

ОБЗОР

© Коллектив авторов

ПЕРСПЕКТИВЫ СОЗДАНИЯ ВАКЦИННЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ТИПА НА ОСНОВЕ ПСЕВДОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ (НА ПРИМЕРЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПОЛИОМИЕЛИТА)

Д.Д. Жданов^{1}, Ю.Ю. Ивин^{1,2}, А.Н. Шишпарёнок¹, С.В. Краевский¹, С.Л. Канащенко¹, Л.Е. Агафонова¹, В.В. Шумянцева^{1,3}, О.В. Гнеденко¹, А.Н. Пиняева^{1,2}, А.А. Ковпак¹, А.А. Ишмухаметов², А.И. Арчаков^{1,3}*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10; *эл. почта: zhdanovdd@mail.ru

²Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, 108819, Москва, поселение Московский, посёлок Института полиомиелита, домовладение 8, корп. 1

³Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, 117997, Москва, ул. Островитянова, 1

Традиционные противовирусные вакцины создаются с использованием химической инактивации вируса, чаще всего под действием формальдегида и β-пропиолактона. Данные подходы не оптимальны, поскольку негативно влияют на сохранность антигенных детерминант инактивированных частиц и требуют дополнительных стадий очистки. Наиболее перспективными для создания вакцин считают платформы на основе псевдовirusных частиц, то есть инактивированных вирусов, которые полностью сохранили наружную оболочку, при этом потеряв способность к размножению из-за разрушения генома. Облучение вирусов ускоренными электронами является оптимальным путём создания псевдовirusных частиц. В данной обзорной работе на примере вируса полиомиелита представлены основные алгоритмы, применимые для функциональной и структурной характеристики псевдовirusных частиц в процессе создания вакцинного препарата, а именно анализа степени разрушения генома и иммуногенности. Рассмотрена структура вируса полиомиелита и методы его инактивации. Для функциональной характеристики псевдовirusов предложены алгоритмы оценки остаточной инфекционности и иммуногенности. Подходы по анализу целостности генома, атомно-силовая и электронная микроскопия, поверхностно-плазмонный резонанс и биоэлектрохимические методы являются ключевыми для структурной характеристики псевдовirusных частиц. Применение описанных в настоящей работе алгоритмов, разработанных для вируса полиомиелита, позволит создать перспективные вакцины нового типа на основе псевдовirusных частиц и оперативно отвечать на вызовы при появлении новых вирусных инфекций.

Ключевые слова: псевдовirus; полиомиелит; вакцина; инактивация; функциональная характеристика; структурная характеристика

DOI: 10.18097/PBMC20236905253

ВВЕДЕНИЕ

Пандемия COVID-19 подтолкнула исследователей, работающих в области создания вирусных вакцин, и всю фармацевтическую индустрию к поиску быстрых решений борьбы с распространением SARS-CoV-2. Не последнюю роль в разработке вакцин против COVID-19 сыграли методы и приёмы биоинформатики и компьютерной обработки данных. Современные биоинформатические и генетические технологии позволили в кратчайшие сроки получить последовательности генома нового патогена, определив главные антигенные детерминанты SARS-CoV-2 по гомологии с его предшественниками SARS-CoV и MERS. Эти данные были необходимы для разработки требуемых вакцин на основе мРНК и различных векторов. Более того, методы компьютерного анализа и моделирования позволили сконструировать химерные генетические структуры, лежащие в основе мРНК и векторных вакцин, доказав их стабильность и эффективность [1].

Помимо вакцин, разрабатываемых при помощи биоинформатических подходов с применением новых технологий (мРНК и векторные вакцины), развивается

целый кластер вакцин, основанных на использовании белковых молекул капсида вируса [2]. К этой группе относят субъединичные (основанные на отдельных белках вируса или его доменах) и пептидные (основанные на небольших участках-эпитопах вирусных белков) вакцинные платформы [3, 4]. Одними из наиболее перспективных платформ создания вакцин можно считать цельновирioнные платформы на основе псевдовirusных частиц [5, 6]. Здесь и далее под псевдовirusной частицей следует понимать вирусную частицу с её ядром/основой и белками оболочки одного или нескольких вирусов. При этом генетический материал внутри псевдовirusа должен быть разрушен, для исключения возможности его размножения и проявления патогенности. Вместе с тем сохранность антигенных детерминант должна обеспечивать иммуногенность. Псевдовirusные частицы следует отличать от инактивированных. Инактивированные вирусные частицы (и соответственно, вакцины на основе них) — это частицы, лишённые возможности размножиться из-за какого-либо воздействия, химического или физического. При этом воздействии нарушается, как правило, и конформация белковой оболочки

вируса, что делает его “не очень похожим” на исходный вирус. “Псевдовиральные частицы” (псевдовиральные вакцины на их основе) — это подмножество инактивированных частиц, которые полностью сохранили наружную оболочку, при этом потеряв способность к размножению из-за разрушения генома. По сути, псевдовиральная частица — это идеальный вариант инактивированного вируса.

Псевдовиральные вакцины выгодно отличает безопасность применения и получения, контролируемая дозировка антигена при применении, а эффективность напрямую зависит от правильной конформации и свойств антигенных детерминант, входящих в состав вакцин [7].

Одной из основных проблем оперативного инактивирования вирусных частиц, которые могут быть использованы для создания вакцинного препарата, является разработка способов полной инактивации генетического материала, но с сохранением антигенных (иммуногенных) свойств псевдовиральной частицы. Необходимо добиться разрушения нуклеиновых кислот при сохранении белковых структур псевдовиралов. В то же время методы инактивации должны отвечать требованиям высокой производительности (несколько тонн в рабочую смену). Химические методы, как правило, для этой цели не оптимальны из-за низкой производительности и использования токсичных химикатов, таких как формальдегид и β -пропиолактон [8, 9]. Кроме того, антигенные детерминанты могут недостаточно хорошо сохраняться или разрушаться из-за побочных реакций межмолекулярного взаимодействия аминокислот [10].

Различные типы ионизирующего излучения работают эффективнее, чем химические способы инактивации. Принцип инактивации в этих методах основан на разрушении нуклеиновых кислот вируса с целью полного подавления способности вируса к размножению, но с сохранением его белковой части для синтеза антител к полученному псевдовirusу [11]. Этот эффект основан на том, что большую молекулу нуклеиновой кислоты легче разрушить, чем молекулу белка; в то же время вирус обычно включает много идентичных копий одного и того же белка, и возможное повреждение одного из них не внесёт существенного негативного эффекта в белковую часть вируса.

Исследования по созданию псевдовиральных вакцинных частиц рационально начинать с использования модельного вируса с достаточным объёмом данных о его строении и функциях. Вирус полиомиелита и его аттенуированные вакцинные штаммы Сэбина типа 1, 2 и 3 подходят для данной цели наилучшим образом. Преимуществом работы со штаммами является их безопасность ввиду высокого популяционного иммунитета против данных штаммов на территории РФ [12, 13]. Данный вирус является одним из самых изученных представителей вирусных, что позволит интерпретировать полученные данные с использованием уже имеющихся сведений о свойствах этого вируса.

Адаптированные к вирусу полиомиелита алгоритмы по определению остаточной инфекционной активности и иммуногенности, а также алгоритмы

инактивации генома и анализа сохранности антигенных детерминант применимы для разработки и создания других вакцинных препаратов на основе псевдовиральных частиц.

В данной работе рассмотрены функциональные и инструментальные характеристики псевдовиральных частиц на основе вирусов, инактивированных различными методами, как основа перспективной платформы для создания вакцин нового типа.

1. ВИРУС ПОЛИОМИЕЛИТА: СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА И ЕГО ИНАКТИВАЦИЯ

Вирус полиомиелита (или полиовирус) относится к семейству пикорнавирусов, роду энтеровирусов. Вирусная частица имеет размер 27–30 нм и не содержит липопротеиновой оболочки. Икосаэдрический капсид включает несегментированный одноцепочечный (+)РНК-геном длиной около 7441 нуклеотид [14]. В природе встречаются три серотипа полиовируса. Полиовирус каждого серотипа индуцирует в организме выработку нейтрализующих специфических антител. При этом вирус одного серотипа не может быть нейтрализован антителами, направленными против вирусов двух других серотипов [15]. Полиовирус размножается в клетках человека и приматов. Одной из самых известных клеточных культур, используемых для размножения вируса полиомиелита и получения полиовакцин, является культура клеток Vero [16].

Капсид вируса полиомиелита состоит из 4 белков: VP1, VP2, VP3 и VP4, каждый из которых имеет 60 копий в составе одной вирусной частицы [17] (рис. 1).

Вирусные структурные белки формируют несколько симметричных структур на поверхности частицы: “пропеллер”, “звезда” (“меза”), “каньон”. Наиболее экспонированные участки играют роль антигенных сайтов при выработке антител. “Каньон” участвует в связывании частицы с вирусным рецептором, поэтому участки, прилегающие к нему, — наиболее важные для формирования эффективных нейтрализующих антител [18]. Существует 4 антигенных сайта, участвующих в формировании нейтрализующих антител против полиовируса. Один из важнейших сайтов формируется так называемой ВС-петлёй белковой цепи VP1, входящей в структуру “меза” (“звезда”) [19].

Структура капсида инфекционной частицы полиовируса, представляющая совокупность антигенных сайтов необходимой конформации, на которую происходит формирование нейтрализующих антител, блокирующих связывание с клеточным рецептором CD155 (PVR), называется D-антигеном. Существует так называемый Н- или С-антиген полиовируса — структурный антиген, который не вызывает образование нейтрализующих антител и образуется после перестройки инфекционной частицы в ходе термической или иной обработки или в результате связывания вируса с рецептором с последующим внедрением геномной РНК в цитоплазму клетки. Таким образом, сохранение

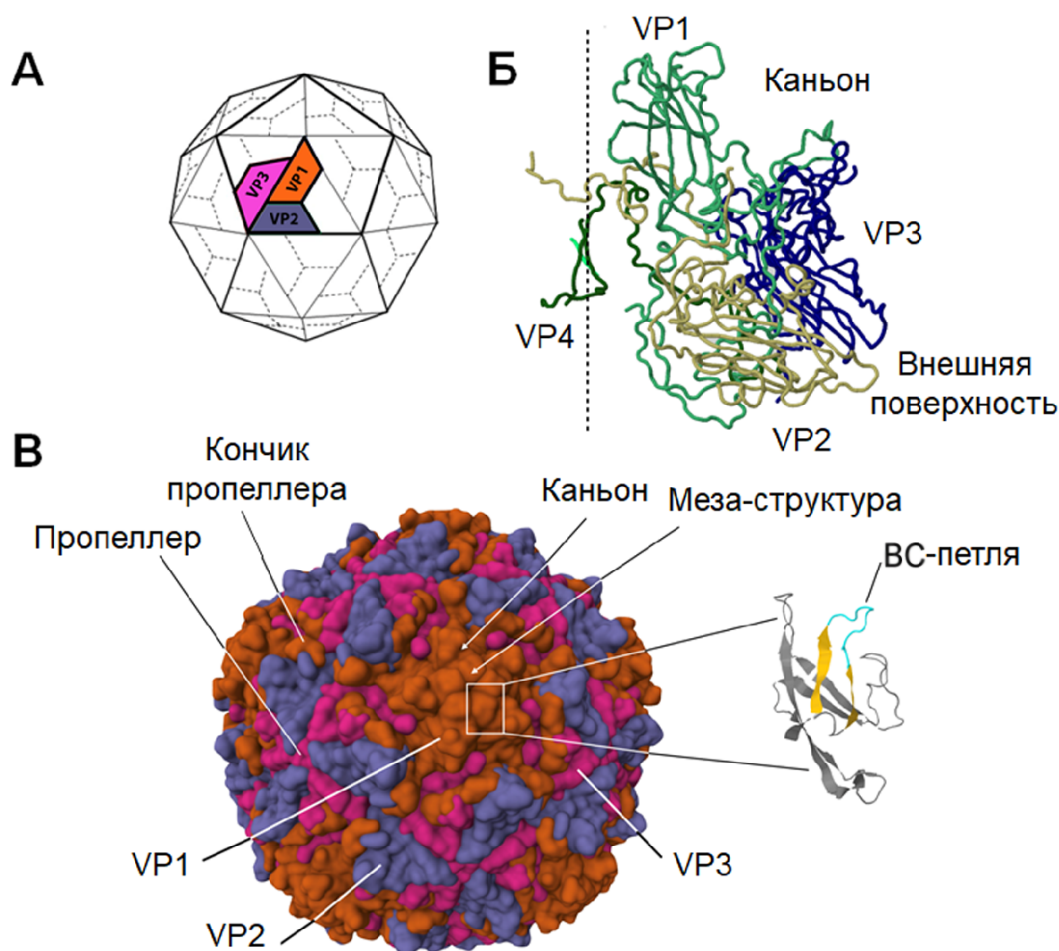


Рисунок 1. Пространственная структура вириона вируса полиомиелита. (А) Белковый состав поверхности вириона. (Б) Структура капсомера, формирующая каньон. (В) Структура поверхности вириона и ВС-петли белка VP1, сделана на основе Protein Data Bank data source 1PVC. Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи.

пространственной структуры D-антигена и выработка алгоритмов контроля его целостности — это основные задачи, которые необходимо решить при проведении процедуры инактивации [20, 21].

В настоящее время используются аттенуированные вакцинные штаммы Сэбина вируса полиомиелита типа 1, 2 и 3: тип 1 — LSc 2 ab, тип 2 — P712 Ch 2 ab, тип 3 — Leon 12a1b. Штаммы Сэбина типа 1 и 3 являются основой живой полиомиелитной вакцины, применяемой на территории РФ. Штамм Сэбина типа 2 входил в состав трёхвалентной живой полиомиелитной вакцины, применяемой в течение более 40 лет на территории СССР и постсоветского пространства. Данные штаммы являются ослабленными, то есть не способными у здорового человека вызывать заболевание.

С развитием в конце 20 века программы ВОЗ по искоренению полиомиелита были введены ограничения на применение живой полиомиелитной вакцины в регионах, где отсутствовала циркуляция диких штаммов полиовируса. Вакцинные штаммы способны в короткий срок восстанавливать нейровирулентные свойства при репродукции в человеческом организме. Одновременно с этим существует определяемая ВОЗ тенденция, по созданию инактивированных вакцин на аттенуированных

штаммах Сэбина взамен применяющихся вакцин, приготовленных на диких штаммах вируса полиомиелита. Создание эффективных вакцин на основе штаммов Сэбина является одной из важнейших задач на пути искоренения полиомиелита в мире [22, 23]. Более того, вирус полиомиелита является одним из самых изученных представителей этого таксона. За годы исследований во всём мире были выявлены антигенные детерминанты вируса, ответственные за выработку защитного иммунитета, изучены их инфекционные свойства. В нашей стране полный цикл исследований полиовируса, начиная с фундаментальных основ течения вирусной инфекции и заканчивая промышленной наработкой патогена с последующим получением вакцинных препаратов, выполнен в Федеральном научном центре исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова (Институт полиомиелита). В Институте полиомиелита отработана технология масштабного культивирования полиовируса в биореакторах и получены и валидированы тест-системы для анализа количества вирусного антигена в образцах. Налажено производство пероральной живой и инактивированной вакцины против полиомиелита на основе штаммов Сэбина [23–25].

На сегодняшний день существуют различные способы инаktivации вирусов, которые используют для изготовления инаktivированных вакцин. Их можно разделить по виду воздействия на две группы: физические (тепловая обработка, ультрафиолетовый свет и гамма-облучение) и химические методы. К самым распространённым физическим методам можно отнести обработку вирусов ультрафиолетовым светом и гамма-облучением, к химическим — обработку формальдегидом и β-пропиолактоном [26, 27]. Ни один из этих методов не обладает абсолютными преимуществами, либо по сохранности антигенных детерминант (например, использование формальдегида), либо по требованиям к безопасности технологического процесса (например, гамма-облучение).

Инаktivированные вакцины зачастую являются более предпочтительными перед другими типами вакцин по соображениям безопасности; однако, при их использовании могут возникать определённые проблемы, связанные с неполной инаktivацией вируса. Это может привести к случаям возникновения заболевания после вакцинации или к разрушению вируснейтрализующих эпитопов, что приводит к слабой выработке вируснейтрализующих антител [28].

Из химических соединений наиболее часто используют два главных типа инаktivаторов: ретикулирующие (разрыхляющие) агенты и алкилирующие агенты. К ретикулирующим агентам относятся альдегиды, в том числе формальдегид, глутаровый альдегид и глицидальдегид, из которых наиболее часто используют формальдегид. К алкилирующим агентам относятся β-пропиолактон, этиленмин и другие азиридины. Механизм действия инаktivирующих агентов заключается во взаимодействии с нуклеиновыми кислотами и белками [29].

Инаktivация вирусов основывается на двойном действии: изменении белков (в том числе образование сшивок между отдельными компонентами), взаимодействующих с клеточными рецепторами, и потере способности нуклеиновых кислот к репликации. Необходимая концентрация инаktivирующих агентов зависит, главным образом, от относительной концентрации белков и нуклеиновых кислот в инаktivируемой среде, что вносит технологические сложности в промышленную организацию этого процесса. Температура и гомогенность инаktivируемого субстрата также играют ключевую роль в кинетике инаktivации вируса [30, 31]. Для вируса полиомиелита оптимизированы процессы инаktivации химическими соединениями, однако, это негативно сказывается на сохранности D-антигена.

1.1. Использование формальдегида для инаktivации вируса

Концентрированный 37% раствор формальдегида в воде (формалин) повсеместно доступен для производства вакцин [32]. Низкая молекулярная масса формальдегида способствует его быстрому проникновению через клеточные мембраны и

вирусные капсидные белки и поэтому формальдегид способен воздействовать как на оболочечные, так и на безоболочечные вирусы [33].

Формальдегид с большей скоростью взаимодействует с аминогруппами аминокислот и белков с образованием метилольных производных, чем с азотистыми основаниями нуклеиновых кислот, образуя гидроксиметилированные, циклизированные, N-метилированные и N-формилированные продукты с очень разной стабильностью (рис. 2) [34].

Присоединение к аминогруппам пуринов и пиримидинов уничтожает матричную активность нуклеиновых кислот, формируя сшивки — метиленовые мостики (рис. 3А). Модификации аминокислот под действием формальдегида приводят не только к фиксации отдельно взятых остатков, но и к соединению аминокислот, располагающихся вблизи в пространственной структуре макромолекулы (рис. 3Б).

Продукты взаимодействия формальдегида с аминокислотами могут вступать в реакцию с нуклеиновыми кислотами значительно быстрее, чем сам формальдегид. Далее происходит медленное взаимодействие первичных продуктов реакции с другими группами белков, в результате чего образуются ковалентно связанные димеры

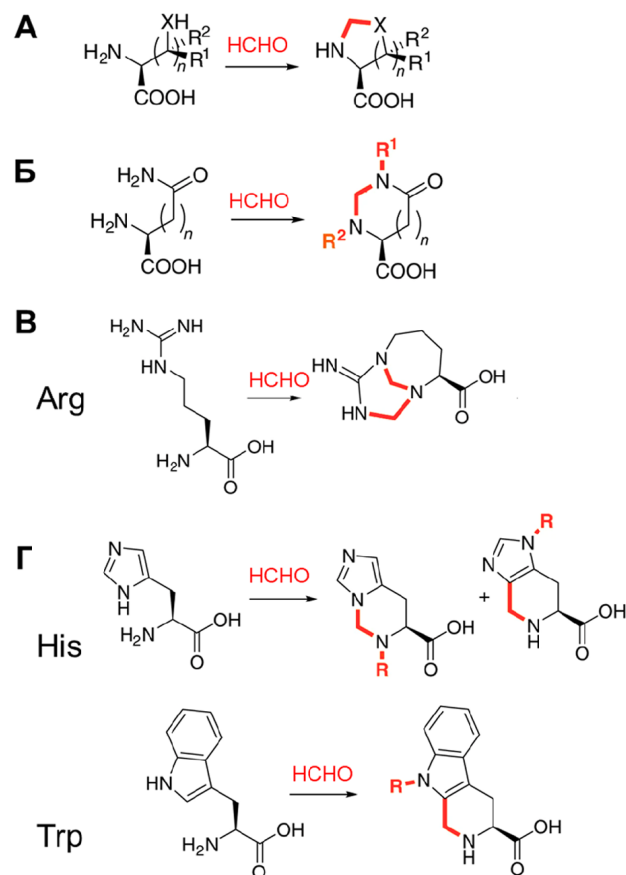


Рисунок 2. Стабильные продукты взаимодействия формальдегида с: (А) серо- и ОН-содержащими аминокислотами (X — S или O; R — Me или H), (Б) аспарагином и глутамином (R — H или CH₂OH), (В) аргинином, (Г) ароматическими аминокислотами, гистидином и триптофаном (R — H или CH₂OH).

