10.15789/1563-0625-DVC-2901

СУБЪЕДИНИЧНАЯ ВАКЦИНА «ДЕЛЬТА-ВАК» ИНДУЦИРУЕТ СИЛЬНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРОТИВ SARS-COV-2

Несмеянова В. С. [1],
Меркульева Ю. А. [1],
Исаева А. А. [1],
Волкова Н. В. [1],
Беленькая С. В. [1],
Боргоякова М. Б. [1],
Волосникова Е. А. [1],
Есина Т. И. [1],
Даниленко Е. Д. [1],
Зайковская А. В. [1],
Олькин С. Е. [1],
Пьянков О. В. [1],
Ильичев А. А. [1],
Щербаков Д. Н. [1]

[1] ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

«DELTA-VAC» SUBUNIT VACCINE INDUCES STRONG HUMORAL IMMUNE RESPONSE AGAINST SARS-COV-2

Nesmeyanova V. S. [a],
Merkulyeva Yu. A. [a],
Isaeva A. A. [a],
Volkova N. V. [a],
Belenkaya S.V. [a],
Borgoyakova M. B. [a],
Volosnikova E. A. [a],
Esina T. I. [a],
Danilenko E. D. [a],
Zaikovskaya A. V. [a],
Olkin S. E. [a],
Pyankov O. V. [a],
Ilichev A. A. [a],
Shcherbakov D.N. [a]

[a] State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Rospotrebnadzor.

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DVC-2901

Резюме

Введение: Пандемия COVID-19 сконцентрировала внимания исследователей всего мира на борьбе с этой инфекцией. Важнейшим подходом противодействия COVID-19 стала разработка профилактических вакцин на основе ряда платформ, включая ДНК- и РНК-вакцины, векторные и субъединичные вакцины. Одной из таких платформ стали субъединичные вакцины привлекательны в первую очередь из-за непревзойдённого профиля их безопасности. Однако безопасность данных вакцин часто сопряжена с невысокой эффективностью, поэтому зачастую необходимо применять адъюванты, а также использовать более сложные схемы иммунизации. В то же время важным достоинством субъединичных вакцин является масштабируемость и относительная простота производства, так как в процессе производства нет необходимости работать с живым вирусом или вирусными векторами. Цель: целью работы была разработка кандидатной вакцины на основе рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) спайкового S-белка SARS-CoV-2 варианта Дельта (B.1.617.2). Материалы и методы: в исследовании применялись иммунологические методы, методы генной инженерии и биотехнологии. Результаты: в ходе работы на основе клеток млекопитающих CHO-K1 разработан продуцент рекомбинантного RBD. Для получения белка, отвечающего требованиям инъекционных препаратов, была разработана схема хроматографической очистки, включающая аффинную и ионообменную хроматографии. Предложен вариант субъединичной вакцины «Дельта-Вак» на основе полученного рекомбинантного белка. Иммуногенность кандидатной вакцины «Дельта-Вак» оценивали на модели лабораторных мышей BALB/c. Проводили двукратную иммунизацию животных дозой 50 мкг RBD в комплексе с $Al(OH)_3$ с двухнедельным интервалом. Показана способность кандидатной вакцины индуцировать выработку специфических IgG и нейтрализующих антител у мышей линии BALB/c. Специфические титры антител иммунизированных животных лежали в диапазоне от $1/10^5$ до $1/10^6$. При этом сыворотки крови обладали нейтрализующей активностью в отношении SARS-CoV-2 (вариант B.1.617.2 (Delta)) с титром до 1/2000. Выводы: Разработанная вакцина «Дельта-Вак» обладает высокой иммуногенностью и индуцирует выработку нейтрализующих антител против гомологичного варианта Delta и гетерологичных вариантов Wuhan и Omicron SARS-CoV-2. Таким образом «Дельта-Вак» может выступать в качестве кандидатной вакцины и служить прототипом для разработки субъединичных вакцин против COVID-19.

Ключевые слова: Субъединичные вакцины, SARS-CoV-2, RBD, S-белок, иммуногенность, нейтрализующие антитела

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DVC-2901

Abstract

Introduction: The COVID-19 pandemic has focused the attention of researchers around the world on the fight against this infection. A critical approach to combating COVID-19 has been the development of preventive vaccines based on a range of platforms, including DNA and RNA vaccines, vector and subunit vaccines. Subunit vaccines have become one of these platforms, primarily due to their unsurpassed safety profile. However, the safety of these vaccines is often associated with low effectiveness, so it is often necessary to use adjuvants, as well as use more complex immunization regimens. At the same time, an important advantage of subunit vaccines is scalability and relative ease of production, since there is no need to work with live virus or viral vectors during the production process. Our object of the work was to develop a candidate vaccine based on the recombinant receptor-binding domain (RBD) of the SARS-CoV-2 spike S-protein of the Delta variant (B.1.617.2). Materials and Methods: The study used immunological methods and methods of genetic engineering and biotechnology. Results: In the course of work based on the mammalian cells CHO-K1 developed producer of recombinant RBD. To obtain a protein that meets the requirements of injectable drugs, a chromatographic purification scheme was developed, including affinity and ion exchange chromatography. A variant of the subunit vaccine «Delta-Vac» based on the obtained recombinant protein was proposed. Assessment of the immunogenicity of the Delta-Vac vaccine was carried out on the model of laboratory mice BALB/c. Animals were immunized twice with a dose of 50 μg of RBD in combination with $Al(OH)_3$ at a two-week interval. The ability of the candidate vaccine to induce the production of specific IgG and neutralizing antibodies in BALB/c mice was demonstrated. The specific antibody titers of immunized animals ranged from $1/10^5$ to $1/10^6$. At the same time, blood serums had neutralizing activity against SARS-CoV-2 (variant B.1.617.2 (Delta)) with a titer of up to 1/2000. Conclusion: The vaccine "Delta-Vak» developed is highly immunogenic and induces the production of neutralizing antibodies against homologous Delta variant and heterologous Wuhan and Omicron SARS-CoV-2 variants. Thus, «Delta-Vac» can act as a vaccine candidate and serve as a prototype for the development of subunit vaccines against COVID-19.

