

УДК 578.74

DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ108681>

## МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ ОЧИЩЕННОГО АНТИГЕНА SARS-CoV-2 ДЛЯ СТРУКТУРНЫХ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЦЕЛНОВИРИОННЫХ ВАКЦИН ПРОТИВ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

А.Н. Зырина<sup>1</sup>, И.О. Целых<sup>1</sup>, А.С. Богдан<sup>1,2</sup>, А.А. Ковпак<sup>1</sup>, Ю.Ю. Ивин<sup>1</sup>, В.Е. Василенко<sup>1</sup>, А.Н. Пиняева<sup>1</sup>, А.А. Шишова<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

<sup>2</sup> МИРЭА — Российский технологический университет, Москва, Россия;

<sup>3</sup> Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

**Для цитирования:** Зырина А.Н., Целых И.О., Богдан А.С., Ковпак А.А., Ивин Ю.Ю., Василенко В.Е., Пиняева А.Н., Шишова А.А. Методика получения очищенного антигена SARS-CoV-2 для структурных и иммунологических исследований цельновирioнных вакцин против коронавирусной инфекции // Медицинский академический журнал. 2022. Т. 22. № 2. С. 183–189. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ108681>

Рукопись получена: 23.05.2022

Рукопись одобрена: 10.06.2022

Опубликована: 30.06.2022

**Обоснование.** Несмотря на масштабные разработки вакцин против коронавирусной инфекции, до сих пор нет полной информации об антигенной структуре вирусной частицы SARS-CoV-2. В этой статье предлагается авторский метод получения чистого концентрированного цельновирioнного препарата, который может быть использован в различных исследованиях.

**Цель статьи** — разработать оптимальную методику очистки инактивированного вируса SARS-CoV-2 для получения препарата, по чистоте и содержанию антигена достаточного для проведения структурных и иммунологических исследований.

**Материалы и методы.** Для получения чистого концентрированного вируса SARS-CoV-2 использовали метод ультрацентрифугирования в плотности сахарозного градиента. Фракции с наибольшим содержанием вирусных частиц оценивали по концентрации нуклеокапсида N и гликопротеина S. Чистоту объединенных фракций (очищенного образца) оценивали по наличию примесных белков, токсинов и бычьего сывороточного альбумина.

**Результаты.** Определены оптимальные условия получения инактивированного очищенного цельного вируса SARS-CoV-2, выделен и охарактеризован его стандартный образец.

**Заключение.** Полученный стандартный образец вируса SARS-CoV-2 можно использовать в иммуоферментном анализе для измерения количества антигена в цельновирioнных вакцинах против коронавирусной инфекции, а также в различных исследованиях структуры вирусной частицы SARS-CoV-2.

**Ключевые слова:** цельновирioнные вакцины; коронавирусная инфекция; SARS-CoV-2; очищенный вирус; сахарозный градиент.

## METHOD OF OBTAINING PURIFIED SARS-CoV-2 ANTIGEN FOR STRUCTURAL AND IMMUNOLOGICAL STUDIES IN WHOLE-VIRION VACCINES AGAINST CORONAVIRUS INFECTION

Anna N. Zyrina<sup>1</sup>, Irina O. Tselykh<sup>1</sup>, Anastasia S. Bogdan<sup>1,2</sup>, Anastasia A. Kovpak<sup>1</sup>, Yury Yu. Ivin<sup>1</sup>, Vladislav E. Vasilenko<sup>1</sup>, Anastasia N. Piniyeva<sup>1</sup>, Anna A. Shishova<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia;

<sup>2</sup> MIREA — Russian Technological University, Moscow, Russia;

<sup>3</sup> Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

**For citation:** Zyrina AN, Tselykh IO, Bogdan AS, Kovpak AA, Ivin YuYu, Vasilenko VE, Piniyeva AN, Shishova AA. Method of obtaining purified SARS-CoV-2 antigen for structural and immunological studies in whole-virion vaccines against coronavirus infection. *Medical Academic Journal*. 2022;22(2):183–189. DOI: <https://doi.org/10.17816/MAJ108681>

Received: 23.05.2022

Accepted: 10.06.2022

Published: 30.06.2022

**BACKGROUND:** Despite the large-scale development of vaccines against coronavirus infection, there is still no complete information about the antigenic structure of the SARS-CoV-2 virus particles. This article describes a method of obtaining a pure concentrated whole-virion sample that can be used in various studies.

