

ХИМЕРНЫЕ ВИРУСОПОДОБНЫЕ ЧАСТИЦЫ, СОДЕРЖАЩИЕ ФРАГМЕНТ БЕЛКА ШИПА КОРОНАВИРУСА, СТИМУЛИРУЮТ СОЗРЕВАНИЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА



В.Ю. Талаев, Д.В. Новиков, И.Е. Заиченко, М.В. Светлова, Е.В. Воронина, О.Н. Бабайкина, В.А. Лапин, Д.А. Мелентьев, Н.А. Новикова, А.Ю. Кашников, В.В. Новиков

ФБУН Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. Введение. Белки вирусных капсидов могут собираться в вирусоподобные частицы, которые лишены инфекционности и несут антигены исходных вирусов или искусственно введенные антигены других возбудителей. Как минимум некоторые из этих частиц обладают высокой иммуногенностью и могут служить основой перспективных вакцин. В данной работе оценивали действие химерных вирусоподобных частиц, декорированных фрагментом белка шипа коронавируса SARS-CoV-2, на дендритные клетки человека — наиболее активные антигенпрезентирующие клетки, которые играют ключевую роль в индукции первичного иммунного ответа. **Материалы и методы.** Объектом исследования были вирусоподобные частицы, собранные из химерных молекул, содержащих антигены коронавируса SARS-CoV-2. Химерные молекулы были получены с помощью слияния генетической последовательности, кодирующей фрагмент основного капсидного белка VP1 норовируса, с последовательностью, кодирующей фрагмент коронавирусного белка шипа, включая рецептор-связывающий домен. Дендритные клетки получали из моноцитов традиционным способом, и оценивали действие частиц на фенотип и функциональные свойства дендритных клеток в условиях *in vitro*. **Результаты.** Инкубация незрелых дендритных клеток с вирусоподобными частицами индуцировала фенотипическое и функциональное созревание клеток. Фенотипическое созревание проявлялось в значительном росте экспрессии молекулы главного комплекса гистосовместимости HLA-DR, ко-стимулирующих молекул CD80 и CD86, а также маркера зрелости CD83. Фенотип дендритных клеток после инкубации с вирусоподобными частицами в максимальной использованной концентрации 10 мкг/мл не имел достоверных отличий от фенотипа зрелых дендритных клеток положительного контроля. Наряду с фенотипическим созреванием вирусоподобные частицы вызывали многократное усиление продукции провоспалительного фактора некроза опухоли- α , противовоспалительного интерлейкина-10, а также интерлейкина-6, который может стимулировать синтез антител, созревание Т-хелперов 17 типа и воспалительные реакции. Выраженная стимуляция дендритных клеток вирусоподобными частицами, покрытыми антигенами коронавируса, свидетельствует об успешном распознавании частиц. В обсуждении приводятся возможные ме-

Адрес для переписки:

Талаев Владимир Юрьевич
603950, Россия, г. Нижний Новгород, ул. Малая Ямская, 71,
ФБУН НИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.
Тел.: 8 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Contacts:

Vladimir Yu. Talayev
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod, Malaya
Yamskaya str., 71, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod
Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology.
Phone: +7 (831) 469-79-48.
E-mail: talaev@inbox.ru

Для цитирования:

Талаев В.Ю., Новиков Д.В., Заиченко И.Е., Светлова М.В., Воронина Е.В., Бабайкина О.Н., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., Новикова Н.А., Кашников А.Ю., Новиков В.В. Химерные вирусоподобные частицы, содержащие фрагмент белка шипа коронавируса, стимулируют созревание дендритных клеток человека // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 2. С. 227–237. doi: 10.15789/2220-7619-CSP-17612

Citation:

Talayev V.Yu., Novikov D.V., Zaichenko I.Ye., Svetlova M.V., Voronina E.V., Babaykina O.N., Lapin V.A., Melentiev D.A., Novikova N.A., Kashnikov A.Yu., Novikov V.V. Coronavirus spike protein fragment-containing chimeric virus-like particles stimulate human dendritic cell maturation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 2, pp. 227–237. doi: 10.15789/2220-7619-CSP-17612

ханизмы распознавания структур исследуемых вирусоподобных частиц рецепторами дендритных клеток. **Заключение.** Показано, что химерные вирусоподобные частицы индуцируют фенотипическое и функциональное созревание дендритных клеток, которое проявляется в значительном росте экспрессии функционально значимых мембранных молекул, а также в многократном усилении продукции цитокинов с широким спектром функций. По нашему мнению, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования вирусоподобных частиц на основе норовирусных белков для экспонирования антигенов коронавируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: вирусоподобные частицы, коронавирус, норовирус, дендритные клетки, вакцина.

CORONAVIRUS SPIKE PROTEIN FRAGMENT-CONTAINING CHIMERIC VIRUS-LIKE PARTICLES STIMULATE HUMAN DENDRITIC CELL MATURATION

Talayev V.Yu., Novikov D.V., Zaichenko I.Ye., Svetlova M.V., Voronina E.V., Babaykina O.N., Lapin V.A., Melentiev D.A., Novikova N.A., Kashnikov A.Yu., Novikov V.V.

Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, Nizhniy Novgorod, Russian Federation

Abstract. Introduction. Viral capsid proteins can assemble into virus-like particles lacking infectivity and bearing parental virus antigens or artificially introduced antigens from other pathogens. At least some of such particles are highly immunogenic and could serve as a platform for promising vaccines. In this work, we assessed an effect of virus-like particles decorated with a SARS-CoV-2 spike protein fragment on human dendritic cell phenotype and functional properties. **Materials and methods.** The virus-like particles were assembled using chimeric molecules obtained by fusing genetic sequences encoding a norovirus major capsid protein VP1 fragment and a coronavirus spike protein fragment, including the receptor-binding domain. Dendritic cells were obtained from monocytes *in vitro*. **Results.** Incubation of immature dendritic cells with virus-like particles induced their phenotypic and functional maturation. The former was revealed by significantly increased expression of HLA-DR, CD80, CD86 and CD83. Dendritic cell phenotype after incubation with virus-like particles at the maximum concentration of 10 µg/ml did not differ significantly from that of mature dendritic cells in positive control. Along with phenotypic maturation, virus-like particles caused a manifold increase in the production of pro-inflammatory tumor necrosis factor-α, anti-inflammatory interleukin-10, as well as interleukin-6, which can stimulate both antibody synthesis and cellular pro-inflammatory reactions. The pronounced stimulation of dendritic cells by virus-like particles coated with coronavirus antigens evidence about successful particle recognition. Finally, we discuss plausible mechanisms for recognition of such virus-like particles by dendritic cell receptors. **Conclusion.** It has been shown that chimeric virus-like particles induced phenotypic and functional dendritic cell maturation, which is manifested by markedly elevated expression of functionally important membrane molecules, as well as a manifold rise in production of cytokines with a wide functional range. In our opinion, the data obtained indicate a promise of using virus-like particles based on norovirus proteins to display SARS-CoV-2 antigens.

Key words: virus-like particles, coronavirus, norovirus, dendritic cells, vaccine.

