

Разработка и получение ДНК-иммуногена на основе генов SARS-CoV-2

Анастасия А. Рябченкова	¹	riabchenkova@service-gene.ru	 0000-0002-9973-0753
Елизавета Р. Чирак	¹	chirak.elizaveta@service-gene.ru	 0000-0002-1610-8935
Евгений Л. Чирак	¹	chirak.evgenii@service-gene.ru	 0000-0001-9167-5000
Николай Н. Колмаков	²	kolmakov@service-gene.ru	 0000-0002-4672-6208
Владимир В. Копать	¹	kopat@service-gene.ru	 0000-0002-6573-6743
Илья В. Духовлинов	¹	atg@service-gene.ru	 0000-0002-5268-9802

1 ООО «АТГ Сервис Ген», пр-кт Малый В.О., д.57, г. Санкт-Петербург, 199178, Россия

2 Институт экспериментальной медицины, г. Санкт-Петербург, 197376, Россия

Аннотация. В связи с развитием пандемии и необходимостью массовой вакцинации разработка вакцин нового поколения против коронавирусной инфекции COVID-19 является важнейшей задачей медицины и биотехнологии. Ввиду распространенности COVID-19, все еще актуально создание безопасной и протективной вакцины, особенно стимулирующей Т-клеточный иммунный ответ. В работе представлены разработка и получение ДНК-иммуногена на основе плазмидной ДНК, кодирующей гибридный белок, содержащий иммуногенные фрагменты структурных белков β -коронавируса SARS-CoV-2. В результате методами генной инженерии была создана векторная конструкция на основе плазмидной ДНК, кодирующей гибридный белок, содержащий наиболее иммуногенные участки структурных белков М, S, N, Е β -коронавируса SARS-CoV-2, для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих; методом электропорации был создан штамм *E.coli* – продуцент ДНК-иммуногена; разработан метод очистки рекомбинантной плазмидной ДНК на основе последовательного постадийного процесса: данная методика позволила получить 100 мг ДНК-иммуногена pCMV-3Tag-3a-CVVV3 в растворе с концентрацией 1 мг/мл (100 мл), соответствующих установленным в Государственной Фармакопее РФ (ОФС.1.7.1.0013.18 ДНК-вакцины) параметрам качества – полученный результат стабильно воспроизводится в лабораторных условиях; были отработаны методики контроля качества плазмидной ДНК и проверена экспрессия гибридного белка методом Вестерн-блоттинга. Было показано, что антиген CVVV3 специфически связывается с иммуноглобулинами IgG из кроличьих сывороток после иммунизации ДНК-иммуногеном pCMV-3Tag-3a-CVVV3. Доля суперспирализованной плазмидной ДНК в образце ДНК-иммуногена pCMV-3Tag-3a-CVVV3 составила 85,64%, содержание эндотоксинов – менее 25 ЕЭ/мг; концентрация остаточных белков штамма-продуцента в растворе 1 мг/мл ДНК-иммуногена pCMV-3Tag-3a-CVVV3 составила менее 100нг на 1 мл (мг суммарной рекомбинантной ДНК).

Ключевые слова: SARS-CoV 2, ДНК-иммуноген, гибридный белок, экспрессия.

Development and production of DNA-immunogen based on SARS-CoV-2 genes

Anastasia A. Riabchenkova	¹	riabchenkova@service-gene.ru	 0000-0002-9973-0753
Elizaveta R. Chirak	¹	chirak.elizaveta@service-gene.ru	 0000-0002-1610-8935
Evgenii L. Chirak	¹	chirak.evgenii@service-gene.ru	 0000-0001-9167-5000
Nikolai N. Kolmakov	²	kolmakov@service-gene.ru	 0000-0002-4672-6208
Vladimir V. Kopat	¹	kopat@service-gene.ru	 0000-0002-6573-6743
Ilya V. Dukhovlinov	¹	atg@service-gene.ru	 0000-0002-5268-9802