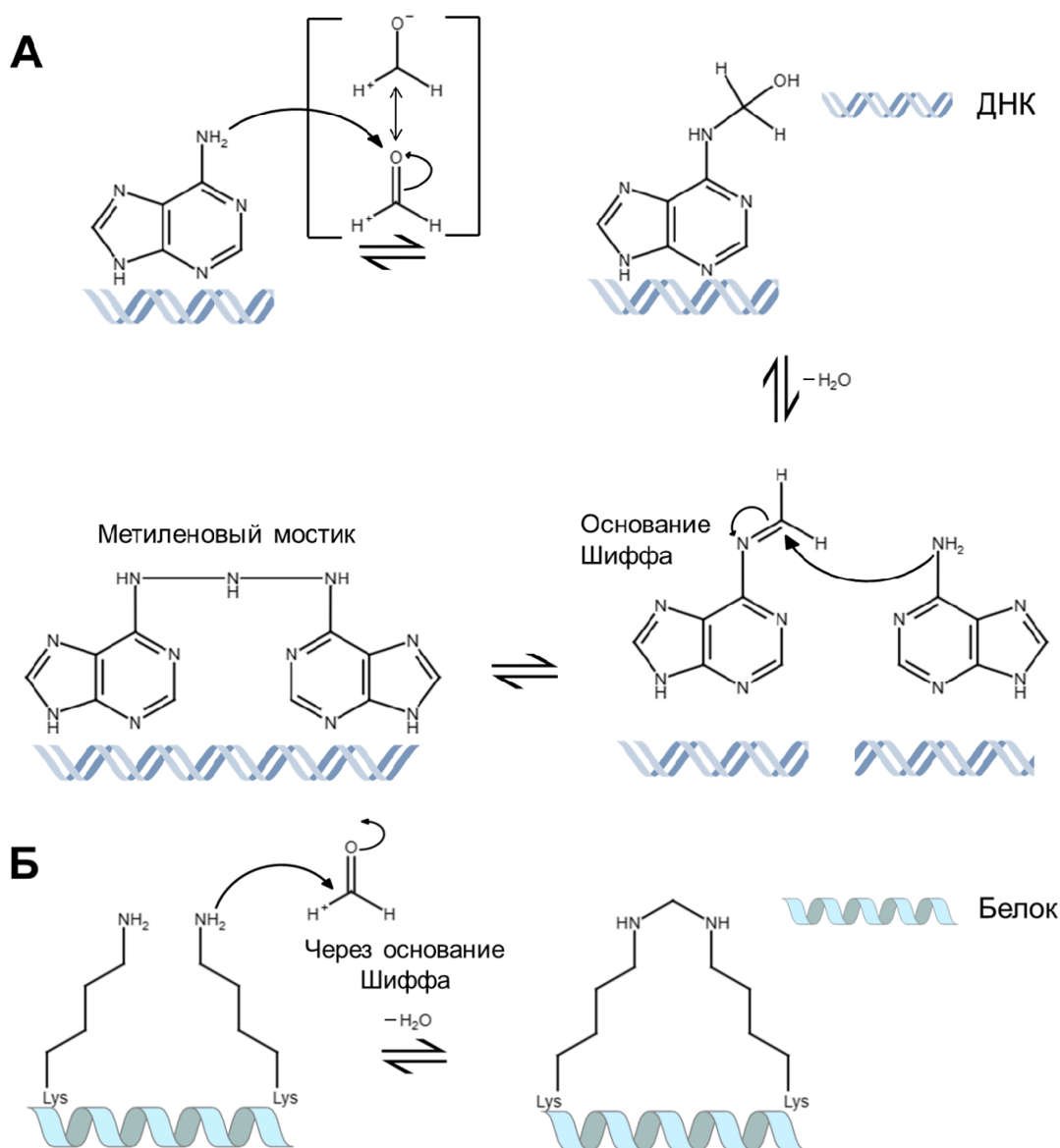


Рисунок 3. Реакции взаимодействия формальдегида с нуклеиновыми кислотами и аминокислотами. (А) Взаимодействие с аденинами нуклеиновых кислот с образованием метиленового мостика или оснований Шиффа. (Б) Взаимодействие с аминогруппами остатков лизина белков капсида вируса в реакции моногидроксиметилирования и образование метиленового мостика.

полипептидов. При этом уплотняется белковая оболочка и уменьшается её проницаемость, что снижает скорость инактивации генетического материала вируса. Следует отметить, что реакция формальдегида с аминогруппами обратима, то есть при удалении избытка реагента или разбавлении раствора активность нуклеиновой кислоты может быть восстановлена [33].

Из-за описанных особенностей механизма взаимодействия формальдегида с вирусом возникает проблема, что некоторые инактивированные вакцины содержат не полностью инактивированные вирусные частицы, которые могут вызывать вспышки вирусных инфекций при вакцинации. Об этом сообщалось в отношении нескольких вирусов, таких как вирус ящура (FMDV) и вирус венесуэльского лошадиного энцефалита (VEEV). С помощью

молекулярного анализа было доказано, что вспышки ящура в Западной Европе в 1980-х годах и VEEV в Центральной Америке в 1970-х годах были следствием не полностью инактивированных вирусных вакцин [28].

Существенным недостатком при использовании формальдегида в качестве инактивирующего агента является его негативное влияние на антигенную структуру ряда вирусов [35]. Установлено, что обработка формальдегидом приводит к изменению антигенной структуры в том числе и вируса полиомиелита. Формальдегид опосредует повреждение иммунодоминантного эпитопа (сайт 1) в петле В-С вируса полиомиелита 1 типа штамма Сэбина [36]. Также это было показано и для других вирусов, таких как вирус герпеса 1, вирус болезни Ньюкасла, вирус гриппа и вирус лихорадки долины Рифт [9].

Свободный формальдегид, присутствующий в инактивированной цельновирионной вакцине против вируса гриппа H1N1, снижал выработку моноклональных антител (mAbs) против консервативных эпитопов вируса гриппа [37].

Химические модификации, вызванные формальдегидом, зависят от таких факторов, как время инкубации, pH, температура, концентрация формальдегида и ионная сила раствора. Длительность процесса инактивации оказывает негативное влияние на сохранность и активность самого целевого вирусного антигена и, как следствие, на иммуногенную активность инактивированной вакцины. Следовательно, важен обоснованный подбор условий инактивации при производстве инактивированной вакцины [33].

Кроме того, ограничением использования этого метода инактивации является токсичность формальдегида. В зависимости от типа вакцины, это химическое вещество должно быть удалено, разбавлено и/или преобразовано в нетоксичную форму после обработки [38].

1.2. Использование β -пропиолактона для инактивации вируса

Другим инактивирующим агентом, который обычно используется многими производителями вакцин, является β -пропиолактон (БПЛ). Он относится к семейству лактонов и состоит из четырёхуглеродного кольца. Инактивация вирусов происходит в основном путём необратимого алкилирования оснований нуклеиновых кислот (рис. 4), что ингибирует репликацию вирусного генома или, в более широком контексте, вызывает деградацию вирусного генома. Как правило, эффекты инактивации БПЛ на оболочечные вирусы, сильнее, чем на вирусы без оболочки [39].

Следует отметить, что исходные алкилированные продукты, находящиеся вблизи друг от друга, могут играть роль реагентов в последующих реакциях сшивания. Сшивание аминокислотных остатков белкового капсида, межцепочечное сшивание ДНК и образование петель внутри вирусной РНК (внутрицепочечное сшивание РНК) являются основными путями последующих реакций [39, 40].

Основываясь на литературных данных, можно сказать, что в отличие от формальдегида, БПЛ инактивирует вирусы главным образом за счёт изменения их нуклеиновых кислот. В результате ожидается, что антигенная структура вирусов будет сохранена неповреждённой в процессе инактивации БПЛ [41].

Тем не менее, было установлено, что БПЛ (особенно в высоких дозах) образует *бис*-алкилированные комплексы за счёт внесения меж- и внутрибелковых поперечных связей. Например, для вирусов гриппа активность гемагглютинина, а также ферментативная активность нейраминидазы могут быть значительно снижены [28].

При исследовании иммуногенности вакцин, инактивированных формальдегидом и БПЛ, сообщалось, что вакцинация мышей цельновирионной вакциной против вируса гриппа H5N1, инактивированной БПЛ, по сравнению с аналогом, убитым формалином, приводит к успешной защите от вируса H1N1. Эти наблюдения показали, что структура вирусных белков сохраняется во время инактивации БПЛ, в частности, за счёт оптимальных условий инактивации [42].

В другом исследовании при инактивации коронавируса SARS-CoV-2 с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (ПААГ) было показано, что S-белок после обработки формальдегидом демонстрировал дисперсионные полосы и поперечные сшивки [43]. В течение 20–24 ч содержание антигена снизилось более чем в два раза по сравнению с обработкой БПЛ. После обработки БПЛ вирусные частицы оставались относительно однородными. Примечательно, что обработка БПЛ в течение длительного времени (48 ч) может вызвать агрегацию вируса и увеличение размера вирусных частиц до 150 нм при одновременном снижении содержания поверхностного антигена [43].

Одним из потенциальных недостатков БПЛ является то, что он обладает онкогенными свойствами, хотя его конечные продукты после гидролиза таковыми не являются. Потенциальным же преимуществом БПЛ является то, что он вступает в реакцию с нуклеиновыми кислотами, так что можно ожидать, что любой загрязняющий генетический материал, полученный в результате

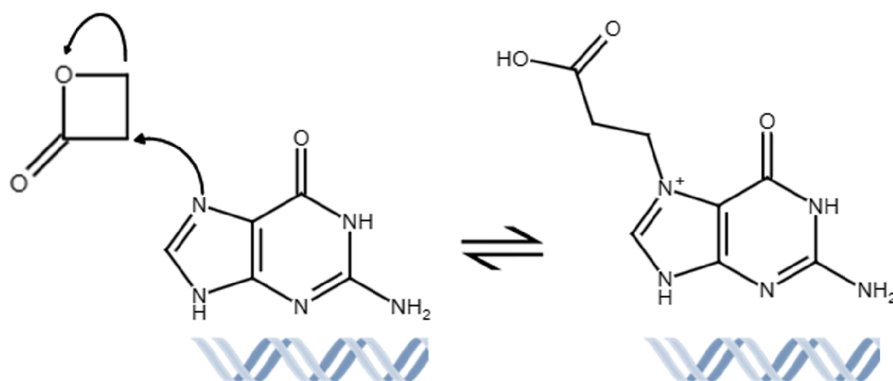


Рисунок 4. Взаимодействие β -пропиолактона с нуклеиновыми кислотами вызывает алкилирование оснований, например гуанина.

культивирования клеток, будет инактивирован. Использование БПЛ в качестве инактивирующего агента даёт ряд преимуществ перед формальдегидом: (i) инаktivация занимает в среднем 24 ч, в то время как для инаktivации формальдегидом требуется более недели; (ii) возможность его гидролиза после завершения процесса; (iii) с помощью БПЛ происходит инаktivация загрязняющих нуклеиновых кислот клеток-продуцентов, облегчая процесс дальнейшей очистки. БПЛ легко гидролизует с образованием безвредных веществ. Во время процесса инаktivации БПЛ гидролизуются до 3-гидроксипропионовой кислоты, которая является промежуточным метаболитом липидного обмена человека [8, 44].

В последние годы БПЛ находит всё большее применение ввиду специфично-направленного механизма действия на геном вирусов [45].

1.3. Использование ультрафиолетового облучения для инаktivации вируса

Использование ультрафиолетового (УФ) облучения относится к физическим методам инаktivации вирусов, и в зависимости от диапазона длин волн ультрафиолетовое излучение подразделяется на три категории: UV-A (от 320 нм до 400 нм), UV-B (от 280 нм до 320 нм) и UV-C (от 200 нм до 280 нм). Большая часть инаktivирующих эффектов ультрафиолетового излучения относится к спектру UV-C и незначительному интервалу внутри диапазона длин волн UV-B. Инаktivирующая вирус активность УФ-излучения в основном связана со стимуляцией образования фотодимеров между соседними пиримидиновыми основаниями (рис. 5), особенно тимин, что приводит к нарушению репликации вируса и транскрипции в клетках-хозяевах. Обычно для инаktivации вирусов используется ультрафиолетовый свет с длиной волны 254 нм (в спектральном диапазоне UV-C) [28].

Хотя основными мишенями являются нуклеиновые кислоты, УФ-облучение может индуцировать перекрёстную связь между вирусным геномом и белками капсида посредством фотохимической реакции аминокислотных остатков (особенно цистеина) с урацилом и/или тимин. Ультрафиолетовый свет также может индуцировать структурные изменения в вирусных белках капсида, приводящие к образованию фотопродукта. Длительное воздействие не только увеличивает эти повреждения, но и способствует окислительному

повреждению, такому как образование карбонильных групп аминокислот капсида, что снижает иммуногенность частиц [46].

1.4. Использование гамма-облучения и облучение ускоренными электронами для инаktivации вируса

Гамма-облучение — один из видов высокоэнергетического ионизирующего излучения с низкой мощностью дозы, которое обычно используется для стерилизации и инаktivации патогенов [47, 48]. Этот тип излучения обладает достаточной энергией, чтобы вытеснить (или даже удалить) внешние электроны молекул, что приводит к разрушению ковалентных связей, а также к ионизации [48]. В отличие от ультрафиолетового излучения, гамма-лучи обладают более высокой проникающей способностью и могут использоваться для инаktivации вирусов в больших объёмах [47]. Согласно теории радиационной мишени, геномы вирусов более восприимчивы к структурному повреждению гамма-лучами по сравнению с вирусными белками из-за их более высокой молекулярной массы [48]. Окислительное повреждение, особенно изменения поверхностных эпитопов, такое как карбонилирование вирусных белков и в меньшей степени разрушение вирусного генома, приводит к снижению антигенности вирусных частиц и, соответственно, эффективности вакцин [33].

Инаktivация вирусов гамма-лучами должна быть осуществлена в замороженном состоянии, для уменьшения образования свободных радикалов за счёт минимизации радиолитического распада воды [47]. С этой целью во время облучения вирусные замороженные образцы хранят на сухом льду. При использовании этой стратегии инаktivации эффект гамма-излучения в первую очередь связан с типом и тяжестью разрушений вирусного генома, включая разрывы одноцепочечных или двуцепочечных цепей, образование перекрёстных сшивок и деградацию нуклеотидов. Эта особенность является преимуществом гамма-лучей перед ранее упомянутыми методами [33]. Существенным недостатком гамма-облучения являются жёсткие требования инфраструктурной организации к условиям системы радиационной безопасности, квалификации персонала и логистическим цепочкам. Поэтому сейчас акцент сместился на облучение ускоренными электронами. Облучение ускоренными электронами обладает теми же преимуществами,

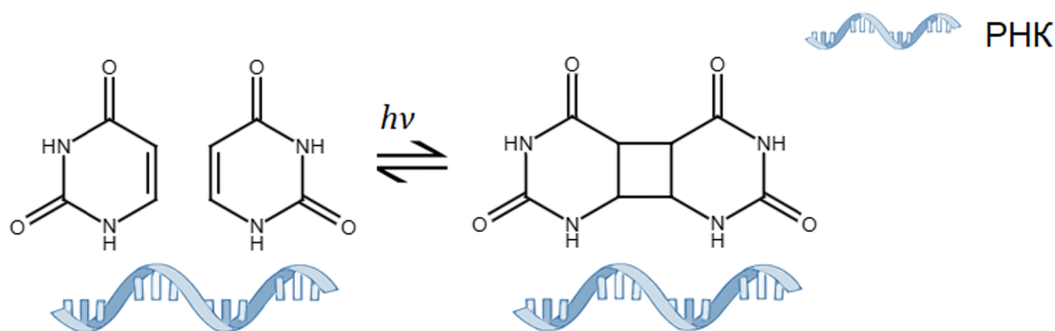


Рисунок 5. Образование пиримидинового (на примере урацила) димера под действием ультрафиолетового облучения.

что и гамма-облучение, но не требует столь жёстких условий организации инфраструктуры. В связи с этим облучение ускоренными электронами предлагается как наиболее рациональный подход для получения псевдовиральных частиц с целью создания вакцинного препарата.

2. ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПСЕВДОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ

При работе над созданием цельновирионных вакцин, основанных на использовании вирионов полиомиелита в качестве исходного материала, особую роль отводят исследованиям свойств получаемых частиц. При изучении псевдовиральных частиц, как и любых инаktivированных частиц, получаемых из инфекционных частиц путём лишения репликативной способности, первостепенными задачами становятся определение полноты инаktivации, содержания антигена и иммуногенной активности. Определение полноты инаktivации (остаточной инфекционности) — важнейшая процедура, которая позволяет подобрать оптимальные условия инаktivации вирусной частицы и лежит в основе безопасности будущего препарата. Определение содержания антигена и иммуногенной активности позволяют выработать оптимальную стратегию инаktivации вирусов с точки зрения сохранения структуры вирусной белковой оболочки и закладывает основу эффективности препарата.

2.1. Определение остаточной инфекционной активности

Разработанная в Институте полиомиелита проверка инфекционности вирусных частиц заключается в не прямой оценке нарушений в генетическом материале или структуре всего пула частиц, подвергнутого процедуре инаktivации, которые привели к потере жизнеспособности вирусного агента. Методы анализа нацелены на доказательство того факта, что во всем объёме обработанного вирусного материала не осталось частиц, способных вызвать запуск вирусной инфекции. Вирус полиомиелита является литическим, то есть патоген вызывает гибель клеток [49]. Анализ основан на визуальной детекции его литического действия. Используют культуры клеток, чувствительные к инфицированию полиовирусом и позволяющие вирусу эффективно размножаться [50].

Для того чтобы клеточные культуры были чувствительны к вирусу полиомиелита, они должны иметь вирус-специфичный рецептор — PVR или CD155, экспрессирующийся в достаточно ограниченном наборе клеточных культур — культур клеток человека и человекообразных приматов [51]. Исторически исследователи использовали первичные культуры клеток приматов, к примеру, клетки почек зелёной мартышки (КПЗМ). Однако впоследствии, с развитием клеточных технологий, широкое применение нашли перевиваемые культуры клеток человека и приматов: НЕР-2, L20В, Vero и другие. Исследования чувствительности описанных культур

к полиовирусу определили, что они могут быть использованы для проведения тестов по поиску остаточного количества инфекционных частиц и определению концентрации этих частиц [52, 53].

Для определения концентрации инфекционных полиовирусных частиц подсчитывают содержание вирусных доз с помощью титрования на чувствительной культуре клеток Нер-2 по 50-процентному инфекционному действию ($TCID_{50}$) (рис. 6). Разработанный алгоритм основан на определении содержания инфекционных частиц при смешивании суспензии чувствительных клеток Нер-2 с различными разведениями испытуемого материала в нескольких повторениях: от неразведённой субстанции до разведения $10^{-(N+2)}$, где 10^N $TCID_{50}/мл$ — титр исходного не инаktivированного вируса полиомиелита.