Введение

Чрезвычайная опасность пандемии коронавирусной болезни 2019 г. потребовала создания вакцины против коронавируса SARS-CoV-2 в беспрецедентно короткие сроки. Первой в мире коронавирусной вакциной, зарегистрированной национальным регулятором для общего применения, стала вакцина Гам-КОВИД-Вак [17], получившая разрешение в Российской Федерации 11 августа 2020 г. После этого в России и за рубежом с использованием как традиционных, так и новейших технологий было создано много других вакцин против коронавируса [24, 34]. Использование этих вакцин принесло огромную пользу человечеству, и процесс совершенствования коронавирусных вакцин и технологий их производства продолжается [24, 34].

Большинство разработанных коронавирусных вакцин используют в качестве основного или единственного антигена белок шипа (белок S) или его фрагменты. Выбор этого антигена в качестве вакцинного определяется протективным эффектом иммунного ответа на белок S, что, в свою очередь, связано с ключевой ролью этого белка в заражении клеток коронавирусом. Морфологически белок S имеет вид булавовидных шипов на поверхности липидной мембраны вириона. Этот белок состоит из одной цепи длиной 1273 аминокислотных остатка (далее — а.о.) в которую входят короткий N-концевой сигнальный пептид и две субъединицы — S1 (а.о. 14–685) и S2 (а.о. 686–1273). В субъединицу S1 входят N-концевой домен (а.о. 14–305) и рецептор-связывающий домен (RBD, а.о. 319–541), а в субъединицу S2 — пептид слияния (а.о. 788–806), два гептапептидных повтора (а.о. 912–984

и 1163–1213), трансмембранный участок (а.о. 1213–1237) и С-концевая последовательность (а.о. 1237–1273), которая в вирионе располагается под его липидной мембраной [35].

Заражение клеток вирусом SARS-CoV-2 начинается со связывания RBD с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) на наружной мембране клеток дыхательных путей [36, 38]. Это взаимодействие ведет к прикреплению вириона к клетке и поглощению его мембранной везикулой [16, 37]. Затем белок S расщепляется на субъединицы S1 и S2 трансмембранной сериновой протеазой 2 (TMPRSS2) хозяина в сайте расщепления фурином (а.о. 682–689) [18], причем образовавшиеся в результате расщепления две полипептидные цепи остаются нековалентно связанными. Вновь созданный С-конец цепи S1 представлен последовательностью Arg-Arg-Ala-Arg, имеющей сродство к нейропину 1 (NRP1 или CD304). NRP1 сильно экспрессируется эпителием дыхательных путей, эндотелием сосудов и предшественниками обонятельных нейронов. В физиологических условиях NRP1 регулирует разнообразные функции, в частности, рост аксонов, ангиогенез, транспорт веществ через мембраны клеток, стенки сосудов и тканевые барьеры [21, 31]. При инфекции NRP1 служит ко-фактором связывания нескольких вирусов, в том числе, SARS-CoV-2, и взаимодействие с ним значительно повышает эффективность проникновения коронавируса в клетку [7, 11]. После праймирования белка S протеазой TMPRSS2 пептид слияния оказывается вблизи вновь образовавшегося N-конца субъединицы S2. Такое положение позволяет этому пептиду осуществить слияние вирусной и везикулярной мембран, что ведет к проникновению вирусного генома внутрь клетки [15, 33].

В данном исследовании в целях разработки новых коронавирусных вакцин изучались свойства вирусоподобных частиц (VLP), состоящих из химерных молекул, в состав которых входил фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2, включая домен RBD и NRP1-связывающий мотив. Химерные молекулы были получены с помощью слияния генетической последовательности, кодирующей фрагмент основного капсидного вирусного белка 1 (VP1) норовируса, с последовательностью, кодирующей RBD-содержащий фрагмент белка S нового коронавируса. При этом норовирусный компонент был предназначен для самосборки частиц, декорированных антигенами коронавируса.

VP1 является основным структурным белком норовирусов. Икосаэдрический капсид этих простых вирусов собран из 180 копий белка VP1 с включением одной или двух копий белка VP2 [8, 12, 23]. VP1 состоит из домена обо-

лочка (S) и выступающего домена (P) с короткой шарнирной областью между ними [12, 22]. S-домен критически необходим для образования капсида. Димеризация Р-доменов формирует дугообразные выступы на внешней поверхности вириона. Эти выступы и, особенно, их дистальные части из субдомена P2 с гипервариабельным участком играют важную роль во взаимодействии вириона с ко-факторами связывания, а также в иммунной реактивности макроорганизма [30]. Экспрессия гена VP1 в клетках насекомых [14, 22, 23], растений [26] и млекопитающих [4] может приводить к сборке VLP, которые антигенно и морфологически сходны с настоящими вирионами. Эти VLP исследуются в качестве кандидатов в вакцины против норовирусов — возбудителей острого гастроэнтерита у людей [13]. Кроме того, норовирусные VLP можно использовать в качестве платформы для отображения антигенных эпитопов других патогенов [13]. Целью создания таких конструкций является увеличение иммуногенности вакцинных антигенов за счет расположения их эпитопов на наружной поверхности частиц на равном расстоянии, оптимальном для перекрестного связывания В-клеточными антигенраспознающими рецепторами [3, 20]. Кроме того, размер и форма VLP могут улучшить сбор антигенов миелоидными антигенпрезентирующими клетками и, тем самым, усилить презентацию антигенов Т-лимфоцитам и индукцию полноценного Т-зависимого иммунного ответа [2]. В данной работе исследовалось действие RBD-содержащих химерных VLP на дендритные клетки (ДК) человека — наиболее активные антигенпрезентирующие клетки, которые играют ключевую роль в индукции первичного иммунного ответа [28].

Материалы и методы

Объектом исследования являлись VLP из химерных молекул, состоящих из белка VP1 норовируса геногруппы II генотипа 4 (GII.4), в котором наружный Р-домен был заменен на RBD-содержащий фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2 (далее — VLP SN-RBD). Для создания VLP из носоглоточного смыва больного коронавирусной инфекцией (Нижегородская область, 2021 г.) с использованием набора РИБО-преп (AmpliSens, Россия) выделяли РНК SARS-CoV-2. Проводили реакцию обратной транскрипции, используя обратную транскриптазу RNAscribe RT и статистические затравки (Биолабмикс, Россия). На матрице полученной кДНК амплифицировали нуклеотидную последовательность, которая кодирует фраг-

мент белка S с 314 по 754 а.о. Этот фрагмент включает RBD и NRP1-связывающий мотив [7, 11]. Для ПЦР использовали праймеры 5'-AAGCCATGGATCAAGCTTCTAACTTTAGAGTCCAACCA-3' и 5'-CATATTGCTCGAGTTAATGGTGATGGTGATGGTGATCACCACA AATGTACATTGTACAATC-3' и Фьюжн ДНК-полимеразу (Pfu-Sso7d), согласно рекомендациям производителя (Биолабмикс, Россия). Полученную кДНК клонировали в составе ранее созданной плазмиды pSN-VP1E30 [1] с использованием рестриктаз Hind III и Xho I (СибЭнзим, Россия). Это приводило к получению генетической конструкции SN-RBD, состоящей из последовательностей, кодирующих домен S и шарнирный регион белка VP1 норовируса, фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2 и 6 остатков гистидина, слитых в одну молекулу. Экспрессию рекомбинантного белка SN-RBD в клетках *E. coli* штамма Rosetta 2 (DE3), его очистку и ренатурацию с формированием VLP проводили, как описано ранее [1].

