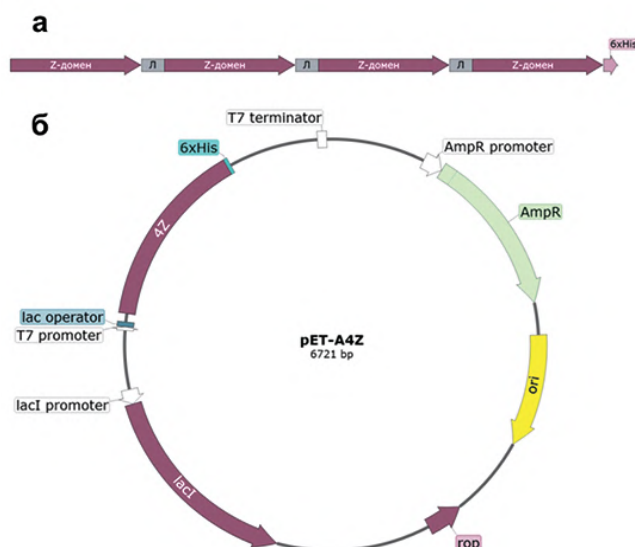


РИС. 1. Дизайн белка А4Z. Схематическая структура белка А4Z (а). Карта плазмиды рЕТ-А4Z (б)

FIG. 1. Design of the A4Z protein. Schematic representation of the A4Z protein structure (a). Map of the pET-A4Z plasmid (b)

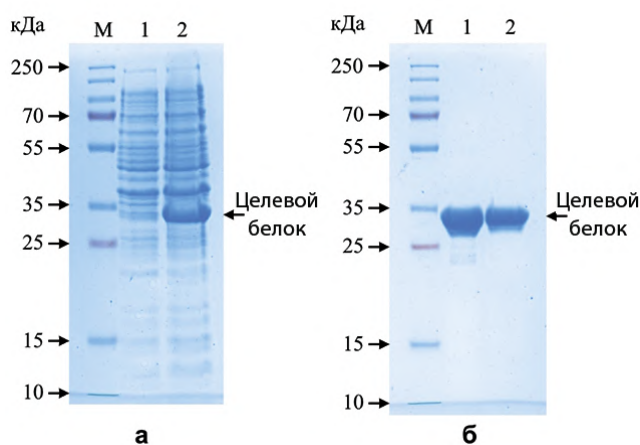


РИС. 2. Электрофореграмма лизатов клеток биомассы штамма-продуцента *E. coli* BL 21(DE3)/рЕТ-А4Z (а) и очищенного рекомбинантного белка А4Z (б). Электрофорез в 12 % SDS-ПААГ, окрашивание кумасси R250. Дорожки (а): М – маркер молекулярных масс белков (10–250 кДа); 1 – лизат клеток биомассы до индукции; 2 – лизат клеток биомассы через 7 ч индукции ИПТГ. Дорожки (б): М – маркер молекулярных масс белков (10–250 кДа); 1 – объединенная фракция элюции с IMAC Sephlife; 2 – объединенная фракция элюции с Q Sephlife – субстанция рекомбинантного белка А4Z

FIG. 2. Electrophoregram of biomass cell lysates from *E. coli* BL21(DE3)/рЕТ-А4Z producing strain (a) and purified recombinant A4Z protein (b). Electrophoresis in 12 % SDS-PAGE, Coomassie R250 staining. Lanes (a): 1 – cell lysates before induction, 2 – cell lysates after 7 h of IPTG induction. Lanes (b): M – protein molecular weight marker (10–150 kDa), 1 – combined fraction resulting from elution using IMAC Sephlife, 2 – combined fraction resulting from elution using Q Sephlife – recombinant protein A4Z substance

ТАБЛИЦА 1

ПОКАЗАТЕЛИ МАССЫ ТЕЛА МЫШЕЙ ПОСЛЕ ВНУТРИБРЮШИННОГО ВВЕДЕНИЯ СУБСТАНЦИИ БЕЛКА А4Z В ДОЗЕ 2 Г/КГ

Препарат	Масса животных, г							
	Исх.	1 сут.	2 сут.	3 сут.	4 сут.	5 сут.	6 сут.	7 сут.
Субстанция белка А4Z	20,0	18,8	19,8	23,2	24,8	25,6	26,8	28,6
	21,8	22,2	24,1	25,4	27,0	27,9	28,2	29,5
	22,3	23,1	24,9	26,4	28,3	29,5	30,7	31,9
	21,5	21,9	23,5	24,5	26,5	27,1	27,9	28,5
	20,0	18,7	19,4	21,8	23,0	24,8	25,7	26,7