1 ATG Service Gene LLC, Maly V.O. Ave., 57, St. Petersburg, 199178, Russia

2 Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, 197376, Russia

Abstract. Due to the development of the pandemic and the need for mass vaccination, the development of next-generation vaccines against COVID 19 coronavirus infection is a major challenge for medicine and biotechnology. Due to the prevalence of COVID 19, it is still urgent to develop a safe and protective vaccine, especially one that stimulates T-cell immune response. This work presents the design and production of a DNA immunogen based on plasmid DNA encoding a hybrid protein containing immunogenic fragments of structural proteins of SARS-CoV 2 β -coronavirus. As a result, a vector construct based on plasmid DNA encoding a hybrid protein containing the most immunogenic parts of structural proteins M, S, N, E of SARS-CoV 2 β -coronavirus was created by genetic engineering methods for transient expression in mammalian cells; a strain of *E. coli*, a producer of DNA-coronavirus β -coronavirus, was created by electroporation. coli, a DNA-immunogen producer; a method of purification of recombinant plasmid DNA was developed on the basis of a sequential step-by-step process: this method allowed to obtain 100 mg of DNA-immunogen pCMV 3Tag 3a-CVVV3 in a solution with a concentration of 1 mg/mL (100 mL), which corresponds to the concentration established in the State Pharmacopoeia of the Russian Federation (OFS.1.7.1.0013.0013.1). .7.1.0013.18 DNA-vaccines quality parameters - the obtained result is stably reproduced in laboratory conditions; methods of plasmid DNA quality control were worked out and expression of hybrid protein was tested by Western blotting. The CVVV3 antigen was shown to bind specifically to IgG immunoglobulins from rabbit sera after immunization with pCMV 3Tag 3a-CVVV3 DNA-immunogen. The proportion of superhelicalized plasmid DNA in the sample of DNA-immunogen pCMV 3Tag 3a-CVVV3 was 85.64 %, the content of endotoxins was less than 25 U/mg; the concentration of residual proteins of the strain-producer in a solution of 1 mg/ml of DNA-immunogen pCMV 3Tag 3a-CVVV3 was less than 100ng per 1 ml (mg of total recombinant DNA).

Keywords: SARS-CoV 2, DNA-immunogen, hybrid protein, expression.

Для цитирования

Рябченкова А.А., Чирак Е.Р., Чирак Е.Л., Колмаков Н.Н., Копать В.В., Духовлинов И.В. Разработка и получение ДНК-иммуногена на основе генов SARS-CoV-2 // Вестник ВГУИТ. 2023. Т. 85. № 4. С. 96–101. doi:10.20914/2310-1202-2023-4-96-101

For citation

Riabchenkova A.A., Chirak E.R., Chirak E.L., Kolmakov N.N., Kopat V.V., Dukhovlinov I.V. Development and production of DNA-immunogen based on SARS-CoV-2 genes. Vestnik VGUIT [Proceedings of VSUET]. 2023. vol. 85. no. 4. pp. 96–101. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2023-4-96-101

Введение

Возбудителем COVID-19 является бета-коронавирус SARS-CoV-2, распознанный в качестве патогена посредством секвенирования метагеномной РНК и выделения вируса из образцов жидкости бронхоальвеолярного лаважа пациентов с тяжелой пневмонией [10].

За последний год был достигнут огромный прогресс в создании эффективных вакцин против SARS-CoV-2. Согласно предварительному проекту ВОЗ по вакцинам, в настоящее время 172 вакцины-кандидата находятся в стадии доклинической разработки, 63 – в стадии клинической разработки, 6 из которых основаны на технологии плазмидной ДНК [1]. Эти вакцины могут легко производиться бактериями в больших количествах, их производство достаточно просто масштабируется и менее затратно по сравнению с иными вариантами вакцин [4].

На данный момент высказываются опасения по поводу безопасности и эффективности вакцин, разрабатываемых на основе различных технологических платформ. Важно, чтобы на введение вакцины не возникло аутоиммунной перекрестной реактивности за счет присутствия в активных агентах вакцины участков, гомологичных участкам генома человека [8]. Кроме того, предпочтительнее использование вакцин, которые также действенны против мутировавших штаммов нового коронавируса.

