

SPR-АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ИНАКТИВИРОВАННЫХ ВАКЦИННЫХ АТТЕНУИРОВАННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ПОЛИОМИЕЛИТА С АНТИТЕЛАМИ

О.В. Гнеденко^{1}, Ю.Ю. Ивин^{1,2}, А.Н. Пиняева^{1,2}, А.Н. Зырина², И.В. Левин², Н.С. Борисенко²,
Д.Д. Жданов¹, А.С. Иванов¹, А.В. Лисица¹, А.А. Ишмухаметов², А.И. Арчаков^{1,3}*

¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В.Н. Ореховича,
119121, Москва, Погодинская ул., 10/8; *эл. почта: gnedenko.oksana@gmail.com

²Федеральный научный центр исследований и разработки

иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва

³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова, Москва

Исследовали взаимодействие инактивированных вакцинных аттенуированных штаммов вируса полиомиелита с антителами, ориентированно иммобилизованными за Fc-фрагмент через протеин А. С помощью SPR-биосенсора определены кинетические и равновесные параметры взаимодействия вакцинных аттенуированных штаммов вируса полиомиелита типа 1 и 2 (штаммов Сэбина), инактивированных различными способами. Наиболее прочным было взаимодействие поликлональных антител к вирусу полиомиелита типа 2 (штамм Сэбина), со штаммом Сэбина вируса полиомиелита типа 2, инактивированным β -пропиолактоном, $K_D = 1,04 \cdot 10^{-11}$ М, а также взаимодействие моноклональных антител к вирусу полиомиелита типа 1 (штамм Сэбина) со штаммом Сэбина вируса полиомиелита типа 1, инактивированным формальдегидом, $K_D = 1,39 \cdot 10^{-11}$ М. Высокоаффинное взаимодействие инактивированных вакцинных штаммов Сэбина вируса полиомиелита типов 1 и 2 с иммобилизованными антителами свидетельствует о том, что D-антиген сохранил свою структуру после инактивации вируса β -пропиолактоном или формальдегидом.

Ключевые слова: взаимодействие антиген-антитело; поверхностный плазмонный резонанс; вакцинные аттенуированные штаммы вируса полиомиелита

DOI: 10.18097/PBMCR1507

ВВЕДЕНИЕ

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR) — мощный аналитический метод, обычно используемый при анализе широкого спектра межмолекулярных взаимодействий. По сравнению с различными биофизическими методами, такими как ядерный магнитный резонанс [1, 2], рентгеновская кристаллография [3], масс-спектропия [4], изотермическая титрационная калориметрия [5], аффинный капиллярный электрофорез [6], аффинная хроматография [7], SPR позволяет отслеживать молекулярные взаимодействия в режиме реального времени, требует небольших количеств образца для анализа (обычно микрограммов) и, в основном, не требует никаких модификаций или мечения иммобилизованных лигандов.

Биосенсорный анализ служит одним из важнейших инструментов для мониторинга процесса или проверки целостности партий при разработке и производстве вакцин. Биосенсоры Biosage были использованы при разработке следующих вакцин против COVID-19: мРНК-вакцины (Moderna/NIAID, Curevac), ДНК-вакцина (Inovio), векторная нереплицирующаяся (J&J), рекомбинантная вакцина (Sanofi/Barda), вакцина на основе вирусоподобных частиц (Medicago), адъювантные системы (GSK), рекомбинантная пептидная вакцина (Epravax).

С помощью Biosage также оценивали антигенность вакцин против гепатита Е [8, 9] измеряли концентрации гемагглютинина в мультивалентных

вакцинах против гриппа [10], причём внедрение такого метода тестирования, может ускорить доставку вакцины против гриппа населению как минимум на 6 недель. Результаты показали, что метод на основе SPR, разработанный с использованием Biosage, является надёжным и не зависит от типа референсных антигенов (инактивированный цельный вирус, расщеплённый или субъединичный материал, полученный из вакцины), и от того, используются ли они в виде моновалентных или мультивалентных препаратов.

Biosage играет значительную роль в разработке вакцин против ВИЧ [11]. С помощью SPR также оценивали наличие конформационно-зависимых нейтрализующих эпитопов на VLP L1 (вирусоподобных частицах, полученных из белка L1 HPV-16 и HPV-18), входящих в состав профилактической вакцины против вируса папилломы человека (HPV) [12].