Для финального доказательства отсутствия инфекционных вирусных частиц согласно рекомендациям ВОЗ и Европейской Фармакопеи после инаktivации применяют инкубацию исследуемой субстанции с чувствительной клеточной культурой (в случае вируса полиомиелита — Нер-2, L20В или Vero) проведением двух последовательных пассажей в течение 7 дней каждый (рис. 7). Разработанный алгоритм позволяет обнаружить остаточные “следы” неинaktivированного вируса. Выбранные культуры клеток погибают при размножении полиовируса, благодаря чему по состоянию клеточного монослоя определяют наличие или отсутствие живых вирусных частиц

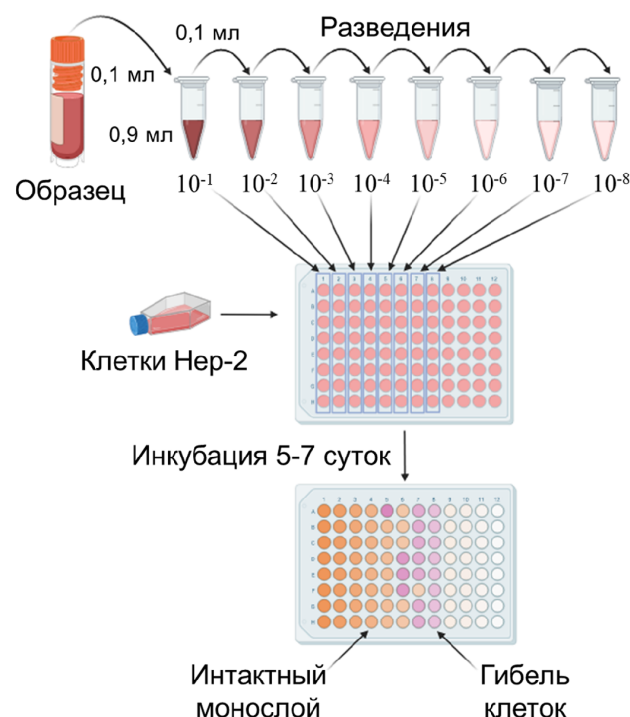


Рисунок 6. Схема разработанной процедуры титрования образцов с помощью чувствительной культуры клеток. Процедура заключается в приготовлении последовательных разведений образца в среде культивирования клеток, внесении разведений образца в 96-луночный планшет с культурой клеток Нер-2, инкубации в течение 5-7 суток и учёте результатов.

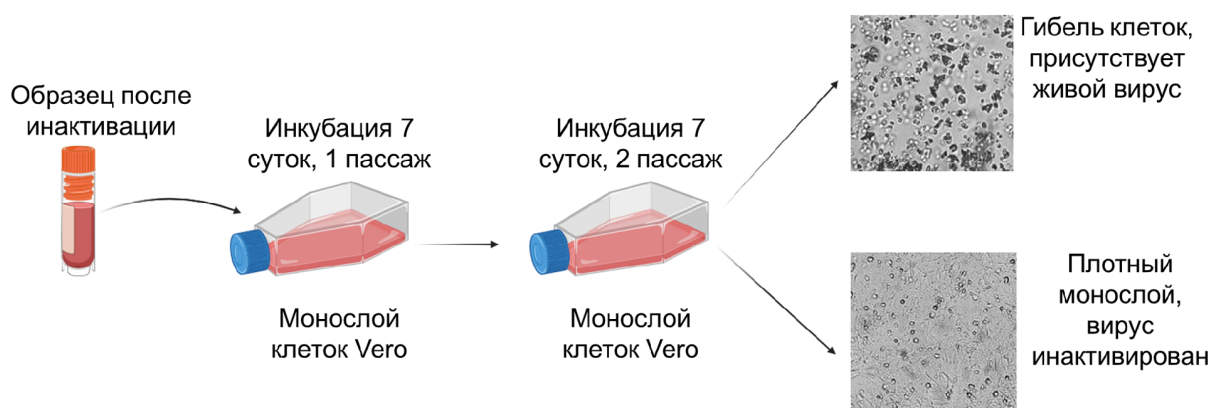


Рисунок 7. Схема предложенного алгоритма проведения пассажей инаktivированного материала для проверки остаточной инфекционности.

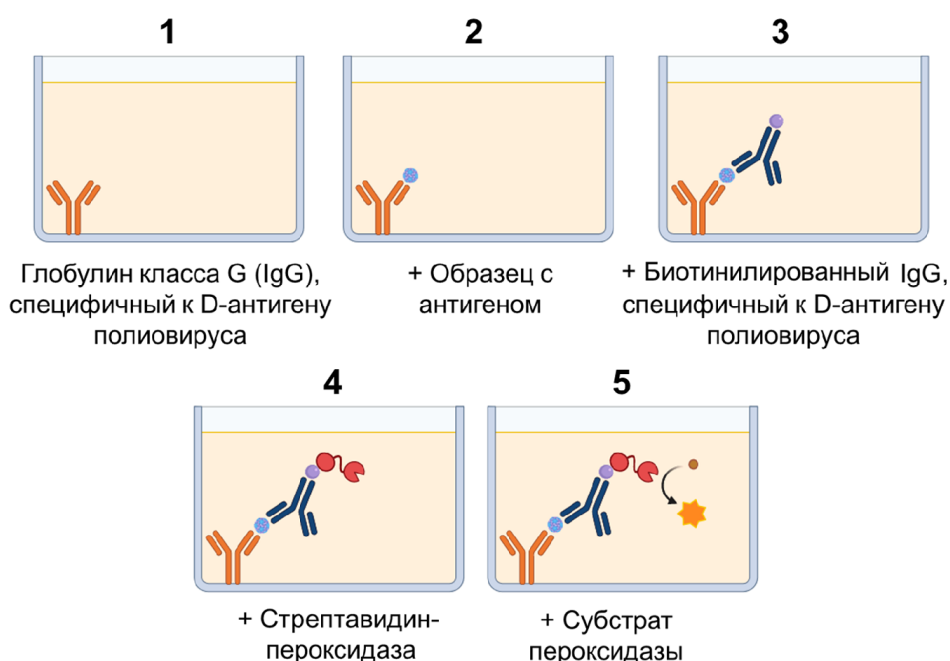


Рисунок 8. Схема адаптированного иммуноферментного анализа для определения содержания D-антигена полиовируса в образцах.

в образце. В ходе проведения пассажей культура клеток оценивается по состоянию монослоя по сравнению с контрольной культурой. После проведения последовательных пассажей, при которых даже единичные частицы, способные размножаться, увеличат свою численность и вызовут гибель клеток, возможно окончательное определение условия полной инаktivации вируса полиомиелита при облучении (рис. 7) [52, 54, 55].

2.2. Определение иммуногенности

Предварительную оценку антигенных свойств, косвенно показывающих сохранность детерминант на поверхности инаktivированных полиовирусных частиц, проводят с помощью иммунных методов анализа с использованием антител к D-антигену. Исходно для определения концентрации D-антигена при анализе потенциальной эффективности инаktivированных полиомиелитных вакцин

использовали радиальную иммунодиффузию. Метод основан на диффузии исследуемого антигена в агаризованной среде, содержащей специфичные антитела. Размер диффузного “кольца” коррелирует с концентрацией антигена в образце [56]. На смену иммунодиффузии пришёл иммуноферментный анализ (ИФА), позволяющий измерять содержание иммуногенного D-антигена вируса полиомиелита в образце в сравнении со стандартным образцом с известной иммуногенностью [57]. ИФА является важным методом характеристики вакцин и других препаратов, который обнаруживает присутствие антигенов (рис. 8).

Для более точной оценки эффективности взаимодействия инаktivированных частиц с антителами против D-антигена полиовируса, то есть с нейтрализующими антителами, может применяться метод поверхностного плазмонного резонанса (см. раздел 3.4.).

Описанные методы косвенно позволяют оценить схожесть инактивированных частиц с нативными живыми частицами вируса полиомиелита по их взаимодействию с нейтрализующими антителами. Чем сильнее взаимодействие, тем, предположительно, более сохранной остаётся структура антигенного сайта, что делает инактивированный препарат потенциально более эффективным, так как именно к данным структурным детерминантам будут вырабатываться защитные антитела при иммунизации.

В настоящий момент именно ИФА является повсеместно используемой методикой для определения D-антигена при производстве инактивированных вакцин против полиомиелита для выполнения контроля по показателю “Специфическая активность”. Специфическая активность — это один из основных показателей качества вакцин [58]. Его выражают в D-антигенных единицах (DU/мл или DU/доза).

Существует множество вариантов систем ИФА для оценки содержания D-антигена, использующие различные схемы взаимодействия между антигеном и антителом, моноклональные и поликлональные антитела. Каждая лаборатория использует свои антитела и протоколы ИФА для определения содержания D-антигена. Используемые антитела должны быть специфичны к серотипу полиовируса и D-антигену [59]. Ввиду сложности антигенной структуры вируса полиомиелита и многообразия систем ИФА в мире существует проблема стандартизации этого метода оценки содержания D-антигена [60]. Для того чтобы результаты были сопоставимы, лаборатории должны использовать международный стандарт или внутренний стандарт, калиброванный по международному, которому присвоено определённое количество единиц D-антигена (DU). Это позволяет выразить эффективность препаратов, производимых разными производителями, используя одни и те же единицы [59]. Именно высокая специфичность антител является залогом создания эффективной процедуры ИФА. Нативный полиовирусный антиген (D-антиген)

легко конвертируется в денатурированную форму (Н-антиген), не вызывающую защитного иммунитета. Поэтому эффективность вакцины должна определяться только содержанием D-антигена [57].

Тест-система ИФА на основе поликлональных сывороток кролика показала, что специфичность IgG к D-антигену была по меньшей мере в 10 раз выше, чем к Н-антигену. Анализ основан на использовании антител, очищенных из иммунной сыворотки кролика, конъюгированных с биотином [57, 58] (рис. 8).

Анализ содержания D-антигена позволяет на начальных этапах оценить иммуногенные свойства вирусной частицы. Иммуногенные свойства — способность инактивированного образца вызывать выработку нейтрализующих антител — оценивают напрямую с помощью проведения иммунизации животных (морских свинок и крыс [61], рисунок 9) и с последующей оценкой концентрации нейтрализующих антител в крови. Чем выше концентрация нейтрализующих антител в крови иммунизированных животных, тем более эффективным является инактивированный образец при одинаковых условиях проведения эксперимента.

3. СТРУКТУРНО-БИОХИМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПСЕВДОВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ

Остаточная инфекционная активность и иммуногенность получаемого псевдовируса напрямую зависят от инактивации (неспособности размножаться) и сохранности антигенных участков. Нарушение репликативной активности связано с нарушением генетического материала вируса. Поэтому определение целостности генома псевдовирусных частиц является определяющей процедурой для подбора условий инактивации. Сохранение антигенных детерминант сопровождается изменением структуры вирусных частиц. В связи с этим существенную роль играет анализ структурно-биохимических характеристик, которые позволяют оценивать степень инактивации и структуру псевдовируса.

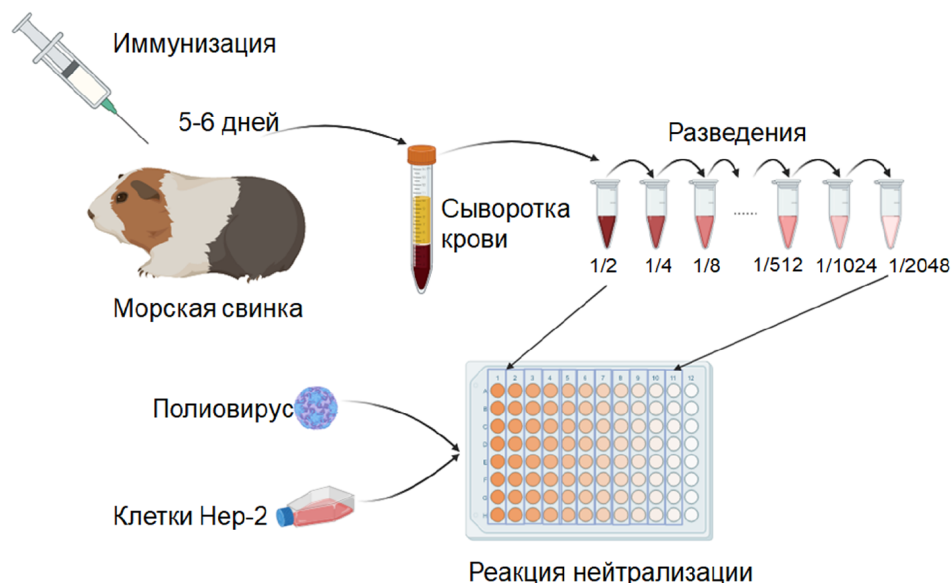


Рисунок 9. Принятая схема оценки иммуногенности образцов, содержащих вирус полиомиелита после инактивации.

3.1. Анализ целостности генома псевдовirusа

Эффективность инактивации вируса при создании вакцинного препарата напрямую зависит от степени деградации его генома.

Геном вируса полиомиелита штамма Сэбина 1 представлен одноцепочечной РНК длиной около 7441 нуклеотида, обладающей матричной активностью (позитивная, или +РНК), то есть РНК, способной непосредственно транслироваться заражённой клеткой.

Предложенным сотрудниками Института биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича (ИБМХ) методом оценки целостности генома вируса и псевдовirusа является количественная полимеразно-цепная реакция (ПЦР в реальном времени) [62–64]. Принцип основан на многократном избирательном копировании определённого участка нуклеиновой кислоты ДНК при помощи фермента ДНК-полимеразы [65, 66]. В случае количественной ПЦР осуществляются наблюдения за изменением количества конкретного ПЦР продукта (амплификата участка вирусного генома), меченого флуоресцентным зондом, в каждом цикле реакции [67–69].

Поскольку геном вируса полиомиелита состоит из РНК, то для проведения ПЦР требуется реакция обратной транскрипции (ПЦР с обратной транскрипцией, ОТ-ПЦР).

Мы полагаем, что поскольку инактивация вируса химическими или физическими агентами приводит к нарушениям в молекуле нуклеиновой кислоты, это негативным образом влияет на эффективность ОТ и снижает количество цельного амплификата. При проведении ОТ-ПЦР в реальном времени, такие повреждения будут увеличивать цикл, на котором детектируется амплификат. Другими словами, увеличение цикла ПЦР, при котором детектируется амплификат, соответствует увеличению деградации

вирусного генома (рис. 10). Пороговые значения цикла ОТ-ПЦР в реальном времени (Ct) определены как количество циклов амплификации, необходимое для того, чтобы накопленная флуоресценция (получаемая в результате амплификации целевой ДНК) достигла порогового значения выше фонового. Таким образом, значения Ct обратно пропорциональны стабильности вирусного генома; низкие значения Ct указывают на целостность генома, а высокие значения Ct указывают на высокую степень деградации нуклеиновой кислоты [70]. В качестве референсной используется РНК интактного вируса.

3.2. Анализ общей морфологии псевдовirusных частиц

3.2.1. Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

СЭМ — метод электронной микроскопии, основанный на детекции вторичных электронов (SE), обратно рассеянных электронов (BSE) и прошедших электронов (scanning transmission electron microscopy, STEM).

При построении изображений СЭМ (рис. 11) тонко сфокусированный пучок электронов сканирует поверхность образца, то есть “чертит растр” по площади, одновременно регистрируя разнообразные сигналы, которые генерируются при взаимодействии первичного пучка электронов с образцом. Обычно в сканирующем микроскопе для формирования первичного пучка используется ускоряющее напряжение в диапазоне 500 В ÷ 30 кВ. Для регистрации каждого типа сигнала используется детектор определённой конструкции. Главным образом в сканирующем микроскопе используются детекторы SE, BSE и STEM [71].

Вторичные электроны (SE, secondary electrons) — это электроны, которые образуются в результате неупругого взаимодействия первичных электронов с образцом. Характерная энергия вторичных

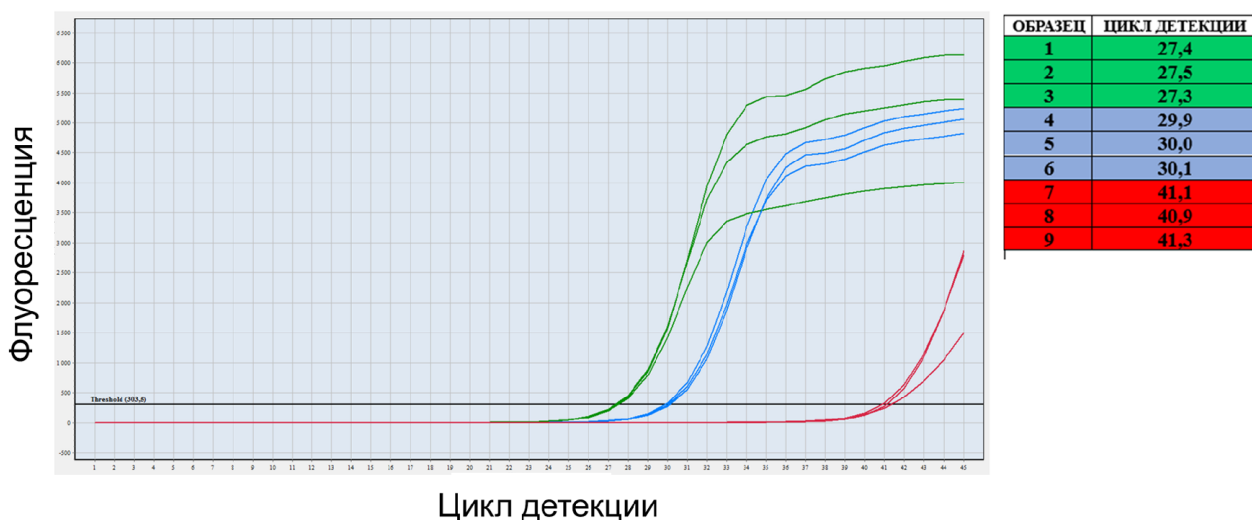


Рисунок 10. Циклы детекции амплификатов ОТ-ПЦР в реальном времени образцов вируса полиомиелита, инактивированных электронным облучением. Увеличение дозы облучения и повреждение структуры РНК сопровождается увеличением Ct. Образцы 1, 2, 3 – циклы для не инактивированных контрольных образцов (зелёные линии). 4, 5, 6 – циклы для образцов вируса, облучённых дозой 10 кГр (синие линии). 7, 8, 9 – циклы для образцов вируса, облучённых дозой 30 кГр (красные линии). Цветной вариант рисунка доступен в электронной версии статьи.

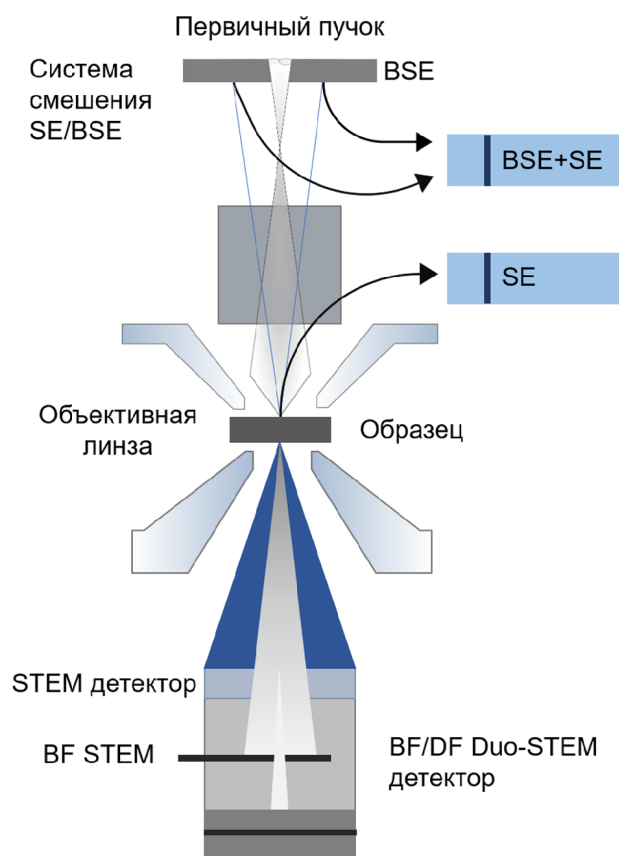


Рисунок 11. Система детекторов сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-5500. Первичный пучок, сформированный системой фокусирующих линз, вызывает образование вторичных и отраженных электронов. Детектор SE – это детектор, который собирает низкоэнергетические вторичные электроны и располагается вне оптической оси СЭМ (обозначен справа). Детектор высокоэнергетических отраженных электронов BSE расположен над образцом. Количество отраженных электронов значительно меньше числа вторичных, и для повышения чувствительности к отраженным электронам в данной модели реализована система смещения SE/BSE сигналов. Вторичные электроны, образованные в BSE детекторе улавливаются отдельным SE детектором. Прошедшие сквозь образец электроны улавливаются STEM детектором. Этот детектор состоит из двух частей: светопольного детектора (BF STEM) и детектора темного поля (BF/DF Duo STEM detector).

электронов не превышает 50 эВ. С их помощью можно выявить морфологию отдельных частиц и топографию поверхности. Варьируя ускоряющее напряжение и ток пучка, можно добиться оптимального соотношения величины сигнала и глубины генерации излучения SE, достигая наилучшего разрешения.

Обратно рассеянные электроны (BSE, back-scattered electrons) — это электроны, которые образуются в результате упругого взаимодействия первичных электронов с ядрами атомов мишени, энергия BSE незначительно отличается от энергии первичного пучка. Обратно рассеянные электроны чувствительны к атомному номеру мишени, они позволяют выявлять контраст между элементами образца с различным атомным номером.