TABLE 1

BODY MASS INDICES OF MICE AFTER INTRAPERITONEAL ADMINISTRATION OF THE A4Z PROTEIN SUBSTANCE AT A DOSE OF 2 G/KG

Согласно классификации токсичности веществ при введении в брюшную полость животного (по К.К. Сидорову) [20] белок А4Z относится к практически нетоксичным веществам.

Согласно проекту классификации токсичности химических веществ в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 при введении препарата в брюшную полость животного белок А4Z можно отнести к 4 классу токсичности – малотоксичные [21].

Для изучения адъювантных свойств были получены конъюгаты А4Z с белком RBD, в качестве препарата сравнения были использованы конъюгаты RBD с водорастворимым хитозаном. Стерильный препарат конъюгата белка А4Z с RBD вводили интраназально двукратно мышам Balb/c из расчета дозы RBD 50 мкг на животное. Интервал введения составил 14 суток. Мыши групп сравнения получали инъекции RBD внутримышечно в тех же дозах с аналогичным интервалом либо конъюгата RBD с хитозаном интраназально. Мышам контрольной группы вводили интраназально физиологический раствор.

Интраназальная иммунизация мышей конъюгатами рекомбинантного белка А4Z и RBD привела к индукции высоких титров специфических IgG. Значения среднего реципрокного титра антител для групп, иммунизированных конъюгатом А4Z интраназально и RBD внутримышечно, достоверно не различались и составляли 10⁵ (рис. 3), однако значительно превышали показатели группы, получавшей интраназально RBD без адъюванта ($p < 0,05$, рис. 3). При этом титры в контрольной группе (RBD без адъюванта) были ненулевыми и сопоставимыми с уровнем, наблюдаемым при использовании RBD в комплексе с хитозаном.

ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка эффективных и безопасных адъювантов для мукозального введения является критически важной задачей для создания вакцин нового поколения, особенно против таких респираторных патогенов, как SARS-CoV-2. В данном исследовании мы предложили и экспериментально обосновали использование

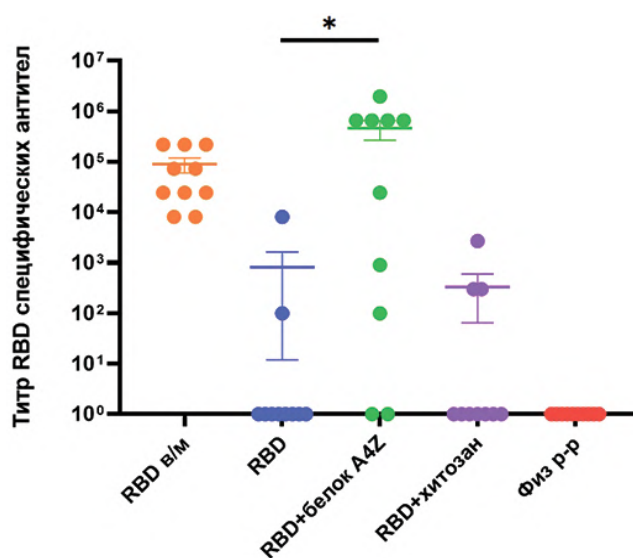


РИС. 3.

Реципрокные титры специфических антител у мышей Balb/c, иммунизированных конъюгатами RBD.

RBD, в/м – внутримышечное введение антигена; RBD, и/н – интраназальное введение антигена; RBD+белок А4Z, и/н – интраназальное введение конъюгата А4Z с RBD; RBD+хитозан, и/н – интраназальное введение конъюгата хитозана с RBD; Физ р-р, и/н – интраназальное введение физиологического раствора. Для оценки значимости межгрупповых различий применяли непараметрический U-критерий Манна-Уитни с критическим уровнем статистической значимости (p), равным 0,05. * – статистически значимые отличия по отношению к группе (без адъюванта), $p \leq 0,05$.

FIG. 3.

Reciprocal titers of specific antibodies in Balb/c mice immunized with RBD conjugates.