Полиомиелит — высококонтагиозное вирусное заболевание. Вирус полиомиелита поражает нервную систему человека и может в считанные часы вызвать полный паралич. Для профилактики полиомиелита долгие годы применяют два типа вакцин: живую пероральную вакцину (ППВ) и инактивированную вакцину (ИПВ). Для производства ППВ применяются аттенуированные штаммы Сэбина (штамм Сэбина типа 1 LSc 2ab, штамм Сэбина типа 2 P712 Ch 2ab, штамм Сэбина типа 3 Leon 12a1b). Для производства инактивированной вакцины долгое время использовались только дикие штаммы (тип 1 — Mahoney, тип 2 — MEF-1, тип 3 — Saukett) [13].



© 2025 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (<http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>).

В ФГАНУ “Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН” была разработана инактивированная вакцина против полиомиелита на основе штаммов Сэбина Полиоваксин [14], которая на данный момент применяется для профилактики полиомиелита в России. При производстве ИПВ как на основе диких штаммов, так и на основе аттенуированных штаммов, для инактивации вируса полиомиелита применяется формальдегид [14, 15]. Инактивация вируса формальдегидом — длительная и трудоёмкая стадия технологического процесса. Однако для инактивации вируса полиомиелита может применяться также β -пропиолактон [16], который потенциально может сократить время производства вакцины [17]. Псевдовиральные частицы на основе вирусов, инактивированных различными методами, могут быть основой перспективной платформы для создания вакцин нового типа. [18].

Антигенность ИПВ выражается в единицах D-антигена. Производители и официальные лаборатории по контролю за лекарственными средствами используют свои собственные антитела и методики. Исследования показали, что существует проблема унификации показателей в случае, когда необходимо количественно охарактеризовать образцы ИПВ. Это справедливо как для оценки концентрации D-антигена [19], так и для оценки иммуногенных свойств вакцин [20]. Керстен и соавт. [21] продемонстрировали, что Вiasoge можно использовать для определения содержания D-антигена в ИПВ. В более поздних исследованиях [22, 23] описан метод на основе биосенсора Вiasoge для оценки концентрации D-антигена. Результаты были сопоставимы с результатами иммуноферментного анализа (ИФА). Это указывает на то, что SPR-биосенсор является альтернативным средством для оценки эффективности ИПВ. В отличие от ИФА улавливающие антитела являются моноклональными, а детектирующие антитела или конъюгаты не требуются, поскольку сигнал биосенсора зависит от массы. Вариации между анализаторами в различных лабораториях могут быть уменьшены за счёт автоматизированного характера биосенсоров. Также биосенсоры позволяют быстро охарактеризовать антитела, что в свою очередь позволяет лабораториям быстро проводить скрининг и выбирать оптимальные антитела.

Целью данной работы было исследование аффинности взаимодействия инактивированных различными способами аттенуированных штаммов вируса полиомиелита типов 1 и 2 с антителами с помощью SPR-биосенсора.

МЕТОДИКА

Анализ взаимодействия исследуемых инактивированных аттенуированных штаммов вируса полиомиелита типов 1 и 2 с антителами выполняли на оптическом биосенсоре Вiasoge X-100 (“Cytiva”, США), работающем на эффекте поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Сигнал биосенсора регистрировали в резонансных единицах RU (1 RU соответствует связыванию 1 пг белка на поверхности оптического чипа). Использовали чипы с укороченным декстраном CM3 (“Cytiva”), рекомендованные для работы с вирусными частицами [23].

Реагенты

Следующие реагенты были получены от фирмы “Cytiva”: HBS-N (150 mM NaCl, 10 mM HEPES, pH 7,4); 10 mM ацетатный буфер, pH 4,5; набор реагентов для ковалентной иммобилизации белков за первичные аминокислоты (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид-HCl, N-гидроксисукцинимид, 1 M этаноламин-HCl, pH 8,5), 10 mM глициновый буфер, pH 1,5. Белок А получен от фирмы “ИМТЕК” (Россия). Моноклональные антитела α -Polio1 Mab234 (Mab1), α -Polio2 Mab1050 (Mab2) и α -Polio3 Mab520 (Mab3) к вакцинным штаммам Сэбина вируса полиомиелита типов 1, 2 и 3, соответственно, были получены от National Institute for Biological Standards and Control (Великобритания). Концентрацию D-антигена в вакцинных штаммах Сэбина вируса полиомиелита типов 1 и 2, инактивированных β -пропиолактоном (SI бпл, SII бпл) или формальдегидом (SI форм, SII форм), а также инактивированных формальдегидом с последующим диализом (SI форм (д), SII форм (д)) определяли методом ИФА в Федеральном научном центре исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН [24].