Разработанные на данный момент вакцины недостаточно эффективны от мутирующих штаммов, поскольку содержат в себе в том числе неконсервативные последовательности S белка [7]. Поэтому актуальна разработка ДНК-иммуногена, безопасного и активного против мутирующих штаммов SARS-CoV-2.

Цель работы – разработка и получение ДНК-иммуногена на основе плазмидной ДНК, кодирующей иммуногенные фрагменты структурных белков нового β -коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего коронавирусную инфекцию 2019 (COVID-19).

Материалы и методы

Полноразмерная последовательность генома базового дикого типа SARS-CoV-2 была получена с сайта NCBI (NC_045512.2). Наиболее иммуногенные (клеточный иммунный ответ) фрагменты структурных белков M, S, N, E SARS-CoV-2 выбрали с помощью программы “CD4 T cell immunogenicity prediction” [2]. Участки белков, содержащие наибольшее количество иммуногенных фрагментов, объединили с помощью полиглициновых линкеров. Выводили полученную последовательность с помощью BLAST против белков человека, чтобы убедиться в отсутствии сходства. Для экспрессии в эукариотических клетках к гибридной

последовательности также добавили транспортный сигнал белка ИГФ человека, последовательность Козака и старт-кодон.

Синтез гибридной последовательности с последующей вставкой в экспрессионный вектор pCMV-3Tag-3a был произведен на коммерческой основе в компании GenScript (США). Полученную плазмиду pCMV-3Tag-3a-CVVV3 нарабатывали в клетках *E. coli* DH5. Подлинность плазмиды подтверждали методом ПЦР, рестрикцией по сайтам клонирования BamHI и XhoI и секвенированием по Сэнгеру.

Выделение плазмидной ДНК из биомассы *E. coli* осуществляли методом щелочного лизиса. Осадок ДНК растворяли в воде и обрабатывали РНКазой А. Для последующей хроматографической очистки использовали последовательно анионообменную, гидрофобную и вновь анионообменную хроматографию.

Определение доли содержания суперспирализованных топоизомеров плазмидной ДНК производили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиенте натрия хлорида (Gen-Pak FAX, NP, АХС 4,6·100 мм 2,5 мкм, (Waters, США)). Отсутствие РНК проверяли по отсутствию диффузной полосы в области 200–500 пар нуклеотидов в 1% агарозном геле. Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводили с помощью ЛАЛ-теста (Pyrotell) согласно рекомендациям производителя. Определение содержания остаточных белков осуществляли методом твердофазного ИФА с помощью набора Cygnus *E. coli* Host Cell Proteins (Cygnus, № F410, США) согласно инструкции к набору.

Суммарные кроличьи антитела из сывороток крови получали двукратной иммунизацией с интервалом в 2 недели 6 самок кроликов породы Советская Шиншилла внутримышечно (в бедро) 2 мл следующей смеси: плазмидная ДНК – 0,2 мг/мл, полиэтиленмин – 1,2 мг/мл, Sabowax – 2%, глюкоза – 10%, бензиловый спирт – 0,3%. Выделение и очистку антител проводили высаждением насыщенным раствором сульфата аммония.

Наличие специфических антител к гибричному белку CVVV3 определяли с помощью Вестерн-блоттинга с использованием белка CVVV3 в качестве антигена (был наработан в культуре эукариотических клеток HEK293) и антител, выделенных из сыворотки кроликов. Использовали поликлональные антитела Goat Anti-Rabbit IgG conjugate (HRP) (EMD Millipore Corp, USA), специфичные к линейным участкам белковой молекулы. Образовавшиеся в месте локализации исследуемого белка иммунные комплексы проявлялись с помощью тетраметилбензидина (ТМБ). Как отрицательный контроль была использована сыворотка кроликов до иммунизации.

