

УДК 57.088.2

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-2-107-118>

EDN QVQVOC



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Получение и анализ физико-химических и антигенных свойств рекомбинантного белка гемагглютинаина вируса свиного гриппа А/Н1N1

Е.Д. Авдонина¹, К.А. Первойкина¹, Л.В. Верховская¹, Д.Н. Щербинин¹, Н.Ю. Вискова¹, И.С. Кружкова^{1,2}, М.А. Ильина², Л.В. Кудрявцева², Л.В. Колобухина^{1,2}, М.М. Шмаров¹, Н.А. Антипят², А.Л. Гинцбург¹, И.Н. Тюрин²

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

² Инфекционная клиническая больница № 1, Департамент здравоохранения города Москвы, Москва, 123098 Россия

 Автор для переписки, e-mail: avdonina.yelena@mail.ru

Аннотация

Цели. Анализ физико-химических и антигенных свойств рекомбинантного белка гемагглютинаина вируса свиного гриппа штамма А/Н1N1 — swH1-His — полученного путем трансдукции суспензионной линии HEK293 рекомбинантным аденовирусом человека 5-го серотипа.

Методы. Сборку целевого гена гемагглютинаина *de novo* проводили методом полимеразной цепной реакции. Рекомбинантный аденовирус recAd5-swH1-His получали с помощью набора AdEasy™ Adenoviral Vector System, накопление препаративных количеств рекомбинантного белка проводили методом трансдукции recAd5-swH1-His суспензионной культуры клеток HEK293 в биореакторе волнового типа. Методом металл-хелатной аффинной очистки на сорбенте выделили рекомбинантный гемагглютинин из культуральной среды. Методами электрофореза и вестерн-блота определили его молекулярную массу, показали ее соответствие ожидаемой, а также наличие гистидиновых остатков. Методом непрямого иммуноферментного анализа со специфическими сыворотками установили антигенную специфичность swH1-His.

Результаты. В ходе работы получили рекомбинантный гемагглютинин swH1-His в количестве 1.2 мг из 50 мл культуральной жидкости, доказали соответствие его массы заявленной молекулярной массе (≈ 70 кДа) и наличие сшивки с гистидиновыми остатками, а также показали антигенную специфичность swH1-His в реакции с сыворотками.

Выводы. Определены физико-химическая и антигенная характеристики рекомбинантного белка гемагглютинаина свиного гриппа А/Н1N1 (swH1-His), полученного трансдукцией клеток HEK293 рекомбинантным аденовирусом человека 5-го серотипа. В дальнейшем полученный рекомбинантный гемагглютинин может быть использован как антиген для диагностики гриппа животных и человека.

Ключевые слова

рекомбинантный белок, рекомбинантный вирус человека 5-го серотипа, выделение рекомбинантного белка, антигенная специфичность, иммуноферментный анализ

Поступила: 15.08.2024
Доработана: 18.12.2024
Принята в печать: 18.02.2025

Для цитирования

Авдонина Е.Д., Первойкина К.А., Верховская Л.В., Щербинин Д.Н., Вискова Н.Ю., Кружкова И.С., Ильина М.А., Кудрявцева Л.В., Колобухина Л.В., Шмаров М.М., Антипят Н.А., Гинцбург А.Л., Тюрин И.Н. Получение и анализ физико-химических и антигенных свойств рекомбинантного белка геммагглютинаина вируса свиного гриппа А/Н1N1. *Тонкие химические технологии*. 2025;20(2): 107–118. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-2-107-118>

RESEARCH ARTICLE

Production of the recombinant hemagglutinin protein of the swine influenza virus A/H1N1 and analysis of its physicochemical and antigenic properties

Elena D. Avdonina¹, Kristina A. Pervoykina¹, Ludmila V. Verkhovskaya¹, Dmitriy N. Shcherbinin¹, Natalia Yu. Viskova¹, Irina S. Kruzhkova^{1,2}, Maria A. Ilina², Larisa V. Kudriavtseva², Lyudmila V. Kolobukhina^{1,2}, Maksim M. Shmarov¹, Natalya A. Antipyat², Alexander L. Gintsburg¹, Igor N. Tyurin²

¹ The Gamaleya National Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

² Infectious Disease Clinical Hospital No. 1, Moscow City Health Department, Moscow, 125367 Russia

 Corresponding author, e-mail: avdonina.yelena@mail.ru

Abstract

Objectives. To analyze the physicochemical and antigenic properties of recombinant hemagglutinin protein of swine influenza virus strain A/H1N1 (swH1-His) obtained by transduction of suspension line HEK293 with recombinant human adenovirus serotype 5.

Methods. The *de novo* assembly of the target hemagglutinin gene was performed via the polymerase chain reaction. Recombinant adenovirus recAd5-swH1-His was obtained using the AdEasy™ Adenoviral Vector System kit. Accumulation of preparative amounts of recombinant protein was performed by transduction of recAd5-swH1-His suspension culture of HEK293 cells in a wave-type bioreactor. Recombinant hemagglutinin was isolated from the culture medium by metal-chelate affinity purification on a sorbent. The actual molecular mass and its correspondence to the expected value, as well as the presence of histidine residues were shown by electrophoresis and Western blot. The antigenic specificity of swH1-His was determined by indirect enzyme-linked immunosorbent assay with specific sera.

Results. Recombinant hemagglutinin swH1-His was obtained in the amount of 1.2 mg from 50 mL of culture fluid. The compliance of its mass with the declared molecular mass (≈ 70 kDa) was confirmed along with the presence of cross-linking with histidine residues. The antigenic specificity of swH1-His in reaction with sera was demonstrated.

Conclusions. The physicochemical and antigenic characteristics of recombinant protein hemagglutinin of swine influenza A/H1N1 (swH1-His) obtained by transduction of HEK293 cells with recombinant human adenovirus of serotype 5 were determined. The obtained recombinant hemagglutinin can be used as an antigen for animal and human influenza diagnostic purposes.