Морфологию VLP определяли с помощью электронной микроскопии. Для этого 5 мкл раствора VLP SN-RBD с концентрацией белка 0,1 мг/мл наносили на электронно-микроскопическую медную сетку, покрытую парлодиевой пленкой, отмывали деионизованной водой и окрашивали водным раствором 2% уранилацетата (рН 4,5). Образцы исследовали с помощью электронного микроскопа просвечивающего типа HT7700 (Hitachi, Япония) при рабочем напряжении 80 киловольт.

В качестве контрольного образца (КО) в исследовании использовали лизат бактерий, трансфицированных вектором, не содержащим последовательностей, кодирующих вирусные белки. КО проходил все циклы очистки, согласно протоколу очистки VLP. Таким образом, КО не содержал целевых белков, но мог содержать примеси, которые, теоретически, могли оставаться в пробах VLP после очистки. Перед внесением в клеточные культуры растворы VLP и КО стерилизовали фильтрацией через мембранный фильтр с диаметром пор 0,22 мкм (Corning, США), диализовали против среды RPMI-1640 и во все пробы вносили 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, Австрия).

ДК получали из моноцитов *in vitro* традиционным способом [25] с модификациями [29]. Кратко, суть метода состоит в следующем. Мононуклеарные клетки периферической крови здоровых взрослых доноров выделяли центрифугированием над слоем Diacoll-1077 (ДиаМ, Россия), засеивали в 48-луночные планшеты (Costar, США) по $2,5 \times 10^6$ клеток на лунку и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в полной

питательной среде (ППС) следующего состава: среда RPMI-1640 (Gibco, Великобритания) с 10% эмбриональной телячьей сыворотки (РАА, Австрия). Через 2 часа лимфоциты удаляли осторожным пипетированием, а прилипшие моноциты культивировали в ППС с 20 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4) и 100 нг/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (Sci.store.ru, Россия). IL-4 и GM-CSF повторно добавляли в культуры в той же концентрации на 3 день культивирования. На 7 день полученные из моноцитов незрелые ДК переводили в свежую ППС и культивировали с VLP в течение 48 часов при 37°C и 5% CO₂. Конечная концентрация белков VLP в культурах составляла 1, 3 и 10 мкг/мл. Негативными контролями являлись незрелые ДК, инкубированные в ППС без стимуляторов, и ДК, инкубированные с КО в концентрациях, эквивалентных концентрациям VLP. Эквивалентность рассчитывалась по количеству стандартизованной суспензии бактерий-продуцентов, использованной для изготовления VLP и КО. Положительным контролем созревания являлись зрелые ДК (зДК), стимулированные в течение 48 часов коктейлем провоспалительных медиаторов, состоящим из 25 нг/мл IL-6 (Sci.store.ru, Россия), 25 нг/мл IL-1 β , 50 нг/мл фактора некроза опухоли- α (TNF α) (R&D, США) и 1 мкг/мл простагландина E2 (Sigma, США).

После 48 часов инкубации ДК ресуспендировали, собирали из лунок и осаждали центрифугированием. Надосадок собирали, аликвотировали и замораживали при минус 70°C для последующего определения содержания цитокинов IL-6, IL-10 и TNF α с помощью иммуноферментных тест-систем «Интерлейкин-6-ИФА-Бест», «Интерлейкин-10-ИФА-Бест» и «Альфа-ФНО-ИФА-Бест» (Вектор-Бест, Россия). Собранные ДК отмывали и ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере Дульбекко с 0,09% NaN₃, разделяли на пробы по 50 мкл и окрашивали флуоресцентно меченными моноклональными антителами к молекулам HLA-DR (Сорбент, Россия), CD80 (BioLegend, США), CD83 (Elabscience, КНР) и CD86 (eBioscience, США). Затем клетки отмывали и анализировали на лазерном проточном цитофлуориметре «FacsCalibur» (BD Biosciences, США). ДК гейтировали по профилю прямого и бокового светорассеивания.

При статистическом анализе полученные результаты проверяли на нормальность распределения и, в случае нормального распределения, сравнивали с помощью парного t-теста Стьюдента с поправкой Бонферрони, а в остальных случаях — с помощью теста Вилкоксона с поправкой Бонферрони.

Результаты

В работе использовали VLP из химерных молекул, полученных с помощью экспрессии генетической конструкции SN-RBD в клетках *E. coli*. В эту генетическую конструкцию входили последовательности, кодирующие фрагмент белка VP1 норовируса, который был необходим для сборки частиц, а также фрагмент белка S коронавируса SARS-CoV-2, который включал в себя домен RBD и мотив, связывающий NRP1 (рис. 1А). Клетки-продуценты накапливали рекомбинантный белок в нерастворимом виде в тельцах включения. После выделения телец включения и обработки РНК-азой и ДНК-азой, белки растворяли в денатурирующих условиях, очищали с помощью металл-хелатной хроматографии и удаляли примесь эндотоксинов, как это описано ранее [1]. В результате получали полипептид с молекулярной массой 72 kDa, что соответствует расчетному показателю рекомби-

нантной молекулы (рис. 1Б). Затем проводили ренатурацию полипептидной цепи и получали растворимый химерный белок, который в физиологических условиях спонтанно образовывал полые VLP с формой, близкой к сферической, и размером от 30 до 50 нм (рис. 1В).

Добавление VLP из белка SN-RBD в культуру моноцитарных ДК человека вызывало созревание клеток, которое проявлялось в усилении экспрессии молекул, обеспечивающих презентацию антигенов и ко-стимуляцию Т-лимфоцитов. Цитофлюориметрический анализ показал, что не стимулированные клетки контрольных культур имели типичный фенотип незрелых ДК. Все они экспрессировали молекулу главного комплекса гистосовместимости класса II HLA-DR, $99,0 \pm 0,3\%$ клеток экспрессировало ко-стимулирующую молекулу CD80, и $57,7 \pm 5,7\%$ клеток экспрессировало ко-стимулирующую молекулу CD86. Однако показатели геометрической средней интенсивности