Keywords: Subunit vaccines, SARS-CoV-2, RBD, S-protein, immunogenicity, neutralizing antibodies

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DVC-2901

Введение

Пандемия COVID-19 сконцентрировала внимания исследователей всего мира на борьбе с этой инфекцией. Важнейшим подходом противодействия COVID-19 стала разработка профилактических вакцин на основе ряда платформ, включая ДНК- и РНК-вакцины, векторные и субъединичные вакцины. Одной из таких платформ стали субъединичные вакцины привлекательны в первую очередь из-за непревзойдённого профиля их безопасности. Однако безопасность данных вакцин часто сопряжена с невысокой эффективностью, поэтому зачастую необходимо применять адъюванты, а также использовать более сложные схемы иммунизации. В то же время важным достоинством субъединичных вакцин является масштабируемость и относительная простота производства, так как в процессе производства нет необходимости работать с живым вирусом или вирусными векторами. Важным достоинством субъединичных вакцин, так же является простота в производстве [1, 2, 3].

Коронавирусный спайковый белок (S-белок) является основной мишенью для нейтрализующих антител и обладает высокой иммуногенностью. Следуя этой логике, S-белок SARS-CoV-2 использовался в качестве основного антигена для большинства разработанных вакцин против COVID-19 [4, 5, 6]. Однако полноразмерный S-белок содержит области эпитопов ненейтрализующих антител, которые могут вызывать антителозависимое усиление инфекции (ADE). Существующий риск ADE дал толчок дальнейшим исследованиям по разработке более безопасного и эффективного иммуногена [7, 1, 8]. Недавно проведенные исследования показали, что рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка как компонент вакцин обладает высоким профилем безопасности [9, 10]. На сегодняшний день, вакцинные платформы, использующие в качестве иммуногена область RBD, обладают значительным преимуществом, так как фокусируют иммунитет на ключевых защитных антигенных детерминантах [11, 12]. Сравнительные исследования тримера S-белка, субъединицы S1 и только последовательности RBD показали, что использование только последовательности RBD в качестве вакцины позволяет добиться появления высоких титров нейтрализующих антител, этот факт тем более примечателен что использование тримера S или фрагмента S1 дает сходные или худшие результаты [13, 14, 15, 11].

В настоящее время накопилось достаточно свидетельств того, что вакцины на основе RBD показывают высокий уровень иммуногенности, при низкой реактогенности и хорошей переносимости поэтому выбор RBD в качестве единственного вакцинного иммуногена вполне оправдан [16, 17, 18]. В связи с этим целью работы была разработка кандидатной субъединичной вакцины против SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного рецептор-связывающего домена RBD варианта Дельта (B.1.617.2) SARS-CoV-2.

Материалы и методы

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DVC-2901

Получение штамма-продуцента CHO-K1-RBDdelta

Продуцент рекомбинантного RBD варианта Дельта (B.1.617.2) SARS-CoV-2 получали как описано ранее [19]. В состав нуклеотидной последовательности, кодирующей RBD Wuhan-1 (GenBank: MN908947) вводили нуклеотидные замены для получения аминокислотных замен (L452R и T479K). Район RBDdelta амплифицировали и клонировали в составе плазмиды pVL3 в рамке считывания с N-концевой сигнальной последовательностью спайкового бекла (MFVFLVLLPLVSSQC) и C-концевой 10 × His-меткой.

Клетки CHO-K1 трансфицировали pVL3-RBDdelta и хелперной плазмидой pCMV (CAT) T7-SB100, кодирующей транспозазу SB100, с использованием липофектамина 3000 (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Селекцию трансформантов проводили на среде с пуромицином (10 мкг/мл) в течение 3 дней. Затем получали высокопродуктивные клоны из единичных клеток методом предельных разведений. Выбранный клон-продуцент RBDdelta адаптировали к суспензионным условиям культивирования.

Суспензионное культивирование штамма-продуцента RBDdelta

Клон-продуцент RBDdelta рассевали в 5 мл свежей среды HyCell CHO (Cytiva, США) + 4 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США) с концентрацией 1×10^6 живых кл/мл в 50 мл центрифужные пробирки. Культивировали на шейкере 200 об/мин, орбита 19 мм, при +37°C во влажной атмосфере 5% CO_2 6-7 дней до достижения концентрации 8×10^6 живых кл./мл. Суспензию клеток 5 мл с концентрацией 8×10^6 живых кл/мл инокулировали в стеклянной колбе с 35 мл свежей среды HyCell CHO (Cytiva, США) + 4 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США). Культивировали на шейкере при тех же условиях 6-7 дней до достижения концентрации 8×10^6 живых кл/мл Суспензию клеток 5 мл с концентрацией 8×10^6 живых кл/мл переносили в новую стеклянную колбу с 35 мл свежей среды HyCell CHO (Cytiva, США) + 4 mM GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, США). Оставшийся объём переносили на шейкере (200 об/мин, орбита 19 м) при +31°C инкубировали 10 дней.

Выделение и очистка RBDdelta

Для получения препарата рекомбинантного RBDdelta была разработана схема двух-стадийной хроматографической очистки, включающая аффинную и ионообменную хроматографии. Аффинную хроматографию проводили с использованием сорбента Ni-IMAC сефарозы (GE Helthcare, США). Культуральную среду, содержащую рекомбинантный белок RBD, центрифугировали 10 минут при 12000 g и 4 °C и фильтровали через фильтровальные системы с размером пор 0,22 мкМ для удаления клеток клеточного дебриса. Доочистку белка проводили с помощью ионообменной хроматографии в два этапа: фракцию целевого белка после аффинной хроматографии наносили на колонку с катиоонообменным сорбентом Nuvia

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DVC-2901

HR-S (50 мл), затем проводили каскадную хроматографию на анионообменных сорбентах ДЭАЭ-сефароза и Q-сефароза. Оценку чистоты (посторонние примеси) препарата рекомбинантного RBDdelta проводили методом ВЭЖХ на хроматографе LC-20 Prominence. Посторонние примеси определяли методом ОФ-ВЭЖХ при следующих условиях: колонка Summetry300-C4, 5 мкм, 4.6 х 150 мм, температура колонки – 60ºС, ПФ А – 5% CH_3CN в воде с 0.1% ТФУ, ПФ В – 90% CH_3CN в воде с 0.1% ТФУ, градиент: 0.0 мин - 10% В, 15 мин – 70% В, 15.1 мин 100% В, 19.0 мин.- 100%В, скорость ПФ – 1 мл/мин, , регистрация хроматограммы - 214 нм, концентрация белка в пробе – 0.4 мг/мл, объем пробы – 50 мкл.

Иммунизация животных

Все экспериментальные протоколы и процедуры были проведены в соответствии с рекомендациями Хельсинкской декларации и одобрено Комитетом по биоэтике НИЦ ВБ «Вектор» (протокол Комитета по биоэтике № 5 от 1 октября 2020 г.)