Получение поликлональных антител

Поликлональные антитела к штамму Сэбина вируса полиомиелита типа 2 (Pab2) получали из сыворотки иммунизированных кроликов породы советская шиншилла. Животных иммунизировали троекратно с промежутком 21 день. Для иммунизации использовали очищенные в градиенте CsCl антигены вируса полиомиелита типа 2 в концентрации 300–1260 мкг/мл. Наличие антител к D-антигену проверяли в реакции нейтрализации на культуре клеток Vero. IgG фракцию антител получали из сывороток с титром не менее 1:2000. Очистку проводили с помощью аффинной хроматографии на колонках HiTrap, Protein G HP (“Cytiva”). Целевую фракцию элюировали 0,1 M глицин-HCl-буфером (pH 2,7) и немедленно доводили до pH 7,0, добавляя 1 M Трис-HCl (pH 9,0). Для дальнейшего использования очищенные антитела переводили в 0,1 M карбонат-бикарбонатный буфер (“Sigma”, США) или фосфатный буферный раствор, pH 7,2 (ФГАНУ “ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН”, Россия) с помощью диализа.

Получение инактивированного вируса

Вакцинные штаммы Сэбина вируса полиомиелита типов 1 и 2 получали при заражении монослойной культуры клеток Vero. Проводили фильтрацию вирусной суспензии, концентрирование [14, 25] и хроматографическую очистку [13, 26]. Инактивацию формальдегидом проводили, как описано ранее [24].

Дополнительно инактивированный вирус был диализован против фосфатно-солевого буферного раствора (pH 7,2) с помощью центрифужных концентраторов с мембраной 30 кДа ("Jet Biofill", Китай), используя рекомендации производителя. Для инактивации β -пропиолактоном ("Molecula", США) использовали вирусную суспензию, которую инкубировали в течение 48 ч при температуре 2–8°C при перемешивании с инактивирующим агентом в концентрации 0,2% (v/v). Очистку проводили путём последовательных процедур фильтрации, концентрирования и хроматографии как описано ранее [13, 14, 25, 26].

Иммобилизация белка А на чипе CM3

Иммобилизацию белка А в обоих каналах чипа оптического биосенсора осуществляли путём формирования ковалентных связей между карбоксильными группами на поверхности оптического чипа CM3 и аминоклассами белка. Карбоксильные группы чипа активировали путём инъекции смеси 0,2 М 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид-HCl/0,05 М N-гидроксисукцинимид в течение 7 мин при скорости потока 5 мкл/мин. Инъекцию раствора белка А (100 мкг/мл) в 10 мМ ацетатном буфере (pH 4,5) выполняли со скоростью 5 мкл/мин в течение 7 мин. Непрореагировавшие активированные группы блокировали 1 М раствором этаноламина гидрохлорида (pH 8,5) в течение 3 мин при скорости потока 5 мкл/мин. В качестве буфера использовали HBS-N.

Иммобилизация антител на чипе CM3 через белок А

Моноклональные антитела α -Polio1 Mab234 (Mab1) или α -Polio2 Mab1050 (Mab2), или α -Polio3 Mab520 (Mab3), или поликлональные антитела (Pab2) в разведении 1:20 инъектировали в рабочий канал биосенсора со скоростью 5 мкл/мин в течение 3 мин. Затем следовала инъекция рабочего буфера. В качестве буфера использовали HBS-N.

Взаимодействие вакцинных штаммов вируса полиомиелита типов 1 и 2, инактивированных β -пропиолактоном или формальдегидом, с антителами

SI бпл, SII бпл, SI форм, SII форм, SI форм (д), SII форм (д) инъектировали через 5 мин после инъекции антител Mab1 или Mab2, или Pab2, соответственно, со скоростью 5 мкл/мин в течение 3 мин. Взаимодействие инактивированных вакцинных штаммов вируса полиомиелита с антителами исследовали в диапазоне концентраций D-антигена от 0,05 нМ до 5 нМ. Регистрацию взаимодействий инактивированных частиц вакцинных штаммов Сэбина вируса полиомиелита типов 1 и 2 с иммобилизованными антителами выполняли в режиме реального времени путём инъекций образцов через контрольный (без антител) и рабочий каналы оптического биосенсора. Результирующие сенсограммы представляли собой разность сигналов в рабочем и контрольном каналах. Поверхность чипа после каждого цикла взаимодействия антител с иммобилизованным белком А и последующего