RBD, i.m. – intramuscular antigen administration; RBD, i.n. – intranasal antigen administration; RBD+A4Z, i.n. – intranasal administration of A4Z conjugated with RBD; RBD+chitosan, i.n. – intranasal administration of chitosan conjugated with RBD; Saline solution, i.n. – intranasal administration of saline solution. The nonparametric Mann – Whitney U-test was used to evaluate the significance of differences between the groups, with a critical statistical significance threshold (p) set at 0.05. * – statistically significant differences thresholded to the group without adjuvant, $p \leq 0.05$.

рекомбинантного мутантного белка на основе иммуноглобулин-связывающего домена белка *A. S. aureus* (A4Z) в качестве перспективного мукозального адъюванта.

Ключевым достижением нашей работы стала успешная разработка высокоэффективной схемы получения и очистки рекомбинантного белка A4Z в системе экспрессии *E. coli*. Несмотря на описанные в литературе сложности, связанные с токсичностью бактериальных белков для клеток-продуцентов и сложностью их очистки от эндотоксинов [16], нам удалось добиться высокого выхода (22–23 % от общего пула белков) и высокой чистоты конечного продукта (98,4 %). Это было достигнуто за счет оптимизации условий культивирования, использования детергента Tergitol 15-S-9 на стадии ИМАС-хроматографии для удаления эндотоксинов [16, 17] и применения последующей двухстадийной ионообменной хроматографии. Полученные результаты демонстрируют возможность масштабируемого и воспроизводимого производства данного белка, что является существенным преимуществом по сравнению с гетерогенными природными полимерами, такими как хитозан [5].

Важнейшим свойством любого адъюванта, особенно предназначенного для клинического применения, является его безопасность. Проведенные исследования острой токсичности показали, что белок A4Z является практически нетоксичным и соответствует 4 классу опасности по ГОСТ 12.1.007-76 [21] даже при высокой дозе 2 г/кг. Отсутствие значительной потери массы тела и гибели животных свидетельствует о том, что внесенные аминокислотные замены (N3A, N6D, N23T) успешно снизили потенциальную токсичность белка А, сохранив при этом его функциональные свойства.

Центральным результатом нашего исследования стала демонстрация адъювантного действия белка A4Z при интраназальном введении. Конъюгат A4Z с RBD-доменом спайкового белка SARS-CoV-2 индуцировал высокий уровень специфических IgG-антител, титры которых статистически не отличались от таковых при внутримышечной иммунизации чистым антигеном, и значимо превосходили титры при интраназальном введении несвязанного RBD. Этот факт доказывает, что A4Z эффективно преодолевает барьер слизистых оболочек и стимулирует системный гуморальный ответ. При этом стоит отметить, что интраназальное введение конъюгата RBD с хитозаном показало более низкую эффективность в наших экспериментах, что подчеркивает преимущество стандартизированного белкового адъюванта.

В перспективе необходимо исследовать способность адъюванта A4Z индуцировать не только системный IgG-, но и мукозальный IgA-ответ, а также оценить формирование клеточного иммунитета (Th1/Th17-ответ). Кроме того, представляет интерес изучение перекрестной нейтрализующей активности сывороток против различных вариантов SARS-CoV-2.

Полученные данные позволяют рассматривать рекомбинантный белок A4Z в качестве перспективного, безопасного и эффективного адъюванта для мукозальных вакцин.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в результате проведенного исследования был успешно разработан и охарактеризован новый рекомбинантный мукозальный адъювант A4Z на основе мутантного иммуноглобулин-связывающего домена белка *A. S. aureus*. Продемонстрирована эффективность разработанной схемы его получения в системе экспрессии *E. coli*, обеспечивающей высокий выход, до 22–23 % от общего пула белков. Методами хроматографии была получена стандартизированная субстанция белка, свободная от эндотоксиновых загрязнений и степень очистки (98,4 %) целевого продукта. Исследование острой токсичности показало, что белок A4Z является практически нетоксичным и относится к 4 классу опасности (малотоксичные вещества) даже при экстремально высокой дозе 2 г/кг, что подтверждает безопасность его применения. Ключевым результатом работы стала демонстрация мощной адъювантной активности белка A4Z при интраназальном введении. Установлено, что конъюгат A4Z с RBD-доменом SARS-CoV-2 индуцирует высокий уровень специфических IgG-антител, статистически не отличающийся от ответа при внутримышечной иммунизации и достоверно превышающий титры в группах контроля, получавших антиген без адъюванта или в комплексе с хитозаном. Полученные данные позволяют рассматривать рекомбинантный белок A4Z в качестве высокоперспективного, безопасного и эффективного адъюванта для разработки мукозальных вакцин нового поколения, способных индуцировать стерилизующий иммунитет на слизистых оболочках — первом барьере на пути респираторных патогенов.