Keywords

recombinant protein, recombinant human serotype 5 virus, purification of recombinant protein, antigenic specificity, enzyme-linked immunosorbent assay

Submitted: 15.08.2024

Revised: 18.12.2024

Accepted: 18.02.2025

For citation

Avdonina E.D., Pervoykina K.A., Verkhovskaya L.V., Shcherbinin D.N., Viskova N.Yu., Kruzhkova I.S., Ilina M.A., Kudriavtseva L.V., Kolobukhina L.V., Shmarov M.M., Antipyat N.A., Gintsburg A.L., Tyurin I.N. Production of the recombinant hemagglutinin protein of the swine influenza virus A/H1N1 and analysis of its physicochemical and antigenic properties. *Tonk. Khim. Tekhnol.* = *Fine Chem. Technol.* 2025;20(2):107–118. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-2-107-118>

ВВЕДЕНИЕ

Грипп — острое респираторное инфекционное заболевание, циркулирующее среди населения повсеместно, с сезонными подъемами заболеваемости. Высокая контагиозность и значительная склонность к мутациям позволяют вирусу гриппа достаточно быстро адаптироваться к сформированному классическими сезонными вакцинами иммунитету [1]. Поэтому актуальной остается разработка вакцин широкого спектра действия против гриппа, направленных на формирование иммунного ответа на консервативные (низковариабельные) последовательности белков вируса гриппа [2–5]. В России такие вакцины активно разрабатываются [6, 7].

Для оценки эффективности вакцинации важным аспектом является разработка тест-систем для определения титров антител у иммунизированных людей. С такой задачей хорошо справляются тест-системы, основанные на иммуноферментном анализе (ИФА). Неотъемлемым их параметром является наличие антигена, отвечающего таким критериям, как доступность получения и очистки, а также соответствие антигенных свойств нативному белку.

Для получения рекомбинантных белков в настоящее время существует несколько различных систем экспрессии. Как правило, выбор продуцентов для получения рекомбинантного белка зависит от конкретных задач. Чаще всего — это получение достаточного количества белка максимально похожего по структуре на свою природную форму. Гликозилирование белка оказывает значительное влияние на физические (укладка, растворимость, молекулярная масса и т.п.) и биологические (биодоступность, иммуногенность) свойства получаемого белка [8], поэтому фактор соответствия профиля гликозилирования синтезируемого рекомбинантного белка нативному зачастую становится ключевым.

Наиболее оптимальной системой экспрессии для получения сложных эукариотических рекомбинантных белков являются клетки млекопитающих. Близкие к естественным условия экспрессии позволяют получить белки с определенной степенью гликозилирования, сильно приближенной к нативной форме [9]. Такой подход оптимален для научно-исследовательских задач, где доступность и быстрота получения должна сочетаться с максимально природной формой рекомбинантного белка.

Среди клеток млекопитающих в качестве продуцентов выделяют две широко используемые

линии клеток — клеточная линия, полученная из эмбриональных почек человека (human embryonic kidney (HEK) 293 cells, HEK293) и клетки яичника китайского хомяка (Chinese hamster ovary (CHO) cells). Последний вариант хоть и дает высокий выход рекомбинантного белка (3–8 г/л) со сложным гликозилированием, но чаще всего связан с долгой и трудоемкой работой для выведения стабильной линии-продуцента. В экспериментальной лаборатории предпочтительнее получать белок методом временной трансфекции, где культура CHO уступает клеткам HEK по сложности постановки трансфекции и уровню наработки рекомбинантного белка [8]. Также клетки HEK293 примечательны отсутствием онкогенного потенциала и низкой иммуногенностью продуцируемых рекомбинантных белков ввиду отсутствия в их структуре модификаций, нехарактерных для человека [10]. Несомненным преимуществом обладает вариант этой линии в виде суспензии. Адаптированная к бессывороточной среде суспензия оптимальна для масштабирования процесса и получения рекомбинантного продукта без излишней белковой нагрузки (например, альбуминов), которую вносит сыворотка, используемая при выращивании адгезионных HEK293.

Повсеместно HEK293 используется для получения вирусных векторов. Благодаря присутствию аденовирусных генов E1A/B, ответственных за вспомогательные функции, в культуре клеток HEK293 получают аденовирусные и аденоассоциированные вирусные вектора, в частности — аденовирус человека 5-го серотипа (Ad5) [10].

Получение рекомбинантных белков *in vitro* через трансдукцию аденовирусным вектором человека Ad5 культуры клеток в настоящее время применяется редко, тем не менее, этот подход имеет значительный потенциал. В совокупности с достоинствами суспензионной линии HEK293 такой тандем способен обеспечить эффективную продукцию рекомбинантного белка, требующего минимальных экономических затрат и усилий по очистке.

В данной работе нами впервые был получен рекомбинантный аденовирус (recAd5), экспрессирующий ген гемагглютинаина свиного гриппа типа А штамма H1N1 (swH1-His) в линии клеток HEK293. Экспрессированный в культуральную среду рекомбинантный белок был аффинно очищен на сорбенте и охарактеризованы его физико-химические и антигенные свойства.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Создание *de novo* гена гемагглютинаина свиного гриппа swH1-His

Сборку гена *de novo* проводили блочным методом, как описано Lei Young и Qihan Dong [11]. Для сборки гена были подобраны олигонуклеотиды — последовательно идущие прямые и обратные праймеры длиной по 65 нуклеотидов (см. табл. 1). Праймеры были синтезированы в компании *Евроген* (Россия). В работе использовали маркер молекулярного веса ДНК GeneRuler SM0311 (*Thermo Fisher Scientific*, США).

На первом этапе в полимеразную цепную реакцию (ПЦР) брали по 4 праймера и объединяли их в блоки по 200 пар оснований (п.о.). На одну реакцию количество внесенных внешних праймеров составляло 10 пмоль и внутренних — 0.01 пмоль. Использовали ДНК-полимеразу Pfu (*ELK Biotechnology*, Китай), отжиг праймеров производили при 55°C. Ампликоны детектировали методом горизонтального электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле (*Thermo Fisher Scientific*, США), фрагменты вырезали из геля и очищали на одной колонке Cleanup mini (*Евроген*, Россия). Далее проводили ПЦР с перекрывающимся расширением (overlap extension polymerase chain reaction, OE-PCR) с использованием 100 нг очищенных ампликонов и полимеразы Pfu. На третьем этапе, проводили стандартную ПЦР с праймерами *swH1-His_out-F* (5'-CGAGCCTAAGCTTCTAGATAAGATGCCGCCACCATGCTTGGACCCTGTATGCTGC-3') и *swH1-His_out-R* (5'-TATCTAGATCCGGTGGATCGGATTCATTAGTGTATGATGGTGTATGGTGTATGG-3').