В эксперименте использовали самок мышей BALB/c весом 16–18 г, которых случайным образом разделили на 2 группы по 10 животных. Группы животных содержали в отдельных клетках в стандартных условиях с постоянным свободным доступом к воде и корму. Первую группу животных дважды иммунизировали 50 мкг RBD с $Al(OH)_3$ с двухнедельным интервалом. Второй контрольной группе также с интервалом в две недели дважды вводили физраствор.

Иммуноферментный анализ

В 96-луночные планшеты (Corning, США) сорбировали 100 мкл антигена (1 мкг/мл) в 2 М мочевине в PBS в течение ночи при 4 °С. Затем планшеты промывали PBST (PBS, содержащим 0,05% Tween-20) и блокировали блокирующим буфером (PBST, содержащим 1% казеина) 1,5 ч при комнатной температуре. Сыворотки иммунизированных животных серийно разбавляли и добавляли в блокированные планшеты. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 ч планшеты трижды промывали PBST и инкубировали с козьим антимышиным IgG-HRP (Sigma-Aldrich, США) вторичными антителами при комнатной температуре в течение 1 часа. Планшеты трижды промывали PBST и добавляли субстрат HRP TMB (Amresco, США). Реакции останавливали с помощью 1 Н HCl. Поглощение измеряли при 450 нм с использованием многорежимного считывателя микропланшетов Varioskan Lux (Thermo Fisher Scientific, США).

Анализ вируснейтрализации

Штаммы вируса Wuhan− hCoV-19/Australia/VIC01/2020 (EPI_ISL_406844), Delta−hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021 (EPI_ISL_7338814) и Omicron 1− hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021 (EPI_ISL_8920444) SARS-CoV-2 были получены из государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Вируссодержащий материал хранился при температуре -70

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DVC-2901

°C. Концентрация вируса в наработанном препарате составляла 5×10^6 ТЦД$_{50}$/мл (тканевая цитопатическая доза на миллилитр).

Образцы крови получали от всех животных через две недели после 2-й иммунизации. Из крови животных были получены сыворотки путем осаждения форменных элементов с помощью центрифугирования при 1000 × g в течение 7 - 10 мин. Полученные сыворотки термически инактивировали при 56 °C в течение 30 мин.

Определение нейтрализующих титров сывороток, проводили путем учета неповрежденного монослоя культуры клеток Vero E6 в лунках 96-луночного планшета (Corning, США). Культуру клеток выращивали в 96-луночных культуральных планшетах в ростовой питательной среде с добавлением 10 % бычьей фетальной сыворотки и антибиотиков. Заражение клеток проводили вариантами Delta (B.1.617.2), Wuhan и Omicron (B.1.1.529) вируса SARS-CoV-2 в дозе 100 ТЦД$_{50}$/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 разведениям сыворотки добавляли вирус в равной пропорции 1:1 и инкубировали в течение 1 ч при 37 ºC, затем смесь вируса и сыворотки наносили в дублях на монослой культуры клеток в объеме 100 мкл/лунку. Планшеты инкубировали в течение 4 сут при 37 °C 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. Учет 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.

Результаты

Разработка вакцины «Дельта-Вак»

Для разработки субъединичной вакцины-кандидата «Дельта-Вак» был выбран участок S-белка коронавируса SARS-CoV-2, соответствующий RBD (308V – 542N). В последовательность RBD Wuhan (GenBank MN908947) вводили нуклеотидные замены для получения аминокислотных замен (L452R и T479K), соответствующих варианту Дельта (B.1.617.2). На основе полученной последовательности, был сконструирован экспрессионный вектор pVL3. Полученный вектор был использован для создания стабильного штамма-продуцента CHO-K1-RBDdelta. Методом предельных разведений были получены и проанализированы 60 отдельных клонов продуцентов. По результатам ИФА выбран перспективный клон суперпродуцент, продуктивность которого достигла 50 мг/л. Полученный клон был

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DVC-2901

адаптирован к суспензионному культивированию и охарактеризован по стабильности экспрессии. Для этого его культивировали в течение 25 пассажей и оценивали продуктивность и жизнеспособность клеток на каждом пассаже. Итоговая продуктивность полученной суспензионной культуры CHO-K1-RBDdelta составила 150 мг/л.

Одним из важных этапов разработки безопасной вакцины является стадия хроматографической очистки. Разработанная схема двух-стадийной хроматографической очистки RBDdelta включала аффинную и ионообменную хроматографии. Чистота итогового препарата RBDdelta, определенная при помощи ВЭЖХ, по посторонним примесям составила 98,3 % в основном пике.

Оценка иммуногенности вакцины «Дельта-Вак»

Иммуногенность вакцины «Дельта-Вак» оценивали на модели мышей BALB/c. Проводили двукратную иммунизацию животных дозой 50 мкг RBD в комплексе с Al $(OH)_3$ с двухнедельным интервалом. Через две недели после второй иммунизации получали сыворотки крови и анализировали титры специфических IgG в ИФА с использованием в качестве антигенов RBD Delta и RBD Wuhan, а также тримеров S-белка вариантов Delta, Wuhan и Omicron SARS-CoV-2. Показано, что иммуноген вызывает индукцию специфических IgG у мышей линии BALB/c (рисунок 1).

Обратные титры специфических антител выявленных в ИФА с использованием рекомбинантных антигенов находились в диапазоне от 1×10^3 до 1×10^6. Статистической разницы в титрах IgG иммунизированных мышей для антигенов RBD Delta и RBD Wuhan не было выявлено. При том, статистическая разница в титрах IgG иммунизированных мышей наблюдалась, когда в качестве антигенов использовали S-белки вариантов Delta (B.1.617.2), Wuhan и Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2. При исследовании взаимодействия мышиных сывороток с S-белком вариантов Wuhan, Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 средние геометрическое титры IgG составили $2{,}6\times10^4$, 1×10^5, $1{,}3\times10^3$ соответственно.

Далее сыворотки крови иммунизированных мышей оценивали на наличие перекрестной нейтрализующей реактивности в отношении вариантов Delta (B.1.617.2), Wuhan и Omicron (B.1.1.529) вируса SARS-CoV-2 *in vitro* на клетках Vero E6. Результаты подтвердили, что сыворотки вакцинированных мышей обладают высокой нейтрализующей активностью в отношении варианта Delta (B.1.617.2) и Wuhan SARS-CoV-2 (рисунок 2), средний геометрический титр составил 1576±1,9 и 905,1± 2,0 соответственно.

Титр нейтрализующих антител против варианта Omicron (B.1.1.529) был ниже и составил 452,5±2,4.