Финансирование

Работа выполнена в рамках Государственного задания, Тема ГЗ-23/26 «Разработка и изучение новых адъювантных систем».

Конфликт интересов

Авторы данной статьи сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wiedinger K, Pinho D, Bitsaktsis C. Utilization of cholera toxin B as a mucosal adjuvant elicits antibody-mediated protection against *S. pneumoniae* infection in mice. *Ther. Adv. Vaccines*. 2017; 5(1): 15-24. doi: 10.1177/2051013617691041
2. Aradottir Pind AA, Molina Estupiñan JL, Magnussdottir GJ, Del Giudice G, Jonsdottir I, Bjarnarson SP. LT-K63 Enhances B Cell Activation and Survival Factors in Neonatal Mice That Translates into Long-Lived Humoral Immunity. *Front. Immunol.* 2020; 11: 527310. doi: 10.3389/fimmu.2020.527310
3. Ong GH, Lian BSX, Kawasaki T, Kawai T. Exploration of Pattern Recognition Receptor Agonists as Candidate

- Adjuvants. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2021; 11: 745016. doi: 10.3389/fcimb.2021.745016
4. Benito-Villalvilla C, Soria I, Subiza JL, Palomares O. Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to mannan. *Allergo J. Int.* 2018; 27(8): 256-262. doi: 10.1007/s40629-018-0069-8
5. Mehrabi M, Montazeri H, Mohamadpour Dounighi N, Rashti A, Vakili-Ghartavol R. Chitosan-based Nanoparticles in Mucosal Vaccine Delivery. *Arch. Razi Inst.* 2018; 73(3): 165-176. doi: 10.22092/ari.2017.109235.1101
6. Díaz-Dinamarca DA, Salazar ML, Castillo BN, Manubens A, Vasquez AE, Salazar F, et al. Protein-Based Adjuvants for Vaccines as Immunomodulators of the Innate and Adaptive Immune Response: Current Knowledge, Challenges, and Future Opportunities. *Pharmaceutics.* 2022; 14(8): 1671. doi: 10.3390/pharmaceutics14081671
7. Sarkar I, Garg R, van Druenen Littel-van den Hurk S. Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens. *Expert Rev. Vaccines.* 2019; 18(5): 505-521. doi: 10.1080/14760584.2019.1604231
8. Omidian H, Gill EJ, Dey Chowdhury S, Cubeddu LX. Chitosan Nanoparticles for Intranasal Drug Delivery. *Pharmaceutics.* 2024; 16(6): 746. doi: 10.3390/pharmaceutics16060746
9. Lebens M, Terrinoni M, Karlsson SL, Larena M, Gustafsson-Hedberg T, Källgård S, et al. Construction and pre-clinical evaluation of mmCT, a novel mutant cholera toxin adjuvant that can be efficiently produced in genetically manipulated *Vibrio cholerae*. *Vaccine.* 2016; 34(18): 2121-2128. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.002
10. Liang X, Zhou J, Wang M, Wang J, Song H, Xu Y, et al. Progress and prospect of polysaccharides as adjuvants in vaccine development. *Virulence.* 2024; 15(1): 2435373. doi: 10.1080/21505594.2024.2435373
11. Lavelle EC, Ward RW. Mucosal vaccines — fortifying the frontiers. *Nat. Rev. Immunol.* 2022; 22(4): 236-250. doi: 10.1038/s41577-021-00583-2
12. Shams N, Jaydari A, Najafi H, Hataminejad M, Khanizadeh S, Pouladi I. An Overview of the types of adjuvants used in the vaccination industry and their mechanisms of action. *Viral Immunol.* 2024; 37(7): 324-336. doi: 10.1089/vim.2024.0032
13. Kumar S, Sunagar R, Gosselin E. Bacterial Protein Toll-Like-Receptor Agonists: A Novel Perspective on Vaccine Adjuvants. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1144. doi: 10.3389/fimmu.2019.01144
14. Hu H, Liu S, Hon K, Psaltis AJ, Wormald PJ, Vreugde S. Staphylococcal protein A modulates inflammation by inducing interferon signaling in human nasal epithelial cells. *Inflamm. Res.* 2023; 72(2): 251-262. doi: 10.1007/s00011-022-01656
15. Focosi D, Maggi F, Casadevall A. Mucosal vaccines, sterilizing immunity, and the future of SARS-CoV-2 virulence. *Viruses.* 2022; 14(2): 187. doi: 10.3390/v14020187
16. Kiesewetter A, Gupta A, Heinen-Kreuzig A, Greenhalgh T, Stein A. Improved endotoxin removal using eco-friendly detergents for intensified plasmid capture. *Biotechnol. Prog.* 2023; 39(6): e3375. doi: 10.1002/btpr.3375
17. Silva F, Sitia L, Allevi R, Bonizzi A, Sevieri M, Morasso C, et al. Combined Method to remove endotoxins from protein nanocages for drug delivery applications: The case of human ferritin. *Pharmaceutics.* 2021; 13(2): 229. doi: 10.3390/pharmaceutics13020229
18. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н. *Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1.* М.: Гриф и К; 2012. [Mironov AN, Bunyatyan ND, Vasilyev AN. *Guidelines for Conducting preclinical studies of drugs.* Moscow: Grif i K; 2012. (In Russ.)].
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, Hrykina IS, Hegai AA, Dyachenko A, Murashev AN, Ivashev MN. Method of blood sampling in animals. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy.* 2013; 11(2): 84-85. (In Russ.)].
20. Измеров Н.Ф., Саноцкий И.В., Сидоров К.К. Параметры токсикометрии промышленных ядов при однократном воздействии: (Справочник). М.: Медицина; 1977. [Izmerov NF, Sanotskii IV, Sidorov KK. *Single-exposure toxicometry parameters for industrial poisons: (Reference Book).* М.: Meditsina; 1977. (In Russ.)].
21. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парантеральных способах введения. *Химико-фармацевтический журнал.* 2003; 37(3): 139-141. [Berezovskaya IV. Classification of Substances with respect to acute toxicity for parenteral administration. *Pharmaceutical Chemistry Journal.* 2003; 37(3): 139-141. (In Russ.)]. doi: 10.1023/A:1024586630954