Полученный ген swH1-His (полная последовательность приведена в табл. 2) клонировали методом простой линейной итеративной кластеризации (simple linear iterative clustering, SLIC) в челночную плазмиду pShuttle-CMV, гидролизованную по сайту Eco32I из набора AdEasy™ Adenoviral Vector System (*Stratagene*, США), с получением плазмиды pShuttle-swH1-His.

Получение *resAd5*, экспрессирующего ген гемагглютинаина свиного гриппа типа А штамма H1N1 (swH1-His)

Для трансфекции использовали реактив Lipofectamine® 2000 Reagent (*Thermo Fisher Scientific*, США) в соответствии с протоколом. После трансфекции собирали клетки и проводили три цикла замораживания-оттаивания для получения вирусного стока. Титр полученного рекомбинантного вируса *resAd5-swH1-His* определяли в реакции бляшкообразования на адгезионной культуре клеток НЕК293 с конфлюентностью 70%. В течение 4 дней наблюдали цитопатическое действие (ЦПД), вызванное *resAd5-swH1-His*.

Для анализа факта наличия последовательностей в составе генома *resAd5-swH1-His* выделяли ДНК и ставили ПЦР с детекцией продуктов методом электрофореза в агарозном геле. Последовательности праймеров для каждой последовательности представлены в табл. 3.

Получение препаративных количеств белка swH1-His в культуральной жидкости

Для накопления препаративного количества рекомбинантного гемагглютинаина суспензионную клеточную линию НЕК293 трансдуцировали вирусом *resAd5-swH1-His*.

Адгезионную и суспензионную клеточные культуры эмбриональной почки человека НЕК293 получили из Коллекции клеточных культур лаборатории культур тканей подразделения Института вирусологии им. Д.И. Ивановского Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства Здравоохранения Российской Федерации. Клетки культивировали в биореакторе волнового типа в мешках для культивирования клеток Biostat® Cultibag RM 5L (*Sartorius AG*, Германия) в культуральной среде CDM4-НЕК293 HyClone™ (*Cytiva*, США) с добавлением 2 г/л бикарбоната натрия (*ПанЭко*, Россия), 1 г/л Poloxamer 188 (*Corning*, США) и 4 мМ L-глутамин (*ПанЭко*, Россия) при температуре 37°C и 5% CO₂. После достижения концентрации $1 \cdot 10^6$ клеток/мл в культуру асептически вносили на 100 мл среды 10 мл вирусной суспензии, содержащей аденовирус *resAd5-swH1-His* в титре 10^8 БОЕ/мл (бляшкообразующих единиц в мл).

Трансдуцированные клетки инкубировали в течение 3 суток до достижения 50–60% ЦПД. Процент живых клеток, предварительно окрашенных метиленовым синим, определяли путем визуального подсчета в камере Горяева. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 7700g в течение 20 мин при комнатной температуре (20°C) и отбрасывали надосадочную жидкость, которую хранили при температуре –70°C.

Металл-хелатная аффинная очистка на сорбенте

К объему 50 мл культуральной жидкости, содержащей целевой белок, добавили 1М калий-фосфатный буфер (*Merck*, Германия) и хлорид натрия (*Merck*, Германия) до конечной концентрации 50 и 300 мМ соответственно и pH 8.0.

Промыли 0.3 мл сорбента — Ni-активированной агарозы (*Thermo Fisher Scientific*, США) — буфером А (50 мМ калий-фосфатного буфера с pH 8.0 и 300 мМ хлорида натрия) в количестве 1 мл. Осадок сорбента отделяли путем центрифугирования в течение 1 мин со скоростью 3000 об/мин. Повторили процедуру дважды.

Подготовленный сорбент перенесли в пробирку с 50 мл культуральной жидкости, содержащей 50 мМ калий-фосфатного буфера и 300 мМ хлорида натрия, и инкубировали смесь на шейкере со скоростью 100 об/мин в течение 16 ч (ночь) при +22°C. Затем центрифугировали при 3000 об/мин и удалили супернатант. Осадок сорбента трижды промыли в 1 мл буфера А.

Провели элюцию белка с сорбента с помощью 1 мл буфера Б, состоящего из 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 8.0), содержащего 300 мМ хлорида натрия и 250 мМ метилимидазола (pH 12), покачиванием на шейкере со скоростью 180 об/мин в течение 5 мин. Осадили сорбент низкоскоростным центрифугированием (1 мин при 3000 об/мин). Супернатант отобрали и диализовали против 50 мМ калий-фосфатного буфера (pH 8.0).

Концентрацию аффинно-очищенного препарата белкового антигена измеряли спектрофотометрически при длине волны 280 нм на приборе NanoDrop 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, США). Препарат хранили при температуре –20°C.

Электрофоретический анализ белка swH1-His

Фракционирование белков проводили методом электрофореза в 12%-ном полиакрилатном геле, содержащем додецилсульфат натрия (ПААГ-ДСН) в буферной системе Лэммли с использованием вертикального прибора для мини-гелей Mini-Protean 3 Cell (*BIO-RAD*, США). Молекулярный вес белка определяли с помощью маркера PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific*, США).

Образцы для электрофореза вносили с расчетом нагрузки 1–4 мкг белка на трек. Перед внесением в гель образцы были помещены

в денатурирующие (+) условия с использованием диссоциирующего буфера 2× Laemmli Sample Buffer (*Merck*, Германия), доводили объем дистиллированной водой до 40 мкл (при необходимости). Пробы прогревали при 95°C в течение 5–7 мин и вносили образцы в лунки геля. Использовали маркер молекулярного веса PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder.

Электрофорез проводили при постоянной силе тока 20 мА/гель в электродном буфере SDS-PAGE Running Buffer, компонентами которого являлись 25 мМ трис-HCl, 0.25 М глицин и 0.1% додецилсульфат натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS), pH 8.3.

По окончании электрофоретического разделения гель сканировали на приборе Gel Doc™ EZ (*BIO-RAD*, США), в соответствующей программе для получения цифрового изображения и оценки электрофоретической чистоты препарата, молекулярной массы целевого белка.

Вестерн-блот анализ белка swH1-His

После проведения электрофореза анализируемых образцов в ПААГ-ДСН провели трансфер белков из геля на мембрану полусухим переносом на приборе Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (*BIO-RAD*, США) при постоянной силе тока 250 мА на площадь геля 7 × 8 см.