Обсуждение

Как было показано, иммунизация рекомбинантным белком RBD SARS-CoV-2, обеспечивает эффективную индукцию нейтрализующих антител, способных обеспечивать защиту иммунизированных и поэтому считаются многообещающим кандидатом в производстве вакцин [20, 21, 22]. Настоящее

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

исследование было направлено на разработку кандидатной субъединичной вакцины против SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного рецептор-связывающего домена RBD SARS-CoV-2 варианта Дельта (B.1.617.2).

Важную роль при разработке субъединичных вакцин играет выбор системы экспрессии. Необходимо обеспечить синтез целевого белка с сохранением его иммуногенных свойств. В ряде недавних исследованиях было показано, что рекомбинантные белковые вакцины на основе RBD SARS-CoV-2, полученного в клетках млекопитающих, индуцируют высокие титры нейтрализующих антител [9, 10, 16, 18]. Наши данные по сравнительному исследованию иммуногенности рекомбинантного RBD SARS-CoV-2, полученного в системах экспрессии клеток прокариот и млекопитающих согласуются с вышеуказанными результатами [19]. В качестве кандидата для вакцины выбрали RBD одного из наиболее патогенных вариантов SARS-CoV-2 – варианта Дельта (B.1.617.2). Был разработан продуцент рекомбинантного RBD на основе клеток CHO-K1 и проведена адаптация клеток продуцента к суспензионному культивированию, при этом продуктивность штамма составила 150 мг с литра культуральной среды. На данный момент, достигнутый уровень продуктивности достаточен для выполнения экспериментов *in vivo* и проведения доклинических испытаний, однако, этот показатель может быть улучшен путем оптимизации состава питательных сред и режима культивирования. По литературным данным уровень продукции коммерчески привлекательного продуцента может достигать 1 г с литра культуры [23].

Для получения белка, отвечающего требованиям инъекционных препаратов, была разработана схема хроматографической очистки, включающая аффинную и ионообменную хроматографии. Потери белка при очистке не превышали 10%, при этом чистота, определенная при помощи ВЭЖХ, составила 98,3 %.

На основании предыдущих экспериментов по иммуногенности [24], в качестве состава вакцины-кандидата была выбрана доза RBD 50 мкг и адъювант – гидроокись алюминия ($Al(OH)_3$). Результаты оценки иммуногенности полученного вакцинного препарата «Дельта-Вак» показывают, что сыворотки, иммунизированных мышей, обладают эффективной связывающей и нейтрализующей активностью в отношении в SARS-CoV-2 вариантов Delta (B.1.617.2), Wuhan, но против варианта Omicron (B.1.1.529) индукция титра специфических IgG и нейтрализующая активность мышиных сывороток снижена. По всей видимости, это связано с тем, что S-белок Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 содержит большое количество мутации в S-белке, 15 из которых расположены в регионе RBD [25]. Наши данные согласуются с недавними исследованиями, которые показали, что увеличение количества и сложности мутаций в S-белке у штамма Omicron (B.1.1.529) приводит к его ускользанию от терапевтических моноклональных антител [25, 26]. Интересно отметить, что при низком титре специфических

 10.15789/1563-0625-DVC-2901

IgG мышиных сывороток к S-белку Omicron (B.1.1.529) SARS-CoV-2 наблюдался достаточно выраженный ответ нейтрализующих антител.

На основании приведенных результатов, можно заключить, что выбранная в работе стратегия получения и очистки рекомбинантного белка RBD Дельта (B.1.617.2) SARS-CoV-2 позволила получить достаточное количество препарата с высоким уровнем чистоты. Разработанная вакцина «Дельта-Вак» обладает высокой иммуногенностью и индуцирует выработку нейтрализующих антител против гомологичного варианта Delta и гетерологичных вариантов Wuhan и Omicron SARS-CoV-2. Таким образом «Дельта-Вак» может выступать в качестве кандидатной вакцины и служить прототипом для разработки субъединичных вакцин против COVID-19.

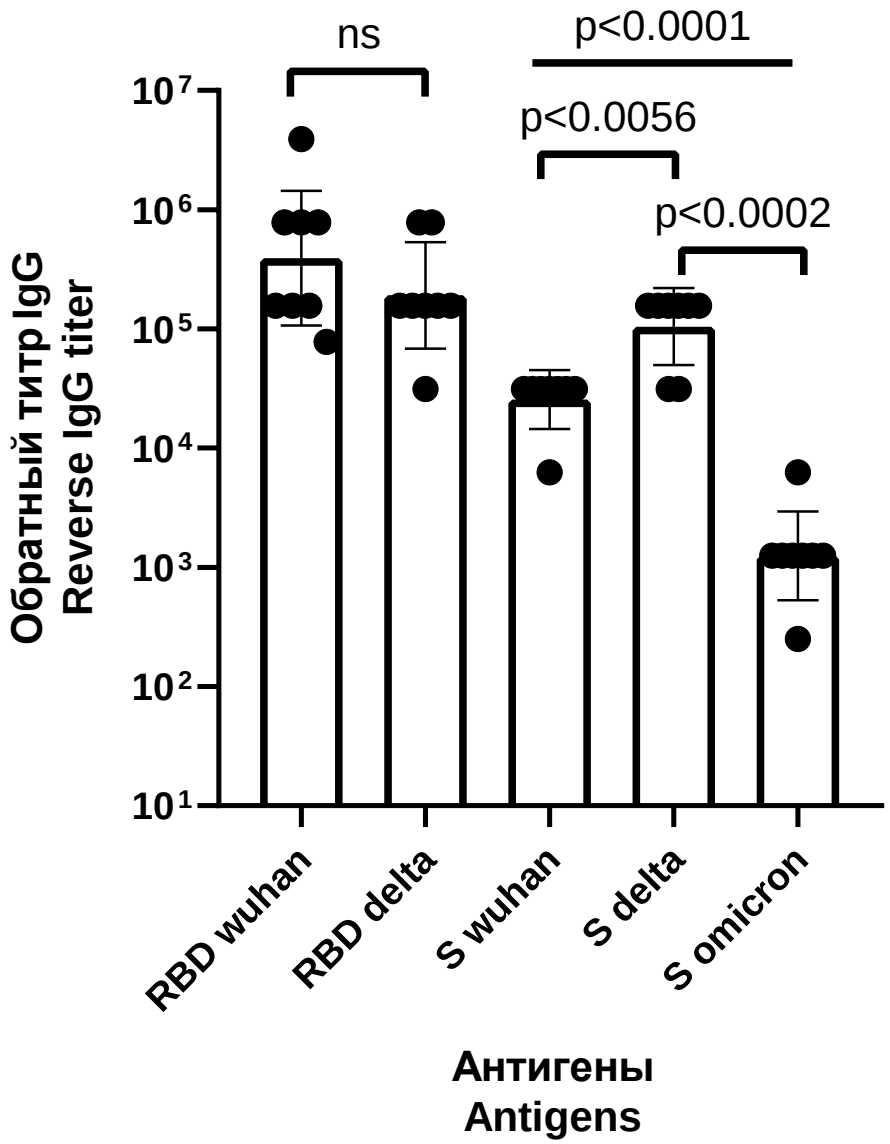
 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

РИСУНКИ

Рисунок 1. Анализ сывороточных IgG у мышей, иммунизированных дозой 50 мкг RBD Delta SARS-CoV-2 в ИФА. Представлены средние геометрические значения ± SD. Статистический анализ выполнен с использованием U критерия Манна-Уитни и критерия Краскела-Уоллиса.