Прошедшие электроны — это электроны первичного пучка, которые прошли образец насквозь и были зарегистрированы детектором прошедших электронов (STEM). Контраст, который возникает в этом случае, подобен контрасту, который характерен для просвечивающего микроскопа [71].

Для традиционной СЭМ обычно требуется, чтобы образцы были твердыми и проводящими ток. Кроме того, камера образца должна быть под вакуумом. Однако, используя дифференциальную откачку и охлаждаемый столик образцов, сканирующая электронная микроскопия окружающей среды (ЭСЭМ) устраняет эти ограничения, позволяя работать в неглубоком вакууме, поэтому можно расширить класс доступных веществ, например, находящихся в растворе или непроводящих ток [72].

Характерное разрешение СЭМ составляет около 3-5 нм, поэтому СЭМ не может измерять размеры элементов в том же масштабе, что и для просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ). Хотя СЭМ часто имеет разрешение ниже, чем ПЭМ или АСМ, она всё же может играть важную роль в анализе размера и формы псевдовирусных частиц [73–75]. Традиционная СЭМ обычно использует сухие порошковые вакцины, поскольку они соответствуют требованиям СЭМ к образцам: эти вакцины твердые и стабильные в вакууме [76].

Однако для визуализации других синтетических вакцин, которые должны храниться в водной среде, можно использовать только ЭСЭМ [77]. Для получения четкого и контрастного изображения образцы обычно должны иметь размер не менее ста микрон. Несмотря на ограничения для многих синтетических вакцин, с помощью СЭМ можно получить трехмерную информацию об образце благодаря феномену большой глубины резкости [78]. На рисунке 12 представлен пример СЭМ изображений инактивированных частиц вируса полиомиелита.

3.2.2. Просвечивающая электронная микроскопия

Принцип действия просвечивающего электронного микроскопа основан на использовании волновых свойств электрона. ПЭМ можно сравнить с оптическим микроскопом с длиной волны в 100000 раз меньше длины световых волн, используемых в оптическом микроскопе. Это свойство ПЭМ и даёт возможность получить изображение объекта с разрешением порядка размера атома, например структуры нанотрубки или фуллерена. В настоящее время существуют микроскопы, которые позволяют разделить точки, проекции которых находятся на расстоянии 0,7 Å.

Для данного вида микроскопии используется терминология, перенесённая из оптики. Источником света электронов служит электронная пушка. Объективом в ПЭМ служит магнитная линза, а её характеристики, такие как сферическая и хроматическая аберрации, также важны для чёткости изображения. Регистрация изображения осуществляется с помощью CCD-камеры [79].



Рисунок 12. СЭМ изображение частиц вируса полиомиелита, прошедшие процедуру деактивации формальдегидом. Изображение получено в центре коллективного пользования “Авогадро” ИБМХ.

В последнее десятилетие несколько обособилась и быстро развивалась крио-электронная микроскопия (крио-ЭМ). Крио-ЭМ — это специфический тип ПЭМ, который обычно используется для визуализации биологических образцов, которые в значительно большей степени, чем неорганические образцы, подвержены радиационной деградации. Образцы изучаются при экстремально низких температурах (до -180°C). С помощью крио-ЭМ можно получать изображения с более высоким разрешением и контрастом, чем при традиционном типе ПЭМ. В крио-ЭМ в качестве держателя (подложки) образца используется тонкая (30 нм) плёнка аморфной (стеклообразной) воды при температуре -150°C . Стеклообразное состояние достигается быстрым охлаждением плёнки воды, содержащей образец (молекулу белка, вирус, везикулу) так, что кристаллы льда не успевают образоваться и границы зёрен не рассеивают электроны. Кроме того, низкие температуры замедляют движение свободных радикалов, которые образуются при прохождении электронов в образце, что задерживает деградацию биологических объектов [80].

Наибольшее разрешение, которое можно достичь с помощью крио-ЭМ, составляет $2,2 \text{ \AA}$ [81], в то время как ПЭМ — только около 10 \AA [82]. Крио-ЭМ широко используется для реконструкции трёхмерных изображений, что позволяет внести значительный вклад в область структурной биологии.

ПЭМ широко использовалась в визуализации вирусов с 1955 г., причём одна из первых публикаций была посвящена именно визуализации вируса полиомиелита [83]. В 1965 году было проведено подробное исследование динамики развития вируса полиомиелита на клетках HeLa с использованием традиционной ПЭМ [84]. Начиная с конца 90-х годов,

с развитием техники крио-ЭМ, стало возможным подробное исследование трёхмерной структуры вируса [85]. Более того, при помощи крио-ПЭМ стало возможным изучение трёхмерной структуры комплекса вирус-рецептор-мембрана [86]. Эти данные позволяют предположить существование отдельных популяций субклеточных везикул, каждая из которых выполняет специализированную роль в процессах репликации полиовируса [87].

3.3. Атомно-силовая микроскопия

С момента своего появления в 1986 г. [88], атомно-силовая микроскопия (АСМ) прочно вошла в арсенал исследователей из различных областей естественных наук. Этому способствует хорошая воспроизводимость результатов, относительная простота приготовления образцов и хорошая согласованность результатов с другими методами (такими как динамическое светорассеяние и электронная микроскопия). При этом пространственное разрешение АСМ-изображений составляет доли нанометров.

АСМ — это метод определения характеристик поверхности образца с высоким разрешением, позволяющий измерять форму, высоту и механические свойства образцов, нанесённых на подложку или в капле. Принцип работы АСМ основан на отклонении кантилевера (зонда), которое вызвано физическими силами между иглой кантилевера и поверхностью образца. Сила, действующая на зонд со стороны поверхности, приводит к изгибу кантилевера (рис. 13). Появление “возвышенностей” или “впадин” под иглой приводит к изменению силы, действующей на зонд, а значит, и к изменению величины изгиба кантилевера [89].

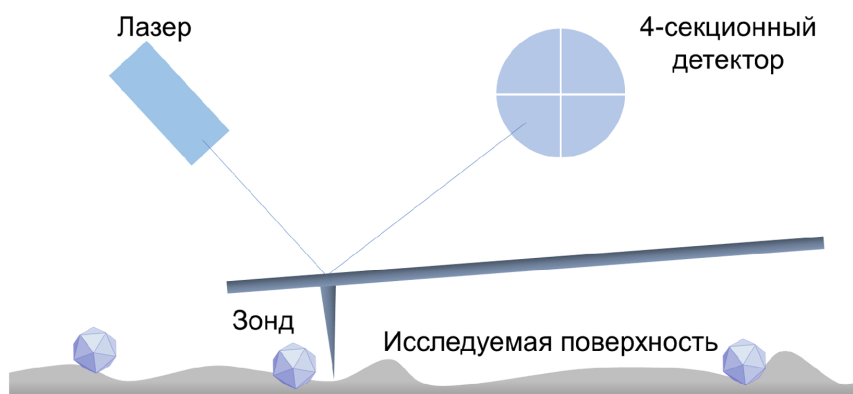


Рисунок 13. Принципиальная схема работы АСМ. Физические силы между зондом и вирусной частицей вызывают его отклонения. Луч лазера направляется на внешнюю поверхность кантилевера, отражается и попадает на четырёхсекционный фотодетектор, где преобразовывается в информацию изображения поверхности вирусной частицы.

Наиболее часто используемые режимы для АСМ включают контактный режим, при котором игла АСМ перемещается по поверхности, и бесконтактный режим, при котором игла отделяется от поверхности образца, а отклонение кантилевера происходит из-за сил притяжения или отталкивания между наконечником и поверхностью. Недостатком контактных АСМ методик является непосредственное механическое взаимодействие зонда с поверхностью. Это часто приводит к поломке зондов и разрушению поверхности образцов в процессе сканирования. Кроме того, контактные методики практически не пригодны для исследования образцов, обладающих малой механической жёсткостью, таких как структуры на основе органических материалов и биологические объекты. На таких объектах часто возникает ситуация, когда игла удерживается силами прилипания настолько сильно, что практически делается невозможным сканирование (игла “залипает”). Чтобы минимизировать разрушающую силу и избежать “залипания” зонда, была разработана модуляционная методика, названная режимом постукивания (tapping mode). В этом режиме колебания кантилевера возбуждаются внешним пьезоэлементом на резонансной частоте. Управляющим параметром для цепи обратной связи является амплитуда колебаний кантилевера. При достаточно большой амплитуде кантилевер разрывает установившуюся связь с образцом на каждом периоде, и, таким образом, исключается влияние сил трения и капиллярного залипания. Режим постукивания наиболее широко используется для анализа псевдовиральных частиц [77, 90].

Хотя оценка морфологии вирусных частиц с помощью АСМ не является рутинной процедурой, она достаточно популярна в научных исследованиях. Возможности и примеры использования данного алгоритма анализа для оценки морфологии вирусных частиц приведены в ряде работ [91–94]. Кроме визуализации, АСМ используется для исследования механических свойств вирусов [95, 96], литических свойств бактериофагов [97, 98], картирования специфических сайтов первичного закрепления вирусов на клетках [99]. Также с помощью АСМ

были охарактеризованы инаktivированные вирусные частицы штамма SARS-CoV-2 и процесс созревания и выхода из инфицированных клеток вирионов SARS-CoV [100].

АСМ применяется и при характеристике инаktivированных вирусных частиц [101, 102]. Кроме определения размеров таких частиц исследуются и их наномеханические свойства. Так, дополнительная информация о вязкоупругих свойствах и модуле Юнга частиц, может позволить их различать, и даст дополнительные сведения об их поведении в присутствии мембраны клетки хозяина [103].

Несмотря на применимость АСМ для исследований вирусов и вирусоподобных частиц, исследование вакцинных штаммов вируса полиомиелита в литературе представлено скудно. Есть сообщение об использовании АСМ в исследовании полиовируса I типа вакцинного штамма Сэбина Lse2ab [104]. Было показано, что такая псевдовиральная частица хорошо сорбируется на различные поверхности: оксид титана, сплавы золота и палладия, свежесколотую слюду и графит. При этом сканирование проводилось в контактном режиме на воздухе, поэтому наблюдались большие скопления солей. В другой работе на схожих образцах [105] были определены размеры тех же частиц. Высота их составила 29 нм. Такие относительно малые размеры исследуемых объектов и большая солевая нагрузка исходных образцов, вероятно, обуславливают сложности работы с данными объектами и малое число публикаций.

Применительно к псевдовиральным частицам вируса полиомиелита, АСМ позволяет провести количественное и качественное сравнение инаktivированных различными способами вирусных частиц полиомиелита, описать морфологию частиц, её наномеханические свойства, в том числе модуль Юнга, а также охарактеризовать специфическое взаимодействие с антителами.

Разрешение АСМ определяется, главным образом, радиусом закругления зонда. Для исследования тонкой структуры применяются два типа ультра-острых зонда с разным радиусом закругления: с наконечником

из кремния ~ 2 нм и более тупые зонды из нитрида кремния с напылёнными на них углеродными иголками ~ 1 нм. Исследования такими зондами позволяют сравнить шаг тонкой структуры и упаковку белков у вирусных частиц, инактивированных разными способами.

Измерения рационально проводить в двух режимах: в Tapping режиме, когда кантилевер возбуждается на резонансной частоте и PeakForce режиме, когда возбуждаются колебания кантилевера на не резонансной частоте и в каждой точке изображения снимается силовая кривая. Для улучшения качества изображения, а также приближения к нативным условиям, измерения имеет смысл проводить не только в воздухе, но и в жидкости. Таким образом, возможно нивелировать мениск, образующийся между кантилевером и подложкой поверхностным слоем воды.

На рисунке 14 представлено АСМ-изображение вакцинного штамма Сэбина II вируса полиомиелита.

3.4. Анализ взаимодействия антигена вируса (D-антигена) с рецептором эукариотических клеток (CD155) методом поверхностного плазмонного резонанса

В настоящее время биосенсоры, работающие на основе эффекта поверхностного плазмонного резонанса, используются для изучения различных взаимодействий: 1) белок-белок [106, 107]; 2) антиген-антитело [108]; 3) белок-липид [109, 110]; 4) белок-низкомолекулярный лиганд [111, 112]; 5) влияние низкомолекулярных соединений на белок-белковые взаимодействия [113, 114] и т.д.

Поверхностный плазмонный резонанс — оптическое явление, основанное на том, что энергия фотонов может передаваться электронам в металле. При определённом значении угла падения света (резонансный угол) происходит резкое снижение интенсивности отражаемого света, так как энергия света тратится на возбуждение поверхностных

плазмонов. При этом возникает поле затухающей световой волны. Значение резонансного угла зависит от показателя преломления среды в приповерхностном слое. При введении раствора, содержащего молекулы, которые образуют комплексы с молекулами, иммобилизованными на сенсорной поверхности, меняется показатель преломления в приповерхностном слое и, следовательно, изменяется резонансный угол. Изменение резонансного угла во времени регистрируется в виде кривой образования комплексов [115]. Путём обработки таких кривых, полученных при различных концентрациях добавляемого вещества, можно рассчитать константы скорости ассоциации и диссоциации и равновесную константу диссоциации.

Биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса (SPR-биосенсоры) (рис. 15) обладают рядом важных преимуществ: широкий методический выбор для ориентированной (His-tag, биотин) и неориентированной ($-\text{SH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COH}$) иммобилизации белка; подбор условий для исследования взаимодействия в широком диапазоне значений pH, ионной силы, температуры, скорости потока и химического состава рабочего буфера; возможность использовать как мягкие, так и жёсткие условия для регенерации сенсорной поверхности с иммобилизованным белком. В качестве анализата (молекулы, взаимодействующей с иммобилизованной молекулой) можно использовать различные вещества от низкомолекулярных соединений и пептидов вплоть до целых клеток и вирусных частиц; использование биосенсоров при разработке и для контроля качества вакцин [116].

Для оценки антигенности вакцин с адъювантом или без него применяли сенсор Viасoge на основе поверхностного плазмонного резонанса с использованием моноклональных антител [117]. Сенсор Viасoge использовали для оценки стабильности вакцины против гепатита Е [118]. Также определение аффинности связывания перекрёстно-реактивных

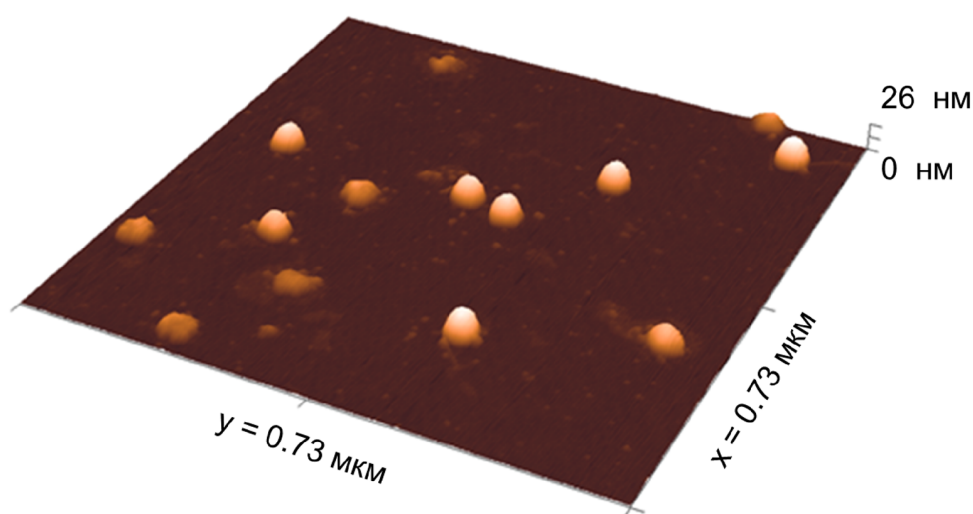


Рисунок 14. АСМ-изображение вакцинного штамма полиомиелита Сэбина II. Высота частиц 26 нм. АСМ-изображение получено в полуконтактном режиме на воздухе. Исходная концентрация суспензии $\sim 10^7$ частиц/мл наносилась на свежесколотую слюду, экспонировалась 5 мин, промывалась 1 мл дистиллированной водой и высушивалась в струе азота. Изображение получено в центре коллективного пользования “Авогадро” ИБМХ.

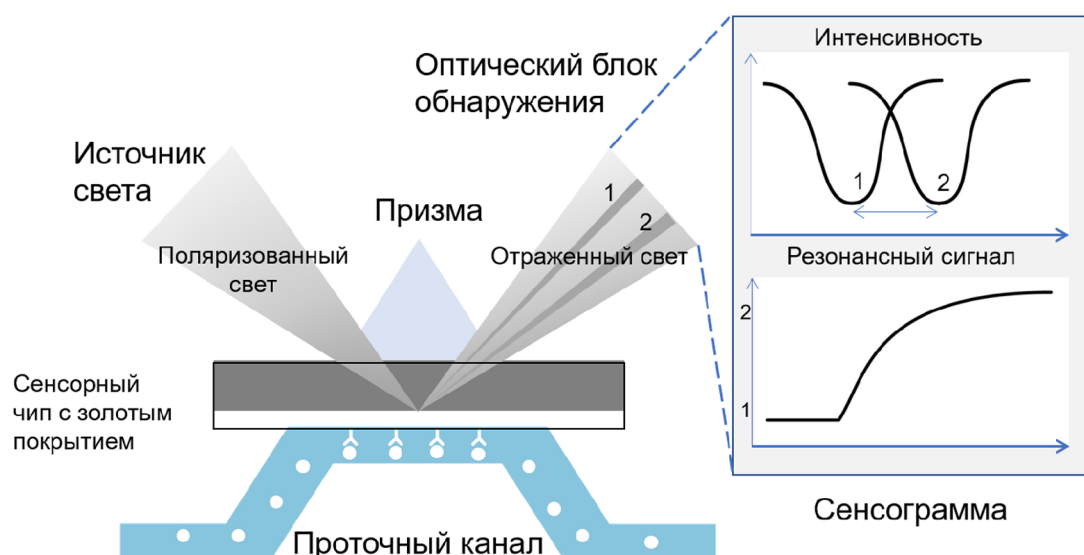


Рисунок 15. Принцип работы SPR-сенсора. Поляризованный свет отражается от раствора с частицами вируса полиомиелита. При введении раствора, содержащего антитела, образуются комплексы с частицами, иммобилизованными на сенсорной поверхности, меняется показатель преломления в приповерхностном слое и, следовательно, изменяется резонансный угол. Изменение резонансного угла во времени регистрируется в виде кривой образования комплексов (рисунок справа).

антител к ACE2 и к S1-RBD с помощью этого сенсора показало, что два моноклональных антитела связывались с ACE2 намного слабее, чем с S1-RBD вируса SARS-CoV-2. Это показывает, что перекрёстно-реактивные антитела к ACE2 и к S1-RBD могут индуцироваться во время инфекции SARS-CoV-2 из-за потенциальной антигенной перекрёстной реактивности между S1-RBD и его рецептором (ACE2) [119]. Кроме того, поверхностный плазмонный резонанс использовался для скрининга ингибиторов проникновения вируса и изучения взаимодействия иммобилизованного NVEM (медиатора проникновения вируса герпеса) и гликопротеина D в присутствии 8 различных соединений. Соединения, в присутствии которых снижался уровень сигнала биосенсора, могут служить в качестве потенциальных ингибиторов проникновения вируса герпеса в клетку [120].

С помощью SPR-технологии были выявлены моноклональные антитела с наивысшей аффинностью, которые эффективно нейтрализовали как псевдотипированный, так и живой штамм MERS-CoV. Высокая нейтрализующая активность этих антител свидетельствует об их большом потенциале для профилактики и терапии инфекции MERS-CoV и в качестве инструмента для разработки вакцинных препаратов [121]. Большинство работ в области использования SPR-технологий посвящено изучению взаимодействию антител с вирусными антигенами [122–124]. В то же время Висоге использовали для изучения взаимодействия двух вирусов животных (вируса коровьей оспы и полиовируса) и двух растительных вирусов (вируса мозаики вигны и вируса табачной мозаики) с моноклональными антителами в реальном времени и без каких-либо меток. С использованием моноклональных антител, специфичных для разных

конформационных состояний вирусного белка, было установлено, что вирусные частицы (вирус мозаики вигны и вирус табачной мозаики) сохраняют свою конформационную целостность при иммобилизации на декстране, присутствующем на сенсорном чипе [125].