взаимодействия инактивированных штаммов с антителами регенерировали глициновым буфером, pH 1,5, со скоростью 30 мкл/мин в течение 30 с. Экспериментальные кривые были обработаны с помощью программы Biaevaluation 4.1.1.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В системе SPR одна из взаимодействующих биомолекул (лиганд) иммобилизуется на поверхности сенсорного чипа. Два подхода используются для иммобилизации лигандов: ковалентная иммобилизация и нековалентный захват. В первом случае функциональные группы на поверхности чипа реагируют с соответствующей функциональной группой лиганда (амино-, карбоксильные, сульфгидрильные группы и т.д.) с образованием стабильных связей [27, 28]. В последнем случае захват предполагает использование лигандов с высокоаффинным tag [29, 30] или антител [23, 31], а также белков А, G [32]. Нами был выбран метод ориентированной иммобилизации антител за Fc-фрагмент через белок А [32], который позволяет удалять иммобилизованные антитела и связавшийся с ними антиген, т.е. регенерировать белок А для следующего взаимодействия. Белок А был иммобилизован в рабочем и контрольном каналах, чтобы исключить неспецифическое взаимодействие инактивированных вакцинных штаммов вируса полиомиелита с этим белком. Иммобилизовано 1530 RU в рабочем и 1120 RU в контрольном каналах. Далее антитела Mab1 или Mab2, или Pab2 были иммобилизованы через белок А в рабочем канале биосенсора. В отличие от этих антител Mab3 не взаимодействовали с белком А. Их не удалось иммобилизовать этим методом.

Был выполнен SPR-анализ образцов SI бпл, SI форм, SI форм(д) в случае иммобилизованных Mab1 (рис. 1), и SII бпл, SII форм, SII форм(д) в случае иммобилизованных Mab2 (рис. 2), а также SII бпл, SII форм в случае иммобилизованных Pab2. Взаимодействие аналита (т.е. D-антигена) с антителами контролировали в реальном времени, а специфическое связывание отражалось изменением величины ответа до и после инъекции антигена (рис. 1, 2). Кроме того, мы не наблюдали взаимодействия инактивированного вакцинного штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 2 с Mab1. В результате обработки экспериментальных кривых были получены константа скорости ассоциации (k_a), константа скорости диссоциации (k_d), равновесная константа диссоциации K_D и аффинность K_A (табл. 1).

Значения K_A комплексов антиген-антитело убывали в следующем порядке (Pab2/SII бпл) \approx (Mab1/SI форм) $>$ (Pab2/SII форм) $>$ (Mab2/SII бпл) $>$ (Mab1/SI форм(д)) $>$ (Mab1/SI бпл) $>$ (Mab2/SII форм) \approx (Mab2/SII форм(д)). Наиболее аффинным было взаимодействие поликлональных антител к штамму Сэбина вируса полиомиелита типа 2 с этим штаммом, инактивированным β -пропиолактоном (SII бпл), а также взаимодействие моноклональных антител к штамму Сэбина вируса полиомиелита типа 1 и этим штаммом, инактивированным формальдегидом (SI форм).

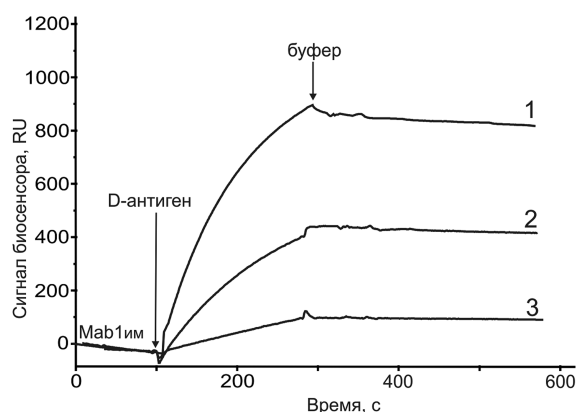


Рисунок 1. Сенсограммы взаимодействия инактивированных частиц вакцинного штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 1 с Mab1. 1 – SI форм, концентрация D-антигена 1,42 нМ; 2 – SI форм(д), концентрация D-антигена 4,2 нМ; 3 – SI бпл, концентрация D-антигена 0,12 нМ.