По окончании переноса, мембрану Nitrocellulose Membranes толщиной 0.2 мкм (*BIO-RAD*, США) трижды отмывали в дистиллированной воде по 10 мин, затем блокировали свободные сайты на мембране рабочим буфером: 20 мМ фосфатно-солевого буфера (phosphate buffered saline solution, PBS), pH 7.2–7.4, содержащего 0.1% полисорбата 20 (Твин 20) и 1% казеина, в течение 30 мин при 37°C на шейкере. Затем мембрану инкубировали в том же буферном растворе, содержащем моноклональные антитела к последовательности гистицинов, меченные пероксидазой mAb-a-His-HRP¹ (*Sigma-Aldrich*, Германия), в рабочем разведении 1/5000 на шейкере при 22°C в течение 16 ч (ночь). По окончании инкубации, мембрану сначала промывали дистиллированной водой, затем трижды по 10 мин буфером 20 мМ PBS (pH 7.2) + 0.1% Твин 20 на шейкере. Хемилюминисцентную детекцию комплекса целевой белок–конъюгат проводили с использованием реагента Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagents (*GE HealthCare*, США) с последующим сканированием иммунореплики на приборе Amersham Imager 600 (*GE HealthCare*, США).

¹ HRP — horseradish peroxidase.

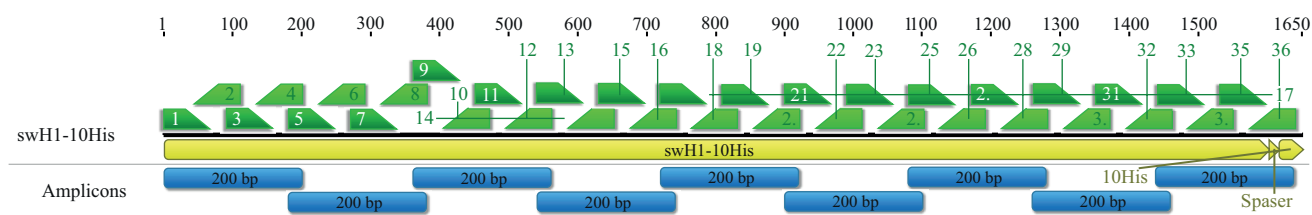


Рис. 1. Схема получения блоков по 200 п.о. с помощью амплификации четырех праймеров

Fig. 1. Scheme for obtaining blocks of 200 base pairs (bp) using four primer amplification

Исследование антигенной специфичности целевого белка swH1-His в реакции со специфическими сыворотками методом непрямого ИФА

Постановку непрямого ИФА проводили по стандартной методике. В качестве антигена брали полученный рекомбинантный белок swH1-His и коммерческий рекомбинантный белок гемагглютинин вируса гриппа А штамма H1N1/California/2009 (Abcam, Великобритания).

Сорбционная доза белка составляла 1 мкг/мл в 50 мМ К-карбонатном буфере, pH 9.6. Блокировку несвязанных сайтов проводили раствором инертного белка — 1% казеин Blocker™ Casein (Thermo Fisher Scientific, США). Антивидовые моноклональные антитела к IgG человека — Goat anti-Human Fc-specific IgG HRP (Sigma-Aldrich, Германия) — вносили в рабочем разведении 1/5000. Для проявления иммунного комплекса использовали однокомпонентный ТМБ-субстрат² (Sigma-Aldrich, Германия). Оптическую плотность измеряли при длине волны $\lambda = 450$ нм с помощью планшетного спектрофотометра iEMS Reader MF Thermo Labsystems (Thermo Fisher Scientific, США). За титр антител принимали величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, в котором оптическое поглощение в 2 раза превышало фон.

Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prism (Dotmatics Canada). Использовали такие методы статистической обработки, как нахождение среднегеометрического титра с указанием 95% доверительного интервала (CI).

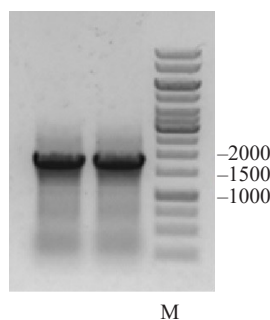


Рис. 2. Электрофореграмма результатов амплификации полноразмерного гена swH1-His с концевыми праймерами swH1-His_out-F и swH1-His_out-R. Размер ампликона равен 1708 п.о., два повтора. М — маркер молекулярного веса

Fig. 2. Electropherogram of the results of amplification of the full-length swH1-His gene with terminal primers swH1-His_out-F and swH1-His_out-R. The amplicon size is 1708 bp, two repeats. M is the molecular weight marker

² ТМБ — стабилизированный раствор 3,3',5,5'-тетрамethylбензидина гидрохлорида. [TMB is stabilized solution of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride.]

³ NCBI — National Center for Biotechnology Information. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Дата обращения 10.06.2023 г. / Accessed June 10, 2023.

Получение recAd5, экспрессирующего ген геммагглютинаина свиного гриппа типа А штамма H1N1 (swH1-His)

В реакции бляшкообразования титр полученного рекомбинантного аденовируса recAd5-swH1-His в лизате клеток составил $2 \cdot 10^8$ БОЕ/мл.

В ПЦР с детекцией продуктов методом электрофореза в агарозном геле (рис. 3) доказали наличие в ДНК рекомбинантного аденовируса человека 5-го серотипа (гексон), последовательности гена swH1-His, а также отсутствие последовательности E1-области аденовируса человека 5-го серотипа.

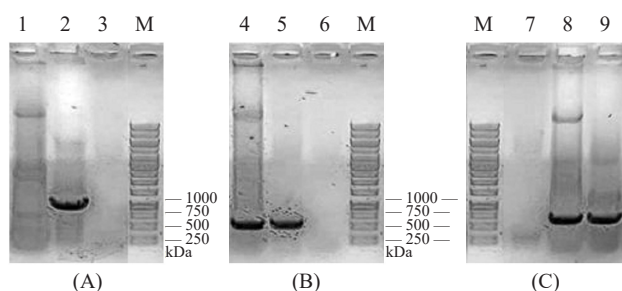


Рис. 3. Электрофореграмма ПЦР анализа ДНК, выделенной из трансдуцированных клеток рекомбинантным аденовирусом recAd5-swH1-His.