Westdijk и соавт. использовали основанный на SPR подход для количественного определения D-антигена [126]. Преимущество такого анализа заключается в уменьшении вариаций теста, поскольку не требуются метки, отсутствует время инкубации и этапы промывки. Количественное определение D-антигена в образцах инактивированного вируса полиомиелита можно выполнять как по стандартному протоколу с получением калибровочных кривых к каждому серотипу, так и в формате CFCA (Calibration-Free Concentration Analysis). В последнем случае анализ основан на измерении скорости связывания во время инъекции образца в условиях частичного или полного ограничения массопереноса. Преимущество CFCA заключается в том, что данная технология не требует калибровочной кривой. С помощью обработки сенсограмм из зависимости сигнала биосенсора от концентрации можно получить данные, характеризующие взаимодействие полиовируса с антителами: константу скорости ассоциации, константу скорости диссоциации, равновесную константу диссоциации. Таким образом, биосенсоры на основе поверхностного плазмонного резонанса широко используются для исследований антиген-антитело и антитело-вирус [127].

3.5. Электрохимический анализ поверхностных антигенных белков и РНК псевдовируса

Электрохимические методы в биохимических и биомедицинских исследованиях активно развиваются благодаря прогрессу в сфере нанотехнологий,

наноматериалов и алгоритмов получения и обработки результатов электроанализа. Электрохимический анализ основан на регистрации процессов, происходящих при получении или отдаче электронов биологическими молекулами. Преимуществами электрохимических методов являются регистрация в режиме реального времени для любых процессов, протекающих на рабочем электроде, малый объём (несколько микролитров) анализируемого биообъекта, возможность использования как стационарных, так и портативных электрохимических устройств с программным обеспечением и взаимозаменяемых электродов, позволяющих получать строго воспроизводимые результаты. Для эффективного электрохимического процесса, связанного с переносом электронов, важную роль играет тип и модификация электрода для иммобилизации биомолекулы, и получения аналитического сигнала. Преимуществами использования взаимозаменяемых электродов является возможность их модификации для оптимизации электрохимической системы, с целью подстроить сенсор под анализируемый биообъект или определяемую биомолекулу, обеспечить необходимые аналитические характеристики метода, такие как биосовместимость, предел обнаружения, диапазон определяемых концентраций.

На основе геносенсорных и иммуносенсорных подходов разработаны электрохимические платформы для регистрации респираторных вирусов [128]. Обобщены данные [129–131] по различным стратегиям выявления вирусов либо по РНК, либо по вирусным белкам или антителам. Геносенсоры на основе иммобилизованных ДНК/РНК-зондов в качестве элемента распознавания позволяют анализировать специфические реакции гибридизации путём молекулярного распознавания комплексов ДНК-ДНК или ДНК-РНК [132–135]. Основными преимуществами этих устройств являются потенциальная возможность миниатюризации, высокая чувствительность, низкие значения предела обнаружения (limit of determination, LOD) и наличие программного обеспечения для обработки результатов. Электрохимические геносенсоры можно разделить на три основные категории по способу иммобилизации зонда, то есть олигонуклеотида, с которым связывается диагностируемая геномная последовательность ДНК или РНК вируса:

- физическая адсорбция [135, 136] на поверхность рабочего электрода за счёт ван-дер-ваальсовых взаимодействий;
- химическая иммобилизация с помощью образования ковалентных связей [137–139] и сшивающих бифункциональных агентов [140–142];
- рациональный дизайн сенсорных конструкций и схемы регистрации с помощью различных модификаций электродов для усиления сигнала [143, 144].

Условия, применяемые для иммобилизации зонда, имеют решающее значение для обеспечения эффективной работы геносенсоров. Плотность иммобилизации олигонуклеотидного зонда напрямую

связана с доступностью сайтов связывания анализируемого вещества. Чрезмерная плотность зонда может привести к насыщению поверхности датчика и стерическим помехам, что значительно снижает эффективность гибридизации [145–147]. Manzano и соавт. применили тиол-Au-взаимодействия при создании геносенсора для чувствительного обнаружения комплементарной ДНК (кДНК) вируса гепатита А. При гибридизации с мишенью наблюдались изменения окислительного потенциала индикаторного трипропиламина из-за блокирования эффектов переноса и диффузии заряда. Устройство достигало предела обнаружения (LOD) 6,94 фг/мкл для вирусной кДНК, что аналогично значениям, полученным с помощью ПЦР (6,4 фг/мкл) [148].

Carinelli и соавт. использовали взаимодействия авидин-биотин для получения эффективной количественной оценки кДНК вируса Эбола [149]. кДНК вируса Эбола была амплифицирована по типу “качящегося кольца” (RCA) на магнитных частицах (этап связывания циркуляризованной биотинилированной кДНК с модифицированными стрептавидином магнитными частицами). Дальнейшую повторную амплификацию проводили круговой амплификацией (С2СА), продукты детектировали методом двойной маркировки, используя биотинилированный захватывающий зонд для иммобилизации на магнитных частицах и считывающий зонд для электрохимического детектирования. Электрохимическое детектирование проводилось на печатных графитовых электродах с использованием вольтамперометрического восстановления H_2O_2 квадратно-волновой вольтамперометрии (КВВА). Электрохимический геносенсор позволил обнаружить всего 200 йоктамолей (200×10^{-24} моль) кДНК, что соответствует 120 молекулам кДНК L-гена вируса Эбола с пределом обнаружения в 33 молекулы кДНК. Уровень LOD, достигаемый с помощью разработанной авторами стратегии, потенциально позволяет выявить заболевание на ранней стадии (от 10^6 до 10^{10} копий РНК/мл).

Стрептавидин-биотин комплексы применяли для определения ДНК вируса Эбола на покрытом золотом печатном графитовом электроде [150] с помощью дифференциально-импульсной вольтамперометрии (ДИВА). Тиолированная ДНК была иммобилизована на поверхности электрода и гибридизована с биотинилированной цепью ДНК-мишени. Биотинилированный гибрид был помечен конъюгатом стрептавидин-щелочная фосфатаза. Предел обнаружения комплементарных олигонуклеотидов составил 4,7 нМ. В работе [151] описана процедура электрохимического считывания с частиц вируса Эбола. кДНК вируса Эбола была амплифицирована на магнитных шариках и дополнительно мечена ферментом глюкозооксидазой. Ферментативный катализ глюкозы, связанной с глюкозооксидазой позволяет проводить косвенное электрохимическое измерение ДНК-мишени. После введения глюкозопероксидазы было проведено хроноамперометрическое определение ДНК-мишени с использованием модифицированного берлинской

лазурью электрода для мониторинга пероксида водорода. Методология, предложенная в этой работе, позволила определять кДНК вируса Эбола с точностью до 1,0 пмоль/л (приблизительно 6×10^8 ДНК-мишеней/мл).

Стрептавидин-биотин комплексы были использованы в работах, посвящённых электрохимическому анализу ДНК вируса Зика [152] и вируса папилломы человека (ВПЧ)-16/18 [153] с использованием в качестве метки пероксидазы хрена. Предел обнаружения ДНК методом хроноамперометрии составил 0,7 пМ и 0,1 нг для вируса Зика и (ВПЧ)-16/18, соответственно.

Farzin и соавт. [147] разработали электрохимическое устройство, модифицированное аминокислотной жидкостью и восстановленным оксидом графена, для обнаружения кДНК (ВПЧ)-16. Материал наносили на электроды, модифицированные многослойными углеродными нанотрубками, и использовали для ковалентного связывания аминированных ДНК-зондов с использованием глутарового альдегида. В присутствии натриевой соли моногидрата антрахинон-2-сульфокислоты в качестве окислительно-активного интеркалятора ДНК гибридизация зондов оцДНК с целевыми цепями ДНК (ВПЧ)-16 приводила к значительному увеличению отклика геносенсора. Сигнал измерялся с помощью дифференциальной импульсной вольтамперометрии: LOD для кДНК (ВПЧ)-16 составил 1,3 нМ. Другие многослойные геносенсоры, предложенные для обнаружения гемофильной палочки, сконструированы с использованием метки толуидинового синего [139], для гепатита В — на основе медиатора ферроцена [154].

В качестве альтернативной платформы для анализа гепатита В авторами [155] был предложен 3D-микрофлюидный анализатор на основе электродов из бумаги, модифицированных графеном. Пирролидинилпептидная нуклеиновая кислота, которая обладает высокой аффинностью к ДНК вируса гепатита В и селективностью, была ковалентно иммобилизована на модифицированной целлюлозе рабочего электрода для захвата ДНК-мишени. Присутствие ДНК вируса приводило к снижению электрохимического ДИВА сигнала гексацианоферрата (III)/(II) в зависимости от концентрации ДНК вируса гепатита В. Предел обнаружения составил 1,45 пМ.

Принцип действия электрохимических иммуносенсоров для выявления различных типов вирусов заключается в преобразовании информации, связанной с иммунохимической реакцией, в измеряемый сигнал, пропорциональный концентрации анализируемого вещества. В качестве элемента биораспознавания сенсорные устройства используют антитело или антиген, которые обычно иммобилизованы на поверхности датчика [156].

Электрохимические иммуносенсоры для диагностики вирусных заболеваний привлекают внимание благодаря возможности миниатюризации, экономичности, простоте эксплуатации, быстрому

отклику, высокой чувствительности и специфичности. Разработаны различные типы электрохимических иммуносенсоров для обнаружения вирусов, такие как вольтамперометрические, амперометрические, импедиметрические и потенциометрические. Электрохимический сигнал регистрируют с помощью медиаторов электронного переноса (феррицианид, ферроцен), электроактивных и ферментативных меток. Такие иммуносенсоры широко используются для обнаружения различных типов вирусов, включая гепатиты В [157–163] и С [164–167], вирусы гриппа [168–172], Денге [173–175], Зика [176], японского энцефалита [177, 178], кори [179], вируса болезни Ньюкасла [180] и энтеровирус [181]. Такого рода сенсоры рассматриваются в качестве дополнительного подхода к традиционной количественной ОТ-ПЦР.

Антигенами вирусов обычно являются гликопротеины, присутствующие на поверхности вирусов и ответственные за связывание с рецептором клетки-хозяина. Например, проникновение коронавируса в клетку-хозяина опосредуется S-белком оболочки коронавируса [182], который недавно был использован в качестве антигена в иммуносенсоре для диагностики COVID-19 [183]. Для диагностики COVID-19 был разработан электроанализ на основе регистрации вирусной РНК или вирусных антигенов (S-белок) с высокой чувствительностью [184, 185].

Вместе с тем в литературе не описан безмедиаторный (прямой) электроанализ компонентов вирусных частиц на основе получения электрохимических “сигнатур” (электрохимическое профилирование) биомолекул при различных биологических процессах. Ранее сотрудники ИБМХ использовали электрохимические методы на основе прямого профилирования биообъектов (трансфицированных клеток, ДНК) для исследования процессов трансфекции клеток и анализа фрагментации ДНК при воздействии ферментов рестрикции и при апоптозе [186]. В работе по созданию псевдовirusных частиц электрохимические методы анализа применимы для сравнительной оценки структурно-биохимических характеристик (рис. 16) после инактивации с помощью ионизирующего излучения.

Эффективность инактивации вируса и получение псевдовirusных частиц зависит от степени деградации его генома [64]. Аналитические характеристики вольтамперограмм (потенциалов, максимальных амплитуд токов, площадей под пиками окисления) позволят получить сравнительные профили окисления РНК вируса полиомиелита на основе анализа пуриновых гетероциклических оснований (гуанина, аденина) и сделать выводы о влиянии процесса инактивации на целостность и фрагментацию вирусной РНК (левая часть рисунка 16).

Ряд аминокислот, таких как тирозин, триптофан, гистидин, метионин и цистеин, обладают уникальным свойством подвергаться электрохимическому окислению [187–189]. Поскольку сохранение пространственной структуры D-антигена — это задача,

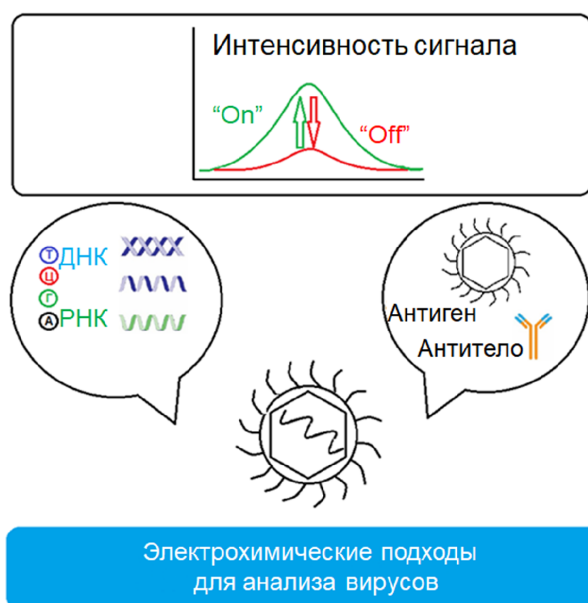


Рисунок 16. Электрохимические подходы для анализа свойств компонентов псевдовиральных частиц, заключающиеся в сравнительном профилировании поверхностных антигенных белков и нуклеиновых кислот псевдовиралов с целью оценки влияния различных параметров инактивации на вирус по изменению сигнала электроокисления.

которую необходимо решить во время проведения процедуры инактивации [21], электрохимическое профилирование вирусных белков D-антигена (правая часть рисунка 16) из разных образцов псевдовиральных частиц полиомиелита, подвергнутых процедуре инактивации различными способами, позволит получить сравнительные профили белков вируса на основе регистрации электрохимического окисления аминокислот белков антигенных детерминант с целью подтверждения сохранения пространственной структуры D-антигена (рис. 17).

Преимущества электрохимического подхода к регистрации белков на основе анализа процессов электроокисления аминокислотных остатков: (1) прямая детекция в достаточно низких концентрациях; (2) чувствительность к изменению конформации белка; (3) изменение сигнала при модификации аминокислот по электроактивным группам.

Анализ компонентов псевдовиральных частиц (РНК, белки), полученных при химической инактивации и электронным облучением, позволит изучить сравнительное влияние химических реагентов и параметров электронного облучения на электрохимический профиль полиовирусов, отражающий степень повреждения РНК и белков капсида (VP1, VP2, VP3). Планируется сравнительный анализ полностью инактивированных вирусных частиц, не вызывающих образование антител и имеющих повреждённый или полностью разрушенный D-антиген, и вирусных частиц, подвергнутых химической инактивации и различным дозам электронного облучения.

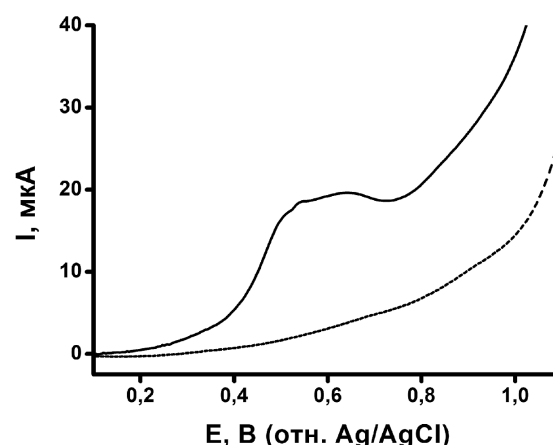


Рисунок 17. Квадратно-волновые вольтамперограммы в отсутствии полиовирусов (ПГЭ/УНТ, пунктирная кривая) и в присутствии полиовируса, инактивированного β-пропиолактоном, штамм Сэбина 1 типа (ПГЭ/УНТ/полиовирус, чёрная кривая).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Область псевдовиральных вакцин становится всё более многообещающей, но наряду с ускорением процесса создания вакцинного препарата, сопровождается ужесточением правил и развитием технологий инактивации. Создание псевдовиральных вакцин электронным облучением представляется наиболее перспективным подходом. Подбор доз и условий облучения позволяет внести нарушения в геном вируса, ограничив его репликативный потенциал, и одновременно сохранить иммуногенные свойства. Современные достижения биологических и инструментальных характеристик вирусов и инактивированных вирусных частиц позволяют инженерам и исследователям создавать противовирусные вакцины с оптимальными физико-химическими свойствами. Предложенные и описанные в данной статье алгоритмы, адаптированные для характеристики вирусных частиц полиомиелита, являются составляющими платформы для разработки псевдовиральных вакцинных препаратов. Реализация алгоритмов платформы позволит создать перспективные вакцины нового типа на основе псевдовиральных частиц.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 23-15-00471.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Hufsky F., Lamkiewicz K., Almeida A., Aouacheria A., Arighi C., Bateman A., Baumbach J., Beerenwinkel N., Brandt C., Cacciabue M., Chuguransky S., Drechsel O., Finn R.D., Fritz A., Fuchs S., Hattab G., Hauschild A.-C., Heider D., Hoffmann M., Hölzer M., Hoops S., Kaderali L., Kalvari I., von Kleist M., Kmiecinski R., Kühnert D., Lasso G., Libin P., List M., Löchel H.F., Martin M.J., Martin R., Matschinske J., McHardy A.C., Mendes P., Mistry J., Navratil V., Nawrocki E.P., O'Toole A.N., Ontiveros-Palacios N., Petrov A.I., Rangel-Pineros G., Redaschi N., Reimering S., Reinert K., Reyes A., Richardson L., Robertson D.L., Sadegh S., Singer J.B., Theys K., Upton C., Welzel M., Williams L., Marz M. (2021) Computational strategies to combat COVID-19: Useful tools to accelerate SARS-CoV-2 and coronavirus research. *Brief. Bioinform.*, **22**(2), 642-663. DOI: 10.1093/bib/bbaa232
2. Fougereux C., Goksøyr L., Idorn M., Soroka V., Myeni S.K., Dagil R., Janitzek C.M., Sogaard M., Aves K.-L., Horsted E.W., Erdoğan S.M., Gustavsson T., Dorosz J., Clemmensen S., Fredsgaard L., Thrane S., Vidal-Calvo E.E., Khalifé P., Hulen T.M., Choudhary S., Theisen M., Singh S.K., Garcia-Senosian A., van Oosten L., Pijlman G., Hierzberger B., Domeyer T., Nalewajek B.W., Strobek A., Skrzypczak M., Andersson L.F., Buus S., Buus A.S., Christensen J.P., Dalebout T.J., Iversen K., Harritshoj L.H., Mordmuller B., Ullum H., Reinert L.S., de Jongh W.A., Kikkert M., Paludan S.R., Theander T.G., Nielsen M.A., Salanti A., Sander A.F. (2021) Capsid-like particles decorated with the SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicit strong virus neutralization activity. *Nat. Commun.*, **12**(1), 324. DOI: 10.1038/s41467-020-20251-8
3. Dong Y., Dai T., Wei Y., Zhang L., Zheng M., Zhou F. (2020) A systematic review of SARS-CoV-2 vaccine candidates. *Signal Transduct. Target. Ther.*, **5**(1), 237. DOI: 10.1038/s41392-020-00352-y
4. Zhang B., Chao C.W., Tsybovsky Y., Abiona O.M., Hutchinson G.B., Moliva J.I., Olia A.S., Pegu A., Phung E., Stewart-Jones G.B.E., Verardi R., Wang L., Wang S., Werner A., Yang E.S., Yap C., Zhou T., Mascola J.R., Sullivan N.J., Graham B.S., Corbett K.S., Kwong P.D. (2020) A platform incorporating trimeric antigens into self-assembling nanoparticles reveals SARS-CoV-2-spike nanoparticles to elicit substantially higher neutralizing responses than spike alone. *Sci. Rep.*, **10**(1), 18149. DOI: 10.1038/s41598-020-74949-2
5. Chen M., Zhang X.-E. (2021) Construction and applications of SARS-CoV-2 pseudoviruses: A mini review. *Int. J. Biol. Sci.*, **17**(6), 1574-1580. DOI: 10.7150/ijbs.59184
6. Geng Q., Tai W., Baxter V.K., Shi J., Wan Y., Zhang X., Montgomery S.A., Taft-Benz S.A., Anderson E.J., Knight A.C., Dinno K.H., Leist S.R., Baric R.S., Shang J., Hong S.-W., Drelich A., Tseng C.-T.K., Jenkins M., Heise M., Du L., Li F. (2021) Novel virus-like nanoparticle vaccine effectively protects animal model from SARS-CoV-2 infection. *PLOS Pathog.*, **17**(9), e1009897. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009897
7. Xiang Q., Li L., Wu J., Tian M., Fu Y. (2022) Application of pseudovirus system in the development of vaccine, antiviral-drugs, and neutralizing antibodies. *Microbiol. Res.*, **258**, 126993. DOI: 10.1016/j.micres.2022.126993
8. Jiang S.D., Pye D., Cox J.C. (1986) Inactivation of poliovirus with β -propiolactone. *J. Biol. Stand.*, **14**(2), 103-109. DOI: 10.1016/0092-1157(86)90028-4
9. Wilton T., Dunn G., Eastwood D., Minor P.D., Martin J. (2014) Effect of formaldehyde inactivation on poliovirus. *J. Virol.*, **88**(20), 11955-11964. DOI: 10.1128/JVI.01809-14
10. Fan C., Ye X., Ku Z., Kong L., Liu Q., Xu C., Cong Y., Huang Z. (2017) Beta-propiolactone inactivation of coxsackievirus A16 induces structural alteration and surface modification of viral capsids. *J. Virol.*, **91**(8), e00038-17. DOI: 10.1128/JVI.00038-17
11. Fertey J., Thoma M., Beckmann J., Bayer L., Finkensieper J., Reißhauer S., Berneck B.S., Issmail L., Schönfelder J., Casado J.P., Poremba A., Rögner F.-H., Standfest B., Makert G.R., Walcher L., Kistenmacher A.-K., Fricke S., Grunwald T., Ulbert S. (2020) Automated application of low energy electron irradiation enables inactivation of pathogen- and cell-containing liquids in biomedical research and production facilities. *Sci. Rep.*, **10**(1), 12786. DOI: 10.1038/s41598-020-69347-7
12. Avanzino B.C., Jue H., Miller C.M., Cheung E., Fuchs G., Fraser C.S. (2018) Molecular mechanism of poliovirus Sabin vaccine strain attenuation. *J. Biol. Chem.*, **293**(40), 15471-15482. DOI: 10.1074/jbc.RA118.004913
13. Bandyopadhyay A.S., Garon J., Seib K., Orenstein W.A. (2015) Polio vaccination: Past, present and future. *Future Microbiol.*, **10**(5), 791-808. DOI: 10.2217/fmb.15.19
14. Quarleri J. (2023) Poliomyelitis is a current challenge: Long-term sequelae and circulating vaccine-derived poliovirus. *GeroScience*, **45**(2), 707-717. DOI: 10.1007/s11357-022-00672-7
15. Klapsa D., Wilton T., Zealand A., Bujaki E., Saxentoff E., Troman C., Shaw A.G., Tedcastle A., Majumdar M., Mate R., Akello J.O., Huseynov S., Zeb A., Zambon M., Bell A., Hagan J., Wade M.J., Ramsay M., Grassly N.C., Saliba V., Martin J. (2022) Sustained detection of type 2 poliovirus in London sewage between February and July, 2022, by enhanced environmental surveillance. *Lancet*, **400**, 1531-1538. DOI: 10.1016/S0140-6736(22)01804-9
16. Okemoto-Nakamura Y., Someya K., Yamaji T., Saito K., Takeda M., Hanada K. (2021) Poliovirus-nonsusceptible Vero cell line for the World Health Organization global action plan. *Sci. Rep.*, **11**(1), 6746. DOI: 10.1038/s41598-021-86050-3
17. Bahar M.W., Porta C., Fox H., Macadam A.J., Fry E.E., Stuart D.I. (2021) Mammalian expression of virus-like particles as a proof of principle for next generation polio vaccines. *NPI vaccines*, **6**(1), 1-10. DOI: 10.1038/s41541-020-00267-3
18. Hogle J.M. (2002) Poliovirus cell entry: Common structural themes in viral cell entry pathways. *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**(1), 677-702. DOI: 10.1146/annurev.micro.56.012302.160757
19. Lentz K.N., Smith A.D., Geisler S.C., Cox S., Buontempo P., Skelton A., deMartino J., Rozhon E., Schwartz J., Girijavallabhan V., O'Connell J., Arnold E. (1997) Structure of poliovirus type 2 Lansing complexed with antiviral agent SCH48973: Comparison of the structural and biological properties of the three poliovirus serotypes. *Structure*, **5**(7), 961-978. DOI: 10.1016/S0969-2126(97)00249-9
20. He Y., Mueller S., Chipman P.R., Bator C.M., Peng X., Bowman V.D., Mukhopadhyay S., Wimmer E., Kuhn R.J., Rossmann M.G. (2003) Complexes of poliovirus serotypes with their common cellular receptor, CD155. *J. Virol.*, **77**(8), 4827-4835. DOI: 10.1128/JVI.77.8.4827-4835.2003
21. Karunatilaka K.S., Filman D.J., Strauss M., Loparo J.J., Hogle J.M. (2021) Real-time imaging of polioviral RNA translocation across a membrane. *MBio*, **12**(1), e03695-20. DOI: 10.1128/mBio.03695-20