Figure 1. Analysis of serum IgG in mice immunized with a dose of 50 μg of RBD Delta SARS-CoV-2 by ELISA. Geometric means ± SD are presented. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test and the Kruskal-Wallis test.

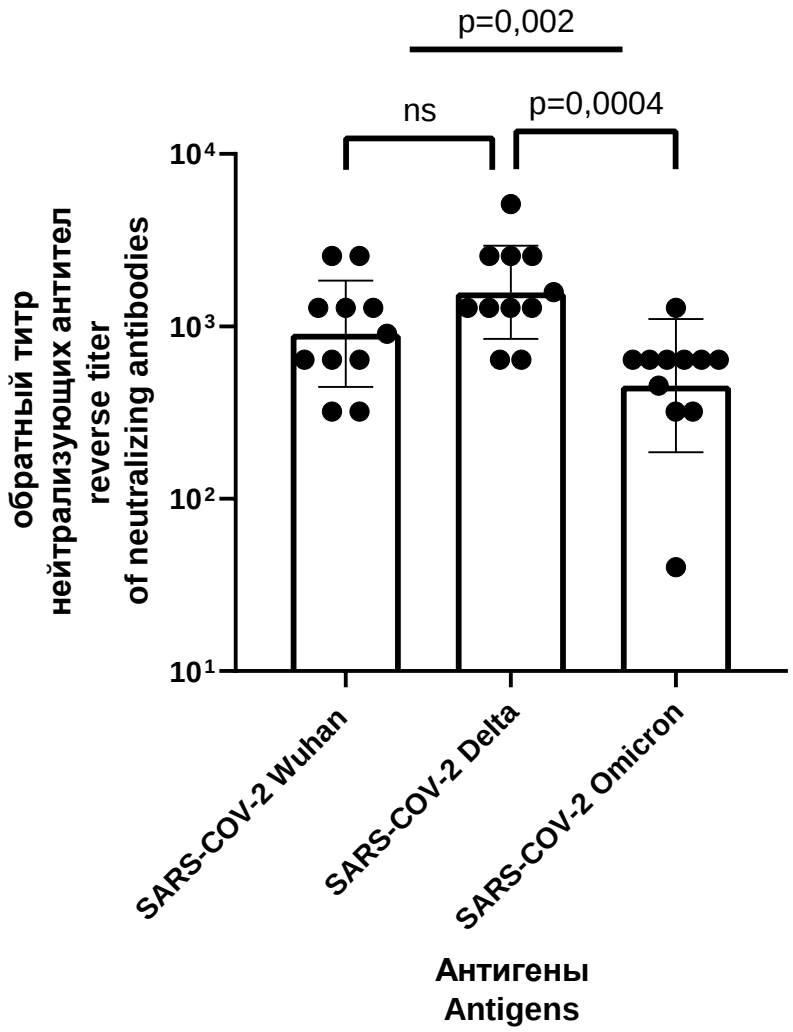


ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DVC-2901

Рисунок 2. Анализ сывороточных IgG у мышей иммунизированных дозой 50 мкг RBD Delta SARS-CoV-2 с гидроокисью алюминия в тесте на ингибирование цитопатического действия вариантов Delta(B.1.617.2), Wuhan и Omicron (B.1.1.529) вируса SARS-CoV-2 (100 ТЦД$_{50}$) на культуре клеток Vero E6. Представлены средние геометрические значения ± SD. Статистический анализ выполнен с использованием U критерия Манна-Уитни и критерия Краскела-Уоллиса.

Figure 2. Analysis of serum IgG in mice immunized with a dose of 50 μg of RBD Delta SARS-CoV-2 with aluminum hydroxide in a test for inhibition of the cytopathic effect of variants Delta (B.1.617.2), Wuhan and Omicron (B.1.1.529) of the SARS virus -CoV-2 (100 TCD50) on Vero E6 cell culture. Geometric means ± SD are presented. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney U test and the Kruskal-Wallis test.



 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

ТИТУЛЬНЫЙ ЛИСТ_МЕТАДАННЫЕ

Блок 1. Информация об авторе ответственном за переписку

Несмеянова Валентина Сергеевна, к.б.н., мнс отдела Биоинженерии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Россия, НСО, р.п. Кольцово, ул Никольский проспект, 16, кв 57
8(383)363-47-10вн.23-32 8(383)363-47-14, nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru

Nesmeyanova Valentina Sergeevna, PhD in Biology, research assistant of the Bioengineering Department of the FBSI SRC VB "Vector" of Rospotrebnadzor
State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Rospotrebnadzor
630559, Russia, NSO, R.p. Koltsovo, St. Nikolsky Prospect, 16, apt. 57
8(383)363-47-10вн.23-32 8(383)363-47-14, nesmeyanova_vs@vector.nsc.ru

Блок 2. Информация об авторах

Меркульева Юлия Александровна, кандидат биологических наук, младший научный сотрудник отдела Биоинженерии
Merkulyeva Yuliya Aleksandrovna, candidate of Sciences in Biology, research assistant Bioengineering Department

Исаева Анастасия Александровна, кандидат химических наук, младший научный сотрудник отдела Биоинженерии
Isaeva Anastasiya Aleksandrovna candidate of Sciences in Chemistry, research assistant Bioengineering Department

Волкова Наталья Вячеславовна кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела Биоинженерии
Volkova Natalya Vyacheslavovna, candidate of Sciences in Biology, research officer Bioengineering Department

Беленькая Светлана Валерьена кандидат биологических наук, научный сотрудник отдела Биоинженерии,
Belenkaya Svetlana Valeryena candidate of Sciences in Biology, research officer Bioengineering Department