- (А) ПЦР с праймерами на E1-область аденовируса:
(1) recAd5-swH1-His,
(2) положительный контроль реакции — 1060 п.о.,
(3) отрицательный контроль реакции.
(В) ПЦР с праймерами на гексон аденовируса:
(4) recAd5-swH1-His,
(5) положительный контроль реакции — 580 п.о.,
(6) отрицательный контроль реакции.
(С) ПЦР с праймерами на ген swH1-His:
(7) отрицательный контроль реакции,
(8) recAd5-swH1-His,
(9) положительный контроль реакции — 670 п.о.

M — маркер молекулярного веса

Fig. 3. Electropherogram of polymerase chain reaction (PCR) analysis of DNA isolated from transduced cells with the recombinant adenovirus recAd5-swH1-His.

- (A) PCR with primers for the E1 region of the adenovirus:
(1) recAd5-swH1-His, (2) positive reaction control — 1060 bp, (3) negative reaction control. (B) PCR with primers for adenovirus hexon: (4) recAd5-swH1-His, (5) positive reaction control — 580 bp, (6) negative reaction control. (C) PCR with primers for the swH1-His gene: (7) negative reaction control, (8) recAd5-swH1-His, (9) positive reaction control — 670 bp. M is the molecular weight marker

Получение препаративных количеств целевого белка swH1-His в культуральной жидкости

Как показали предыдущие исследования [12], при использовании аденовекторной системы наилучшими параметрами для накопления целевого

рекомбинантного белка в культуральной среде являются доза заражения 200 БОЕ/клетку и 3 суток инкубации с достижением 50–60% ЦПД.

Из осветленной культуральной жидкости методом металл-хелатного аффинного выделения в объеме получили 1 мл раствора рекомбинантного белка swH1-His с концентрацией 1.2 мг/мл.

Физико-химические свойства рекомбинантного геммагглютинаина swH1-His

Анализ полученного рекомбинантного белка swH1-His проводили методом белкового электрофореза в 12% ПААГ-ДСН в денатурирующих условиях. Определяли молекулярную массу рекомбинантного белка swH1-His и ее соответствие заявленной. Результаты электрофореза в ПААГ-ДСН представлены на рис. 4.

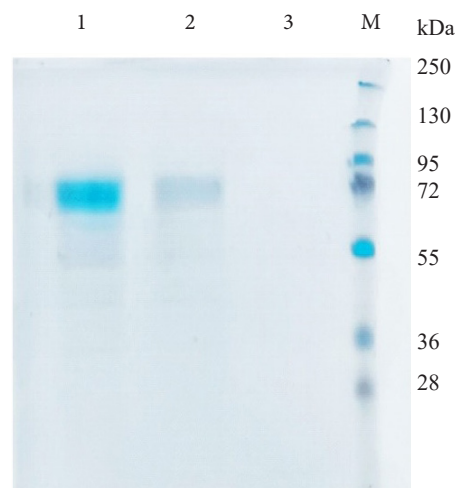


Рис. 4. Электрофореграмма очищенного белка swH1-His: (1) белок swH1-His (1-я элюция) — 4 мкг/трек, (2) белок swH1-His (2-я элюция) — 1 мкг/трек, (3) «проскок» (образец после адсорбции на Ni-агарозе). M — маркер молекулярного веса

Fig. 4. Electropherogram of purified swH1-His protein: (1) swH1-His protein (1st elution) — 4 µg/track, (2) swH1-His protein (2nd elution) — 1 µg/track, (3) “tailings” (sample after adsorption on Ni-agarose). M is the marker molecular weight

По данным электрофореза, молекулярная масса рекомбинантного белка swH1-His составляет ≈ 70 кДа, что соответствует полноразмерной молекуле геммагглютинаина вируса гриппа А.

Методом иммуноблоттинга в реакции с моноклональными антителами, специфичными к последовательности остатков гистидина (рис. 5), подтвердили наличие в составе очищенного рекомбинантного белка swH1-His 10 гистидиновых остатков.

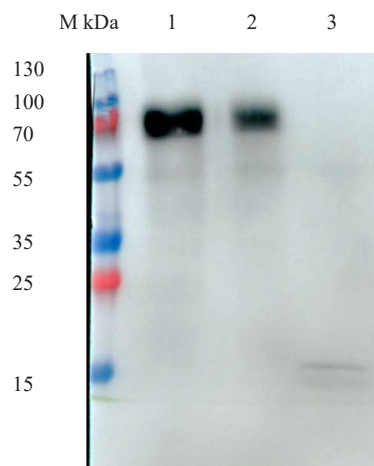


Рис. 5. Иммунореплика очищенного белка swH1-His: (1) белок swH1-His (1-я элюция) — 4 мкг/трек, (2) белок swH1-His (2-я элюция) — 1 мкг/трек, (3) «проскок» материала после адсорбции на Ni-агарозе. М — маркер молекулярного веса

Fig. 5. Immunoreplica of purified swH1-His protein: (1) swH1-His protein (1st elution) — 4 µg/track, (2) swH1-His protein (2nd elution) — 1 µg/track, (3) “tailings” (sample after adsorption on Ni-agarose). M is the marker molecular weight

Антигенные свойства рекомбинантного гемагглютинаина swH1-His

Антигенная активность очищенного рекомбинантного гемагглютинаина swH1-His охарактеризовали в непрямом ИФА. Для этого использовали специфические сыворотки людей, переболевших гриппом. Диагноз «грипп» ставился на основании клинических признаков и положительной ПЦР на РНК вируса гриппа А/Н1Н1 в мазке из носоглотки.

Далее, в период реконвалесценции (на 10–12 день заболевания и позднее) от пациентов получали кровь, из которой выделяли сыворотку стандартным методом. Все пациенты подписали информированное согласие. Исследование соответствует общепринятым медицинским и этическим стандартам, принципам Хельсинкской Декларации Всемирной медицинской ассоциации (2013 г.), национальным законам и стандартам Российской Федерации и Правилам надлежащей клинической практики (ICH GCP⁴), принятыми в Российской Федерации (ГОСТ Р 52379-2005⁵).

Затем образцы сывороток тестировали методом непрямого ИФА против полученного белка swH1-His и коммерческого рекомбинантного белка гемагглютинаина вируса гриппа А штамма H1N1/California/2009 (recH1) с целью сравнения антигенной активности. Результаты непрямого ИФА представлены на рис. 6.