**AIM:** The goal is to develop an optimal method of purification of the inactivated SARS-CoV-2 virus in order to obtain a standard with parameters of purity and antigen content sufficient for structural and immunological studies.

### Список сокращений

БСА — бычий сывороточный альбумин; ИФА — иммуоферментный анализ.

**MATERIALS AND METHODS:** To obtain a pure concentrated virus SARS-CoV-2 we used the sucrose density gradient ultracentrifugation. Fractions with the highest content of viral particles were evaluated based on the concentration of nucleocapsid N and glycoprotein S. The purity of the pooled fractions (the purified sample) was evaluated by the presence of impurity proteins, toxins and bovine serum albumin.

**RESULTS:** The optimal conditions for obtaining the inactivated purified SARS-CoV-2 whole virus were determined. A standard sample of the inactivated SARS-CoV-2 virus was isolated and characterized.

**CONCLUSIONS:** The obtained standard sample can be used in enzyme immunoassay to measure the amount of antigen in whole-virion vaccines against coronavirus infection, as well as in various structural studies of SARS-CoV-2 virus particle.

**Keywords:** whole-virion vaccines; coronavirus infection; SARS-CoV-2; purified virus; sucrose gradient.

## Обоснование

После объявления Всемирной организацией здравоохранения пандемии коронавирусной инфекции в марте 2020 г. началась активная разработка вакцин и методов мониторинга их эффективности. Один из параметров оценки качества вакцины — определение уровня антигена, вызывающего образование нейтрализующих антител. В настоящее время наиболее широко распространен метод иммуноферментного анализа (тест-система ИФА) для измерения количества антигена в образце [1, 2]. Содержание антигена измеряют относительно эталонного стандарта с известными защитными свойствами и параметрами чистоты. Для тест-системы ИФА необходимы специфичные к вирусу антитела, полученные иммунизацией животных стандартом. Таким образом, для определения количества антигена методом ИФА, например в цельновирioнных антиковидных вакцинах, требуется стандарт: чистый препарат, содержащий целевой вирус SARS-CoV-2. Известно большое число методов очистки и концентрирования вирусного материала: адсорбция на эритроцитах; осаждение на сахарозную подушку; хроматографическая очистка; ультрацентрифугирование в градиенте плотности сахарозы, хлорида цезия или йодиксанола; тангенциальная поточная фильтрация; водная двухфазная экстракция; диализ и др. [3]. У каждого метода имеются свои достоинства и недостатки.

**Цель исследования** — разработать оптимальную методику очистки инактивированного вируса SARS-CoV-2 для получения стандарта, отвечающего необходимым требованиям по чистоте и содержанию антигена.

## Материалы и методы

Инактивированный антиген SARS-CoV-2 выделяли из вирусного концентрата, обработанного бета-пропиолактоном. Вирусный концентрат получали путем наработки SARS-CoV-2 штамма AYDAR-1 (GISAID EPI\_ISL\_428851) в культуре клеток Vero в питательной среде Игла MEM с добавлением 5 % эмбриональной телячьей сыворотки, главный компонент которой — бычий сывороточный альбумин (БСА). Подробный про-

токол получения концентрата описан ранее [4]. Для получения грубой фракции концентрат очищали от клеточного дебриса центрифугированием на скорости 76618 g 4 ч при температуре 4 °C. Полученный осадок растворяли в 3 мл фосфатно-солевого буфера. Готовили заранее в центрифужных пробирках сахарозный градиент из 10 и 50 % сахарозы: аккуратно в центрифужную пробирку по стенке вносили 6 мл 50 % сахарозы, сверху — 6 мл 10 % сахарозы, и оставляли на ночь при 4 °C для уравнивания. Затем вирусную суспензию в объеме 500 мкл насаивали поверх сахарозного градиента и проводили разделение вируса и субклеточных частиц методом ультрацентрифугирования в течение 5 ч на скорости 129080 g при температуре 4 °C. В результате в пробирке визуальнo детектировали бэнд с размытыми краями, содержащий коронавирuсные частицы. Отбирали фракции по 1 мл путем прокалывания дна пробирки иглой от шприца.

Собранные фракции анализировали на содержание в них целевого N-белка и БСА методом электрофореза в полиакриламидном геле в редуцирующих условиях. Количественную оценку бэндов белков на геле осуществляли с помощью программы imageJ (версия 1.53k, см. <https://imagej.nih.gov/ij>, США).