Боргоякова Мария Борисовна, младший научный сотрудник отдела Биоинженерии

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

Borgoyakova Mariya Borisovna, research assistant Bioengineering Department

Волосникова Екатерина Александровна кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов, заведующая лаборатории получения и анализа биосубстанций,
Volosnikova Ekaterina Alexandrovna, candidate of Sciences in Biology, senior research officer of the department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals, Head of the Laboratory of Obtaining and Analizing Biosubstances

Есина Татьяна Игоревна младший научный сотрудник отдела разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов,
Esina Tatiana Igorevna, research assistant of the department of Technology Development and Pilot Production of Biologicals

Даниленко Елена Дмитриевна кандидат биологических наук, Врио директора Института медицинской биотехнологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора,
Danilenko Elena Dmitrievna, candidate of Sciences in Biology, director of the Institute of medical biotechnology, State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor

Зайковская Анна Владимировна кандидат биологических наук, старший научный сотрудник отдела "Коллекция микроорганизмов",
Zaikovskaya Anna Vladimirovna, candidate of Sciences in Biology, senior research officer department "Collection of microorganisms"

Олькин Сергей Евгеньевич ведущий научный сотрудник отдела биофизики и экологических исследований,
Olkin Sergey Evgenievich senior research officer of the Department of Biophysics and Ecological Research

Пьянков Олег Викторович кандидат биологических наук, заведующий отделом «Коллекция микроорганизмов»,
Pyankov Oleg Viktorovich, candidate of Sciences in Biology, Head of the Department "Collection of Microorganisms"

Ильичев Александр Алексеевич доктор биологических наук, заведующий отделом биоинженерии, профессор,
Ilichev Aleksandr Alekseevich, Doctor of Science in Biological Sciences, head of Bioengineering Department, full Professor

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

 10.15789/1563-0625-DVC-2901

Щербаков Дмитрий Николаевич кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник отдела биоинженерии, заведующий лаборатории иммунохимии,
Shcherbakov Dmitriy Nikolaevich, candidate of Sciences in Biology, senior research officer of Bioengineering Department, head of the Laboratory of immunochemistry.

Блок 3. Метаданные статьи

СУБЪЕДИНИЧНАЯ ВАКЦИНА «ДЕЛЬТА-ВАК» ИНДУЦИРУЕТ СИЛЬНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПРОТИВ SARS-COV-2
«DELTA-VAC» SUBUNIT VACCINE INDUCES STRONG HUMORAL IMMUNE RESPONSE AGAINST SARS-COV-2

Сокращенное название статьи для верхнего колонтитула:

Субъединичная вакцина «Дельта-Вак»
Subunit vaccine "Delta-Vac"

Ключевые слова: Субъединичные вакцины, SARS-CoV-2, RBD, S-белок, иммуногенность, нейтрализующие антитела
Keywords: Subunit vaccines, SARS-CoV-2, RBD, S-protein, immunogenicity, neutralizing antibodies

Оригинальные статьи
Количество страниц текста – 7
Количество таблиц – 0
Количество рисунков – 2
Дата поступления: 17.08.2023

 ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи или ее doi.
1	Матвеев А. Л., Хлусевич Я. А., Байков И. К., Бабкин И. В., Гончарова Е. П., Морозова В. В., Тикунова Н. В. Создание стабильного штамма-продуцента полноразмерного антитела человека на примере антитела против вируса эктромелии. Вавиловский журнал генетики и селекции, 2018, Т. 21, №. 8, С. 993-1000.	Matveev A.L., Khlusevich Ya.A., Baykov I.K., Babkin I.V., Goncharova E.P., Morozova V.V., Tikunova N.V. Development of a stable eukaryotic strain producing fully human monoclonal antibody on the basis of the human antibody against ectromelia virus. Vavilov skii Zhurnal Genetiki i Selektsii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(8):9931000. DOI 10.18699/VJ17.324 (in Russian)	https://doi.org/10.18699/VJ17.324
2	Arora P., Zhang L., Rocha C., Graichen L., Nehlmeier I., Kempf A., Cossmann	–	https://doi.org/10.3390/ijms232214057

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	A.,Gema Morillas Ramos G. M., Baier E., Tampe B., Moerer O., Dickel S., Winkler M. S., Behrens G. M. N., Pöhlmann S., Hoffmann M. The SARS-CoV-2 Delta-Omicron Recombinant Lineage (XD) Exhibits Immune-Escape Properties Similar to the Omicron (BA. 1) Variant . International Journal of Molecular Sciences, 2022, Vol. 23, no. 22, pp. 14057.		
3	Coria L. M., Saposnik L. M., Pueblas Castro C., Castro E. F., Bruno L. A., Stone W. B., Pérez P. S., Darriba M. L., Chemes L. B., Alcain J., Mazzitelli I., Varese A., Salvatori M., Auguste A. J., Álvarez D. E., Pasquevich K. A., Cassataro J. A Novel Bacterial Protease Inhibitor Adjuvant in RBD-Based COVID-19 Vaccine	–	doi: 10.3389/fimmu.2022.844837

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	Formulations Containing Alum Increases Neutralizing Antibodies , Specific Germinal Center B Cells and Confers Protection Against SARS-CoV-2 Infection in Mice. Frontiers in Immunology, 2022, Vol. 13, no. 2, pp. 1-17.		
4	Dai L., Gao G. F. Viral targets for vaccines against COVID-19. Nature Reviews Immunology, 2021, Vol. 21, no. 2, pp. 73-82.	–	doi: 10.1038/s41577-020-00480-0
5	Ghaemi A., Roshani P. Asl., Zargaran H., Ahmadi D., Hashimi A. A., Abdolalipour E., Bathaeian S., Miri S. M. Recombinant COVID-19 vaccine based on recombinant RBD/Nucleoprotein and saponin adjuvant induces long-lasting neutralizing antibodies and cellular	–	doi: 10.3389/fimmu.2022.974364

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	immunity. Frontiers in Immunology, 2022, 13(September), pp. 1–16.		
6	Karthik K., Senthilkumar T. M. A., Udhayavel S., Raj G. D. Role of antibody-dependent enhancement (ADE) in the virulence of SARS-CoV-2 and its mitigation strategies for the development of vaccines and immunotherapies to counter COVID-19. Human Vaccines and Immunotherapeutics, 2020, Vol. 16, no. 12, pp. 3055-3060.	–	doi: 10.1080/21645515.2020.1796425
7	Kleanthous H., Silverman J. M., Makar K. W., Yoon I. K., Jackson N., Vaughn D. W. Scientific rationale for developing potent RBD-based vaccines targeting COVID-19. Vaccines, 2021, Vol. 6, no. 1, pp. 1-10.	–	doi: 10.1038/s41541-021-00393-6