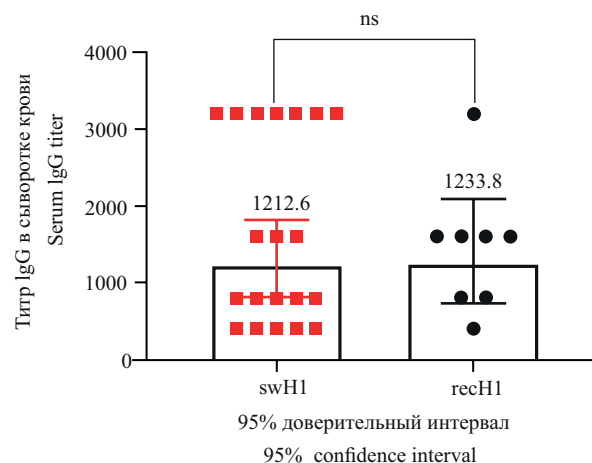


Рис. 6. Среднегеометрические титры специфических IgG в сыворотках крови людей, переболевших гриппом, к рекомбинантному белку swH1-His и коммерческому рекомбинантному белку recH1

Fig. 6. Geometric mean titers of specific IgG in the blood sera of people who have had influenza to the swH1-His recombinant protein and to the recH1 commercial recombinant protein

По данным ИФА белок swH1-His обладал антигенной активностью в реакции с сыворотками переболевших людей. Титры специфических антител к полученному рекомбинантному антигену swH1-His и к фирменному коммерческому антигену recH1 не показали достоверных отличий. Это говорит о потенциальной возможности использования swH1-His в качестве антигена в ИФА-тест системе на выявление специфических антител.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе работы путем трансдукции линии клеток эмбриональной почки человека НЕК293 получили рекомбинантный аденовирус человека 5-го серотипа, экспрессирующий ген гемагглютинаина свиного гриппа типа А штамма H1N1 (swH1-His), содержащий в составе 10 гистидиновых остатков.

⁴ ICH GCP — Надлежащая клиническая практика (Good Clinical Practice) Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации фармацевтических продуктов, предназначенных для применения человеком (International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; ICH).

⁵ ГОСТ Р 52379-2005. Национальный стандарт Российской Федерации. Надлежащая клиническая практика (утв. Приказом Ростехрегулирования от 27.09.2005, № 232-ст). Москва: Стандартинформ; 2006. [GOST R 52379-2005. National Standard of the Russian Federation. Good Clinical Practice. Moscow: Standartinform; 2006 (in Russ.).]

Рекомбинантный белок — гемагглютинин свиного гриппа типа А штамма H1N1 (swH1-His) — был афинно очищен от культуральной среды. Выход высокоочищенного белка swH1-His составил 24 мг/л. Молекулярная масса очищенного белка соответствовала заявленной (≈ 70 кДа), а по данным иммуноблоттинга подтвердилась подлинность сшивки рекомбинантного белка с последовательностью гистидинов.

В непрямом ИФА показали антигенную специфичность белка swH1-His в реакции со специфическими сыворотками крови переболевших гриппом людей. В дальнейшей работе полученный белок swH1-His будет применен как антиген в тест-системе ИФА для оценки иммуногенности векторных вакцин для профилактики гриппа.

Благодарности

Финансирование было предоставлено Автономной некоммерческой организацией «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении» в рамках соглашения № 1603-46/23 от 16 мая 2023 г. о предоставлении гранта на реализацию научно-практического проекта в сфере медицины.

Acknowledgments

The funding was provided by the Autonomous Nonprofit Organization “Moscow Center for Healthcare Innovations” within the Agreement No. 1603-46/23, dated May 16, 2023, for the grant to implement the scientific and practical project in medicine.

Вклад авторов

Е.Д. Авдонина — очистка белка batch-методом, интерпретация результатов исследования, написание и доработка текста статьи.

К.А. Первойкина — синтез гена и получение рекомбинантного аденовируса.

Л.В. Верховская — дот-иммуноферментный анализ, электрофорез белков в полиакриламидном геле, постановка вестерн-блот анализа.

Д.Н. Щербинин — дизайн и синтез гена и получение рекомбинантного аденовируса.

Н.Ю. Вискова — получение препаративных количеств рекомбинантных антител в культуральной жидкости.

И.С. Кружкова — подготовка банка специфических сывороток крови пациентов, переболевших вирусом гриппа А.

М.А. Ильина — подготовка банка специфических сывороток крови пациентов, переболевших вирусом гриппа А.

Л.В. Кудрявцева — отработка условий постановки ИФА со специфическими сыворотками крови пациентов, переболевших вирусом гриппа А.

Л.В. Колобухина — подготовка медицинской документации для работы со специфическими сыворотками крови пациентов, переболевших вирусом гриппа А.

М.М. Шмаров — концепция и дизайн исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Н.А. Антипят — идея исследования, отработка условий постановки ИФА со специфическими сыворотками крови пациентов, переболевших вирусом гриппа А.

А.Л. Гинцбург — идея и концепция исследования, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

И.Н. Тюрин — концепция и дизайн исследования, согласование медицинской документации, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions

E.D. Avdonina — protein purification by batch method, interpretation of the results of the study, writing and revising the text.

K.A. Pervoykina — gene synthesis and obtaining recombinant adenovirus.

L.V. Verkhovskaya — dot-blot, proteins electrophoresis in PAAG, Western blot.

D.N. Shcherbinin — gene design, synthesis, and production of recombinant adenovirus.

N.Yu. Viskova — obtaining preparative quantities of recombinant antibodies in culture fluid.

I.S. Kruzhkova — preparation of a bank of specific blood sera from patients who have had influenza A virus.

M.A. Ilyina — preparation of a bank of specific blood sera from patients who have had influenza A virus.

L.V. Kudriavtseva — developing conditions for enzyme-linked immunosorbent assay with specific sera from patients who have had influenza A virus.

L.V. Kolobukhina — preparing the medical documentation for work with specific blood sera of patients who have had influenza A virus.

M.M. Shmarov — concept and design of the study, approval of the final version of the of the article for publication.

N.A. Antipyat — research idea, developing conditions for enzyme-linked immunosorbent assay with specific sera of blood of patients who have had influenza A virus.

A.L. Gintsburg — research idea and concept, approval of the final version of the article for publication.