Наличие вирусных N- и S-белков во фракциях проверяли методом вестерн-блота. Перенос белков с полиакриламидного геля на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) проводили в камере Bio-Rad (90 В, 300 мА, 60 мин). Для блокировки неспецифических сайтов связывания мембрану инкубировали 1 ч в 5 % растворе сухого молока. Далее выдерживали 1 ч с первичными антителами [поликлональные антитела, полученные путем иммунизации кроликов в два этапа коммерческим N-белком или S-белком (abcam, США) с адьювантом Фрейнда], в разведении 1 : 500. Затем инкубировали 1 ч со вторичными моноклональными антикроличьими антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, в разведении 1 : 2500 (Sigma, США). Проявление мембраны проводили с использованием набора реактивов Clarity™ Western ECL (Bio-Rad, США).

На следующем этапе объединяли фракции с наибольшим содержанием вирусных белков и наименьшим — БСА, проводили очистку от сахарозы на центрифужных ультрафильтрах Амикон 50 к Да (Millipore, США) при условиях центрифугирования: 40 мин на скорости 1811 г при температуре 4 °С.

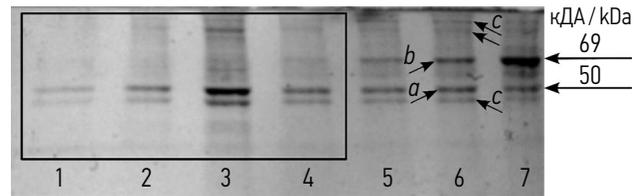
Полученный стандарт анализировали на содержание БСА и целевого белка (вирусного нуклеокапсида N) методом электрофореза в полиакриламидном геле в редуцирующих условиях с нанесением стандартных образцов БСА в различных концентрациях (10, 5, 2,5 мкг/мл) для построения калибровочной кривой. Полученные результаты подсчитывали в программе GeneTools (Syngene, США).

Содержание бактериальных эндотоксинов проверяли с помощью геле-тромб-теста ЛАЛ (ООО НПО «ЛАЛ-Центр», Россия и Charles River Endosafe, США) согласно инструкции производителя [5], с некоторыми модификациями. Для калибровки контрольный стандарт эндотоксина разводили в 10 раз, затем проводили серию последовательных разведений эндотоксина в 2 раза до концентраций 0,015, 0,008, 0,004 и 0,002 ЕЭ/мл. Далее выполняли серию из 5 последовательных разведений очищенного стандарта SARS-CoV-2 в 128 раз. После проведения теста, согласно инструкции производителя, детектировали, при каком разведении калибровки и стандарта SARS-CoV-2 образуется плотный гель, и определяли содержание эндотоксинов, перемножая значения разведений.

## Результаты

### Получение фракций, содержащих вирусные частицы

После проведения всех этапов центрифугирования отбирали фракции с наибольшим содержанием вирусных частиц, которое оценивали по количеству N-белка во фракциях. Этот белок — мажорный в составе вируса SARS-CoV-2 [6], поэтому по его количеству можно судить о концентрации целевого вируса. Методом электрофореза в полиакриламидном геле в редуцирующих условиях визуализировали фракции (рис. 1), затем с помощью программы imageJ количественно оценивали бэнды на геле и выбирали фракции с наибольшим количеством вирусного мажорного N-белка (молекулярная масса 50 кДа) и с наименьшим количеством БСА (молекулярная масса 69 кДа) (рис. 2). Необходимость очистки стандартного вирусного образца от БСА объясняется тем, что при иммунизации животных данным стандартом образовывались бы антитела не только на вирусный стандарт SARS-CoV-2,