Результаты

Созданная конструкция (рисунок 1), представляет собой ДНК-иммуноген, кодирующий гибридный белок, состоящий из фрагментов основных белков М, S, N и Е коронавируса SARS-CoV-2. Химерный белок, экспрессирующийся в клетках млекопитающих, содержит 424 аминокислоты, имеет прогнозируемую массу 46,5 кДа и pI 9,61, является стабильным и его период полураспада у млекопитающих составляет около 100 часов [3].

В результате лизиса и хроматографической очистки из 1 кг биомассы получили 100 мг ДНК-иммуногена pCMV-3Tag-3a-CVVV3 в растворе с концентрацией 1 мг/мл.

Полученный образец проанализировали согласно ряду критериев, указанных в Государственной Фармакопее РФ (ОФС.1.7.1.0013.18

ДНК-вакцины). Время выхода суперспирализованной изоформы плазмидной ДНК составило 6,26 минут, площадь пика 85,64% (рисунок 2).

Концентрация эндотоксинов в растворе 1 мг/мл составила менее 25,0 ЕЭ на 1 мл, концентрация остаточных белков штамма-продуцента составила менее 100нг на 1 мл. Таким образом, по перечисленным критериям наш ДНК-иммуноген по перечисленным параметрам качества соответствует ГФ РФ.

Из кроличьих сывороток было получено 30 мл суммарных иммуноглобулинов с концентрацией 10 мкг/мл. Антиген CVVV3, наработанный в линии эукариотических клеток HEK293, специфически связывается с иммуноглобулинами IgG из кроличьих сывороток после иммунизации ДНК-иммуногеном pCMV-3Tag-3A-CVVV3 (рисунок 3).

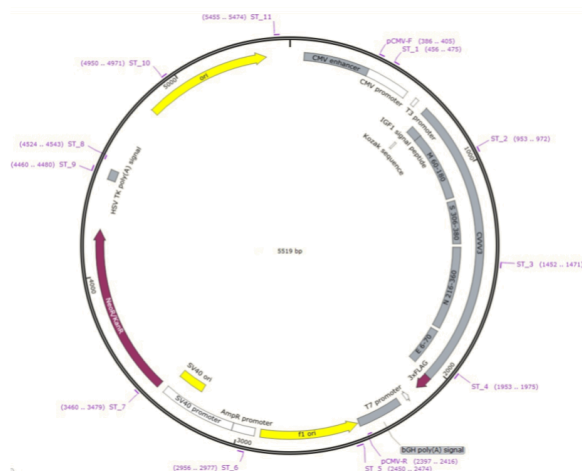


Рисунок 1. Структура плазмиды pCMV-3Tag-3a-CVVV3 с праймерами, необходимыми для секвенирования вектора вместе со вставкой

Figure 1. Structure of plasmid pCMV 3Tag 3a-CVVV3 with primers required for sequencing the vector together with the insert

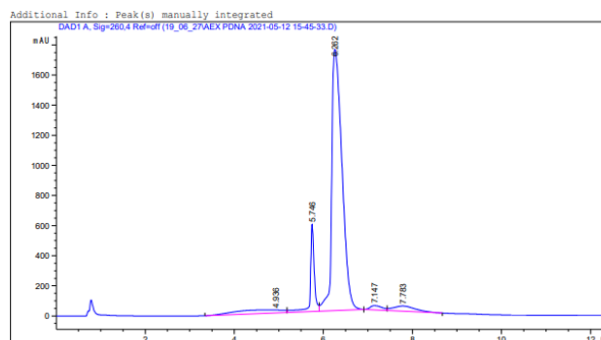


Рисунок 2. Анализ образца pCMV-3Tag-3A-CVVV3 с помощью ВЭЖХ. Суперспирализованная изоформа – пик на 6,26 мин

Figure 2. Analysis of the pCMV 3Tag 3A-CVVV3 sample by HPLC. Superspiralized isoform - peak at 6.26 min