I.N. Tyurin — concept and design of the study, coordination of medical documentation, approval of the final version of the article for publication.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.
The authors declare no conflicts of interest.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Becker T., Elbahesh H., Reperant L.A., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. Influenza Vaccines: Successes and Continuing Challenges. *J. Infect. Dis.* 2021;224(12 Suppl. 2): S405–S419. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab269>
2. Lim M.L., Komarasamy T.V., Adnan N.A.A.B., Radhakrishnan A.K., Balasubramaniam V.R.M.T. Recent Advances, Approaches and Challenges in the Development of Universal Influenza Vaccines. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2024;18(3):e13276. <https://doi.org/10.1111/irv.13276>
3. Jang Y.H., Seong B.L. The Quest for a Truly Universal Influenza Vaccine. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019;9:344. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00344>
4. Sautto G.A., Kirchenbaum G.A., Ross T.M. Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal. *Virol. J.* 2018;15(1):17. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0918-y>
5. Wang W.-C., Sayedahmed E.E., Sambhara S., Mittal S.K. Progress towards the Development of a Universal Influenza Vaccine. *Viruses.* 2022;14(8):1684. <https://doi.org/10.3390/v14081684>
6. Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Котляров Р.Ю., Блохина Е.А., Шуклина М.А., Марданова Е.С., Коротков А.В., Потапчук М.В., Равин Н.В. Усиление эффективности кандидатной вакцины против гриппа сочетанием консервативных последовательностей гемагглютинина и М2 белка. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2017;16(3):65–70. <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-3-65-70>
7. Сычев И.А., Копейкин П.М., Цветкова Е.В., Чередова К.В., Мильман Б.Л., Шамова О.В., Исакова-Сивак И.Н., Дешева Ю.А. Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А. *Инфекция и иммунитет.* 2021;11(3):463–472. <https://doi.org/10.15789/10.15789/2220-7619-IOC-1343>
8. Crosset A., Delafosse L., Gaudry J.-P., Arod C., Glez L., Losberger C., Begue D., Krstanovic A., Robert F., Vilbois F., Chevalet L., Antonsson B. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J. Biotechnol.* 2012;161(3):336–348. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.038>
9. Schütz A., Bernhard F., Berrow N., Buyel J.F., Ferreira-da-Silva F., Haustraete J., van den Heuvel J., Hoffmann J.-E., de Marco A., Peleg Y., Suppmann S., Unger T., Vanhoucke M., Witt S., Remans K. A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. *STAR Protoc.* 2023;4(4):102572. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102572>
10. Tan E., Chin C.S.H., Lim Z.F.S., Ng S.K. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
11. Young L., Dong Q. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(7):e59. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh058>
12. Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Банделюк А.С., Верховская Л.В., Вискова Н.Ю., Авдонина Е.Д., Прокофьев В.В., Рябова Е.И., Есмагамбетов И.Б., Первойкина К.А., Богачева Е.А., Лысенко А.А., Шмаров М.М. Способ получения рекомбинантных антител, продуцируемых клеточной линией, трансдуцированной рекомбинантными аденовирусами. *Тонкие химические технологии.* 2023;18(1):48–64. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>

REFERENCES

1. Becker T., Elbahesh H., Reperant L.A., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D.M.E. Influenza Vaccines: Successes and Continuing Challenges. *J. Infect. Dis.* 2021;224(12 Suppl. 2): S405–S419. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiab269>
2. Lim M.L., Komarasamy T.V., Adnan N.A.A.B., Radhakrishnan A.K., Balasubramaniam V.R.M.T. Recent Advances, Approaches and Challenges in the Development of Universal Influenza Vaccines. *Influenza Other Respir. Viruses.* 2024;18(3):e13276. <https://doi.org/10.1111/irv.13276>
3. Jang Y.H., Seong B.L. The Quest for a Truly Universal Influenza Vaccine. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2019;9:344. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2019.00344>
4. Sautto G.A., Kirchenbaum G.A., Ross T.M. Towards a universal influenza vaccine: different approaches for one goal. *Virol. J.* 2018;15(1):17. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0918-y>
5. Wang W.-C., Sayedahmed E.E., Sambhara S., Mittal S.K. Progress towards the Development of a Universal Influenza Vaccine. *Viruses.* 2022;14(8):1684. <https://doi.org/10.3390/v14081684>
6. Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Kotlyarov R.Yu., Blokhina E.A., Shuklina M.A., Mardanova E.S., Korotkov A.V., Potapchuk M.V., Ravin N.V. Strengthening the effectiveness of the candidate influenza vaccine by combining conserved sequences of hemagglutinin and M2 protein. *Epidemiologiya i Vaksino profilaktika = Epidemiology and Vaccine Prophylaxis.* 2017;16(3):65–70 (in Russ.). <https://doi.org/10.31631/2073-3046-2017-16-3-65-70>
7. Sychev I.A., Kopeikin P.M., Tsvetkova E.V., Cheredova K.V., Mil'man B.L., Shamova O.V., Isakova-Sivak I.N., Desheva Yu.A. Induction of cross-reactive antibodies in mice immunized with conserved influenza A virus neuraminidase-derived linear B-cell epitopes. *Infektsiya i immunitet = Russ. J. Infection and Immunity.* 2021;11(3):463–472 (in Russ.). <https://doi.org/10.15789/10.15789/2220-7619-IOC-1343>
8. Crosset A., Delafosse L., Gaudry J.-P., Arod C., Glez L., Losberger C., Begue D., Krstanovic A., Robert F., Vilbois F., Chevalet L., Antonsson B. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J. Biotechnol.* 2012;161(3):336–348. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.038>
9. Schütz A., Bernhard F., Berrow N., Buyel J.F., Ferreira-da-Silva F., Haustraete J., van den Heuvel J., Hoffmann J.-E., de Marco A., Peleg Y., Suppmann S., Unger T., Vanhoucke M., Witt S., Remans K. A concise guide to choosing suitable gene expression systems for recombinant protein production. *STAR Protoc.* 2023;4(4):102572. <https://doi.org/10.1016/j.xpro.2023.102572>
10. Tan E., Chin C.S.H., Lim Z.F.S., Ng S.K. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
11. Young L., Dong Q. Two-step total gene synthesis method. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(7):e59. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh058>
12. Sedova E.S., Shcherbinin D.N., Bandelyuk A.S., Verkhovskaya L.V., Viskova N.Yu., Avdonina E.D., Prokofiev V.V., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Pervoykina K.A., Bogacheva E.A., Lysenko A.A., Shmarov M.M. Method for obtaining recombinant antibodies produced by a cell line transduced with recombinant adenoviruses. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):48–64. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>