22. Лашкевич В.А. (2013) История создания в 1959 г. живой вакцины из аттенуированных штаммов А. Сэбина и идея искоренения полиомиелита. Вопросы вирусологии, **58**(1), 4-10. [Lashkevich V.A. (2013) History of development of the live poliomyelitis vaccine from Sabin attenuated strains in 1959 and idea of poliomyelitis eradication. Problems of Virology, **58**(1), 4-10.]
23. Piniaeva A., Ignatyev G., Kozlovskaya L., Ivin Y., Kovpak A., Ivanov A., Shishova A., Antonova L., Khapchaev Y., Feldblum I., Ivanova O., Siniugina A., Ishmukhametov A. (2021) Immunogenicity and safety of inactivated Sabin-strain polio vaccine "PoliovacSin": Clinical trials phase I and II. Vaccines, **9**(6), 565. DOI: 10.3390/vaccines9060565
24. Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Ivanova O.E., Ipatova E.G., Gmyl L.V., Ishmukhametov A.A. (2016) Experimental approaches to the development of inactivated poliovirus vaccine based on Sabin strains. Epidemiol. Vaccine Prev., **15**(4), 59-64. DOI: 10.31631/2073-3046-2016-15-4-59-64
25. Ivanov A.P., Klebleeva T.D., Malysheva L.P., Ivanova O.E. (2019) Poliovirus-binding inhibition ELISA based on specific chicken egg yolk antibodies as an alternative to the neutralization test. J. Virol. Methods, **266**, 7-10. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.01.007
26. Patterson E.I., Prince T., Anderson E.R., Casas-Sanchez A., Smith S.L., Cansado-Utrilla C., Solomon T., Griffiths M.J., Acosta-Serrano A., Turtle L., Hughes G.L. (2020) Methods of inactivation of SARS-CoV-2 for downstream biological assays. J. Infect. Dis., **222**(9), 1462-1467. DOI: 10.1093/infdis/jiaa507
27. Auerswald H., Yann S., Dul S., In S., Dussart P., Martin N.J., Karlsson E.A., Garcia-Rivera J.A. (2021) Assessment of inactivation procedures for SARS-CoV-2. J. Gen. Virol., **102**(3), 001539. DOI: 10.1099/jgv.0.001539
28. Delrue I., Verzele D., Madder A., Nauwynck H.J. (2012) Inactivated virus vaccines from chemistry to prophylaxis: Merits, risks and challenges. Expert Rev. Vaccines, **11**(6), 695-719. DOI: 10.1586/erv.12.38
29. Zhou S.S. (2022) Variability and Relative Order of Susceptibility of Non-Enveloped Viruses to Chemical Inactivation. In: Disinfection of Viruses (Nims W.R., Ljaz M.K., eds.), Intechopen, 184 p. DOI: 10.5772/intechopen.102727
30. Wigginton K.R., Pecson B.M., Sigstam T., Bosshard F., Kohn T. (2012) Virus inactivation mechanisms: Impact of disinfectants on virus function and structural integrity. Environ. Sci. Technol., **46**(21), 12069-12078. DOI: 10.1021/es3029473
31. Hossain F. (2022) Sources, enumerations and inactivation mechanisms of four emerging viruses in aqueous phase. J. Water Health, **20**(2), 396-440. DOI: 10.2166/wh.2022.263
32. Salthammer T., Mentese S., Marutzky R. (2010) Formaldehyde in the indoor environment. Chem. Rev., **110**(4), 2536-2572. DOI: 10.1021/cr800399g
33. Sabbaghi A., Miri S.M., Keshavarz M., Zargar M., Ghaemi A. (2019) Inactivation methods for whole influenza vaccine production. Rev. Med. Virol., **29**(6), e2074. DOI: 10.1002/rmv.2074
34. Kamps J.J.A.G., Hopkinson R.J., Schofield C.J., Claridge T.D.W. (2019) How formaldehyde reacts with amino acids. Commun. Chem., **2**(1), 126. DOI: 10.1038/s42004-019-0224-2
35. Abd-Elghaffar A.A., Rashed M.E., Ali A.E., Amin M.A. (2020) In-vitro inactivation of Sabin-polioviruses for development of safe and effective polio vaccine. Vaccines, **8**(4), 601. DOI: 10.3390/vaccines8040601
36. Tobin G.J., Tobin J.K., Gaidamakova E.K., Wiggins T.J., Bushnell R. V., Lee W.-M., Matrosova V.Y., Dollery S.J., Meeks H.N., Kouliavskaya D., Chumakov K., Daly M.J. (2020) A novel gamma radiation-inactivated Sabin-based polio vaccine. PLoS One, **15**(1), e0228006. DOI: 10.1371/journal.pone.0228006
37. Kim E., Han G.-Y., Nguyen H. (2017) An adenovirus-vectored influenza vaccine induces durable cross-protective hemagglutinin stalk antibody responses in mice. Viruses, **9**(8), 234. DOI: 10.3390/v9080234
38. Fertey J., Bayer L., Grunwald T., Pohl A., Beckmann J., Gotzmann G., Casado J., Schonfelder J., Rogner F.-H., Wetzel C., Thoma M., Bailer S., Hiller E., Rupp S., Ulbert S. (2016) Pathogens inactivated by low-energy-electron irradiation maintain antigenic properties and induce protective immune responses. Viruses, **8**(11), 319. DOI: 10.3390/v8110319
39. Budowsky E., Friedman E., Zhelezanova N., Noskov F. (1991) Principles of selective inactivation of viral genome. VI. Inactivation of the infectivity of the influenza virus by the action of β -propiolactone. Vaccine, **9**(6), 398-402. DOI: 10.1016/0264-410X(91)90125-P
40. Perrin P., Morgeaux S. (1995) Inactivation of DNA by β -propiolactone. Biologicals, **23**(3), 207-211. DOI: 10.1006/biol.1995.0034
41. Uittenbogaard J.P., Zomer B., Hoogerhout P., Metz B. (2011) Reactions of β -propiolactone with nucleobase analogues, nucleosides, and peptides. J. Biol. Chem., **286**(42), 36198-36214. DOI: 10.1074/jbc.M111.279232
42. Herrera-Rodriguez J., Signorazzi A., Holtrop M., de Vries-Idema J., Huckriede A. (2019) Inactivated or damaged? Comparing the effect of inactivation methods on influenza virions to optimize vaccine production. Vaccine, **37**(12), 1630-1637. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.01.086
43. Yu S., Wei Y., Liang H., Ji W., Chang Z., Xie S., Wang Y., Li W., Liu Y., Wu H., Li J., Wang H., Yang X. (2022) Comparison of physical and biochemical characterizations of SARS-CoV-2 inactivated by different treatments. Viruses, **14**(9), 1938. DOI: 10.3390/v14091938
44. Савина Н.Н., Екимов А.А., Трухин В.П., Евтушенко А.Э., Жиренкина Е.Н., Синегубова Е.О., Слита А.В. (2021) Оценка методов инактивирования аденовируса птиц при производстве гриппозных вакцин. Медицина экстремальных ситуаций, №3, 84-89. [Savina N.N., Ekimov A.A., Trukhin V.P., Evtushenko A.E., Zhirenkina E.N., Sinigubova E.O., Slita A.V. (2021) Evaluation of avian adenovirus inactivation methods used in the production of influenza vaccines. Extreme Medicine, 3, 78-83.] DOI: 10.47183/mes.2021.032
45. Elveborg S., Monteil V., Mirazimi A. (2022) Methods of inactivation of highly pathogenic viruses for molecular, serology or vaccine development purposes. Pathogens, **11**(2), 271. DOI: 10.3390/pathogens11020271
46. Miller R.L., Plagemann P.G.W. (1974) Effect of ultraviolet light on mengovirus: Formation of uracil dimers, instability and degradation of capsid, and covalent linkage of protein to viral RNA. J. Virol., **13**(3), 729-739. DOI: 10.1128/jvi.13.3.729-739.1974
47. Furuya Y., Regner M., Lobigs M., Koskinen A., Mullbacher A., Alsharifi M. (2010) Effect of inactivation method on the cross-protective immunity induced by whole "killed" influenza A viruses and commercial vaccine preparations. J. Gen. Virol., **91**(6), 1450-1460. DOI: 10.1099/vir.0.018168-0

48. Grieb T., Forng R.-Y., Brown R., Owolabi T., Maddox E., Mcbain A., Drohan W.N., Mann D.M., Burgess W.H. (2002) Effective use of gamma irradiation for pathogen inactivation of monoclonal antibody preparations. *Biologicals*, **30**(3), 207-216. DOI: 10.1006/biol.2002.0330
49. Buenz E.J., Howe C.L. (2006) Picornaviruses and cell death. *Trends Microbiol.*, **14**(1), 28-36. DOI: 10.1016/j.tim.2005.11.003
50. Montagnon B.J., Nicolas A.J., Fanget B., Peyron L. (1981) Comparison of sensitivity of Vero cell line versus primary monkey kidney cells in the detection of residual live polio virus during and after inactivation. *Dev. Biol. Stand.*, **47**, 151-155.
51. Mendelsohn C.L., Wimmer E., Racaniello V.R. (1989) Cellular receptor for poliovirus: Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of a new member of the immunoglobulin superfamily. *Cell*, **56**(5), 855-865. DOI: 10.1016/0092-8674(89)90690-9
52. Chapel C., Rocher-Hélion N., Mantel N., Imbert S., Deshaies E., Barban V., Sabouraud A., Barbe J.-P., Mallet L. (2018) Replacement of primary monkey kidney cells by L20B cell line in the test for effective inactivation of inactivated poliovirus vaccine. *J. Virol. Methods*, **256**, 77-84. DOI: 10.1016/j.jviromet.2018.03.004
53. Kende M., Robbins M.L. (1965) Titration and neutralization of poliovirus in micro tissue culture under increased carbon dioxide. *Appl. Microbiol.*, **13**(6), 1026-1029. DOI: 10.1128/am.13.6.1026-1029.1965
54. Poliomyelitis vaccine (inactivated) version 9.2, 2010. Retrieved October 12, 2023, from <https://pdfsearches.com/european-pharmacopoeia-9-2>
55. Recommendations for the production and control of poliomyelitis vaccine (inactivated). Retrieved October 12, 2023, from [https://www.who.int/publications/m/item/recommendations-for-the-production-and-control-of-poliomyelitis-vaccine-\(inactivated\)](https://www.who.int/publications/m/item/recommendations-for-the-production-and-control-of-poliomyelitis-vaccine-(inactivated))
56. Beale A.J., Mason P.J. (1962) The measurement of the D-antigen in poliovirus preparations. *J. Hygiene (London)*, **60**(1), 113-121. DOI: 10.1017/S002217240003936X
57. Rezapkin G., Dragunsky E., Chumakov K. (2005) Improved ELISA test for determination of potency of inactivated poliovirus vaccine (IPV). *Biologicals*, **33**(1), 17-27. DOI: 10.1016/j.biologicals.2004.11.003
58. Иванов А.П., Козлов В.Г., Клеблеева Т.Д., Иванова О.Е., Киктенко А.В. (2014) Система иммуноферментного анализа на основе специфических антител класса (IgY) из яичных желтков для количественного определения D-антигена в инактивированных полиовирусных вакцинах. *Вопросы вирусологии*, **59**(6), 39-42. [Ivanov A.P., Kozlov V.G., Klebleeva T.D., Ivanova O.E., Kiktenko A.V. (2014) An ELISA system based on the specific class Y (IgY) antibodies from egg yolks for the quantitative determination of D-antigen in inactivated poliovirus vaccines. *Problems of Virology*, **59**(6), 39-42.]
59. Kouliavskaja D., Puligedda R.D., Dessain S.K., Chumakov K. (2020) Universal ELISA for quantification of D-antigen in inactivated poliovirus vaccines. *J. Virol. Methods*, **276**, 113785. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.113785
60. Wood D.J., Heath A.B., Sawyer L.A. (1995) A WHO collaborative study on assays of the antigenic content of inactivated poliovirus vaccines. *Biologicals*, **23**(1), 83-94. DOI: 10.1016/1045-1056(95)90017-9
61. Wilton T. (2016) Methods for the quality control of inactivated poliovirus vaccines. *Methods Mol. Biol.*, **1387**, 279-297. DOI: 10.1007/978-1-4939-3292-4_15
62. Zhdanov D.D., Plyasova A.A., Pokrovsky V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Gladilina Y.A., Sokolov N.N. (2020) Inhibition of nuclease activity by a splice-switching oligonucleotide targeting deoxyribonuclease 1 mRNA prevents apoptosis progression and prolong viability of normal human CD4(+) T-lymphocytes. *Biochimie*, **174**, 34-43. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.04.009
63. Zhdanov D.D., Gladilina Y.A., Pokrovsky V.S., Grishin D.V., Grachev V.A., Orlova V.S., Pokrovskaya M.V., Alexandrova S.S., Plyasova A.A., Sokolov N.N. (2019) Endonuclease G modulates the alternative splicing of deoxyribonuclease 1 mRNA in human CD4+ T lymphocytes and prevents the progression of apoptosis. *Biochimie*, **157**, 158-176. DOI: 10.1016/j.biochi.2018.11.020
64. Burton J., Love H., Richards K., Burton C., Summers S., Pitman J., Easterbrook L., Davies K., Spencer P., Killip M., Cane P., Bruce C., Roberts A.D.G. (2021) The effect of heat-treatment on SARS-CoV-2 viability and detection. *J. Virol. Methods*, **290**, 114087. DOI: 10.1016/j.jviromet.2021.114087
65. Baker M. (2011) qPCR: Quicker and easier but don't be sloppy. *Nat. Methods*, **8**(3), 207-212. DOI: 10.1038/nmeth0311-207
66. Holden M.J., Wang L. (2008) Quantitative Real-Time PCR: Fluorescent Probe Options and Issues. In: *Standardization and Quality Assurance in Fluorescence Measurements II* (Resch-Genger U., ed.). Springer Series on Fluorescence, vol. 6. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 489-508. DOI: 10.1007/4243_2008_046
67. Park H., Jung W., Jang H., Namkoong K., Choi K.-Y. (2022) One-step RT-qPCR for viral RNA detection using digital analysis. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, **10**, 837838. DOI: 10.3389/fbioe.2022.837838
68. Wozniak A., Cerda A., Ibarra-Henriquez C., Sebastian V., Armijo G., Lamig L., Miranda C., Lagos M., Solari S., Guzmán A.M., Quiroga T., Hirschfeld S., Riveras E., Ferrés M., Gutiérrez R.A., García P. (2020) A simple RNA preparation method for SARS-CoV-2 detection by RT-qPCR. *Sci. Rep.*, **10**(1), 16608. DOI: 10.1038/s41598-020-73616-w
69. de Oliveira Lopes G.A., Ferreira L.R., de Souza Trindade G., Fonseca A.A., dos Reis J.K.P. (2021) qPCR assay for the detection of pseudocowpox virus. *Arch. Virol.*, **166**(1), 243-247. DOI: 10.1007/s00705-020-04872-4
70. Sabat J., Subhadra S., Rath S., Ho L.M., Kanungo S., Panda S., Mandal M.C., Dash S., Pati S., Turuk J. (2021) Yielding quality viral RNA by using two different chemistries: A comparative performance study. *Biotechniques*, **71**(4), 510-515. DOI: 10.2144/btn-2021-0054
71. Reichelt R. (2007) Scanning Electron Microscopy. In: *Science of Microscopy* (Hawkes P.W., Spence J.C.H., eds.), Springer, New York, NY, pp. 133-272. DOI: 10.1007/978-0-387-49762-4_3
72. Singh A.K. (2016) Experimental Methodologies for the Characterization of Nanoparticles. In: *Engineered Nanoparticles*, Stanford University, pp. 125-170. DOI: 10.1016/B978-0-12-801406-6.00004-2
73. Ulery B.D., Kumar D., Ramer-Tait A.E., Metzger D.W., Wannemuehler M.J., Narasimhan B. (2011) Design of a protective single-dose intranasal nanoparticle-based vaccine platform for respiratory infectious diseases. *PLoS One*, **6**(3), e17642. DOI: 10.1371/journal.pone.0017642