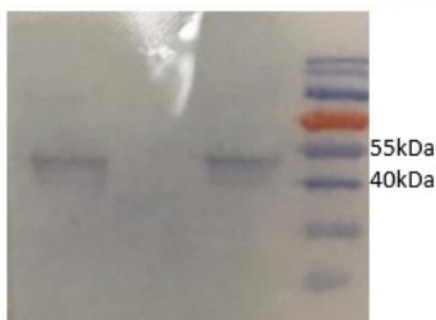


Рисунок 3. Проверка экспрессии гибридного белка методом Вестерн-блоттинга. Образец рекомбинантного белка CVVV3, наработанный в культуре клеток HEK293, нанесен в двух нагрузках. Source: Составлено авторами

Figure 3. Verification of hybrid protein expression by Western blotting. A sample of recombinant CVVV3 protein produced in HEK293 cell culture was plated in two loads. Source: Compiled by the authors

Обсуждение

В ходе работы был разработан и очищен ДНК-иммуноген для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих, содержащий иммуногенные участки структурных белков М, S, N, Е β -коронавируса SARS-CoV-2.

Также была подтверждена экспрессия закодированного в нём рекомбинантного белка CVVV3 в клетках млекопитающих. Метод Вестерн-блоттинга позволил оценить формирование гуморального иммунного ответа на антиген CVVV3 и предварительно оценить его использование для разработки метода, аналогичного иммунофлуоресцентному анализу [4].

Кролики были двукратно иммунизированы pCMV-3Tag-3a-CVVV3 с адъювантным комплексом ПЭИ-Sabowax, поскольку существуют

трудности в достижении достаточной иммуногенности ДНК-вакцин [5]. Также возможен вариант интраназальной иммунизации с добавлением адьюванта.

Разработанная технология получения ДНК-иммуногена приводит к выходу 0,1 мг/г, выходы зависят большей частью от процесса ферментации и производственных мощностей [9]. Для наработки большего количества ДНК-иммуногена процесс ферментации будет усовершенствован.

Разработана схожая ДНК-вакцина ZyCoV-D, кодирующая фрагменты S-белка SARS-CoV-2. Кандидатная ДНК-вакцина индуцирует в том числе нейтрализующие антитела и обеспечивает ответ Th-1, о чем свидетельствуют повышенные уровни IFN- γ (Momin, 2021). Дизайн нашего ДНК-иммуногена позволяет прогнозировать схожие данные исследований иммуногенности и безопасности.

Заключение

Разработана плазида pCMV-3Tag-3a-CVVV3, кодирующая гибридный белок, содержащий иммуногенные участки структурных белков M, S, N, E β -коронавируса SARS-CoV-2, для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих. Данный ДНК-иммуноген рассматривается как перспективная кандидатная вакцина против SARS-CoV-2. Методом Вестерн-блоттинга подтверждена экспрессия гибридного белка CVVV3 в клетках млекопитающих. Усиление иммуногенных свойств ДНК-иммуногена pCMV-3Tag-3a-CVVV3 возможно изменением способа введения на интраназальный или внутрикожный. Созданный ДНК-иммуноген отвечает критериям кандидатной вакцины против COVID-19 нового поколения и в дальнейшей работе будет изучена иммуногенность и протективность.