Об авторах

Авдонина Елена Дмитриевна, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной биотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Министерство здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: avdonina.yelena@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8059-9743>

Первойкина Кристина Алексеевна, младший научный сотрудник, лаборатория молекулярной биотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Министерство здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: uk-ru123@yandex.ru. Scopus Author ID 57698990900, <https://orcid.org/0000-0003-0780-5998>

Верховская Людмила Викторовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярной биотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Министерство здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: verkhov@mail.ru. SPIN-код РИНЦ 5529-5909, <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

Щербинин Дмитрий Николаевич, к.б.н., научный сотрудник, лаборатория молекулярной биотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Министерство здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: dim284@inbox.ru. Scopus Author ID 36599350900, ResearcherID E-7682-2014, SPIN-код РИНЦ 7743-6517, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Вискова Наталья Юрьевна, научный сотрудник, лаборатория клеточной микробиологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Министерство здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: apr2004@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-6476-3520>

Кружкова Ирина Сергеевна, врач-инфекционист, ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы» (125367, Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 63); научный сотрудник, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Министерство здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: irina-kru@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0002-1983-481X>

Ильина Мария Аркадьевна, заведующая Московским центром хронических инфекционных заболеваний, клещевых инфекций, медицины путешествий и вакцинопрофилактики, ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы» (125367, Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 63). E-mail: ilina_mar@list.ru. <http://orcid.org/0000-0003-4227-5363>

Кудрявцева Лариса Васильевна, заведующая лабораторно-диагностическим отделением, ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы» (125367, Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 63). E-mail: drkudriavtsevalv@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0001-7516-9490>

Колобухина Людмила Васильевна, д.м.н., профессор, руководитель лаборатории респираторных вирусных инфекций с апробацией лекарственных средств, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Министерство здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18); врач-инфекционист, ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы» (125367, Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 63). E-mail: lkolobuchina@yandex.ru. Scopus Author ID 6601956811, <http://orcid.org/0000-0001-5775-3343>

Шмаров Максим Михайлович, д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Министерство здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: ribozym@mail.ru. Scopus Author ID 6507322279, ResearcherID D-8662-2014, SPIN-код РИНЦ 4874-2578, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Антипат Наталья Александровна, заместитель главного врача по медицинской части, ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы» (125367, Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 63). E-mail: natadoc70@bk.ru. Scopus Author ID 57207693166, <http://orcid.org/0000-0001-8578-2838>

Гинцбург Александр Леонидович, академик Российской академии наук, д.б.н., профессор, директор ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», Министерство здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18); заведующий кафедрой инфектологии и вирусологии, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Министерство здравоохранения Российской Федерации (119048, Россия, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2). E-mail: gintsburg@gamaleya.org. Scopus Author ID 7005111491, SPIN-код РИНЦ 7626-0373, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Тюрин Игорь Николаевич, главный врач, ГБУЗ «Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения г. Москвы» (125367, Россия, Москва, Волоколамское шоссе, д. 63). E-mail: tyurin.dti@yandex.ru. Scopus Author ID 56895933300, <http://orcid.org/0000-0002-5696-1586>

About the Authors

Elena D. Avdonina, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: avdonina.yelena@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8059-9743>

Kristina A. Pervoykina, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: uk-ru123@yandex.ru. Scopus Author ID 57698990900, <https://orcid.org/0000-0003-0780-5998>

Ludmila V. Verkhovskaya, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: verkhov@mail.ru. RSCI SPIN-code 5529-5909, <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

Dmitriy N. Shcherbinin, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: dim284@inbox.ru. Scopus Author ID 36599350900, ResearcherID E-7682-2014, RSCI SPIN-code 7743-6517, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Natalia Yu. Viskova, Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: apr2004@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-6476-3520>

Irina S. Kruzhkova, Infectious Disease Specialist, Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1, Moscow City Health Department (63, Volokolamskoye sh., Moscow, 125367, Russia); Researcher, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia), E-mail: irina-kru@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0002-1983-481X>

Maria A. Ilina, Head of the Moscow Center for Chronic Infectious Diseases, Tick-Borne Infections, Travel Medicine and Vaccine Prevention, Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1, Moscow City Health Department (63, Volokolamskoye sh., Moscow, 125367, Russia). E-mail: ilina_mar@list.ru. <http://orcid.org/0000-0003-4227-5363>

Larisa V. Kudriavtseva, Head of Laboratory and Diagnostic Department, Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1, Moscow City Health Department (63, Volokolamskoye sh., Moscow, 125367, Russia). E-mail: drkudriavtsevalv@yandex.ru. <http://orcid.org/0000-0001-7516-9490>

Lyudmila V. Kolobukhina, Dr. Sci. (Med.), Professor, Head of the Laboratory of Respiratory Viral Infections with Drug Testing, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia); Infectious Disease Specialist, Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1, Moscow City Health Department (63, Volokolamskoye sh., Moscow, 125367, Russia). E-mail: lkolobuchina@yandex.ru. Scopus Author ID 6601956811, <http://orcid.org/0000-0001-5775-3343>

Maksim M. Shmarov, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: ribozym@mail.ru. Scopus Author ID 6507322279, ResearcherID D-8662-2014, RSCI SPIN-code 4874-2578, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

Natalya A. Antipyat, Deputy Chief Physician for Medical Affairs, Infectious Diseases Clinical Hospital No. 1, Moscow City Health Department (63, Volokolamskoye sh., Moscow, 125367, Russia). E-mail: natadoc70@bk.ru. Scopus Author ID 57207693166, <http://orcid.org/0000-0001-8578-2838>

Alexander L. Gintsburg, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Director of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia); Head of the Department of Infectology and Virology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University) (8-2, Trubetskaya ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: gintsburg@gamaleya.org. Scopus Author ID 7005111491 RSCI SPIN-code 7626-0373, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Igor N. Tyurin, Chief Physician, Infectious Diseases Clinical Hospital No 1, Moscow City Health Department (63, Volokolamskoye sh., Moscow, 125367, Russia). E-mail: tyurin.dti@yandex.ru. Scopus Author ID 56895933300, <http://orcid.org/0000-0002-5696-1586>