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

8	Kuo T. Y., Lin M. Y., Coffman R. L., Campbell J. D., Traquina P., Lin Y. J., Liu L. T.-Ch., Cheng J., Wu Y.-Ch., Wu Ch.-Ch., Tang W.-H., Huang Ch.-G., Tsao K.-Ch., Chen C. Development of CpG-adjuvanted stable prefusion SARS-CoV-2 spike antigen as a subunit vaccine against COVID-19. Scientific Reports, 2020, Vol. 10, no. 1, pp. 1–10.	–	doi: 10.1038/s41598-020-77077-z
9	Lee I. J., Sun C. P., Wu P. Y., Lan Y. H., Wang I. H., Liu W. C., Yuan J. P.-Y., Chang Y.-W., Tseng Sh.-Ch., Tsung S.-I., Chou Y.-Ch., Kumari M., Lin Y.-Sh., Chen H.-F., Chen T.-Y., Lin Ch.-Ch., Chiu Ch.-W., Hsieh Ch.-H., Chuang Ch.-Y., Cheng Ch.-M., Lin H.-T., Chen W.-Y., Hsu F.-F., Hong M.-H., Liao Ch.-Ch., Chang Ch.-Sh.,	–	doi: 10.1186/s12929-022-00830-1

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	Liang J.-J., Ma H.-H., Chiang M.-T., Liao H.-N., Ko H.-Y., Chen L.-Y., Ko Y.-A., Yu P.-Y., Yang T.-J., Chiang P.-Ch., Hsu Sh.-T., Lin Y.-L., Lee Ch.-Ch., Wu H.-Ch., Tao M. H. A booster dose of Delta × Omicron hybrid mRNA vaccine produced broadly neutralizing antibody against Omicron and other SARS-CoV-2 variants. Journal of Biomedical Science, 2022, Vol. 29, no. 1, pp. 1-13.		
10	Liao Y., Li Y., Pei R., Fang X., Zeng P., Fan R., Ou Zh., Deng J., Zhou J., Guan W., Min Y., Deng F., Peng H., Zhang Zh., Feng Ch., Xin B., He J., Hu Zh., Zhang J. Safety and immunogenicity of a recombinant interferon-armed RBD dimer vaccine (V-01) for COVID-19 in healthy adults: a randomized,	–	doi: 10.1080/22221751.2021.1951126

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	double-blind, placebo-controlled, Phase I trial. Emerging Microbes and Infections, 2021, Vol. 10, no. 1, pp. 1589-1597.		
11	Lin T. W., Huang P. H., Liao B. H., Chao T. L., Tsai Y. M., Chang S. C., Chang S-Y., Chen, H. W. Tag-Free SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain (RBD), but Not C-Terminal Tagged SARS-CoV-2 RBD, Induces a Rapid and Potent Neutralizing Antibody Response. Vaccines, 2022, Vol. 10 no. 11, pp. 1-11.	–	doi: 10.3390/vaccines10111839
12	Liu Ch., Ginn H. M., Dejnirattisai W., Supasa P., Wang B., Tuekprakhon A., Nutalai R., Zhou D., Mentzer A. J., Zhao Y., Duyvesteyn H. M. E., López-Camacho C., Slon-Campos J., Walter Th. S., Skelly D., Johnson S.	–	https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.06.020

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	A., Ritter Th. G., Mason Ch., Clemens S. A. C., Naveca F. G., Nascimento V., Nascimento F., Fernandes da Costa C., Resende P. C., Pauvolid-Correa A., Siqueira M. M., Dold Ch., Temperton N., Dong T., Pollard A. J., Knight J. C., Crook D., Lambe T., Clutterbuck E., Bibi S., Flaxman A., Bittaye M., Belij-Rammerstorfer S., Gilbert S. C., Malik T., Carroll M. W., Klenerman P., Barnes E., Dunachie S. J., Baillie V., Serafin N., Ditse Z., Silva K. D., Paterson N. G., Williams M. A., Hall D. R., Madhi Sh., Nunes M. C., Goulder Ph., Fry E. E., Mongkolsapaya J., Ren J., Stuart D. I., Screaton G. R. Reduced neutralization of SARS-CoV-2 B. 1.617 by vaccine and convalescent serum. Cell, 2021, Vol. 184, no. 16, pp. 4220-4236. e13.		

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

13	Malladi S. K., Singh R., Pandey S., Gayathri S., Kanjo K., Ahmed S., Khan M. S., Kalita P., Girish N., Upadhyaya A., Reddy P., Pramanick I., Bhasin M., Mani Sh., Bhattacharyya S., Joseph J., Thankamani K., Raj V. S., Dutta S., Singh R., Nadig G., Varadarajan R. Design of a highly thermotolerant, immunogenic SARS-CoV-2 spike fragment. Journal of Biological Chemistry, 2021, Vol. 296, pp. 100025.	–	doi: 10.1074/jbc.RA120.016284
14	Merkuleva I. A., Shcherbakov D. N., Borgoyakova M. B., Isaeva A. A., Nesmeyanova V. S., Volkova N. V., Aripov V. S., Shanshin D. V., Karpenko L. I., Belenkaya S. V., Kazachinskaia E. I., Volosnikova E. A., Esina T. I., Sergeev A. A., Titova K.	–	doi: 10.3390/v14051060

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	A., Konyakhina Y. V., Zaykovskaya A. V., Pyankov O. V., Kolosova E. A., Viktorina O. E., Shelemba A. A., Rudometov A. P., Ilyichev, A. A. Are Hamsters a Suitable Model for Evaluating the Immunogenicity of RBD-Based Anti-COVID-19 Subunit Vaccines?. Viruses, 2022, Vol. 14, no. 5, pp. 1060.		
15	Merkuleva I. A., Shcherbakov D. N., Borgoyakova M. B., Shanshin D. V., Rudometov A. P., Karpenko L. I., Belenkaya S. V., Isaeva A. A., Nesmeyanova V. S., Kazachinskaia E. I., Volosnikova E. A., Esina T. I., Zaykovskaya A. V., Pyankov O. V., Borisevich S. S., Shelemba A. A., Chikaev A. N., Ilyichev A. A.	–	doi: 10.3390/vaccines10010096