Литература

- 1 Dey A. Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models // Vaccine. 2021. V. 39. № 30. P. 4108–4116.
- 2 Dhandha S.K. Prediction of HLA CD4 immunogenicity in human populations // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 1369.
- 3 Пат. № 2747762, RU, A61K 39/215, A61P 31/14, C12Q 1/6806, C07K 16/10, C12N 15/50. Вакцина для профилактики или лечения коронавирусной инфекции на основе генетической конструкции / Духовлинов И.В., Федорова Е.А., Колмаков Н.Н., Чирак Е.Л., Алексеев А.В. № 2020112937; Заявл. 05.04.2020; Оpubл. 13.05.2021, Бюл. № 14.
- 4 He Q. Development of a Western Blot Assay for Detection of Antibodies against Coronavirus Causing Severe Acute Respiratory Syndrome // Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2004. V. 11. № 2. P. 417–422.
- 5 Lee J. Engineering DNA vaccines against infectious diseases // Acta Biomater. 2018. V. 80. P. 31–47.
- 6 Momin T. Safety and Immunogenicity of a DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India // EclinicalMedicine. 2021. V. 38.
- 7 Rodrigues João P.G.L.M. Insights on cross-species transmission of SARS-CoV-2 from structural modeling // PLoS Comput Biol. 2020. V. 16. № 12.
- 8 Vojdania A., Kharrazianb D. Potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 and human tissue with a possible link to an increase in autoimmune diseases // Clinical Immunology. 2020. V. 217. P. 1–2.
- 9 Williams J.A. Generic plasmid DNA production platform incorporating low metabolic burden seed-stock and fed-batch fermentation processes // Biotechnol Bioeng. 2010. V. 103. № 6. P. 1129–1143.
- 10 Zhao J. Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel coronavirus disease 2019 // Clin. Infect. Dis. 2020. V. 71. № 16. P. 2027–2034.
- 11 Чашин В.П., Гудков А.Б., Попова О.Н., Одланд Ю.О. и др. Характеристика основных факторов риска нарушений здоровья населения, проживающего на территориях активного природопользования в Арктике // Экология человека. 2014. № 1. С. 3–12.
- 12 Контарович А.Э., Коржубаев А.Г., Эдер Л.В. Прогноз глобального энергообеспечения: методология, количественные оценки, практические выводы // Минеральные ресурсы России. Экономика и управление. 2006. № 5. С. 18–27.
- 13 Раскина Т.А., Пирогова О.А., Зобнина О.В., Пинтова, Г.А. Показатели системы остеокластогенеза у мужчин с различными клиническими вариантами анкилозирующего спондилита // Современная ревматология. 2015. Т. 9. № 2. С. 23–27. doi: 10.14412/1996-7012-2015-2-23-27
- 14 Новиков А.А., Смоленский А.В., Михайлова А.В. Подходы к оценке показателей вариабельности сердечного ритма (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2023. Т. 17. № 3. С. 85–94.
- 15 Абдурахманов Г.М., Лопатин И.К., Исмаилов Ш.И. Основы зоологии и зоогеографии. Москва: Академия, 2001.
- 16 Кондратьев В.Б. Глобальная фармацевтическая промышленность // Отрасли и сектора глобальной экономики: особенности и тенденции развития. 2015. С. 226–249. URL: http://perspektivy.info/rus/ekob/globalnaja_farmaceuticheskaja_promyshlennost_2011-07-18.html
- 17 ГОСТ 8.586.5-2005. Государственная система обеспечения единства измерений. Измерение расхода и количества жидкостей и газов с помощью стандартных сужающих устройств. М.: Стандартинформ, 2007.
- 18 Ura T., Yamashita A., Mizuki N., Okuda K. et al. New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates // Vaccine. 2021. V. 39. № 2. P. 197–201.
- 19 Chavda V.P., Pandya R., Apostolopoulos V. DNA vaccines for SARS-CoV-2: toward third-generation vaccination era // Expert Review of Vaccines. 2021. V. 20. № 12. P. 1549–1560.
- 20 Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Shanshin D.V. et al. Immunogenic properties of the DNA construct encoding the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein // Molecular Biology. 2021. V. 55. P. 889–898.