Сведения об авторах

Волосникова Екатерина Александровна – кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник, заведующая отделом разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Есина Татьяна Игоревна – научный сотрудник 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>

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

Гайворонский Сергей Игоревич – стажер-исследователь лаборатории молекулярной и синтетической биологии ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; e-mail: gajvoronskij_si@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0004-0276-7229>

Гогина Яна Станиславовна – старший научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; e-mail: gogina_yas@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8986-0477>

Рар Анастасия Анатольевна – инженер-микробиолог отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора; e-mail: rar_aa@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0000-2652-8434>

Шимина Галина Григорьевна – научный сотрудник отдела биологических исследований 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>

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

Information about the authors

Ekaterina A. Volosnikova – Cand. Sc. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Department of Technology Development and Pilot Production of Biopreparations, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: volosnikova_ea@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5028-5647>

Tatiana I. Esina – Researcher, Department of Technology Development and Pilot Production of Biopreparations, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: esina_ti@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-9006-8313>

Natalia V. Volkova – Cand. Sc. (Biol.), Researcher, Laboratory of Molecular and Synthetic Biology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: volkova_nv@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5010-9424>

Sergey I. Gayvoronskiy – Intern Researcher, Laboratory of Molecular and Synthetic Biology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: gajvoronskij_si@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0004-0276-7229>

Yana S. Gogina – Senior Researcher, Department of Technology Development and Pilot Production of Biopreparations, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: gogina_yas@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8986-0477>

Anastasiya A. Rar – Engineer Microbiologist, Department of Technology Development and Pilot Production of Biopreparations, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: rar_aa@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0009-0000-2652-8434>

Galina G. Shimina – Researcher, Department of Biological Studies, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; 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 Research Center of Virology and Biotechnology «Vector» of Rosпотребнадзор, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: danilenko_ed@vector.nsc.ru, <https://orcid.org/0000-0001-5026-1602>

Dmitry N. Shcherbakov – Cand. Sc. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Laboratory of Molecular and Synthetic Biology, State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being; e-mail: dnschcherbakov@gmail.ru, <https://orcid.org/0000-0001-8023-4453>