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	Comparative Immunogenicity of the Recombinant Receptor-Binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems. Vaccines, 2022, Vol. 10 no. 1.		
16	Premkumar L., Segovia-Chumbez B., Jadi R., Martinez D. R., Raut R., Markmann A. J., Cornaby C., Bartelt L., Weiss S., Park Y., Edwards C. E., Weimer E., Scherer E. M., Rouphael N., Edupugantih S., Weiskopf D., TSE L. V., HOU Y. J., Margolis D., Sette A., Collins M. H., Schmitz J., Baric R. S., De Silva A. M. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients.	–	doi: 10.1126/sciimmunol.abc8413

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	Science immunology, 2020, Vol. 5, no. 48, pp. eabc8413.		
17	Shimizu J., Sasaki T., Koketsu R., Morita R., Yoshimura Y., Murakami A., Saito Y., Kusunoki T., Samune Y., Nakayama E. E., Miyazaki K., Shioda T. Reevaluation of antibody-dependent enhancement of infection in anti-SARS-CoV-2 therapeutic antibodies and mRNA-vaccine antisera using FcR- and ACE2-positive cells. Scientific Reports, 2022, Vol. 12, no. 1, pp. 1-9.	–	doi: 10.1038/s41598-022-19993-w
18	Starr T. N., Czudnochowski N., Liu Z., Zatta F., Park Y. J., Addetia A., Pinto D., Beltramello M., Hernandez P., Greaney A. J., Marzi R., Glass W. G., Zhang I., Dingens A. S., Bowen J. E., Tortorici M. A., Walls A. C.,	–	doi: 10.1038/s41586-021-03807-6

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	Wojcechowskyj J. A., De Marco A., Rosen L. E., Zhou J., Montiel-Ruiz M., Kaiser H., Dillen J. R., Tucker H., Bassi J., Silacci-Fregni Ch., Housley M. P., Di Iulio J., Lombardo G., Agostini M., Sprugasci N., Culap K., Jaconi S., Meury M., Jr E. D., Abdelnabi R., Foo Sh.-Y. C., Cameroni E., Stumpf S., Croll T. I., Nix J. C., Havenar-Daughton C., Piccoli L., Benigni F., Neyts J., Telenti A., Lempp F.A., Pizzuto M. S., Chodera J. D., Hebner Ch. M., Virgin H. W., Whelan S. P. J., Veesler D., Corti D., Bloom J. D., Snell G. SARS-CoV-2 RBD antibodies that maximize breadth and resistance to escape. Nature, 2021, Vol. 597, no. 7874, pp. 97-102		
19	Wang J., Wen Y., Zhou S. H., Zhang H. W., Peng X. Q.,	–	doi: 10.1021/acs.jmedchem.1c02000

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	Zhang R. Y., Yin X-G., Qiu H., Gong R., Yang G.-F., Guo J. Self-Adjuvanting Lipoprotein Conjugate αgalCer-RBD Induces Potent Immunity against SARS-CoV-2 and its Variants of Concern. Journal of Medicinal Chemistry, 2022, Vol. 65 no. 3, pp. 2558-2570.		
20	Yang D. K., Kweon C. H., Kim B. H., Lim S. I., Kwon J. H., Kim S. H., Jae-Young S., Han H. R. Immunogenicity of baculovirus expressed recombinant proteins of Japanese encephalitis virus in mice. Journal of Veterinary Science, 2005, Vol. 6, no. 2, pp. 125-133.	–	https://doi.org/10.4142/jvs.2005.6.2.125
21	Yang J., Wang W., Chen Z., Lu S., Yang F., Bi Z., Bao L., Mo F., Li X., Huang Y., Hong W., Yang Y., Zhao Y.,	–	doi: 10.1038/s41586-020-2599-8

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	Ye F., Lin Sh., Deng W., Chen H., Lei H., Zhang Z., Luo M., Gao H., Zheng Y., Gong Y., Jiang X., Xu Y., Lv Q., Li D., Wang M., Li F., Wang Sh., Wang G., Yu P., Qu Y., Yang L., Deng H., Tong A., Li J., Wang Zh., Yang J., Shen G., Zhao Zh., Li Y., Luo J., Liu H., Yu W., Yang M., Xu J., Wang J., Li H., Wang H., Kuang D., Lin P., Hu Zh., Guo W., Cheng W., He Y., Song X., Chen Ch., Xue Zh., Yao Sh., Chen L., Ma X., Chen S., Gou M., Huang W., Wang Y., Fan Ch., Tian Zh., Shi M., Wang F.-Sh., Dai L., Wu M., Li G., Wang G., Peng Y., Qian Zh., Huang C., Lau J. Y.-N., Yang Zh., Wei Y., Cen X., Peng X., Qin Ch., Zhang K., Lu G., Wei X. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity.		

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	Nature, 2020, Vol. 586, no. 7830, pp. 572-577.		
22	Ye J., Meng S., Zhu X. Recent advances in the development of bispecific antibodies. Sheng wu Gong Cheng xue bao= Chinese Journal of Biotechnology, 2020, Vol. 36, no. 1, pp. 33-43.	–	doi: 10.13345/j.cjb.190154
23	Zhang J., Zeng H., Gu J., Li H., Zheng L., Zou Q. Progress and prospects on vaccine development against SARS-CoV-2. Vaccines, 2020, Vol. 8, no. 2, pp. 1–12.	–	doi: 10.3390/vaccines8020153
24	Zang J., Gu C., Zhou B., Zhang C., Yang Y., Xu S., Bai L., Zhang R., Deng Q., Yuan Zh., Tang H., Qu D., Lavillette D., Xie Y., Huang Z. Immunization with the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 elicits	–	doi: 10.1038/s41421-020-00199-1

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)

10.15789/1563-0625-DVC-2901

	antibodies cross-neutralizing SARS-CoV-2 and SARS-CoV without antibody-dependent enhancement. Cell Discovery, 2020, Vol. 6, no. 1, pp. 4-7.		
25	Zhang J., Han Z. B., Liang Y., Zhang X. F., Jin Y. Q., Du L. F., Shao Sh., Wang H., Hou J. W., Xu K., Lei W., Lei Z. H., Liu Zh. M., Zhang J., Hou Y. N., Liu N., Shen F. J., Wu J. J., Zheng X., Li X. Y., Li X., Huang W. J., Wu G. Zh., Su J. G., Li, Q. M. A mosaic-type trimeric RBD-based COVID-19 vaccine candidate induces potent neutralization against Omicron and other SARS-CoV-2 variants. eLife, 2022, Vol. 11, pp. 1-23.	–	doi: 10.7554/eLife.78633

ISSN 1563-0625 (Print)
ISSN 2313-741X (Online)