References

- 1 Dey A. Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV 2 in animal models. *Vaccine*. 2021. vol. 39. no. 30. pp. 4108–4116.
- 2 Dhanda S.K. Prediction of HLA CD4 immunogenicity in human populations. *Front. Immunol.* 2018. vol. 9. pp. 1369.
- 3 Dukhovlinov I.V., Fedorova E.A., Kolmakov N.N., Chirak E.L., Alekseev A.V. Vaccine for the prevention or treatment of coronavirus infection based on a genetic design. Patent RF, no. 2747762, 2021.
- 4 He Q. Development of a Western Blot Assay for Detection of Antibodies against Coronavirus Causing Severe Acute Respiratory Syndrome. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2004. vol. 11. no. 2. pp. 417–422.
- 5 Lee J. Engineering DNA vaccines against infectious diseases. *Acta Biomater.* 2018. vol. 80. pp. 31–47.
- 6 Momin T. Safety and Immunogenicity of a DNA SARS-CoV 2 vaccine (ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India. *EClinicalMedicine*. 2021. vol. 38.
- 7 Rodrigues João P.G.L.M. Insights on cross-species transmission of SARS-CoV 2 from structural modeling. *PLoS Comput Biol.* 2020. vol. 16. no. 12.
- 8 Vojdania A., Kharrazianb D. Potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV 2 and human tissue with a possible link to an increase in autoimmune diseases. *Clinical Immunology*. 2020. vol. 217. pp. 1–2.
- 9 Williams J.A. Generic plasmid DNA production platform incorporating low metabolic burden seed-stock and fed-batch fermentation processes. *Biotechnol Bioeng.* 2010. vol. 103. no. 6. pp. 1129–1143.
- 10 Zhao J. Antibody responses to SARS-CoV 2 in patients of novel Antibody responses to SARS-CoV 2 in patients of novel coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.* 2020. vol. 71. no. 16. pp. 2027–2034.
- 11 Chashchin V.P., Gudkov A.B., Popova O.N., Odland Yu.O. et al. Characteristics of the main risk factors for health problems among the population living in areas of active environmental management in the Arctic. *Human Ecology*. 2014. no. 1. pp. 3–12. (in Russian).
- 12 Kontorovich A.E., Korzhubaev A.G., Eder L.V. Forecast of global energy supply: methodology, quantitative estimates, practical conclusions. *Mineral Resources of Russia. Economics and Management*. 2006. no. 5. pp. 18–27. (in Russian).
- 13 Raskina T.A., Pirogova O.A., Zobnina O.V., Pintova, G.A. Indicators of the osteoclastogenesis system in men with various clinical variants of ankylosing spondylitis. *Modern rheumatology*. 2015. vol. 9. no. 2. pp. 23–27. doi: 10.14412/1996-7012-2015-2-23-27 (in Russian).
- 14 Novikov A.A., Smolensky A.V., Mikhailova A.V. Approaches to assessing heart rate variability indicators (literature review). *Bulletin of new medical technologies. Electronic edition*. 2023. vol. 17. no. 3. pp. 85–94. (in Russian).
- 15 Abdurakhmanov G.M., Lopatin I.K., Ismailov Sh.I. *Fundamentals of zoology and zoogeography*. Moscow, Academy, 2001. (in Russian).
- 16 Kondratyev V.B. Global pharmaceutical industry. Industries and sectors of the global economy: features and development trends. 2015. pp. 226–249. Available at: http://perspektivy.info/rus/ekob/globalnaja_farmaceuticheskaja_promyshlennost_2011-07-18.html (in Russian).
- 17 GOST 8.586.5-2005. State system for ensuring the uniformity of measurements. Measurement of flow and quantity of liquids and gases using standard restriction devices. Moscow, Standartinform, 2007. (in Russian).
- 18 Ura T., Yamashita A., Mizuki N., Okuda K. et al. New vaccine production platforms used in developing SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Vaccine*. 2021. vol. 39. no. 2. pp. 197–201.
- 19 Chavda V.P., Pandya R., Apostolopoulos V. DNA vaccines for SARS-CoV-2: toward third-generation vaccination era. *Expert Review of Vaccines*. 2021. vol. 20. no. 12. pp. 1549–1560.
- 20 Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Shanshin D.V. et al. Immunogenic properties of the DNA construct encoding the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein. *Molecular Biology*. 2021. vol. 55. pp. 889–898.