74. Kipper M.J., Wilson J.H., Wannemuehler M.J., Narasimhan B. (2006) Single dose vaccine based on biodegradable polyanhydride microspheres can modulate immune response mechanism. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **76A**(4), 798-810. DOI: 10.1002/jbm.a.30545
75. Ross K.A., Loyd H., Wu W., Huntimer L., Wannemuehler M.J., Carpenter S., Narasimhan B. (2014) Structural and antigenic stability of H5N1 hemagglutinin trimer upon release from polyanhydride nanoparticles. *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, **102**(11), 4161-4168. DOI: 10.1002/jbm.a.35086
76. Ingvarsson P.T., Schmidt S.T., Christensen D., Larsen N.B., Hinrichs W.L.J., Andersen P., Rantanen J., Nielsen H.M., Yang M., Foged C. (2013) Designing CAF-adjuvanted dry powder vaccines: Spray drying preserves the adjuvant activity of CAF01. *J. Control. Release*, **167**(3), 256-264. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.01.031
77. Vangala A., Kirby D., Rosenkrands I., Agger E.M., Andersen P., Perrie Y. (2010) A comparative study of cationic liposome and niosome-based adjuvant systems for protein subunit vaccines: Characterisation, environmental scanning electron microscopy and immunisation studies in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, **58**(6), 787-799. DOI: 10.1211/jpp.58.6.0009
78. Lee J.T.Y., Chow K.L. (2012) SEM sample preparation for cells on 3D scaffolds by freeze-drying and HMDS. *Scanning*, **34**(1), 12-25. DOI: 10.1002/sca.20271
79. Williams D.B., Carter C.B. (2009) The Transmission Electron Microscope. In: *Transmission Electron Microscopy*. Springer, Boston, MA, pp. 3-22. DOI: 10.1007/978-0-387-76501-3_1
80. Newbury D.E., Joy D.C., Echlin P., Fiori C.E., Goldstein J.I. (1986) Cryomicroscopy. In: *Advanced Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis*. Springer, Boston, MA, pp. 365-433. DOI: 10.1007/978-1-4757-9027-6_9
81. Callaway E. (2015) The revolution will not be crystallized: A new method sweeps through structural biology. *Nature*, **525**(7568), 172-174. DOI: 10.1038/525172a
82. Rames M., Yu Y., Ren G. (2014) Optimized negative staining: A high-throughput protocol for examining small and asymmetric protein structure by electron microscopy. *J. Vis. Exp.*, 2014(90), e51087. DOI: 10.3791/51087
83. Taylor A.R., McCormick M.J. (1956) Electron microscopy of poliomyelitis virus. *Yale J. Biol. Med.*, **28**(6), 589-597.
84. Dales S., Eggers H.J., Tamm I., Palade G.E. (1965) Electron microscopic study of the formation of poliovirus. *Virology*, **26**(3), 379-389. DOI: 10.1016/0042-6822(65)90001-2
85. Belnap D.M., McDermott B.M., Filman D.J., Cheng N., Trus B.L., Zuccola H.J., Racaniello V.R., Hogle J.M., Steven A.C. (2000) Three-dimensional structure of poliovirus receptor bound to poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**(1), 73-78. DOI: 10.1073/pnas.97.1.73
86. Bubeck D., Filman D.J., Hogle J.M. (2005) Cryo-electron microscopy reconstruction of a poliovirus-receptor-membrane complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**(7), 615-618. DOI: 10.1038/nsmb955
87. Rossignol E., Yang J., Bullitt E. (2015) The role of electron microscopy in studying the continuum of changes in membranous structures during poliovirus infection. *Viruses*, **7**(10), 5305-5318. DOI: 10.3390/v7102874
88. Binnig G., Quate C.F., Gerber C. (1986) Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.*, **56**(9), 930-933. DOI: 10.1103/PhysRevLett.56.930
89. Loh S., Cheah W. (2017) Optical beam deflection based AFM with integrated hardware and software platform for an undergraduate engineering laboratory. *Appl. Sci.*, **7**(3), 226. DOI: 10.3390/app7030226
90. Trent A., Ulery B.D., Black M.J., Barrett J.C., Liang S., Kostenko Y., David N.A., Tirrell M.V. (2015) Peptide amphiphile micelles self-adjuvant group A streptococcal vaccination. *AAPS J.*, **17**(2), 380-388. DOI: 10.1208/s12248-014-9707-3
91. Akhmetova A.I., Yaminsky I.V. (2022) High resolution imaging of viruses: Scanning probe microscopy and related techniques. *Methods*, **197**, 30-38. DOI: 10.1016/j.ymeth.2021.06.011
92. de Pablo P.J., Schaap I.A.T. (2019) Atomic force microscopy of viruses. *Phys. Virol. Adv. Exp. Med. Biol.*, **1215**, 159-179. DOI: 10.1007/978-3-030-14741-9_8
93. Malkin A.J., Plomp M., McPherson A. (2005) Unraveling the architecture of viruses by high-resolution atomic force microscopy. *Methods Mol. Biol.*, **292**, 85-108. DOI: 10.1385/1-59259-848-X:085
94. Kuznetsov Y.G., Malkin A.J., Lucas R.W., Plomp M., McPherson A. (2001) Imaging of viruses by atomic force microscopy. *J. Gen. Virol.*, **82**(9), 2025-2034. DOI: 10.1099/0022-1317-82-9-2025
95. Liashkovich I., Hafezi W., Kuhn J.E., Oberleithner H., Kramer A., Shahin V. (2008) Exceptional mechanical and structural stability of HSV-1 unveiled with fluid atomic force microscopy. *J. Cell Sci.*, **121**(14), 2287-2292. DOI: 10.1242/jcs.032284
96. Sae-Ueng U., Li D., Zuo X., Huffman J.B., Homa F.L., Rau D., Evilevitch A. (2014) Solid-to-fluid DNA transition inside HSV-1 capsid close to the temperature of infection. *Nat. Chem. Biol.*, **10**(10), 861-867. DOI: 10.1038/nchembio.1628
97. Dubrovin E.V., Voloshin A.G., Kraevsky S.V., Ignatyuk T.E., Abramchuk S.S., Yaminsky I.V., Ignatov S.G. (2008) Atomic force microscopy investigation of phage infection of bacteria. *Langmuir*, **24**(22), 13068-13074. DOI: 10.1021/la8022612
98. Dubrovin E.V., Popova A.V., Kraevskiy S.V., Ignatov S.G., Ignatyuk T.E., Yaminsky I.V., Volozhantsev N.V. (2012) Atomic force microscopy analysis of the *Acinetobacter baumannii* bacteriophage AP22 lytic cycle. *PLoS One*, **7**(10), e47348. DOI: 10.1371/journal.pone.0047348
99. Alsteens D., Newton R., Schubert R., Martinez-Martin D., Delguste M., Roska B., Müller D.J. (2017) Nanomechanical mapping of first binding steps of a virus to animal cells. *Nat. Nanotechnol.*, **12**(2), 177-183. DOI: 10.1038/nnano.2016.228
100. Bagrov D.V., Glukhov G.S., Moiseenko A.V., Karlova M.G., Litvinov D.S., Zaitsev P.A., Kozlovskaya L.I., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Piniaeva A.N., Oksanich A.S., Volok V.P., Osolodkin D.I., Ishmukhametov A.A., Egorov A.M., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P., Sokolova O.S. (2022) Structural characterization of β -propiolactone inactivated severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) particles. *Microsc. Res. Tech.*, **85**(2), 562-569. DOI: 10.1002/jemt.23931
101. Nooraei S., Bahrulolum H., Hoseini Z.S., Katalani C., Hajizade A., Easton A.J., Ahmadian G. (2021) Virus-like particles: Preparation, immunogenicity and their roles as nanovaccines and drug nanocarriers. *J. Nanobiotechnology*, **19**(1), 59. DOI: 10.1186/s12951-021-00806-7
102. Oropesa R., Ramos J.R., Falcón V., Felipe A. (2013) Characterization of virus-like particles by atomic force microscopy in ambient conditions. *Adv. Nat. Sci. Nanosci. Nanotechnol.*, **4**(2), 025007. DOI: 10.1088/2043-6262/4/2/025007

103. *González-Domínguez I., Gutiérrez-Granados S., Cervera L., Gódia F., Domingo N.* (2016) Identification of HIV-1-based virus-like particles by multifrequency atomic force microscopy. *Biophys. J.*, **111**(6), 1173-1179. DOI: 10.1016/j.bpj.2016.07.046
104. *Яминский И.В., Большакова А.В., Логинов Б.А., Протасенко В.В., Суворов А.Л., Козодаев М.А., Волнин Д.С.* (1999) Микроскопический контроль на содержание вируса полиомиелита. Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования, **7**, 100-103. [*Yaminsky I.V., Bolshakova A.V., Loginov B.A., Protasenko V.V., Suvorov A.L., Kozodaev M.A., Volnin D.S.* (2000) Microscopic control on content of poliomyelitis virus. *Surf. Investig. X-Ray, Synchrotron Neutron Tech.*, **15**, 1119-1125.]
105. *Голутвин И.А.* (2004) Сканирующая силовая спектроскопия наноструктурированных полимерных и биологических систем. Дис. канд. физ.-мат. наук, ФГУП Государственный научный центр Российской Федерации Институт теоретической и экспериментальной физики, Москва. [*Golutvin I.A.* (2004) Scanning force spectroscopy of nanostructured polymer and biological systems. dis. Ph.D. physics and mathematics Sciences, Federal State Unitary Enterprise State Scientific Center of the Russian Federation Institute of Theoretical and Experimental Physics, Moscow.]
106. *Yablokov E.O., Sushko T.A., Ershov P.V., Florinskaya A.V., Gnedenko O.V., Shkel T.V., Grabovec I.P., Strushkevich N.V., Kaluzhskiy L.A., Usanov S.A., Gilep A.A., Ivanov A.S.* (2019) A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of interactions of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners. *Biochimie*, **162**, 156-166. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.04.020.
107. *Гнеденко О.В., Яблоков Е.О., Еришов П.В., Свирид А.В., Шкель Т.В., Гайдукевич И.В., Струшкевич Н.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Иванов А.С.* (2019) Взаимодействие простаглицинсинтазы с цитохромами P450. Биомедицинская химия, **65**(1), 63-66. [*Gnedenko O.V., Yablokov E.O., Ershov P.V., Svirid A.V., Shkel T.V., Haidukevich I.V., Strushkevich N.V., Gilep A.A., Usanov S.A., Ivanov A.S.* (2019) Interaction of prostacyclin synthase with cytochromes P450. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **65**(1), 63-66.] DOI: 10.18097/PBMC20196501063
108. *Gnedenko O.V., Mezentssev Y.V., Molnar A.A., Lisitsa A.V., Ivanov A.S., Archakov A.I.* (2013) Highly sensitive detection of human cardiac myoglobin using a reverse sandwich immunoassay with a gold nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor. *Anal. Chim. Acta*, **759**, 105-109. DOI: 10.1016/j.aca.2012.10.053.
109. *Калужский Л.А., Еришов П.В., Курпединов К.С., Сони́на Д.С., Яблоков Е.О., Шкель Т.В., Гайдукевич И.В., Сергеев Г.В., Усанов С.А., Иванов А.С.* (2019) SPR анализ белок-белковых взаимодействий с участием цитохромов P450 и цитохрома b5, встроенных в бислойную липидную мембрану. Биомедицинская химия, **65**(5), 374-379. [*Kaluzhskiy L.A., Ershov P.V., Kurpedinov K.S., Sonina D.S., Yablokov E.O., Shkel T.V., Haidukevich I.V., Sergeev G.V., Usanov S.A., Ivanov A.S.* (2019) SPR analysis of protein-protein interactions with P450 cytochromes and cytochrome b5 integrated into lipid membrane. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **65**(5), 374-379.] DOI: 10.18097/PBMC20196505374
110. *Еришов П.В., Калужский Л.А., Яблоков Е.О., Гнеденко О.В., Ковалевский А.А., Тумилович А.М., Гилеп А.А., Струшкевич Н.В., Иванов А.С.* (2021) Применение SPR-биосенсора для анализа белок-белковых взаимодействий в водной среде и бислойной липидной мембране на примере P450sc (CYP11A1). Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии, **38**(1), 71-80. [*Ershov P.V., Kaluzhskiy L.A., Yablokov E.O., Gnedenko O.V., Kavaleuski A.A., Tumilovich A.M., Gilep A.A., Strushkevich N.V., Ivanov A.S.* (2021) Application of the SPR biosensor for the analysis of protein-protein interactions in aqueous environment and bilayer lipid membrane as exemplified by P450sc (CYP11A1). *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **15**(1), 89-96.] DOI: 10.1134/S1990747821010049
111. *Kaluzhskiy L., Ershov P., Yablokov E., Shkel T., Grabovec I., Mezentssev Y., Gnedenko O., Usanov S., Shabunya P., Fatykhava S., Popov A., Artyukov A., Styshova O., Gilep A., Strushkevich N., Ivanov A.* (2021) Human lanosterol 14-alpha demethylase (CYP51A1) is a putative target for natural flavonoid luteolin 7,3'-disulfate. *Molecules*, **26**(8), 2237. DOI: 10.3390/molecules26082237.
112. *Калужский Л.А., Еришов П.В., Яблоков Е.О., Мезенцев Ю.В., Гнеденко О.В., Шкель Т.В., Гилеп А.А., Усанов С.А., Иванов А.С.* (2021) Скрининг потенциальных неазольных ингибиторов 14-альфадеметилазы (CYP51) грибов рода *Candida*. Биомедицинская химия, **67**(1), 42-50. [*Kaluzhskiy L.A., Ershov P.V., Yablokov E.O., Mezentssev Y.V., Gnedenko O.V., Shkel T.V., Gilep A.A., Usanov S.A., Ivanov A.S.* (2021) Screening of potential non-azole inhibitors of lanosterol 14-alpha demethylase (CYP51) of *Candida* fungi. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **67**(1), 42-50.] DOI: 10.18097/PBMC20216701042
113. *Yablokov E.O., Sushko T.A., Kaluzhskiy L.A., Kavaleuski A.A., Mezentssev Y.V., Ershov P.V., Gilep A.A., Ivanov A.S., Strushkevich N.V.* (2021) Substrate-induced modulation of protein-protein interactions within human mitochondrial cytochrome P450-dependent system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **208**, 105793. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2020.105793
114. *Ershov P.V., Yablokov E.O., Florinskaya A.V., Mezentssev Y.V., Kaluzhskiy L.A., Tumilovich A.M., Gilep A.A., Usanov S.A., Ivanov A.S.* (2019) SPR-based study of affinity of cytochrome P450s / redox partners interactions modulated by steroidal substrates. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **187**, 124-129. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2018.11.009
115. *van der Merwe P.A.* (2001) Surface Plasmon Resonance. In: *Protein-Ligand Interactions: Hydrodynamics and Calorimetry* (Harding S.E., Chowdry B.Z., eds.), Oxford University Press, New York, pp. 137-170.
116. *Иванов А.С.* (2012) Исследование межмолекулярных взаимодействий с помощью оптических биосенсоров, работающих на эффекте поверхностного плазмонного резонанса. Современные технологии в медицине, **4**, 142-153. [*Ivanov A.S.* (2012) The study of intermolecular interactions using optical biosensors operating on the effect of surface plasmon resonance. *Sovremennye Tehnologii v Medicine*, **4**, 142-152.]
117. *Yin X., Wang X., Zhang Z., Li Y., Lin Z., Pan H., Gu Y., Li S., Zhang J., Xia N., Zhao Q.* (2020) Demonstration of real-time and accelerated stability of hepatitis E vaccine with a combination of different physicochemical and immunochemical methods. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **177**, 112880. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.112880
118. *Li Y., Huang X., Zhang Z., Li S., Zhang J., Xia N., Zhao Q.* (2020) Prophylactic hepatitis E vaccines: Antigenic analysis and serological evaluation. *Viruses*, **12**(1), 109. DOI: 10.3390/v12010109

119. Lai Y.-C., Cheng Y.-W., Chao C.-H., Chang Y.-Y., Chen C.-D., Tsai W.-J., Wang S., Lin Y.-S., Chang C.-P., Chuang W.-J., Chen L.-Y., Wang Y.-R., Chang S.-Y., Huang W., Wang J.-R., Tseng C.-K., Lin C.-K., Chuang Y.-C., Yeh T.-M. (2022) Antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 S1-RBD and its receptor ACE2. *Front. Immunol.*, **13**, 868724. DOI: 10.3389/fimmu.2022.868724
120. Kumar P.K.R. (2020) Systematic screening of viral entry inhibitors using surface plasmon resonance. *Methods Mol. Biol.*, **2089**, 131-145. DOI: 10.1007/978-1-0716-0163-1_8
121. Ying T., Du L., Ju T.W., Prabakaran P., Lau C.C.Y., Lu L., Liu Q., Wang L., Feng Y., Wang Y., Zheng B.-J., Yuen K.-Y., Jiang S., Dimitrov D.S. (2014) Exceptionally potent neutralization of middle east respiratory syndrome coronavirus by human monoclonal antibodies. *J. Virol.*, **88**(14), 7796-7805. DOI: 10.1128/JVI.00912-14
122. Rossi G., Real-Fernández F., Panza F., Barbetti F., Pratesi F., Rovero P., Migliorini P. (2014) Biosensor analysis of anti-citrullinated protein/peptide antibody affinity. *Anal. Biochem.*, **465**, 96-101. DOI: 10.1016/j.ab.2014.07.030
123. Okagawa T., Konnai S., Nishimori A., Maekawa N., Ikebuchi R., Goto S., Nakajima C., Kohara J., Ogasawara S., Kato Y., Suzuki Y., Murata S., Ohashi K. (2017) Anti-bovine programmed death-1 rat-bovine chimeric antibody for immunotherapy of bovine leukemia virus infection in cattle. *Front. Immunol.*, **8**, 650. DOI: 10.3389/fimmu.2017.00650
124. Wong C.L., Chua M., Mittman H., Choo L.X., Lim H.Q., Olivo M. (2017) A phase-intensity surface plasmon resonance biosensor for avian influenza A (H5N1) detection. *Sensors*, **17**(10), 2363. DOI: 10.3390/s17102363
125. Dubs M.-C., Altschuh D., van Regenmortel M.H.V. (1992) Interaction between viruses and monoclonal antibodies studied by surface plasmon resonance. *Immunol. Lett.*, **31**(1), 59-64. DOI: 10.1016/0165-2478(92)90011-C
126. Westdijk J., van der Maas L., ten Have R., Kersten G. (2016) Measuring poliovirus antigenicity by surface plasmon resonance. Application for potency indicating assays. *Methods Mol. Biol.*, **1387**, 299-323. DOI: 10.1007/978-1-4939-3292-4_16
127. Visentin J., Minder L., Lee J.-H., Taupin J.-L., di Primo C. (2016) Calibration free concentration analysis by surface plasmon resonance in a capture mode. *Talanta*, **148**, 478-485. DOI: 10.1016/j.talanta.2015.11.025
128. Sobhanie E., Salehnia F., Xu G., Hamidipanah Y., Arshian S., Firoozbakhtian A., Hosseini M., Ganjali M.R., Hanif S. (2022) Recent trends and advancements in electrochemiluminescence biosensors for human virus detection. *Trends Anal. Chem.*, **157**, 116727. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116727
129. Ribeiro B.V., Cordeiro T.A.R., Oliveira e Freitas G.R., Ferreira L.F., Franco D.L. (2020) Biosensors for the detection of respiratory viruses: A review. *Talanta Open*, **2**, 100007. DOI: 10.1016/j.talo.2020.100007
130. Traipop S., Jampasa S., Tangkijvanich P., Chuaypen N., Chailapakul O. (2023) Dual-label vertical flow-based electrochemical immunosensor for rapid and simultaneous detection of hepatitis B surface and e virus antigens. *Sensors Actuators B Chem.*, **387**, 133769. DOI: 10.1016/j.snb.2023.133769
131. Martins G., Gogola J.L., Budni L.H., Janegitz B.C., Marcolino-Junior L.H., Bergamini M.F. (2021) 3D-printed electrode as a new platform for electrochemical immunosensors for virus detection. *Anal. Chim. Acta*, **1147**, 30-37. DOI: 10.1016/j.aca.2020.12.014
132. Pividori M. (2000) Electrochemical genosensor design: Immobilisation of oligonucleotides onto transducer surfaces and detection methods. *Biosens. Bioelectron.*, **15**(5-6), 291-303. DOI: 10.1016/S0956-5663(00)00071-3
133. Rasheed P.A., Sandhyarani N. (2017) Carbon nanostructures as immobilization platform for DNA: A review on current progress in electrochemical DNA sensors. *Biosens. Bioelectron.*, **97**, 226-237. DOI: 10.1016/j.bios.2017.06.001
134. da Fonseca Alves R., Franco D.L., Cordeiro M.T., de Oliveira E.M., Fireman Dutra R.A., Sotomayor M.D.P.T. (2019) Novel electrochemical genosensor for Zika virus based on a poly-(3-amino-4-hydroxybenzoic acid)-modified pencil carbon graphite electrode. *Sensors Actuators B Chem.*, **296**, 126681. DOI: 10.1016/j.snb.2019.126681
135. Wang J., Cai X., Rivas G., Shiraishi H., Dontha N. (1997) Nucleic-acid immobilization, recognition and detection at chronopotentiometric DNA chips. *Biosens. Bioelectron.*, **12**(7), 587-599. DOI: 10.1016/S0956-5663(96)00076-0
136. Erdem A., Pividori M.I., del Valle M., Alegret S. (2004) Rigid carbon composites: A new transducing material for label-free electrochemical genosensing. *J. Electroanal. Chem.*, **567**(1), 29-37. DOI: 10.1016/j.jelechem.2003.10.049
137. Zhang Y., Wang J., Xu M. (2010) A sensitive DNA biosensor fabricated with gold nanoparticles/poly (p-aminobenzoic acid)/carbon nanotubes modified electrode. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **75**(1), 179-185. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.08.030
138. Balasubramanian K., Burghard M. (2005) Chemically functionalized carbon nanotubes. *Small*, **1**(2), 180-192. DOI: 10.1002/smll.200400118
139. Saadati A., Hassanpour S., Hasanazadeh M., Shadjou N. (2020) Binding of pDNA with cDNA using hybridization strategy towards monitoring of *Haemophilus influenza* genome in human plasma samples. *Int. J. Biol. Macromol.*, **150**, 218-227. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.062
140. Marrazza G., Chianella I., Mascini M. (1999) Disposable DNA electrochemical sensor for hybridization detection. *Biosens. Bioelectron.*, **14**(1), 43-51. DOI: 10.1016/S0956-5663(98)00102-X
141. Riccardi C.S., Dahmouche K., Santilli C.V., da Costa P.I., Yamanaka H. (2006) Immobilization of streptavidin in sol-gel films: Application on the diagnosis of hepatitis C virus. *Talanta*, **70**(3), 637-643. DOI: 10.1016/j.talanta.2006.01.027
142. Dong S., Zhao R., Zhu J., Lu X., Li Y., Qiu S., Jia L., Jiao X., Song S., Fan C., Hao R., Song H. (2015) Electrochemical DNA biosensor based on a tetrahedral nanostructure probe for the detection of avian influenza A (H7N9) virus. *ACS Appl. Mater. Interfaces*, **7**(16), 8834-8842. DOI: 10.1021/acsami.5b01438
143. Sajid M., Nazal M.K., Mansha M., Alsharaa A., Jillani S.M.S., Basheer C. (2016) Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine in the presence of uric acid and ascorbic acid: A review. *Trends Anal. Chem.*, **76**, 15-29. DOI: 10.1016/j.trac.2015.09.006
144. Шумянцева В.В., Агафонова Л.Е., Булко Т.В., Кузиков А.В., Масамреkh P.A., Ян Д., Пергушов Д.В., Сиголаева Л.В. (2021) Электроанализ биомолекул: обоснованный выбор сенсорных конструкций. Успехи биологической химии, **61**, 295-316. [Shumyantseva V.V., Agafonova L.E., Bulko T.V., Kuzikov A.V., Masamrekh P.A., Yan D., Pergushov D.V., Sigolaeva L.V. (2021) Electroanalysis of biomolecules: Rational selection of sensor construction. *Biochemistry (Moscow)*, **86**(S1), S140-S151.] DOI: 10.1134/S0006297921140108