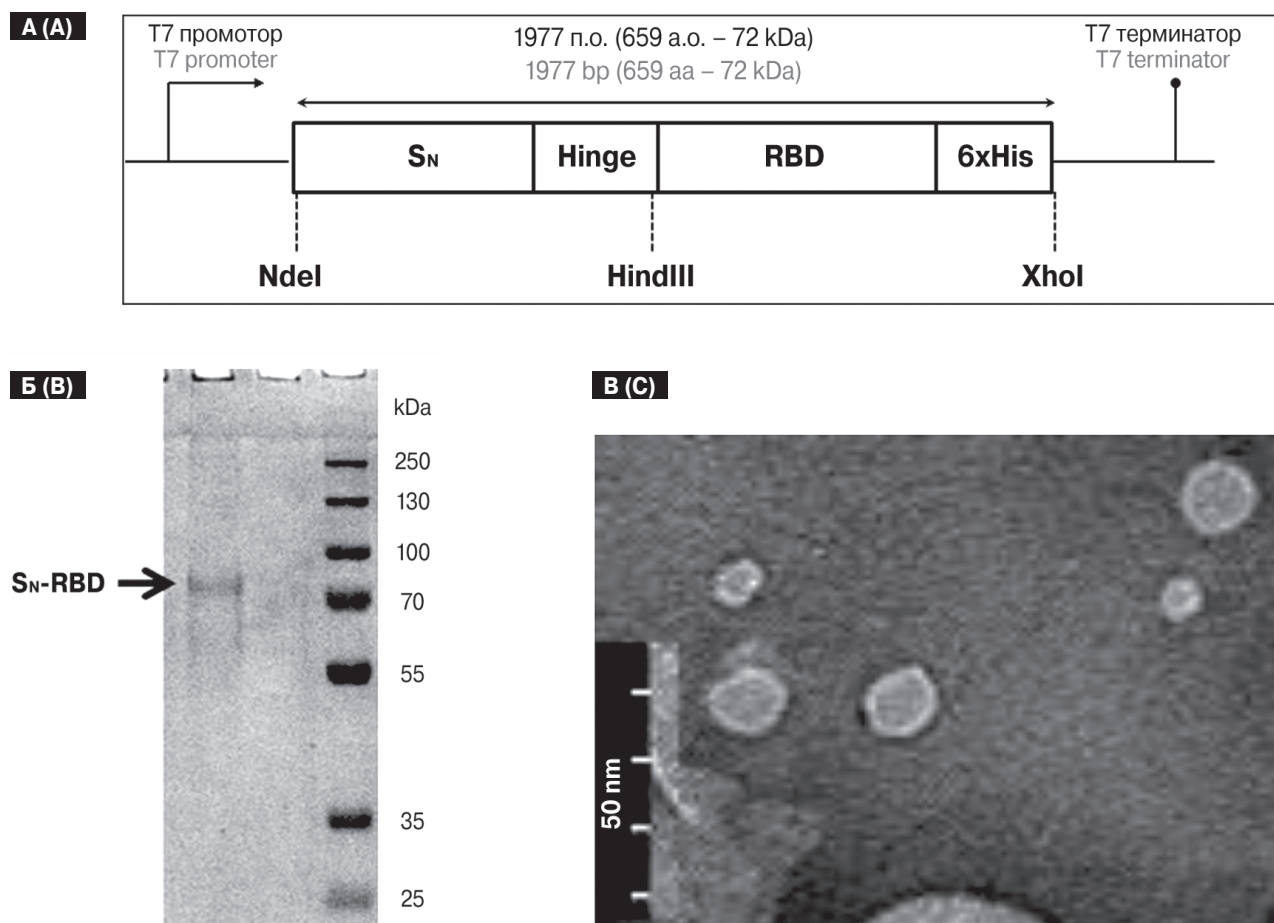


Рисунок 1. Характеристика VLP SN-RBD

Figure 1. Characteristics of SN-RBD VLPs

Примечание. А) Схема генетической конструкции, кодирующей химерный белок SN-RBD. Б) Электрофореграмма очищенного белка SN-RBD. В) Электронно-микроскопические фотографии VLP; увеличение $\times 15\,000$.

Note. A) A scheme of the genetic construct encoding the chimeric protein SN-RBD. B) Electropherogram of purified SN-RBD protein. C) VLPs electron microscopic images; magnification $\times 15\,000$.

флюоресцентной окраски (GMFI) этих молекул на ДК контрольных культур были низкими, что свидетельствует о малой плотности экспрессии молекул на мембране (рис. 2, 3). Кроме того, клетки контрольных культур обладали слабой экспрессией маркера зрелости ДК — молекулы CD83. Эту молекулу экспрессировало лишь $10,1 \pm 2,1\%$ клеток не стимулированного контроля. Контрольный образец, полученный из бактерий, трансформированных вектором без последовательности SN-RBD, не оказывал существенного влияния на фенотип ДК. В то же время инкубация ДК с VLP SN-RBD вызывала значительный рост экспрессии функционально значимых молекул, который проявляется в увеличении доли клеток, несущих молекулы CD83 и CD86, а также в росте показателя GMFI для молекул HLA-DR, CD80 и CD86 (рис. 2, 3). Увеличение экспрессии этих молекул носило дозозависимый характер, и достоверный рост их экспрессии наблюдался при концентрациях VLP 3 и 10 мкг/мл (рис. 3). Следует отметить, что VLP эффективно стимулировали созревание ДК, и фенотипические показатели клеток, обработанных максимальной использованной концентрацией VLP, приближались к показателям зрелых ДК положительного контроля, созревание которых было индуцировано мощной стимуляцией смесью медиаторов воспаления.

Действие VLP на функциональную активность ДК определяли по продукции клетками цитокинов IL-6, TNF α и IL-10. IL-6 продуцируется дендритными клетками в больших коли-

чествах и является полифункциональным цитокином, способным стимулировать как синтез антител, так и клеточные провоспалительные реакции и созревание Т-хелперов 17 типа. TNF α является прототипическим провоспалительным цитокином, тогда как IL-10 подавляет воспаление и способствует развитию гуморального иммунного ответа. Показано, что инкубация ДК с VLP из SN-RBD многократно усиливала продукцию всех оцененных в работе цитокинов, тогда как не содержащий VLP контрольный образец значимого действия на продукцию цитокинов не оказывал (рис. 4). Для достоверного роста продукции TNF α и IL-10 требовалось добавление в культуру ДК максимальной использованной концентрации VLP 10 мкг/мл, тогда как продукция IL-6 значительно увеличивалась уже при концентрации 3 мкг/мл.

Обсуждение

Объединение белков в наноразмерные строго организованные агрегаты может существенно увеличивать их иммуногенность. Такое объединение может осуществляться за счет свойств самих белков, как это наблюдается у белков вирусных капсидов при самосборке VLP. По-видимому, основной причиной роста иммуногенности белков при их объединении в VLP является оптимизация взаимодействия равномерно повторяющихся антигенных эпитопов поверхности частиц с мембранными иммуноглобулинами В-клеток, которые, во-первых,