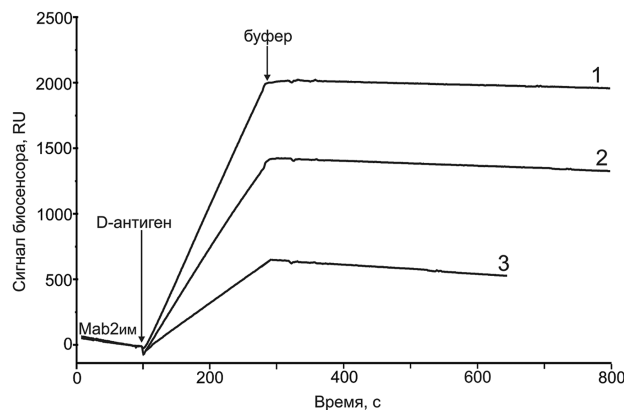


Рисунок 2. Сенсограммы взаимодействия инактивированных частиц вакцинного штамма Сэбина вируса полиомиелита типа 2 с Mab2. 1 – SII бпл, концентрация D-антигена 0,08 нМ; 2 – SII форм(д), концентрация D-антигена 0,46 нМ; 3 – SII форм, концентрация D-антигена 0,08 нМ.

Таблица 1. Кинетические (k_a , k_d) и равновесные параметры (K_D , K_A) взаимодействия антиген-антитело

Комплекс	k_a , $M^{-1} \cdot s^{-1}$	k_d , s^{-1}	K_D , M	K_A , M^{-1}
Mab1/SI бпл	$5,37 \cdot 10^5$	$2,15 \cdot 10^{-4}$	$4,01 \cdot 10^{-10}$	$2,49 \cdot 10^9$
Mab1/SI форм	$6,10 \cdot 10^6$	$8,52 \cdot 10^{-5}$	$1,39 \cdot 10^{-11}$	$7,19 \cdot 10^{10}$
Mab1/SI форм(д)	$1,58 \cdot 10^6$	$2,46 \cdot 10^{-4}$	$1,56 \cdot 10^{-10}$	$6,41 \cdot 10^9$
Mab2/SII бпл	$5,22 \cdot 10^5$	$2,68 \cdot 10^{-5}$	$5,13 \cdot 10^{-11}$	$1,95 \cdot 10^{10}$
Mab2/SII форм	$2,70 \cdot 10^5$	$1,59 \cdot 10^{-4}$	$5,91 \cdot 10^{-10}$	$1,69 \cdot 10^9$
Mab2/SII форм(д)	$2,27 \cdot 10^5$	$1,75 \cdot 10^{-4}$	$7,71 \cdot 10^{-10}$	$1,30 \cdot 10^9$
Pab2/SII бпл	$3,39 \cdot 10^7$	$3,52 \cdot 10^{-4}$	$1,04 \cdot 10^{-11}$	$9,61 \cdot 10^{10}$
Pab2/SII форм	$1,15 \cdot 10^7$	$2,37 \cdot 10^{-4}$	$2,06 \cdot 10^{-11}$	$4,85 \cdot 10^{10}$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

SPR-анализ взаимодействия инактивированных вакцинных аттенуированных штаммов Сэбина вируса полиомиелита типов 1 и 2 с соответствующими антителами выполнен с использованием ориентированной иммобилизации антител за Fc-фрагмент через белок А. Выявлена сопоставимая аффинность взаимодействия вакцинных штаммов вируса полиомиелита, инактивированных различными способами (β -пропиолактоном или формальдегидом), с антителами. Высокоаффинное взаимодействие инактивированных вакцинных аттенуированных штаммов Сэбина вируса полиомиелита типов 1 и 2 с иммобилизованными антителами свидетельствует о том, что D-антиген сохранил свою структуру после инактивации вируса.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках гранта Российского Научного Фонда № 23-15-00471, <https://rscf.ru/project/23-15-00471/>

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты проводили с соблюдением общепринятых норм гуманного отношения к лабораторным животным. Работа выполнена

в соответствии с Приказом Минздрава РФ №199н от 1 апреля 2016 г “Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики” и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г по охране животных, используемых в научных целях.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

- Shuker S.B., Hajduk P.J., Meadows R.P., Fesik S.W. (1996) Discovering high-affinity ligands for proteins: SAR by NMR. *Science*, **274**(5292), 1531–1534. DOI: 10.1126/science.274.5292.1531
- Mayer M., Meyer B. (1999) Characterization of ligand binding by saturation transfer difference NMR spectroscopy. *Angewandte Chemie International Edition*, **38**(12), 1784–1788. DOI: 10.1002/(SICI)1521-3773(19990614)38:12<1784::AID-ANIE1784>3.0.CO;2-Q
- Blundell T.L., Jhoti H., Abell C. (2002) High-throughput crystallography for lead discovery in drug design. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **1**(1), 45–54. DOI: 10.1038/nrd706
- Duong-Thi M.-D., Bergström M., Fex T., Isaksson R., Ohlson S. (2013) High-throughput fragment screening by affinity LC-MS. *J. Biomol. Screen.*, **18**(2), 160–171. DOI: 10.1177/1087057112459271