Сведения об авторах

Анастасия А. Рябченкова научный сотрудник, ООО «АТГ Сервис Ген», 199178, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Васильевский, пр-кт Малый В.О., д.57, riabchenkova@service-gene.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9973-0753>

Елизавета Р. Чирак научный сотрудник, ООО «АТГ Сервис Ген», 199178, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Васильевский, пр-кт Малый В.О., д.57, Россия, chirak.elizaveta@service-gene.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1610-8935>

Евгений Л. Чирак научный сотрудник, ООО «АТГ Сервис Ген», 199178, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Васильевский, пр-кт Малый В.О., д.57, Россия, chirak.evgenii@service-gene.ru

<https://orcid.org/0000-0001-9167-5000>

Николай Н. Колмаков к.б.н., Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, Россия, kolmakov@service-gene.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4672-6208>

Information about authors

Anastasia A. Riabchenkova research scientist, LLC ATG Service Gene, 199034, Saint-Petersburg, int. ter. municipal district Vasilyevsky, pr-kt Maly V.O., 57, Russia, riabchenkova@service-gene.ru

<https://orcid.org/0000-0002-9973-0753>

Elizaveta R. Chirak research scientist, LLC ATG Service Gene, 199034, Saint-Petersburg, municipal district Vasilyevsky, pr-kt Maly V.O., 57, Russia, chirak.elizaveta@service-gene.ru

<https://orcid.org/0000-0002-1610-8935>

Evgenii L. Chirak research scientist, Limited Liability Company 'ATG Service Gene', 199034, Saint-Petersburg, municipal district Vasilyevsky, pr-kt Maly V.O., 57, Russia, chirak.evgenii@service-gene.ru

<https://orcid.org/0000-0001-9167-5000>

Nikolai N. Kolmakov Cand. Sci. (Biol.), Institution Institute of experimental medicine, 197376, St. Petersburg, Russia, kolmakov@service-gene.ru

<https://orcid.org/0000-0002-4672-6208>

Владимир В. Копать директор по развитию, ООО «АТГ Сервис Ген», 199178, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Васильевский, пр-кт Малый В.О., д.57, Россия, kopat@service-gene.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-6573-6743>

Илья В. Духовлинов к.б.н., директор по науке, ООО «АТГ Сервис Ген», 199178, г. Санкт-Петербург, вн. тер. г. муниципальный округ Васильевский, пр-кт Малый В.О., д.57, Россия, atg@service-gene.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-5268-9802>

Вклад авторов

Анастасия А. Рябченкова проведение исследования, написание текста, подготовка, создание опубликованной работы

Елизавета Р. Чирак участие в научном дизайне, написание текста, анализ и интерпретация полученных данных

Евгений Л. Чирак проведение исследования, сбор и обработка данных

Николай Н. Колмаков участие в научном дизайне

Владимир В. Копать концепция и дизайн исследования

Илья В. Духовлинов концепция и дизайн исследования

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Vladimir V. Kopat development director, Limited Liability Company 'ATG Service Gene', 199034, Saint-Petersburg, municipal district Vasilyevsky, pr-kt Maly V.O., 57, Russia, kopat@service-gene.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-6573-6743>

Ilya V. Dukhovlinov Cand. Sci. (Biol.), director of research, Limited Liability Company 'ATG Service Gene', 199034, Saint-Petersburg, municipal district Vasilyevsky, pr-kt Maly V.O., 57, Russia, atg@service-gene.ru

 <https://orcid.org/0000-0002-5268-9802>

Contribution

Anastasia A. Riabchenkova conducting research, writing text, preparing, creating a published work

Elizaveta R. Chirak participation in scientific design, text writing, analysis and interpretation of data obtained

Evgenii L. Chirak conducting research, collecting and processing data

Nikolai N. Kolmakov participation in scientific design

Vladimir V. Kopat study concept and design

Ilya V. Dukhovlinov study concept and design

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Поступила 06/10/2023	После редакции 28/10/2023	Принята в печать 17/11/2023
Received 06/10/2023	Accepted in revised 28/10/2023	Accepted 17/11/2023