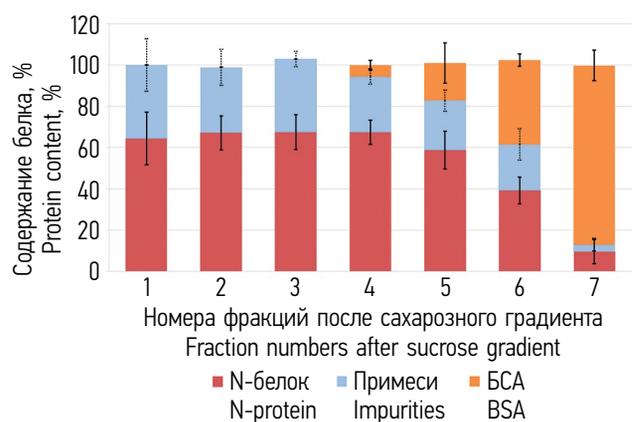


**Рис. 1.** Пример полиакриламидного геля. Номерами отмечены фракции, собранные после ультрацентрифугирования. Фракции с наибольшей степенью чистоты от БСА и с наибольшим содержанием целевого N-белка выделены рамкой. Стрелками указаны полосы: *a* — N-белка; *b* — БСА; *c* — примесных белков. БСА — бычий сывороточный альбумин

**Fig. 1.** An example of polyacrylamide gel. Fractions collected after ultracentrifugation are marked with numbers. Fractions with the highest degree of purity from BSA and with the highest content of N-protein are in a highlight box. Arrows indicate: *a* — N-protein band; *b* — BSA band; *c* — impurity protein bands. BSA — bovine serum albumin

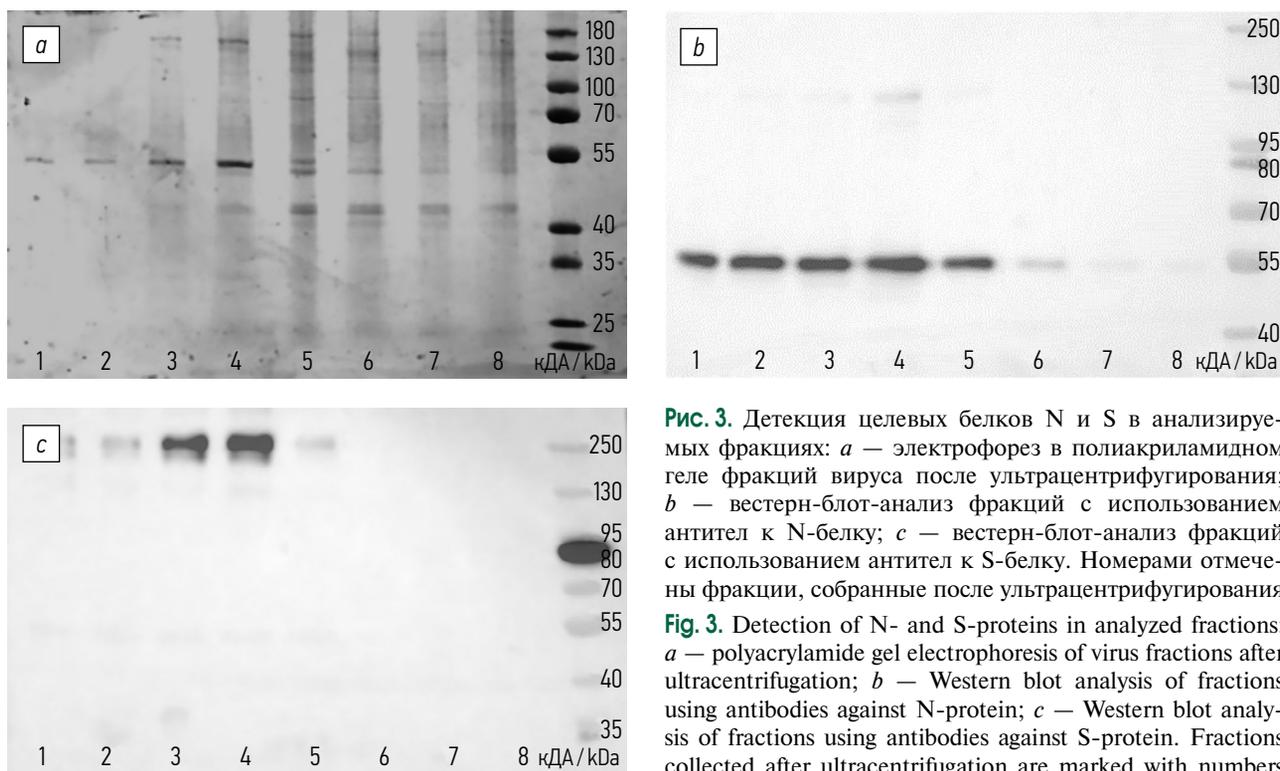
но и на БСА, что искажало бы результаты в тест-системах ИФА для оценки содержания вирусного антигена в цельновирсионных вакцинах. Кроме того, для вакцинных препаратов существуют требования по содержанию БСА [7].