5. *Ladbury J.E., Klebe G., Freire E.* (2010) Adding calorimetric data to decision making in lead discovery: a hot tip. *Nat. Rev. Drug Discov.*, **9**(1), 23–27. DOI: 10.1038/nrd3054
6. *Lewis L.M., Engle L.J., Pierceall W.E., Hughes D.E., Shaw K.J.* (2004) Affinity capillary electrophoresis for the screening of novel antimicrobial targets. *J. Biomol. Screen.*, **9**(4), 303–308. DOI: 10.1177/1087057104263439
7. *Duong-Thi M.-D., Meiby E., Bergström M., Fex T., Isaksson R., Ohlson S.* (2011) Weak affinity chromatography as a new approach for fragment screening in drug discovery. *Anal. Biochem.*, **414**(1), 138–146. DOI: 10.1016/j.ab.2011.02.022
8. *Wang X., Li M., Lin Z., Pan H., Tang Z., Zheng Z., Li S., Zhang J., Xia N., Zhao Q.* (2018) Multifaceted characterization of recombinant protein-based vaccines: an immunochemical toolbox for epitope-specific analyses of the hepatitis E vaccine. *Vaccine*, **36**(50), 7650–7658. DOI: 10.1016/j.vaccine.2018.10.089
9. *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
10. *Narayan K., Paduraru C., Blake T., Arunachalam A.B.* (2023) Rapid determination of influenza vaccine potency by an SPR-based method using subtype or lineage-specific monoclonal antibodies. *Front. Immunol.*, **14**, 1128683. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1128683
11. *Wen Y., Trinh H.V., Linton C.E., Tani C., Norais N., Martinez-Guzman D., Ramesh P., Sun Y., Situ F., Karaca-Griffin S., Hamlin C., Onkar S., Tian S., Hilt S., Malyala P., Lodaya R., Li N., Otten G., Palladino G., Friedrich K., Aggarwal Y., LaBranche C., Duffy R., Shen X., Tomaras G.D., Montefiori D.C., Fulp W., Gottardo R., Burke B., Ulmer J.B., Zolla-Pazner S., Liao H.X., Haynes B.F., Michael N.L., Kim J.H., Rao M., O'Connell R.J., Carfi A., Barnett S.W.* (2018) Generation and characterization of a bivalent protein boost for future clinical trials: HIV-1 subtypes CR01_AE and B gp120 antigens with a potent adjuvant. *PLOS One*, **13**(4), e0194266. DOI: 10.1371/journal.pone.0194266
12. *Deschuyteneer M., Elouahabi A., Plainchamp D., Plisnier M., Soete D., Corazza Y., Lockman L., Giannini S., Deschamps M.* (2010) Molecular and structural characterization of the L1 virus-like particles that are used as vaccine antigens in Cervarix™, the AS04-adjuvanted HPV-16 and -18 cervical cancer vaccine. *Human Vaccines*, **6**(5), 407–419. DOI: 10.4161/hv.6.5.11023
13. *Пиняева А.Н., Ковпак А.А., Ивин Ю.Ю., Шишова А.А., Сорокин А.А., Простова М.А., Белякова А.В., Синюгина А.А., Ишмухаметов А.А., Хаччаев Ю.Х., Гмыль А.П.* (2021) Подбор сорбента для очистки концентрата вакцинного штамма полиовируса методом гель-фильтрации. *Биотехнология*, **37**(6), 84–94. [Pinyaeva A.N., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Shishova A.A., Sorokin A.A., Prostova M.A., Belyakova A.V., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A., Hapchaev Y.H., Gmyl A.P. (2021) Selection of sorbent for poliovirus vaccine strain concentrate purification by gel filtration. *Biotechnologiya*, **37**(6), 84–94.] DOI: 10.21519/0234-2758-2021-37-6-84-94
14. *Pinyaeva A., Ignatyev G., Kozlovskaya L., Ivin Y., Kovpak A., Ivanov A., Shishova A., Antonova L., Kharpaev 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
15. *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
16. *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
17. *Elveborg S., Monteil V.M., 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
18. *Жданов Д.Д., Ивин Ю.Ю., Шишпарёнок А.Н., Краевский С.В., Канащенко С.Л., Агафонова Л.Е., Шумянцева В.В., Гнеденко О.В., Пиняева А.Н., Ковпак А.А., Ишмухаметов А.А., Арчаков А.И.* (2023) Перспективы создания вакцинных препаратов нового типа на основе псевдовиральных частиц (на примере вакцины против полиомиелита). *Биомедицинская химия*, **69**(5), 253–280. [Zhdanov D.D., Ivin Yu.Yu., Shishparenok A.N., Kraevskiy S.V., Kanashenko S.L., Agafonova L.E., Shumyantseva V.V., Gnedenko O.V., Pinyaeva A.N., Kovpak A.A., Ishmukhametov A.A., Archakov A.I. (2023) Perspectives for the creation of a new type of vaccine preparations based on pseudovirus particles using polio vaccine as an example. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **69**(5), 253–280.] DOI: 10.18097/PBMC20236905253
19. *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
20. *Wood D.J., Heath A.B.* (1995) A WHO collaborative study of immunogenicity assays of inactivated poliovirus vaccines. *Biologicals*, **23**(4), 301–311. DOI: 10.1006/biol.1995.0049
21. *Kersten G., Hazendonk T., Beuvery C.* (1999) Antigenic and immunogenic properties of inactivated polio vaccine made from Sabin strains. *Vaccine*, **17**(15–16), 2059–2066. DOI: 10.1016/S0264-410X(98)00409-5
22. *Westdijk J., Brugmans D., Martin J., van't Oever A., Bakker W.A.M., Levels L., Kersten G.* (2011) Characterization and standardization of Sabin based inactivated polio vaccine: proposal for a new antigen unit for inactivated polio vaccines. *Vaccine*, **29**(18), 3390–3397. DOI: 10.1016/j.vaccine.2011.02.085
23. *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
24. *Агафонова Л.Е., Шумянцева В.В., Ивин Ю.Ю., Пиняева А.Н., Ковпак А.А., Ишмухаметов А.А., Будник С.В., Чурюкин Р.С., Жданов Д.Д., Арчаков А.И.* (2024) Электрохимическое профилирование вирусных частиц полиомиелита, инактивированных химическим способом и ионизирующим излучением. *Биомедицинская химия*, **70**(3), 161–167. [Agafonova L.E., Shumyantseva V.V., Ivin Yu.Yu., Pinyaeva A.N., Kovpak A.A., Ishmukhametov A.A., Budnik S.V., Churyukin R.S., Zhdanov D.D., Archakov A.I. (2024) Electrochemical profiling of poliovirus particles inactivated by chemical method and ionizing radiation. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **70**(3), 161–167.] DOI: 10.18097/PBMC20247003161
25. *Ковпак А.А., Ивин Ю.Ю., Пиняева А.Н., Хаччаев Ю.Х., Ожерелков С.В., Белякова А.В., Ишмухаметов А.А.* (2021) Применение ультрафильтрационных мембран для очистки и концентрирования вируса полиомиелита типа 1 штамм Сэбина. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*, **98**(2), 135–143.