145. *Movilli J., Rozzi A., Ricciardi R., Corradini R., Huskens J.* (2018) Control of probe density at DNA biosensor surfaces using poly(l-lysine) with appended reactive groups. *Bioconjug. Chem.*, **29**(12), 4110-4118. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.8b00733
146. *Idili A., Amodio A., Vidonis M., Feinberg-Somerson J., Castronovo M., Ricci F.* (2014) Folding-upon-binding and signal-on electrochemical DNA sensor with high affinity and specificity. *Anal. Chem.*, **86**(18), 9013-9019. DOI: 10.1021/ac501418g
147. *Farzin L., Sadjadi S., Shamsipur M., Sheibani S.* (2020) Electrochemical genosensor based on carbon nanotube/amine-ionic liquid functionalized reduced graphene oxide nanoplateform for detection of human papillomavirus (HPV16)-related head and neck cancer. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **179**, 112989. DOI: 10.1016/j.jpba.2019.112989
148. *Manzano M., Viezzi S., Mazerat S., Marks R.S., Vidic J.* (2018) Rapid and label-free electrochemical DNA biosensor for detecting hepatitis A virus. *Biosens. Bioelectron.*, **100**, 89-95. DOI: 10.1016/j.bios.2017.08.043
149. *Carinelli S., Kühnemund M., Nilsson M., Pividori M.I.* (2017) Yoctomole electrochemical genosensing of Ebola virus cDNA by rolling circle and circle to circle amplification. *Biosens. Bioelectron.*, **93**, 65-71. DOI: 10.1016/j.bios.2016.09.099
150. *Ilkhani H., Farhad S.* (2018) A novel electrochemical DNA biosensor for Ebola virus detection. *Anal. Biochem.*, **557**, 151-155. DOI: 10.1016/j.ab.2018.06.010
151. *Ciftci S., Cánovas R., Neumann F., Paulraj T., Nilsson M., Crespo G.A., Madaboosi N.* (2020) The sweet detection of rolling circle amplification: Glucose-based electrochemical genosensor for the detection of viral nucleic acid. *Biosens. Bioelectron.*, **151**, 112002. DOI: 10.1016/j.bios.2019.112002
152. *Alzate D., Cajigas S., Robledo S., Muskus C., Orozco J.* (2020) Genosensors for differential detection of Zika virus. *Talanta*, **210**, 120648. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.120648
153. *Bartosik M., Jirakova L., Anton M., Vojtesek B., Hrstka R.* (2018) Genomagnetic LAMP-based electrochemical test for determination of high-risk HPV16 and HPV18 in clinical samples. *Anal. Chim. Acta*, **1042**, 37-43. DOI: 10.1016/j.aca.2018.08.020
154. *Ahangar L.E., Mehrgardi M.A.* (2017) Amplified detection of hepatitis B virus using an electrochemical DNA biosensor on a nanoporous gold platform. *Bioelectrochemistry*, **117**, 83-88. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2017.06.006
155. *Srisomwat C., Teengam P., Chuaypen N., Tangkijvanich P., Vilaivan T., Chailapakul O.* (2020) Pop-up paper electrochemical device for label-free hepatitis B virus DNA detection. *Sensors Actuators B Chem.*, **316**, 128077. DOI: 10.1016/j.snb.2020.128077
156. *Malhotra B.D., Ali M.A.* (2018) Nanomaterials in Biosensors: Fundamentals and Applications. In: *Nanomaterials for Biosensors*, William Andrew Publishing, pp. 1-74. DOI: 10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7
157. *Zhao F., Cao L., Liang Y., Wu Z., Chen Z., Zeng R.* (2017) Label-free amperometric immunosensor based on graphene oxide and ferrocene-chitosan nanocomposites for detection of hepatitis B virus antigen. *J. Biomed. Nanotechnol.*, **13**(10), 1300-1308. DOI: 10.1166/jbn.2017.2415
158. *Wei S., Xiao H., Cao L., Chen Z.* (2020) A label-free immunosensor based on graphene oxide/Fe₃O₄/Prussian blue nanocomposites for the electrochemical determination of HBsAg. *Biosensors*, **10**(3), 24. DOI: 10.3390/bios10030024
159. *Trindade E.K.G., Dutra R.F.* (2018) A label-free and reagentless immunoelectrode for antibodies against hepatitis B core antigen (anti-HBc) detection. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **172**, 272-279. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2018.08.050
160. *Gao Z., Li Y., Zhang X., Feng J., Kong L., Wang P., Chen Z., Dong Y., Wei Q.* (2018) Ultrasensitive electrochemical immunosensor for quantitative detection of HBeAg using Au@Pd/MoS₂@MWCNTs nanocomposite as enzyme-mimetic labels. *Biosens. Bioelectron.*, **102**, 189-195. DOI: 10.1016/j.bios.2017.11.032
161. *Alizadeh N., Hallaj R., Salimi A.* (2018) Dual amplified electrochemical immunosensor for hepatitis B virus surface antigen detection using hemin/G-quadruplex immobilized onto Fe₃O₄-AuNPs or (hemin-amino-rGO-Au) nanohybrid. *Electroanalysis*, **30**(3), 402-414. DOI: 10.1002/elan.201700727
162. *Alizadeh N., Hallaj R., Salimi A.* (2017) A highly sensitive electrochemical immunosensor for hepatitis B virus surface antigen detection based on Hemin/G-quadruplex horseradish peroxidase-mimicking DNAzyme-signal amplification. *Biosens. Bioelectron.*, **94**, 184-192. DOI: 10.1016/j.bios.2017.02.039
163. *Li F., Li Y., Feng J., Gao Z., Lv H., Ren X., Wei Q.* (2018) Facile synthesis of MoS₂@Cu₂O-Pt nanohybrid as enzyme-mimetic label for the detection of the hepatitis B surface antigen. *Biosens. Bioelectron.*, **100**, 512-518. DOI: 10.1016/j.bios.2017.09.048
164. *Biasotto G., Costa J.P.C., Costa P.I., Zaghet M.A.* (2019) ZnO nanorods-gold nanoparticle-based biosensor for detecting hepatitis C. *Appl. Phys. A*, **125**(12), 821. DOI: 10.1007/s00339-019-3128-1
165. *Valipour A., Roushani M.* (2017) Using silver nanoparticle and thiol graphene quantum dots nanocomposite as a substratum to load antibody for detection of hepatitis C virus core antigen: Electrochemical oxidation of riboflavin was used as redox probe. *Biosens. Bioelectron.*, **89**, 946-951. DOI: 10.1016/j.bios.2016.09.086
166. *Valipour A., Roushani M.* (2017) A glassy carbon immunoelectrode modified with vanadium oxide nanobelts for ultrasensitive voltammetric determination of the core antigen of hepatitis C virus. *Microchim. Acta*, **184**(11), 4477-4483. DOI: 10.1007/s00604-017-2449-z
167. *Valipour A., Roushani M.* (2017) TiO₂ nanoparticles doped with Celestine Blue as a label in a sandwich immunoassay for the hepatitis C virus core antigen using a screen printed electrode. *Microchim. Acta*, **184**(7), 2015-2022. DOI: 10.1007/s00604-017-2190-7
168. *Singh R., Hong S., Jang J.* (2017) Label-free detection of influenza viruses using a reduced graphene oxide-based electrochemical immunosensor integrated with a microfluidic platform. *Sci. Rep.*, **7**(1), 42771. DOI: 10.1038/srep42771
169. *Huang J., Xie Z., Xie Z., Luo S., Xie L., Huang L., Fan Q., Zhang Y., Wang S., Zeng T.* (2016) Silver nanoparticles coated graphene electrochemical sensor for the ultrasensitive analysis of avian influenza virus H7. *Anal. Chim. Acta*, **913**, 121-127. DOI: 10.1016/j.aca.2016.01.050
170. *Wu Z., Guo W.-J., Bai Y.-Y., Zhang L., Hu J., Pang D.-W., Zhang Z.-L.* (2018) Digital single virus electrochemical enzyme-linked immunoassay for ultrasensitive H7N9 avian influenza virus counting. *Anal. Chem.*, **90**(3), 1683-1690. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03281
171. *Sayhi M., Ouerghi O., Belgacem K., Arbi M., Tepeli Y., Ghram A., Anik Ü., Österlund L., Laouini D., Diouani M.F.* (2018) Electrochemical detection of influenza virus H9N2

- based on both immunomagnetic extraction and gold catalysis using an immobilization-free screen printed carbon microelectrode. *Biosens. Bioelectron.*, **107**, 170-177. DOI: 10.1016/j.bios.2018.02.018
172. Yang Z.-H., Zhuo Y., Yuan R., Chai Y.-Q. (2016) A nanohybrid of platinum nanoparticles-porous ZnO-hemin with electrocatalytic activity to construct an amplified immunosensor for detection of influenza. *Biosens. Bioelectron.*, **78**, 321-327. DOI: 10.1016/j.bios.2015.10.073
173. Darwish N.T., Alrawi A.H., Sekaran S.D., Alias Y., Khor S.M. (2016) Electrochemical immunosensor based on antibody-nanoparticle hybrid for specific detection of the Dengue virus NS1 biomarker. *J. Electrochem. Soc.*, **163**(3), B19-B25. DOI: 10.1149/2.0471603jes
174. Kim J.H., Cho C.H., Ryu M.Y., Kim J.-G., Lee S.-J., Park T.J., Park J.P. (2019) Development of peptide biosensor for the detection of dengue fever biomarker, nonstructural 1. *PLoS One*, **14**(9), e0222144. DOI: 10.1371/journal.pone.0222144
175. Kanagavalli P., Veerapandian M. (2020) Opto-electrochemical functionality of Ru(II)-reinforced graphene oxide nanosheets for immunosensing of dengue virus non-structural 1 protein. *Biosens. Bioelectron.*, **150**, 111878. DOI: 10.1016/j.bios.2019.111878
176. Faria A.M., Mazon T. (2019) Early diagnosis of Zika infection using a ZnO nanostructures-based rapid electrochemical biosensor. *Talanta*, **203**, 153-160. DOI: 10.1016/j.talanta.2019.04.080
177. Chin S.F., Lim L.S., Pang S.C., Sum M.S.H., Perera D. (2017) Carbon nanoparticle modified screen printed carbon electrode as a disposable electrochemical immunosensor strip for the detection of Japanese encephalitis virus. *Microchim. Acta*, **184**(2), 491-497. DOI: 10.1007/s00604-016-2029-7
178. Hien H.T., Giang H.T., Trung T., van Tuan C. (2017) Enhancement of biosensing performance using a polyaniline/multiwalled carbon nanotubes nanocomposite. *J. Mater. Sci.*, **52**(3), 1694-1703. DOI: 10.1007/s10853-016-0461-z
179. Svalova T.S., Malysheva N.N., Bubekova A.K., Saigushkina A.A., Medvedeva M.V., Kozitsina A.N. (2020) Effect of the method for immobilizing receptor layer on the analytical characteristics of a label-free electrochemical immunosensor for the determination of measles antibodies. *J. Anal. Chem.*, **75**(2), 254-261. DOI: 10.1134/S106193482002015X
180. Tran L.T., Tran T.Q., Ho H.P., Chu X.T., Mai T.A. (2019) Simple label-free electrochemical immunosensor in a microchamber for detecting Newcastle disease virus. *J. Nanomater.*, **2019**, 1-9. DOI: 10.1155/2019/3835609
181. Hou Y.-H., Wang J.-J., Jiang Y.-Z., Lv C., Xia L., Hong S.-L., Lin M., Lin Y., Zhang Z.-L., Pang D.-W. (2018) A colorimetric and electrochemical immunosensor for point-of-care detection of enterovirus 71. *Biosens. Bioelectron.*, **99**, 186-192. DOI: 10.1016/j.bios.2017.07.035
182. Walls A.C., Park Y.-J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. (2020) Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*, **181**(2), 281-292.e6. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058
183. Seo G., Lee G., Kim M.J., Baek S.-H., Choi M., Ku K.B., Lee C.-S., Jun S., Park D., Kim H.G., Kim S.-J., Lee J.-O., Kim B.T., Park E.C., Kim S.I. (2020) Rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor. *ACS Nano*, **14**(4), 5135-5142. DOI: 10.1021/acsnano.0c02823
184. Tamborelli A., Mujica M.L., Gallay P., Vaschetti V., Reartes D., Delpino R., Bravo L., Bollo S., Rodriguez M., Rubianes M.D., Dalmasso P., Rivas G. (2023) Biosensing strategies for the detection of SARS-CoV-2 nucleic acids. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **232**, 115370. DOI: 10.1016/j.jpba.2023.115370
185. Yakoh A., Pimpitak U., Rengpipat S., Hirankarn N., Chailapakul O., Chaiyo S. (2021) Paper-based electrochemical biosensor for diagnosing COVID-19: Detection of SARS-CoV-2 antibodies and antigen. *Biosens. Bioelectron.*, **176**, 112912. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112912
186. Agafonova L., Zhdanov D., Gladilina Y., Kanashenko S., Shumyantseva V. (2022) A pilot study on an electrochemical approach for assessing transient DNA transfection in eukaryotic cells. *J. Electroanal. Chem.*, **920**, 116635. DOI: 10.1016/j.jelechem.2022.116635
187. Brabec V., Mornstein V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. I. Electrooxidation of proteins as a new probe of protein structure and reactions. *Biochim. Biophys. Acta Protein Struct.*, **625**(1), 43-50. DOI: 10.1016/0005-2795(80)90106-3
188. Brabec V., Mornstein V. (1980) Electrochemical behaviour of proteins at graphite electrodes. *Biophys. Chem.*, **12**(2), 159-165. DOI: 10.1016/0301-4622(80)80048-2
189. Shumyantseva V., Bulko T., Kuzikov A., Masamrek R., Archakov A. (2018) Analysis of L-tyrosine based on electrocatalytic oxidative reactions via screen-printed electrodes modified with multi-walled carbon nanotubes and nanosized titanium oxide (TiO₂). *Amino Acids*, **50**(7), 823-829. DOI: 10.1007/s00726-018-2557-z

Поступила в редакцию: 02. 09. 2023.
После доработки: 15. 10. 2023.
Принята к печати: 19. 10. 2023.

PERSPECTIVES FOR THE CREATION OF A NEW TYPE OF VACCINE PREPARATIONS
BASED ON PSEUDOVIRUS PARTICLES USING POLIO VACCINE AS AN EXAMPLE

D.D. Zhdanov^{1}, Yu.Yu. Ivin^{1,2}, A.N. Shishparenok¹, S.V. Kraevskiy¹, S.L. Kanashenko¹, L.E. Agafonova¹,
V.V. Shumyantseva^{1,3}, O.V. Gnedenko¹, A.N. Pinyaeva^{1,2}, A.A. Kovpak¹, A.A. Ishmukhametov², A.I. Archakov^{1,3}*

¹Institute of Biomedical Chemistry,
10 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: zhdanovdd@mail.ru
²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development
of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences,
8/1 Moskovsky settlement, Polio Institute settlement, Moscow, 108819 Russia
³Pirogov Russian National Research Medical University,
1 Ostrovityanova str., Moscow, 117997 Russia

Traditional antiviral vaccines are currently created by inactivating the virus chemically, most often using formaldehyde or β -propiolactone. These approaches are not optimal since they negatively affect the safety of the antigenic determinants of the inactivated particles and require additional purification stages. The most promising platforms for creating vaccines are based on pseudoviruses, i.e., viruses that have completely preserved the outer shell (capsid), while losing the ability to reproduce owing to the destruction of the genome. The irradiation of viruses with electron beam is the optimal way to create pseudoviral particles. In this review, with the example of the poliovirus, the main algorithms that can be applied to characterize pseudoviral particles functionally and structurally in the process of creating a vaccine preparation are presented. These algorithms are, namely, the analysis of the degree of genome destruction and coimmunogenicity. The structure of the poliovirus and methods of its inactivation are considered. Methods for assessing residual infectivity and immunogenicity are proposed for the functional characterization of pseudoviruses. Genome integrity analysis approaches, atomic force and electron microscopy, surface plasmon resonance, and bioelectrochemical methods are crucial to structural characterization of the pseudovirus particles.

The whole English version is available at <http://pbmc.ibmc.msk.ru>.

Key words: pseudovirus; poliomyelitis; vaccine; inactivation; functional characterization; structural characterization

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 23-15-00471.

Received: 02.09.2023; revised: 15.10.2023; accepted: 19.10.2023.