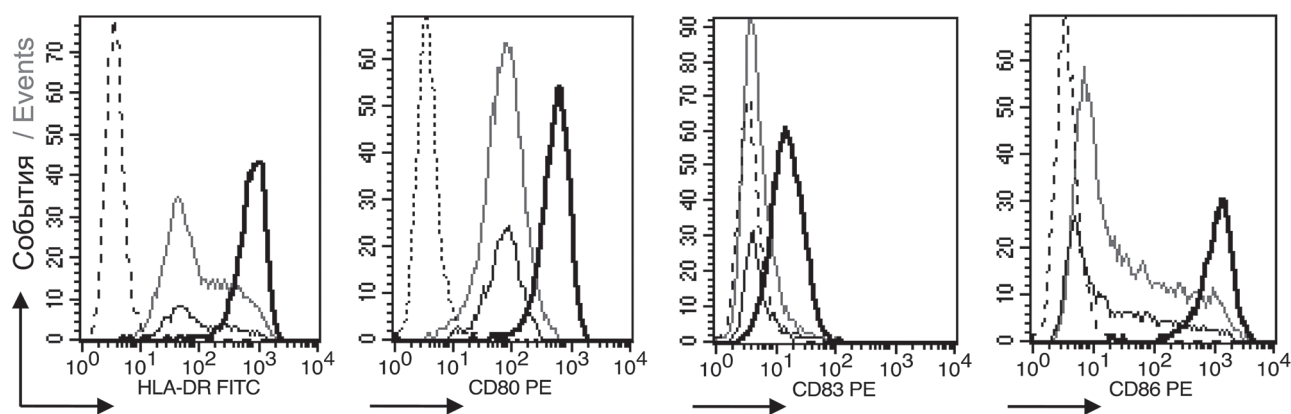


Рисунок 2. Экспрессия мембранных молекул на нестимулированных иДК (тонкая серая линия) и на ДК, инкубированных с 10 мкг/мл VLP SN-RBD (толстая черная линия) или с эквивалентным количеством КО (тонкая черная линия)

Figure 2. Expression of membrane molecules on unstimulated iDCs (thin gray line) and DCs incubated with 10 µg/ml SN-RBD VLPs (thick black line) or equivalent CS amount (thin black line)

Примечание. Пунктирная линия показывает отрицательный контроль окрашивания ДК, инкубированных с VLP. Мембранные молекулы и интенсивность флюоресценции обозначены под осью абсцисс. Представлен результат репрезентативного эксперимента (n = 11).

Note. The dotted line shows DC negative control staining exposed to VLPs. Membrane molecules and fluorescence intensity are indicated below the x-axis. A representative experiment (n = 11) is presented.

являются двухвалентными рецепторами, а вторых, образуют на мембране В-лимфоцита мультимолекулярные кластеры с определенным расстоянием между отдельными рецепторами [3]. Кроме того, свойства поверхности и размер VLP могут способствовать поглощению этих частиц миелоидными антигенпрезентирующими клетками, в частности ДК [2]. Как известно, ДК играют ключевую роль в индукции первичного Т-зависимого иммунного ответа за счет способности обеспечивать мощную стимуляцию Т-лимфоцитов, необходимую для вовлечения наименее зрелых, наивных Т-клеток в иммунный ответ [28]. Жизненный цикл ДК разделен на две фазы. На первой фазе, незрелые ДК, рассеянные по различным тканям организма, собирают доступный антигенный материал. Распознавание типовых молекул микроорганизмов, так называемых патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMP) а также признаков воспаления и по-

вреждения клеток вызывает созревание ДК. При этом ДК усиливают экспрессию молекул главного комплекса гистосовместимости для презентации собранных антигенов, а также некоторых мембранных молекул и цитокинов, необходимых для дополнительной стимуляции Т-лимфоцитов, изменяют набор хемокиновых рецепторов и мигрируют в Т-клеточную зону дренирующего лимфоидного органа, куда из кровотока постоянно поступают наивные Т-клетки в поиске своего первого контакта с антигеном.

В данной работе показано, что VLP, декорированные фрагментом белка S коронавируса SARS-CoV-2, индуцируют фенотипическое и функциональное созревание ДК человека, которое проявляется в значительном росте экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости и молекул ко-стимуляции Т-лимфоцитов, а также в многократном усилении продукции цитокинов с широким спектром

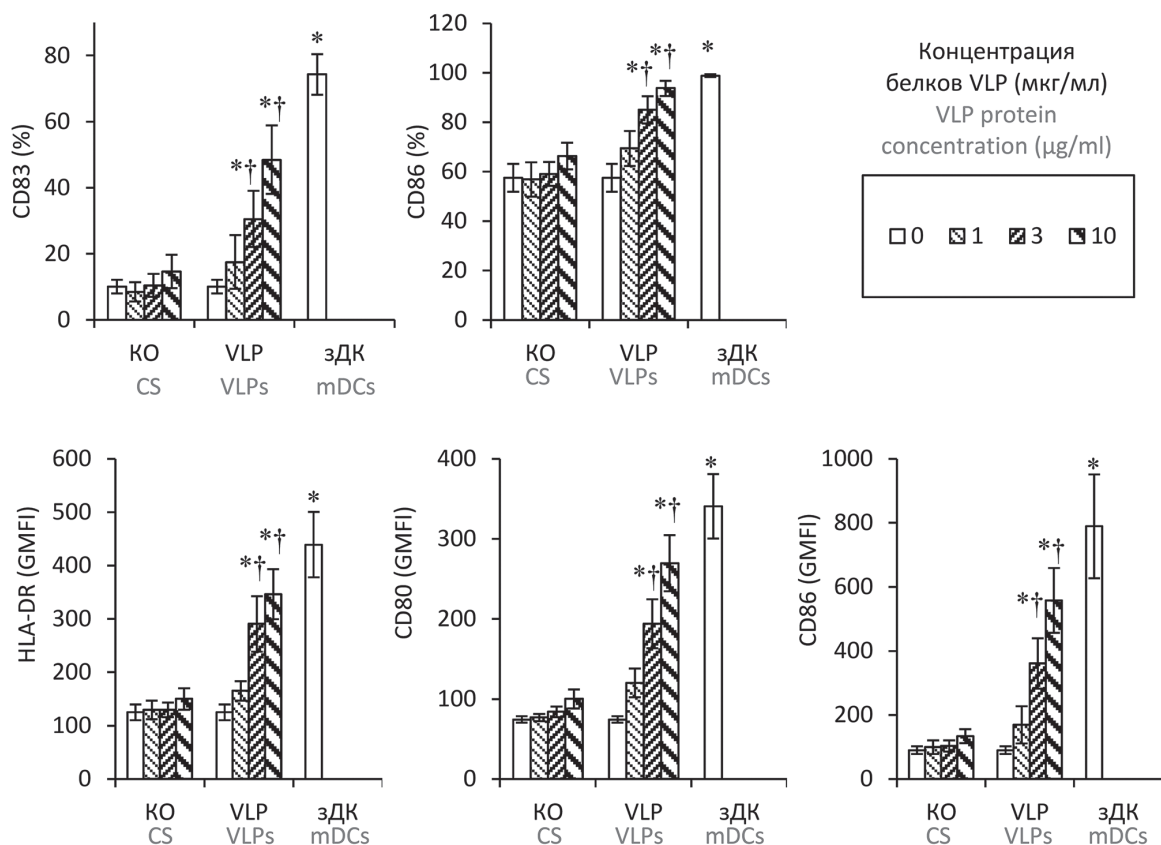


Рисунок 3. Действие VLP SN-RBD на созревание ДК

Figure 3. Effect of SN-RBD VLPs on DC maturation

Примечание. По оси ординат — процент экспрессирующей молекулу клеток или GMFI окрашенной молекулы. Тип стимулятора обозначен под осью абсцисс, концентрация VLP — в легенде. Достоверные отличия ($p < 0,05$ в парном t-тесте с поправкой Бонферрони) при сравнении с нестимулированными ДК (*) и ДК с КО (†). Данные представлены как $M \pm m$ ($n = 11$).