Таким образом, разработанная методика очистки SARS-CoV-2 позволила получить суспензию вируса, очищенную от БСА, с выходом около 60 % (рис. 2, фракции 1–4).



**Рис. 2.** Количественное представление результатов электрофореза в полиакриламидном геле. Номерами отмечены фракции, собранные после ультрацентрифугирования. Цветом обозначены подсчитанные в программе imageJ бэнды белков на геле. Результаты представлены как среднее со стандартной ошибкой. Количество независимых экспериментов — 3. БСА — бычий сывороточный альбумин

**Fig. 2.** Quantification of proteins on polyacrylamide gel. Fractions collected after ultracentrifugation are marked with numbers. The color indicates the protein bands calculated in imageJ program. Results are presented as mean with standard error. Number of independent experiments,  $n = 3$ . BSA — bovine serum albumin

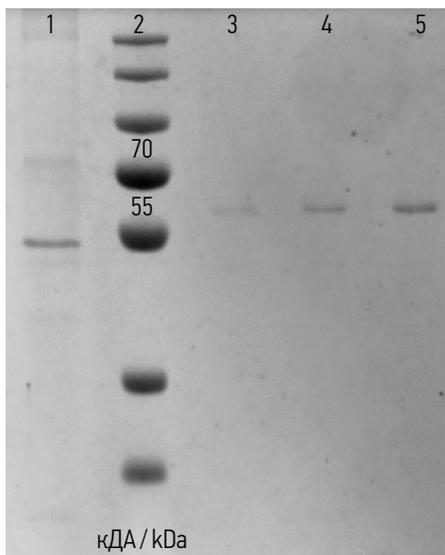


**Рис. 3.** Детекция целевых белков N и S в анализируемых фракциях: *a* — электрофорез в полиакриламидном геле фракций вируса после ультрацентрифугирования; *b* — вестерн-блот-анализ фракций с использованием антител к N-белку; *c* — вестерн-блот-анализ фракций с использованием антител к S-белку. Номерами отмечены фракции, собранные после ультрацентрифугирования

**Fig. 3.** Detection of N- and S-proteins in analyzed fractions: *a* — polyacrylamide gel electrophoresis of virus fractions after ultracentrifugation; *b* — Western blot analysis of fractions using antibodies against N-protein; *c* — Western blot analysis of fractions using antibodies against S-protein. Fractions collected after ultracentrifugation are marked with numbers

#### Выбор фракций с содержанием целых вирусных частиц

Для подтверждения наличия целовирионных частиц определяли, в каких фракциях содержатся целевые белки N и S методом вестерн-



**Рис. 4.** Оценка количества целевого N-белка в стандарте SARS-CoV-2 и чистоты от БСА. 1 — полученный стандарт, разведенный в 2 раза; 2 — белковый маркер; 3–5 — БСА в концентрациях 2,5, 5, 10 мкг/мл соответственно. БСА — бычий сывороточный альбумин

**Fig. 4.** Evaluation of the amount of N-protein in the SARS-CoV-2 standard and the purity from BSA. 1 — obtained standard, diluted 2 times; 2 — protein marker; 3–5 — BSA with concentrations 2.5 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml, respectively. BSA — bovine serum albumin

блота (рис. 3). На поликриламидном геле обнаружено, что фракции с наибольшей чистотой от примесных белков, БСА и наибольшим содержанием N-белка (рис. 3, фракции 1–4) соответствовали тем же фракциям (1–4) на вестерн-блоте, у которых наблюдалось свечение на уровне молекулярной массы 55 кДа, что соответствует N-белку (рис. 3, *b*), и на уровне молекулярной массы ~200 кДа, что соответствует S-белку (рис. 3, *c*).

Таким образом, присутствие целевых белков N и S во фракциях 1–4 после ультрацентрифугирования подтвердило наличие в них целовирионного антигена.

#### Оценка чистоты и количества антигена в полученном вирусном образце

Опираясь на полученные выше результаты оценки содержания N-белка, БСА (рис. 1 и 2) и целовирионных частиц (рис. 3) в собранных вирусных фракциях, были объединены фракции 1–4. Полученные фракции очистили от сахарозы и сконцентрировали на центрифужных ультрафильтрах Амикон 50 кДа. Далее пробу охарактеризовали на содержание в ней БСА и количество целевого N-белка, а также на наличие бактериальных эндотоксинов.