- [Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Piniyeva A.N., Khapchaev Y.K., Ozherelkov S.V., Belyakova A.V., Ishmukhametov A.A. (2021) Application of ultrafiltration membranes for purification and concentration of Sabin poliovirus type 1. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, **98**(2), 135–143.] DOI: 10.36233/0372-9311-94
26. Пиняева А.Н., Ковпак А.А., Ивин Ю.Ю., Санджиева С.Х., Шишова А.А., Целых И.О., Василенко В.Е., Каа К.В., Мажед Ж.Х., Халчаев Ю.Х., Синюгина А.А., Ишмухаметов А.А. (2022) Применение ионообменной хроматографии при разработке технологии получения инактивированной вакцины против полиомиелита. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, **21**(5), 107–119. [Piniyeva A.N., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Sandzhieva S.H., Shishova A.A., Tselikh I.O., Vasilenko V.E., Kaa K.V., Mazhed Zh.H., Khapchaev Yu.Kh., Siniugina A.A., Ishmukhametov A.A. (2022) Application of ion exchange chromatography in the development of technology to obtain inactivated poliovirus vaccine. *Epidemiology and Vaccinal Prevention*, **21**(5), 107–119.] DOI: 10.31631/2073-3046-2022-21-5-107-119
27. Yablokov E., Sushko T., Ershov P., Florinskaya A., Gnedenko O., Shkel T., Grabovec I., Strushkevich N., Kaluzhskiy L., Usanov S., Gilep A., Ivanov A. (2019) A large-scale comparative analysis of affinity, thermodynamics and functional characteristics of twelve cytochrome P450 isoforms and their redox partners. *Biochimie*, **162**, 156–166. DOI: 10.1016/j.biochi.2019.04.020
28. Barykin E.P., Garifulina A.I., Tolstova A.P., Anashkina A.A., Adzhubei A.A., Mezentsev Y.V., Shelukhina I.V., Kozin S.A., Tsetlin V.I., Makarov A.A. (2020) Tetrapeptide Ac-HAEE-NH₂ protects $\alpha 4\beta 2$ nAChR from inhibition by A β . *Int. J. Mol. Sci.*, **21**(17), 6272. DOI: 10.3390/ijms21176272
29. Ivanov A.S., Gnedenko O.V., Molnar A.A., Archakov A.I., Podust L.M. (2010) FMN binding site of yeast NADPH-cytochrome P450 reductase exposed at the surface is highly specific. *ACS Chem. Biol.*, **5**(8), 767–776. DOI: 10.1021/cb100055v
30. Рахметова С.Ю., Радько С.П., Гнеденко О.В., Бодоев Н.В., Иванов А.С., Арчаков А.И. (2010) Сравнительный термодинамический анализ взаимодействия тромбина с антитромбиновыми аптамерами и их гетеродимерной конструкцией. *Биомедицинская химия*, **56**(3), 404–411. [Rakhmetova S.Yu., Radko S.P., Gnedenko O.V., Bodoev N.V., Ivanov A.S., Archakov A.I. (2010) Comparative thermodynamic analysis of thrombin interaction with anti-thrombin aptamers and their heterodimeric construct. *Biomeditsinskaya Khimiya*, **56**(3), 404–411.] DOI: 10.18097/PBMC20105603404
31. Dubs M.C., Altschuh D., van Regenmortel M.H. (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
32. Bright R.A., Carter D.M., Crevar C.J., Toapanta F.R., Seckbeck J.D., Cole K.S., Kumar N.M., Pushko P., Smith G., Tumpey T.M., Ross T.M. (2008) Cross-clade protective immune responses to influenza viruses with H5N1 HA and NA elicited by an influenza virus-like particle. *PLOS One*, **3**(1), e1501. DOI: 10.1371/journal.pone.0001501

Поступила в редакцию: 04. 09. 2024.
После доработки: 09. 12. 2024.
Принята к печати: 10. 12. 2024.

THE SPR ANALYSIS OF THE INTERACTION OF INACTIVATED POLIOVIRUS VACCINE ATTENUATED STRAINS WITH ANTIBODIES

O.V. Gnedenko^{1*}, Yu.Yu. Ivin^{1,2}, A.N. Piniyeva^{1,2}, A.N. Zyrina³, I.V. Levin³, N.S. Borisenko³, D.D. Zhdanov¹, A.S. Ivanov¹, A.V. Lisitsa¹, A.A. Ishmukhametov², A.I. Archakov^{1,3}

¹Institute of Biomedical Chemistry,

10/8 Pogodinskaya str., Moscow, 119121 Russia; *e-mail: gnedenko.oksana@gmail.com

²Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of Russian Academy of Sciences, 8/1 Moskovsky settlement, Village of Institute of Poliomyelitis, Moscow, 108819 Russia

³Pirogov Russian National Research Medical University, 1 Ostrovityanova str., Moscow, 117997 Russia

The interaction of inactivated poliovirus vaccine strains with oriented antibodies immobilized to protein A via Fc fragments has been investigated. Using an SPR biosensor, the kinetic and equilibrium parameters of the interaction of vaccine attenuated polioviruses of the Sabin strains type 1 and type 2, inactivated by various methods were determined. The strongest interaction was observed between polyclonal antibodies to Sabin strain type 2 poliovirus and Sabin strain type 2 poliovirus inactivated with β -propiolactone, $K_D = 1.04 \cdot 10^{-11}$ M, as well as the interaction of monoclonal antibodies to Sabin strain type 1 poliovirus and Sabin strain type 1 poliovirus inactivated with formaldehyde, $K_D = 1.39 \cdot 10^{-11}$ M. The high-affinity interaction of inactivated vaccine polioviruses of the Sabin strains type 1 and type 2 with immobilized antibodies indicates that the D-antigen retained its structure after virus inactivation with β -propiolactone or formaldehyde.

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

Keywords: antigen-antibody interaction; surface plasmon resonance; vaccine attenuated poliovirus strains

Funding. The work was supported the Russian Science Foundation (project No. 23-15-00471), <https://rscf.ru/project/23-15-00471/>

Received: 04.09.2024; revised: 09.12.2024; accepted: 10.12.2024.