Note. The y-axis: percentage of cells expressing the molecule or the GMFI for stained molecule. The type of stimulant is indicated under the x-axis, the VLP concentration is indicated in the legend. Significant differences ($p < 0.05$ in paired t-test with Bonferroni correction) compared to unstimulated DCs (*) and CS-treated DCs (†). Data are presented as $M \pm m$ ($n = 11$).

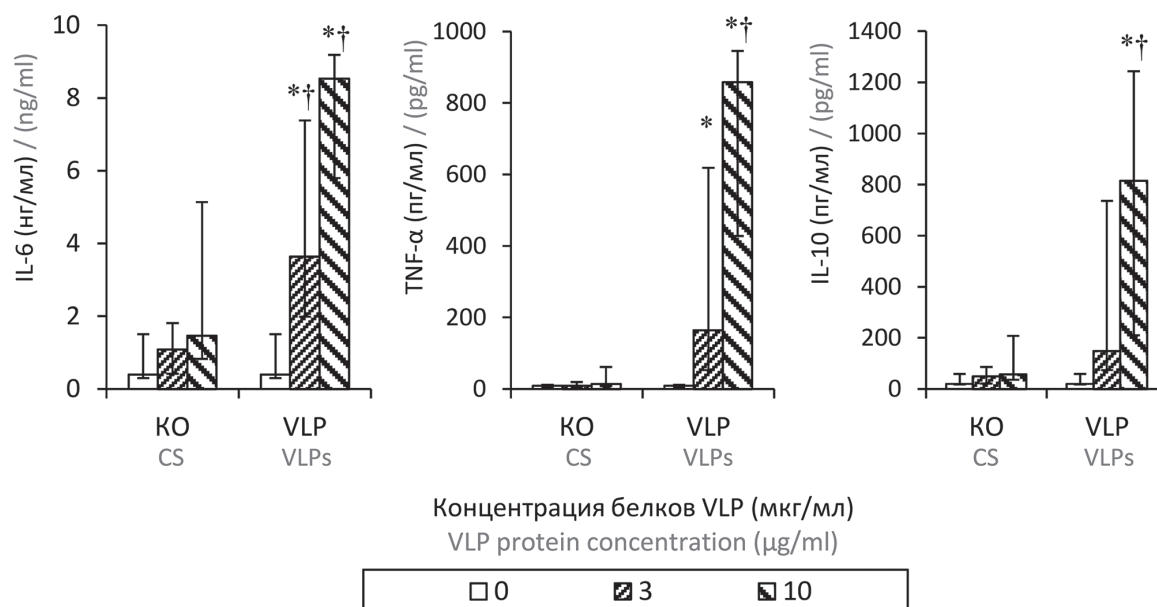


Рисунок 4. Действие VLP SN-RBD на продукцию цитокинов в культурах ДК

Figure 4. Effect of SN-RBD VLPs on cytokine production in DC cultures

Примечание. Тип стимулятора — под осью абсцисс, концентрации цитокинов — по оси ординат, концентрация VLP — в легенде. Достоверные отличия ($p < 0,05$; критерий Вилкоксона с поправкой Бонферрони) при сравнении с нестимулированными ДК (*) и ДК с КО (†). Данные представлены как Медиана \pm квартиль ($n = 11$).

Note. The type of stimulant is under the x-axis, cytokine concentrations are shown on the y-axis, VLP concentration shown in the legend. Significant differences ($p < 0.05$; Wilcoxon test with Bonferroni correction) when compared with unstimulated DCs (*) and DCs cultured with CS (†). Data are presented as Median \pm quartile ($n = 11$).

функций. VLP в максимальной использованной концентрации действуют на ДК очень эффективно и вызывают фенотипические изменения, близкие к показателям зрелых ДК положительного контроля. Столь выраженная стимуляция свидетельствует об успешном распознавании дендритными клетками частиц, покрытых антигенами коронавируса. Ранее было показано, что растворимый белок S и, особенно, его фрагмент RBD вызывают фенотипическое созревание моноцитарных ДК человека, а RBD, к тому же, стимулирует продукцию этими клетками провоспалительных IL-1 β , TNF α и IL-6 [5]. Механизм распознавания белка S или RBD дендритными клетками достоверно не определен, и при его обсуждении вполне ожидаемо высказываются предположения о роли ACE2, который служит коронавирусу в качестве рецептора, критически необходимого для заражения клеток. ACE2 отсутствует на циркулирующих моноцитах и ДК, но сильно экспрессируется на тканевых макрофагах [27]. Полученные *in vitro* моноцитарные ДК слабо экспрессируют ACE2, и доля клеток, несущих этот белок невелика и составляет в среднем 14% от всех незрелых ДК [5]. Следует отметить, что доля ДК, отвечающих на растворимый RBD в предшествующем исследовании [5] или на VLP в данной работе значительно превышает 14%, что может

свидетельствовать либо о непрямом действии на популяцию ДК через отдельные ACE2⁺ клетки, либо о наличии иных механизмов рецепции белка S дендритными клетками. Как известно, основными рецепторами, активирующими созревание ДК, являются PAMP-распознающие Толл-подобные рецепторы (TLR). В связи с этим особый интерес представляют исследования *in silico*, предсказывающие возможность распознавания белка S с помощью TLR4 [9]. Кроме того, расчеты *in silico* предсказывают, что RBD может связываться с высокой аффинностью с множеством других мембранных рецепторов различных групп ДК, включая CD26, CD2, CD56, CD7, CCR9, CD150, CD4, CD50/ICAM3 и XCR1 [19]. Также можно предположить, что ДК при взаимодействии с VLP могут распознавать NRP1-связывающий мотив коронавирусного белка S. Рецептор NRP1 обладает широким профилем экспрессии, необычайным разнообразием функций и множеством лигандов, отвечающих «правилу С-конца» (CendR: С-концевая последовательность Arg/LisXXArg/Lis, где X — любой а.о.) [35]. В состав его лигандов входят изоформа фактора роста эндотелия сосудов VEGF-A165, трансформирующий фактор роста β , семафорин 3А и множество продуктов частичного ферментативного расщепления белков, включая субъединицу S1 коронавируса [7,

11, 31]. NRP1 под названием BDCA4 известен как маркер плазмацитоидных ДК, он отсутствует на моноцитах, но сильно экспрессируется на всех ДК, полученных из моноцитов *in vitro* [6, 10, 32]. NRP1 на ДК работает как классический рецептор комплемента, обеспечивая взаимодействие этих клеток с объектами, «помеченными» факторами C4d, C3d и iC3b [6]. Кроме того, NRP1 стимулирует миграцию ДК, влияя через плексин-A1 на цитоскелет клеток и увеличивая их пластичность [10]. С высокой вероятностью можно предположить, что ДК используют NRP1 для эндоцитоза белков и пептидов, отвечающих правилу CendR. По крайней мере, опухолевые клетки поглощают такие лиганды посредством NRP1-зависимого эндоцитозного процесса, напоминающего макропиноцитоз [21].

Таким образом можно предположить, что RBD, представленный на VLP, имеет возможность взаимодействовать как с ACE2, так и с мно-

жеством других мембранных молекул ДК, для части которых показана способность передачи активационного сигнала внутрь клетки. Также можно предположить, что NRP1-связывающий мотив после частичного расщепления последовательности белка S может увеличивать эффективность поглощения частиц, а также влиять на миграцию ДК.