Используя калибровочный график с разведениями по БСА, количественно оценили содержание N-белка и проверили фракции на чистоту от БСА (рис. 4). Для достоверности результата обсчитывали три полиакриламидных геля. В пробе БСА не был обнаружен, о чем говорит отсутствие в образце полосы на уровне молеку-

лярной массы 69 кДа. Расчет количества N-белка (а значит, и количества целевого вируса) показал значение  $24,4 \pm 3$  мкг/мл.

Используя набор гель-тромб-теста ЛАЛ, мы определили количество эндотоксинов в образце — менее 7,68 ЕЭ/мл.

### Обсуждение

Полученные значения концентрации и чистоты вирусных частиц в пробе удовлетворительны для дальнейшего использования образца как стандартного в тест-системах ИФА для мониторинга количества антигена в цельновирионных вакцинах против коронавирусной инфекции, а также для исследований структуры вируса. Эта методика успешно применялась для изучения структурных особенностей SARS-CoV-2. В исследовании сравнивали два метода очистки инактивированного вирусного концентрата. Наравне с ультрацентрифугированием использовали хроматографическую очистку методом гель-фильтрации. Популяция частиц, полученных с использованием ультрацентрифугирования, была гомогенной: на изображениях почти полностью отсутствовал дебрис [8]. Однако для масштабирования и очистки вакцинного препарата данная методика не может быть использована. Стадии ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы сложно проводить на вирусных концентратах больших объемов. Однако спектр приложений, в которых данная методика применима, включает не только структурные исследования вирусной частицы SARS-CoV-2. Полученный с помощью ультрацентрифугирования антиген также может быть использован для иммунизации животных и получения антител для тест-систем ИФА на измерение количества антигена в цельновирионных вакцинах против вируса SARS-CoV-2. Данный способ очистки может быть применим для вирусов со схожей структурой и использован в аналитических методиках.

Отдельно стоит пояснить причину выбора N-белка как целевого для получения стандартного вирусного образца. Нуклеокапсидный N-белок — мажорный в структуре вируса SARS-CoV-2 [6], а молекулярная масса белка 55 кДа, поэтому его удобно детектировать электрофоретическим методом. Кроме того, мы подбирали оптимальные условия получения стандарта для изучения именно цельновирионных вакцин, следовательно, оценивать количество целых вирионов корректно по наиболее представленному и эволюционно консервативному N-белку. Более того, N-белок, так же как и S-белок, вызывает иммунный ответ и может применяться как антиген в иммунологических исследованиях [9].

### Дополнительная информация

**Источник финансирования.** Статья не имеет спонсорской поддержки.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанного с подготовкой и публикацией статьи.

**Вклад авторов.** Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией. Наибольший вклад распределен следующим образом: *А.Н. Зырина, И.О. Целых, А.С. Богдан* — проведение экспериментальных исследований, обработка и анализ результатов; *А.Н. Зырина, А.С. Богдан* — написание текста статьи; *А.А. Шишова, А.Н. Пиняева* — редактирование статьи; *А.А. Ковпак, Ю.Ю. Ивин, В.Е. Василенко* — получение вирусного концентрата SARS-CoV-2.

### Additional information

**Funding sources.** The article has no sponsorship.

**Competing interests.** The authors declare the absence of obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

**Authors' contribution.** All authors made a significant contribution to the development of the concept and preparation of the article, read and approved the final version before publication. The largest contribution is distributed as follows: *A.N. Zyrina, I.O. Tselykh, A.S. Bogdan* — conducting experimental studies, processing and analyzing the results; *A.N. Zyrina, A.S. Bogdan* — writing the text of the article; *A.A. Shishova, A.N. Pinyaeva* — editing the article; *A.A. Kopyak, Yu.Yu. Ivin, V.E. Vasilenko* — obtaining a viral concentrate of SARS-CoV-2.

### Список литературы

1. Fan S., Xiao K., Li D. et al. Preclinical immunological evaluation of an intradermal heterologous vaccine against SARS-CoV-2 variants // *Emerg. Microbes Infect.* 2022. Vol. 11, No. 1. P. 212–226. DOI: 10.1080/22221751.2021.2021807
2. Che Y., Liu X., Pu Y. et al. Randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 2 trial of an inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 vaccine in healthy adults // *Clin. Infect. Dis.* 2021. Vol. 73, No. 11. P. e3949–e3955. DOI: 10.1093/cid/ciaa1703
3. Saagar V.K. Virus purification, detection and removal [dissertation]. Michigan Technological University, 2014. DOI: 10.37099/mtu.dc.etsd/850
4. Kozlovskaya L.I., Pinaeva A.N., Ignatyev G.M. et al. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in pre-clinical studies // *Emerg. Microbes Infect.* 2021. Vol. 10, No. 1. P. 1790–1806. DOI: 10.1080/22221751.2021.1971569
5. Limulus amoebocyte lysate [Электронный ресурс] // Endosafe. USA. License No.1197. Режим доступа: <https://limulustest.com>

- ru/upload/iblock/625/LAL-Reagent %20Endosafe.PDF. Дата обращения: 08.06.2022.
- Cubuk J., Alston J.J., Incicco J.J. et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA // *Nat. Commun.* 2021. Vol. 12, No. 1. P. 1936. DOI: 10.1038/s41467-021-21953-3
  - ОФС.1.2.3.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле // Государственная фармакопея Российской Федерации XIV.
  - Bagrov D.V., Glukhov G.S., Moiseenko A.V. et al. Structural characterization of  $\beta$ -propiolactone inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2) particles // *Microsc. Res. Tech.* 2022. Vol. 85, No. 2. P. 562–569. DOI: 10.1002/jemt.23931
  - Bai Z., Cao Y., Liu W., Li J. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation // *Viruses.* 2021. Vol. 13, No. 6. P. 1115. DOI: 10.3390/v13061115
  - ry syndrome coronavirus 2 vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis.* 2021;73(11):e3949–e3955. DOI: 10.1093/cid/ciaa1703
  - Saagar VK. Virus purification, detection and removal [dissertation]. Michigan Technological University; 2014. DOI: 10.37099/mtu.dc.etsd/850
  - Kozlovskaya LI, Piniava AN, Ignatyev GM, et al. Long-term humoral immunogenicity, safety and protective efficacy of inactivated vaccine against COVID-19 (CoviVac) in preclinical studies. *Emerg Microbes Infect.* 2021;10(1):1790–1806. DOI: 10.1080/22221751.2021.1971569
  - Limulus amoebocyte lysate [Internet]. Endosafe. USA. License No. 1197. Available from: <https://limulustest.ru/upload/iblock/625/LAL-Reagent %20Endosafe.PDF>. Accessed: 08.06.2022.
  - Cubuk J, Alston JJ, Incicco JJ, et al. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein is dynamic, disordered, and phase separates with RNA. *Nat Commun.* 2021;12(1):1936. DOI: 10.1038/s41467-021-21953-3
  - ОФС.1.2.3.0023.15. Электрофорез в полиакриламидном геле. *Государственная фармакопея Российской Федерации XIV.* (In Russ.)
  - Bagrov DV, Glukhov GS, Moiseenko AV, et al. Structural characterization of  $\beta$ -propiolactone inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV-2) particles. *Microsc Res Tech.* 2022;85(2):562–569. DOI: 10.1002/jemt.23931
  - Bai Z, Cao Y, Liu W, Li J. The SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and its role in viral structure, biological functions, and a potential target for drug or vaccine mitigation. *Viruses.* 2021;13(6):1115. DOI: 10.3390/v13061115

## References

- Fan S, Xiao K, Li D, et al. Preclinical immunological evaluation of an intradermal heterologous vaccine against SARS-CoV-2 variants. *Emerg Microbes Infect.* 2022;11(1):212–226. DOI: 10.1080/22221751.2021.2021807
- Che Y, Liu X, Pu Y, et al. Randomized, double-blinded, placebo-controlled phase 2 trial of an inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 vaccine in healthy adults. *Clin Infect Dis.* 2021;73(11):e3949–e3955. DOI: 10.1093/cid/ciaa1703

## Информация об авторах / Information about the authors

ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН, Москва, Россия

Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Анна Николаевна Зырина — канд. биол. наук, микробиолог группы разработки и валидации методик. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3675-8361>; Scopus Author ID: 57041299900; e-mail: zyrina22anna@gmail.com

Anna N. Zyrina — Cand. Sci. (Biol.), Microbiologist of Analytical Method Development and Validation Team. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3675-8361>; Scopus Author ID: 57041299900; e-mail: zyrina22anna@gmail.com

Ирина Олеговна Целых — микробиолог группы разработки и валидации методик. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7530-3925>; e-mail: will-uhm@mail.ru

Irina O. Tselykh — Microbiologist of Analytical Method Development and Validation Team. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7530-3925>; e-mail: will-uhm@mail.ru

Анастасия Александровна Ковпак — руководитель группы процессов очистки и формуляции готовых лекарственных форм. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3200-763X>; Scopus Author ID: 57218547079; e-mail: kovpak\_aa@chumakovs.su

Anastasia A. Kovpak — Head of Team of Purification Processes and Finished Dosage Forms Formulation. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3200-763X>; Scopus Author ID: 57218547079; e-mail: kovpak\_aa@chumakovs.su

Юрий Юрьевич Ивин — заместитель начальника управления разработки и внедрения инновационных и полупромышленных технологий. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0995-7944>; Scopus Author ID: 57218552209; e-mail: ivin\_uu@chumakovs.su

Yury Yu. Ivin — Deputy Head of Division of Development and Integration of Innovative and Semi-industrial Technologies. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0995-7944>; Scopus Author ID: 57218552209; e-mail: ivin\_uu@chumakovs.su

*Владислав Евгеньевич Василенко* — руководитель группы ферментации и культивирования.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7980-0921>;  
ResearcherID: A-1043-2015;  
Scopus Author ID: 41361884300;  
e-mail: [vasilenko\\_ve@chumakovs.su](mailto:vasilenko_ve@chumakovs.su)

*Анастасия Николаевна Пиняева* — начальник управления разработки и внедрения инновационных и полупромышленных технологий.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5381-2393>;  
Scopus Author ID: 57218545661;  
e-mail: [pinyaeva\\_an@chumakovs.su](mailto:pinyaeva_an@chumakovs.su)

*ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН, Москва, Россия*

*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*ФГБОУ ВО МИРЭА — Российский технологический университет, Москва, Россия*  
*MIREA — Russian Technological University, Moscow, Russia*

*Анастасия Сергеевна Богдан* — лаборант группы разработки и валидации методик; бакалавр Института тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова.  
E-mail: [nastyabog1346@gmail.com](mailto:nastyabog1346@gmail.com)

*Vladislav E. Vasilenko* — Head of Fermentation and Cultivation Team.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7980-0921>;  
ResearcherID: A-1043-2015;  
Scopus Author ID: 41361884300;  
e-mail: [vasilenko\\_ve@chumakovs.su](mailto:vasilenko_ve@chumakovs.su)

*Anastasia N. Pinyaeva* — Head of Division of Development and Integration of Innovative and Semi-industrial Technologies.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5381-2393>;  
Scopus Author ID: 57218545661;  
e-mail: [pinyaeva\\_an@chumakovs.su](mailto:pinyaeva_an@chumakovs.su)

*Anastasia S. Bogdan* — group laboratory assistant of Analytical Method Development and Validation Team; Bachelor of M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies.  
E-mail: [nastyabog1346@gmail.com](mailto:nastyabog1346@gmail.com)

*ФГАНУ «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова» РАН, Москва, Россия*

*Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

*ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), Москва, Россия*  
*Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia*

*Анна Андреевна Шишова* — научный сотрудник лаборатории биохимии; старший преподаватель Института трансляционной медицины и биотехнологии.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5907-0615>;  
Scopus Author ID: 57222487150;  
e-mail: [shishova\\_aa@chumakovs.su](mailto:shishova_aa@chumakovs.su)

*Anna A. Shishova* — Research Associate in Laboratory of Biochemistry; Senior Lecturer in Institute for Translational Medicine and Biotechnology.  
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5907-0615>;  
Scopus Author ID: 57222487150;  
e-mail: [shishova\\_aa@chumakovs.su](mailto:shishova_aa@chumakovs.su)

#### ✉ Контактное лицо / Corresponding author

*Анна Николаевна Зырина / Anna N. Zyrina*

Адрес: Россия, 108819, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1  
Address: Premises 8, building 1, Village of Institute of Poliomyelitis, Settlement, Moscow, Russia  
E-mail: [zyrina22anna@gmail.com](mailto:zyrina22anna@gmail.com)