Заключение

Показано, что химерные норовирусные VLP, декорированные RBD-содержащим фрагментом белка S коронавируса SARS-CoV-2, эффективно индуцируют фенотипическое и функциональное созревание ДК. По нашему мнению, полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования химерных норовирусных VLP для экспонирования белка S коронавируса SARS-CoV-2.

Список литературы/References

- Новиков Д.В., Мелентьев Д.А., Мохонов В.В., Кашников А.Ю., Новикова Н.А., Лапин В.А., Мохонова Е.В., Новиков В.В. Получение вирусоподобных частиц норовируса (Caliciviridae: Norovirus), содержащих белок VP1 энтеровируса Echovirus 30 (Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B) // Вопросы вирусологии. 2021. Т. 66, № 5. С. 383–389. [Novikov D.V., Melentev D.A., Mokhonov V.V., Kashnikov A.Y., Novikova N.A., Lapin V.A., Mokhonova E.V., Novikov V.V. Construction of norovirus (Caliciviridae: Norovirus) virus-like particles containing VP1 of the Echovirus 30 (Picornaviridae: Enterovirus: Enterovirus B). *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2021, vol. 66, no. 5, pp. 383–389. (In Russ.)] doi: 10.36233/0507-4088-79
- Талаев В.Ю., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н., Светлова М.В., Воронина Е.В. Пути эндоцитоза вирусоподобных частиц и презентация поглощенных антигенов // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 2. С. 219–233. [Talayev V.Yu., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N., Svetlova M.V., Voronina E.V. Virus-like particle endocytosis pathways and presentation of captured antigens. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 2, pp. 219–233. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-VPE-8045
- Талаев В.Ю., Светлова М.В., Заиченко И.Е., Бабайкина О.Н., Воронина Е.В., Чистяков С.И. Взаимодействие В-клеточных рецепторов и антигенов с различным пространственным расположением // Инфекция и иммунитет. 2023. Т. 13, № 5. С. 809–821. [Talayev V.Yu., Svetlova M.V., Zaichenko I.Ye., Babaykina O.N., Voronina E.V., Chistyakov S.I. Interaction of B-cell receptors and antigens with different spatial arrangement. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, vol. 13, no. 5, pp. 809–821. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-EOB-14033
- Baric R.S., Yount B., Lindesmith L., Harrington P.R., Greene S.R., Tseng F.C., Davis N., Johnston R.E., Klapper D.G., Moe C.L. Expression and self-assembly of Norwalk virus capsid protein from venezuelan equine encephalitis virus replicons. *J. Virol.*, 2002, vol. 76, no. 6, pp. 3023–3030. doi: 10.1128/jvi.76.6.3023-3030.2002
- Barreda D., Santiago C., Rodríguez J.R., Rodríguez J.F., Casasnovas J.M., Mérida I., Ávila-Flores A. SARS-CoV-2 Spike Protein and Its Receptor Binding Domain Promote a Proinflammatory Activation Profile on Human Dendritic Cells. *Cells*, 2021, vol. 10, no. 12: 3279. doi: 10.3390/cells10123279
- Battin C., De Sousa Linhares A., Paster W., Isenman D.E., Wahrman M., Leitner J., Zlabinger G.J., Steinberger P., Hofer J. Neuropilin-1 Acts as a Receptor for Complement Split Products. *Front. Immunol.*, 2019, vol. 10: 2209. doi: 10.3389/fimmu.2019.02209
- Cantuti-Castelvetri L., Ojha R., Pedro L.D., Djannatian M., Franz J., Kuivanen S., van der Meer F., Kallio K., Kaya T., Anastasina M., Smura T., Levanov L., Szivoczka L., Tobi A., Kallio-Kokko H., Österlund P., Joensuu M., Meunier F.A., Butcher S.J., Winkler M.S., Mollenhauer B., Helenius A., Gokce O., Teesalu T., Hepojoki J., Vapalahti O., Stadelmann C., Balistreri G., Simons M. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science*, 2020, vol. 370, no. 6518, pp. 856–860. doi: 10.1126/science.abd2985
- Chen R., Neill J.D., Noel J.S., Hutson A.M., Glass R.I., Estes M.K., Prasad B.V. Inter- and intragenus structural variations in caliciviruses and their functional implications. *J. Virol.*, 2004, vol. 78, no. 12, pp. 6469–6479. doi: 10.1128/JVI.78.12.6469-6479.2004
- Choudhury A., Mukherjee S. In silico studies on the comparative characterization of the interactions of SARS-CoV-2 spike glycoprotein with ACE-2 receptor homologs and human TLRs. *J. Med. Virol.*, 2020, vol. 92, no. 10, pp. 2105–2113. doi: 10.1002/jmv.25987
- Curreli S., Wong B.S., Latinovic O., Konstantopoulos K., Stamatou N.M. Class 3 semaphorins induce F-actin reorganization in human dendritic cells: Role in cell migration. *J. Leukoc. Biol.*, 2016, vol. 100, no. 6, pp. 1323–1334. doi: 10.1189/jlb.2A1114-534R

11. Daly J.L., Simonetti B., Klein K., Chen K.E., Williamson M.K., Antón-Plágaro C., Shoemark D.K., Simón-Gracia L., Bauer M., Hollandi R., Greber U.F., Horvath P., Sessions R.B., Helenius A., Hiscox J.A., Teesalu T., Matthews D.A., Davidson A.D., Collins B.M., Cullen P.J., Yamauchi Y. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science*, 2020, vol. 370, no. 6518, pp. 861–865. doi: 10.1126/science.abd3072
12. Hardy M.E. Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2005, vol. 253, no. 1, pp. 1–8. doi: 10.1016/j.femsle.2005.08.031
13. Herbst-Kralovetz M., Mason H.S., Chen Q. Norwalk virus-like particles as vaccines. *Expert Rev. Vaccines*, 2010, vol. 9, no. 3, pp. 299–307. doi: 10.1586/erv.09.163
14. Jiang X., Wang M., Graham D.Y., Estes M.K. Expression, self-assembly, and antigenicity of the Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.*, 1992, vol. 66, no. 11, pp. 6527–6532. doi: 10.1128/JVI.66.11.6527-6532.1992
15. Letko M., Marzi A., Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat. Microbiol.*, 2020, vol. 5, no. 4, pp. 562–569. doi: 10.1038/s41564-020-0688-y
16. Li F. Receptor recognition mechanisms of coronaviruses: a decade of structural studies. *J. Virol.*, 2015, vol. 89, no. 4, pp. 1954–1964. doi: 10.1128/JVI.02615-14
17. Logunov D.Y., Dolzhenkova I.V., Shcheblyakov D.V., Tikhvatulin A.I., Zubkova O.V., Dzharullaeva A.S., Kovyreshina A.V., Lubenets N.L., Grousova D.M., Erokhova A.S., Botikov A.G., Izhaeva F.M., Popova O., Ozharovskaya T.A., Esmagambetov I.B., Favorskaya I.A., Zrelkin D.I., Voronina D.V., Shcherbinin D.N., Semikhin A.S., Simakova Y.V., Tokarskaya E.A., Egorova D.A., Shmarov M.M., Nikitenko N.A., Gushchin V.A., Smolyarchuk E.A., Zyryanov S.K., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Gam-COVID-Vac Vaccine Trial Group. Safety and efficacy of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine: an interim analysis of a randomised controlled phase 3 trial in Russia. *Lancet*, 2021, vol. 397, no. 10275, pp. 671–681. doi: 10.1016/S0140-6736(21)00234-8
18. Malik Y.A. Properties of Coronavirus and SARS-CoV-2. *Malays. J. Pathol.*, 2020, vol. 42, no. 1, pp. 3–11.
19. Mobini S., Chizari M., Mafakher L., Rismani E., Rismani E. Structure-based study of immune receptors as eligible binding targets of coronavirus SARS-CoV-2 spike protein. *J. Mol. Graph. Model.*, 2021, vol. 108: 107997. doi: 10.1016/j.jmgm.2021.107997
20. Mohsen M.O., Gomes A.C., Vogel M., Bachmann M.F. Interaction of viral capsid-derived virus-like particles (VLPs) with the innate immune system. *Vaccines*, 2018, vol. 6, no 3, pp. 37. doi: 10.3390/vaccines6030037
21. Pang H.B., Braun G.B., Friman T., Aza-Blanc P., Ruidiaz M.E., Sugahara K.N., Teesalu T., Ruoslahti E. An endocytosis pathway initiated through neuropilin-1 and regulated by nutrient availability. *Nat. Commun.*, 2014, vol. 5: 4904. doi: 10.1038/ncomms5904
22. Prasad B.V., Hardy M.E., Dokland T., Bella J., Rossmann M.G., Estes M.K. X-ray crystallographic structure of the Norwalk virus capsid. *Science*, 1999, vol. 286, pp. 287–290. doi: 10.1126/science.286.5438.287
23. Prasad B.V., Rothnagel R., Jiang X., Estes M.K. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, pp. 5117–5125. doi: 10.1128/jvi.68.8.5117-5125.1994
24. Rando H.M., Lordan R., Lee A.J., Naik A., Wellhausen N., Sell E., Kolla L., COVID-19 Review Consortium, Gitter A., Greene C.S. Application of Traditional Vaccine Development Strategies to SARS-CoV-2. *mSystems*, 2023, vol. 8, no. 2: e0092722. doi: 10.1128/msystems.00927-22
25. Sallusto F., Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.*, 1994, vol. 179, pp. 1109–1118. doi: 10.1084/jem.179.4.1109
26. Santi L., Batchelor L., Huang Z., Hjelm B., Kilbourne J., Arntzen C.J., Chen Q., Mason H.S. An efficient plant viral expression system generating orally immunogenic Norwalk virus-like particles. *Vaccine*, 2008, vol. 26, no. 15, pp. 1846–1854. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.01.053
27. Song X., Hu W., Yu H., Zhao L., Zhao Y., Zhao X., Xue H.H., Zhao Y. Little to no expression of angiotensin-converting enzyme-2 on most human peripheral blood immune cells but highly expressed on tissue macrophages. *Cytometry A*, 2023, vol. 103, no. 2, pp. 136–145. doi: 10.1002/cyto.a.24285
28. Steinman R.M. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991, vol. 9, pp. 271–296. doi: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001415
29. Talayev V., Zaichenko I., Svetlova M., Matveichev A., Babaykina O., Voronina E., Mironov A. Low-dose influenza vaccine Grippol Quadrivalent with adjuvant Polyoxidonium induces a T helper-2 mediated humoral immune response and increases NK cell activity. *Vaccine*, 2020, vol. 38, no. 42, pp. 6645–6655. doi: 10.1016/j.vaccine.2020.07.053
30. Tan M., Jiang X. The p-domain of norovirus capsid protein forms a subviral particle that binds to histo-blood group antigen receptors. *J. Virol.*, 2005, vol. 79, pp. 14017–14030. doi: 10.1128/JVI.79.22.14017-14030.2005
31. Teesalu T., Sugahara K.N., Kotamraju V.R., Ruoslahti E. C-end rule peptides mediate neuropilin-1-dependent cell, vascular, and tissue penetration. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 38, pp. 16157–16162. doi: 10.1073/pnas.0908201106
32. Tordjman R., Lepelletier Y., Lemarchandel V., Cambot M., Gaulard P., Hermine O., Roméo P.H. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat. Immunol.*, 2002, vol. 3, no. 5, pp. 477–482. doi: 10.1038/ni789
33. Tortorici M.A., Vesler D. Structural insights into coronavirus entry. *Adv. Virus. Res.*, 2019, vol. 105, pp. 93–116. doi: 10.1016/bs.aivir.2019.08.002
34. Tulimilli S.V., Dallavalasa S., Basavaraju C.G., Kumar Rao V., Chikkahonnaiah P., Madhunapantula S.V., Veeranna R.P. Variants of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and Vaccine Effectiveness. *Vaccines (Basel)*, 2022, vol. 10, no. 10: 1751. doi: 10.3390/vaccines10101751
35. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Vesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, 2020, vol. 181, no. 2, pp. 281–292.e6. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.058
36. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., Meng J., Zhu Z., Zhang Z., Wang J., Sheng J., Quan L., Xia Z., Tan W., Cheng G., Jiang T. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*, 2020, vol. 27, no. 3, pp. 325–328. doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001

37. Yan R., Zhang Y., Li Y., Xia L., Guo Y., Zhou Q. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. *Science*, 2020, vol. 367, no. 6485, pp. 1444–1448. doi: 10.1126/science.abb2762
38. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., Chen H.D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.D., Liu M.Q., Chen Y., Shen X.R., Wang X., Zheng X.S., Zhao K., Chen Q.J., Deng F., Liu L.L., Yan B., Zhan F.X., Wang Y.Y., Xiao G.F., Shi Z.L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 2020, vol. 579, no. 7798, pp. 270–273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7

Авторы:

Талаев В.Ю., д.м.н., профессор, зав. лабораторией клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Новиков Д.В., к.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Заиченко И.Е., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Светлова М.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Воронина Е.В., к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Бабайкина О.Н., к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунологии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Лапин В.А., младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Мелентьев Д.А., младший научный сотрудник лаборатории иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Новикова Н.А., д.б.н., профессор, зав. лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Кашников А.Ю., научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия;

Новиков В.В., д.б.н., профессор, зав. лабораторией иммунохимии ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия.

Authors:

Talayev V.Yu., DSc (Medicine), Professor, Head of the Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Novikov D.V., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Zaichenko I.Ye., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Svetlova M.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Voronina E.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Babaykina O.N., PhD (Medicine), Senior Researcher, Laboratory of Cellular Immunology, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Lapin V.A., Junior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Melentiev D.A., Junior Researcher, Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Novikova N.A., DSc (Biology), Professor, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Kashnikov A.Yu., Researcher, Laboratory of Molecular Epidemiology of Viral Infections, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation;

Novikov V.V., DSc (Biology), Professor, Head of the Laboratory of Immunochemistry, Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation.