

<https://doi.org/10.15407/dopovidi2021.03.096>

УДК 573.6.086.835:579.8

В.Г. Спиридонов¹, М.Д. Мельничук²

¹ Китайсько-український інститут наук про життя, Джудзі, КНР

² Всеукраїнський науково-навчальний консорціум, Вінниця

E-mail: spurydonov@ukr.net, maksymm@yahoo.com

Коронавірусний S-антиген як маркер ефективної вакцинації

Представлено академіком НАН України В.С. Підгорським

Отримано дріжджовий аналог фрагмента S-антигену коронавірусу (SARS-CoV-2), що відповідає за зв'язування із клітинним рецептором ACE-2. Ідентичність отриманого дріжджового аналога щодо нативного, вірусного, була визначена в непрямому ІФА і вестерн-блот-аналізі із використанням комерційної кролячої анти-SARS-CoV-2 S сироватки. Імунологічну реактивність синтезованого дріжджового аналога S-антигену аналізували в непрямому ІФА із сироватками волонтерів (n = 8), відібраними до вакцинації і на 28-му добу після першої вакцинації. Вакцинація проводилася китайською вакциною SinoVac у два етапи з проміжком в 14 діб. Результати аналізу показали, що титр антитіл на 28-му добу після першої вакцинації достовірно в 4 рази вищий, ніж до вакцинації, що підтверджує сероконверсію внаслідок застосування даної вакцини і побічно служить маркером ефективної вакцинації з утворенням віруснейтралізуючих антитіл.

Ключові слова: COVID-19, коронавірус, рекомбінантні антигени, *S. cerevisiae*, віруснейтралізуючі антитіла, SinoVac, ІФА.

Станом на березень 2021 р. у світі зареєстровано понад 100 млн підтверджених випадків захворювання COVID-19, з них понад 2,7 млн смертельних. Станом на 20 березня 2021 р. було вироблено близько 400 млн доз вакцини [1]. Біоінформативний аналіз показує, що збудником COVID-19 є бета-коронавірус SARS-CoV-2, тісно пов'язаний з атиповою пневмонією SARS, який спричиняв бета-коронавірус в 2002 р. вперше, і ймовірно, виник у результаті зоонозного перенесення від кожанів [2].

Основою гуморального імунітету до багатьох коронавірусів є спайковий антиген (S), мембранний глікопротеїн типу I, розміром 140 кДа, виявлений на поверхні вірусу [3]. Спайкові антигени вірусів SARS і SARS-CoV-2 мають понад 75 % гомології та багато спільних ознак і використовують один і той же клітинний рецептор для проникнення в клітину — ангіотензинперетворювальний фермент 2 (ACE2) [4]. SARS-CoV S-протеїн складається з 1255 амінокислотних залишків та містить два домени: S I (17–680 а. з.), який відповідає

Цитування: Спиридонов В.Г., Мельничук М.Д. Коронавірусний S-антиген як маркер ефективної вакцинації. *Допов. Нац. акад. наук Укр.* 2021. № 3. С. 96–103. <https://doi.org/10.15407/dopovidi2021.03.096>

за зв'язування з рецепторами, та S II (681–1255 а. з.), який відповідає за злиття з клітинною мембраною [5]. S-протеїн розташований на поверхні віріону і здатний індукувати потужні віруснейтралізуючі антитіла у свавців [6]. При цьому завдяки мутаціям у гені, що кодує S-антиген, це дає можливість вірусу швидко розповсюджуватися й уникати гуморальної імунної відповіді з боку інфікованих організмів. Так, наприклад, нещодавно виявлений так званий британський штам коронавірусу має мутацію N501Y у S-антигені, яка відповідає за підвищену вірулентність [7]. Ця мутація розташована саме у рецепторзв'язувальному регіоні S-антигену і в декілька разів збільшує афінність до рецептора. Інша мутація в S-антигені, а саме E484K, притаманна так званому південноафриканському штаму і відповідає за ухилення від нейтралізації моноклональними антитілами проти SARS-CoV-2 [8]. Усе це вказує на те, що саме спайковий S-білок несе важливу імунологічну функцію і є основним кандидатом на мішень під час розробки ефективних вакцин [9].

У КНР 6 травня 2020 р. вперше було оголошено про розробку вакцини проти нового коронавірусу. Компанія Sinovac Biotech Ltd. представила вірусну інактивовану вакцину CoronaVac. Вакцина пройшла третю стадію випробування і дозволена до використання FDA Китаю. Вакцина індукує вироблення нейтралізуючих антитіл класу IgG, спрямованих проти рецепторзв'язувального домену S-антигену [10].

Метою нашого дослідження було отримати дріжджовий аналог рецепторзв'язувального домену S-антигену нового коронавірусу (SARS-CoV-2), підтвердити його імунологічну автентичність нативному і проаналізувати його як маркер ефективної вакцинації китайською вакциною Sinovac, здатний виявляти титри віруснейтралізуючих антитіл після вакцинації.

Матеріали і методи. У дослідженні використано дріжджові клітини *S. cerevisiae* INVSc1 (*MATa*, *his3D1*, *leu2*, *trp1-289*, *ura3-52*, *MAT*, *his3D1*, *leu2*, *trp1-289*, *ura3-52*) від компанії Invitrogen (США). Синтез гена, що кодує фрагмент спайкового антигену S (318-541 а. з.) було виконано на замовлення компанією Ruibiotech (КНР). Фрагмент гена клонували у вектор для дріжджової експресії pYES2 (Invitrogen, США) за сайтами рестрикції *EcoRI* та *XhoI* (NEB, США). Протокол трансформації та експресії описаний у літературі [11].

Трансформовані дріжджові клітини культивували в рідкому середовищі YPD (1 % дріжджовий екстракт, 2 % пептон, 2 % D-глюкоза), тоді як експресію цільового протеїну здійснювали у синтетичному мінімальному середовищі без урацилу (SC-U) із 0,01 % галактозою як індуктора експресії протягом 72 год при 30 °С.

Дріжджові клітини після експресії осаджували центрифугуванням і суспендували у лізис-буфері (40 мМ NaH_2PO_4 , 0,3 М NaCl , 5 мМ імідазол, 1 мМ PMSEF, 5 мМ β -ME) та руйнували за допомогою гомогенізатора BeadBeater (BioSpec, США).

Виділення і очищення S-антигену з дріжджового лізату проводили на Ni-сефарозі за допомогою хроматографічної системи АСТА Prime Plus (GE Healthcare, США). Фракції піка поєднували та діалізували проти 2 л ФБС розчину протягом 24 год при 4 °С. Після діалізу S-антиген концентрували у центриконах (MWCO 3000, Merck) протягом 3 год при 5 тис. об/хв.

Виділений S-антиген аналізували у непрямому ІФА із використанням S-специфічних кролячих поліклональних антитіл SARS-CoV-2 Spike Antibody, Rabbit PAb Cat. № 40591-T62 (SinoBiological, КНР). Очищений S-антиген адсорбували в концентрації 0,1 мкг/мл у лунках полістирольного планшета High binding microplate strips (Costar, США) у 0,05 М КББ (рН 9,6) протягом 24 год при 4 °С. Процедуру ІФА здійснювали за стандартними умовами [12].

Як вторинні використовували козячі антитіла проти IgG кроля, мічені пероксидазою хрому, Goat anti Rabbit IgG-HRP Cat. № SH-0031 (DingGuo, КНР). Після кожної стадії аналізу лунки планшета промивали розчином ФБС із 0,05 % твін-20 за допомогою мікропланшетного вошера HydroFlex (Tecan, Швейцарія). На останній стадії в лунки вносили розчин субстрату пероксиду водню із хромогеном ТМБ (DingGuo, КНР), витримували при кімнатній температурі у темряві 10 хв. Ензиматичну реакцію зупиняли, додаючи розчин сірчаної кислоти (2 М), оптичну густину вимірювали при 450 нм із використанням мікропланшетного рідера Infinite F50 (Tecan, Швейцарія).

Для підтвердження антигенної спорідненості синтезованого S-антигену проводили вестерн-блот-аналіз (ВБА), для чого очищений S-антиген розділяли електрофорезом у 12 % ПААГ у нативних умовах і переносили на PVDF мембрану в трансфер-буфері. Процедуру ВБА також проводили за стандартними умовами [12] із використанням імунологічних реагентів, як і в непрямому ІФА (первинні антитіла — SARS-CoV-2 Spike Antibody, Rabbit PAб; вторинні — Goat anti Rabbit IgG-HRP). Мембрану проявляли за допомогою набору реактивів для підсиленої хемілюмінесценції (ECL) і фіксували на рентгенівську плівку Kodak.

Для перевірки S-антигену як маркера вакцинації коронавірусною вакциною сформували групу з восьми волонтерів різного віку (від 23 до 59 років), різної статі (чоловіки — 5, жінки — 3) та расової належності (азіати — 6, європейці — 2), у яких відбирали венозну кров у асептичних умовах до вакцинації (доба — 0) та 28 діб потому (доба — 28). Вакцинацію проводили китайською вакциною CoronaVac (Sinovac, КНР) в умовах шпиталю у два етапи із проміжком у 14 діб. Рівень імунних антитіл (IgG) визначали в непрямому ІФА із зразками сироваток у розведенні 1/25. Як імуоферментний кон'югат використовували козячі антитіла проти IgG людини, мічені пероксидазою хрому, Goat anti Human IgG (H+L)-HRP Cat. № SH-0041 (DingGuo, КНР).

Отримані дані аналізували за допомогою програми Microsoft Excel 2007, статистичну обробку результатів проводили, враховуючи парний *t*-критерій Стьюдента для залежних сукупностей. Статистично значущими вважали відмінності при $p < 0,05$.

Результати та їх обговорення. На світовому біотехнологічному ринку із початком пандемії з'явилося багато пропозицій на рекомбінантні S-білки нового коронавірусу, збудника COVID-19, головними продуцентами яких є клітинні лінії ссавців, такі як HEK293 та CHO [13, 14]. Це пояснюється тим, що саме спайковий білок є головною мішенню імунної системи, що забезпечує синтез віруснейтралізуючих антитіл. Саме цей вірусний білок став основою для розробки багатьох вакцинних препаратів. Ринкова вартість рекомбінантного S-протеїну, виробленого з культури клітин ссавців, сягає від 4 до 6 тис. дол. США за 1,0 мг очищеного протеїну. Така висока вартість зумовлена не тільки високим попитом на цей вид продукції під час пандемії, а також високовартісною технологічною процедурою клітинного синтезу та очищення цільового продукту. Саме тому ми запропонували альтернативну систему еукаріотичної експресії S-протеїну в клітинах дріжджів *S. cerevisiae*.

Синтетичний ген, що кодує 318–541 а. з. (рецепторзв'язувальний домен) S-протеїну нового коронавірусу (ген банк № MN908947.3), був клонований у вектор для дріжджової експресії pYES2 під контроль GAL1 промотору та CYC1 термінатора транскрипції в єдиній рамці зчитування із послідовністю, що кодує 6 а. з. гістидину. Отриманою генетичною конструкцією (pYES-CoV-S-RBD) трансформували клітини дріжджів *S. cerevisiae* INVSc1,

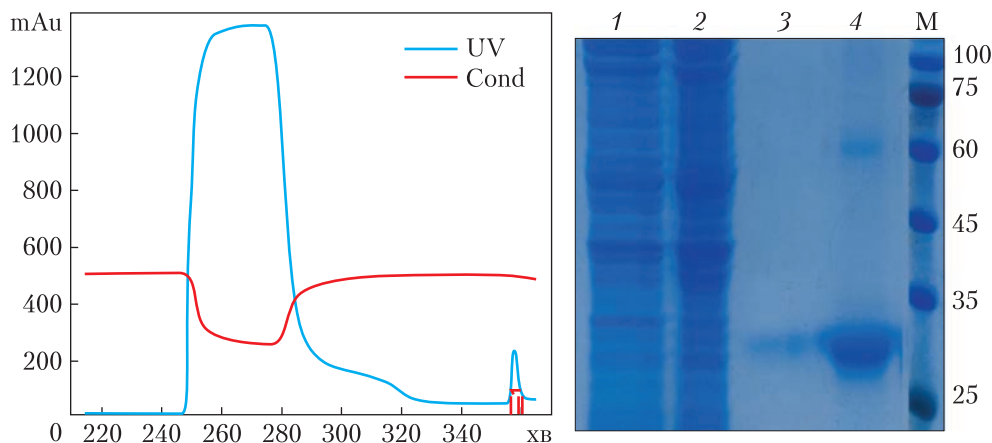
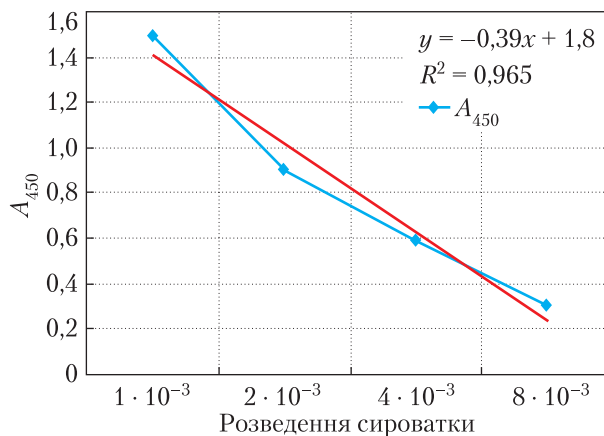


Рис. 1. Хроматографічний профіль очищення S-антигену із дріжджового лізату на Ni-сефарозі (а) та електрофореграма фракції очищення S-антигену (б: 1 – лізат до нанесення на колонку; 2 – фракція, лізату після проходження крізь колонку; 3 – фракція піка елюції S-антигену; 4 – S-антиген після концентрації)

Рис. 2. Криві титрування специфічної сироватки anti-S у непряму ІФА. Первинні антитіла: SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike Antibody, Rabbit PAb (SinoBiological), Cat#40591-T62). Вторинні антитіла, мічені пероксидазою хрому: Goat anti Rabbit IgG-HRP (DingGuo), Cat# SH-0031 (розведення 1/5000)



селекцію трансформованих клонів проводили на селективному синтетичному середовищі SC-Ura, оскільки генетична конструкція містить маркер ауксотрофної селекції URA3, що дає можливість трансформованим клітинам виживати на мінімальному середовищі без урацилу.

Для індукції експресії рекомбінантного S-протеїну використовували галактозу, яку додавали у живильне середовище під час ферментації відібраного дріжджового клону з максимальним рівнем експресії 0,3 мг на літр культури-продуцента після 72 год інкубації при 30 °С. Після очищення і концентрації S-антигену чистоту одержаного препарату перевіряли електрофорезом у 12 % ПААГ-ДСН. Як видно з рис. 1, очищений білок достатньо гомогенний і мігрує у гелі з розміром, близьким до 28 кДа у порівнянні із розмірним стандартом протеїнів, що узгоджується із даними, теоретично розрахованими під час дизайну експерименту.

Для серологічної характеристики одержаного S-антигену нами проведено титрування стандартної гіперімунної кролячої сироватки (SARS-CoV-2 S-антигенспецифічної) у непряму імуноаналізі. Як видно з рис. 2, двократне титрування сироватки, починаючи з розведення 1/1000, демонструє лінійну залежність із коефіцієнтом кореляції R^2 96 %, що вказує на специфічний характер взаємодії антитіл (IgG) із адсорбованим S-антигеном.

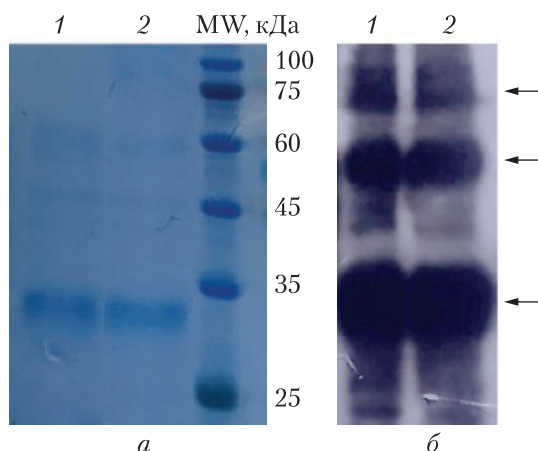
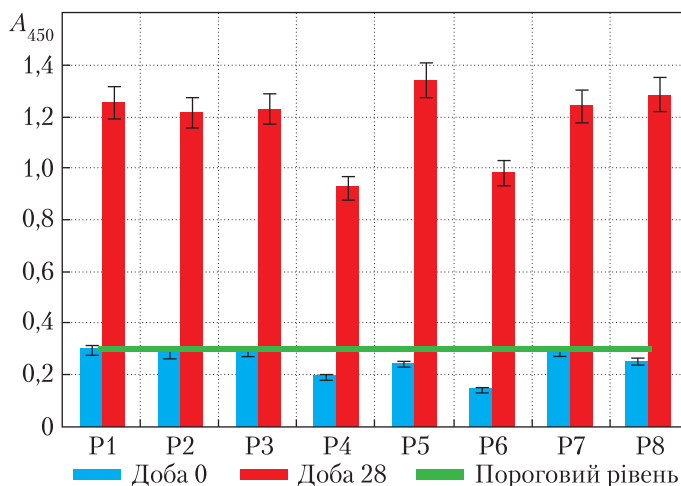


Рис. 3. Серологічна ідентифікація S-антигену у вестерн-блот-аналізі за допомогою anti-S специфічної сироватки. Електрофореграма очищеного S-антигену (а) та прояв мембрани (ECL) після дослідження (б). Стрілками вказані мономерна, димерна та тримерна організація S-антигену. *Первинні антитіла:* SARS-CoV-2 (2019-nCoV) Spike Antibody, Rabbit PAb (SinoBiological), Cat#40591-T62 (розведення 1/2000). *Вторинні антитіла, мічені пероксидазою хрому:* Goat anti Rabbit IgG-HRP (DingGuo), Cat# SH-0031 (розведення 1/2000)

Рис. 4. Титр антитіл до (доба 0) та після вакцинації (доба 28). Середнє значення титру антитіл до вакцинації становить $0,250 \pm 0,054$ ($m \pm \sigma$, $m = \pm 0,019$). Середнє значення титру антитіл на 28-му добу після вакцинації становить $1,186 \pm 0,149$ ($m \pm \sigma$, $m = \pm 0,053$) *t*-критерій Стьюдента дорівнює 23,527, зміни ознаки статистично значущі ($p < 0,05$)



Результати невідновленого гел-електрофорезу і ВБА (рис. 3) не тільки підтвердили специфічність S-антигену, а також показали, що цільовий білок утворює димерну та тримерну організацію, що узгоджується із літературними даними щодо взаємодії спайкового білка коронавірусу із клітинним рецептором у вигляді тримеру [14].

Нарешті, після підтвердження антигенної спорідненості рекомбінантного S-антигену із специфічною стандартною кролячою сироваткою нами було досліджено титри антитіл у здорової людини після вакцинації китайською вакциною CoronaVac (Sinovac Life Sciences, КНР), яка являє собою інактивованій вірус SARS-CoV-2, вироблений на культурі клітин Vero [9]. Для цього було відібрано кілька волонтерів ($n = 8$) різної вікової групи, статі та расової належності. На рис. 4 показано діаграму результатів непрямого імуноаналізу із використанням отриманого S-антигену і зразків сироваток до вакцинації та на 28-му добу після вакцинації. При цьому вакцинації проходили у два етапи з інтервалом 14 днів. Як впливає з результатів аналізу, рівень антитіл (класу IgG) після вакцинації достовірно у 4,7 рази вищий, ніж до вакцинації. Це дає підставу зробити висновок, що дріжджовий S-антиген може слугувати маркером ефективності вакцинації та підтвердження наявності протек-

тивних віруснейтралізуючих антитіл. Розроблений нами препарат S-антигену SARS-CoV-2 дає змогу проводити ефективний аналіз титрів віруснейтралізуючих антитіл після вакцинації людей різноманітними доступними вакцинами проти коронавірусу SARS-CoV-2.

ЦИТОВАНА ЛІТЕРАТУРА

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. World Health Organization. URL: <https://covid19.who.int>. (Дата звернення: 08.04.2021).
2. Lu R., Zhao X., Li J., Niu P., Yang B., Wu H., Wang W., Song H., Huang B., Zhu N., Bi Y., Ma X., Zhan F., Wang L., Hu T., Zhou H., Hu Z., Zhou W., Zhao L., Chen J., Meng Y., Wang J., Lin Y., Yuan J., Xie Z., Ma J., Liu W.J., Wang D., Xu W., Holmes E.C., Gao G.F., Wu G., Chen W., Shi W., Tan W. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020. **395**. P. 565–574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
3. Shih Y.-P., Chen C.-Y., Liu S.-J., Chen K.-H., Lee Y.-M., Chao Y.-C., Chen Y.-M. A. Identifying epitopes responsible for neutralizing antibody and DC-SIGN binding on the spike glycoprotein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2006. **80**, № 21. P. 10315–10324. <https://doi.org/10.1128/JVI.01138-06>
4. Premkumar L., Segovia-Chumbez B., Jadi R., Martinez D.R., Raut R., Markmann A., Cornaby C., Bartelt L., Weiss S., Park Y., Edwards C.E., Weimer E., Scherer E.M., Roupheal N., Edupuganti S., Weiskopf D., Tse L.V., Hou Y.J., Margolis D., Sette A., Collins M.H., Schmitz J., Baric R.S., de Silva A.M. The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* 2020. **5**, eabc8413. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc8413>
5. Walls A.C., Tortorici M.A., Snijder J., Xiong X., Bosch B.-J., Rey F.A., Velesler D. Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. **114**, № 42. P. 11157–11162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708727114>
6. Chen W.H., Hotez P.J., Bottazzi M.A. Potential for developing a SARS-CoV receptor-binding domain (RBD) recombinant protein as a heterologous human vaccine against coronavirus infectious disease (COVID)-19. *Hum. Vaccin. Immunother.* 2020. **16**, № 6. P. 1239–1242. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1740560>
7. Liu Y., Liu J., Plante K.S., Plante J.A., Xie X., Zhang X., Ku Z., An Z., Scharton D., Schindewolf C., Menachery V.D., Shi P.-Y., Weaver S.C. The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 transmission. *bioRxiv*. 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.03.08.434499>
8. Weisblum Y., Schmidt F., Zhang F., DaSilva J., Poston D., Lorenzi J.Cc., Muecksch F., Rutkowska M., Hoffmann H.-H., Michailidis E., Gaebler C., Agudelo M., Cho A., Wang Z., Gazumyan A., Cipolla M., Luchsinger L., Hillyer C.D., Caskey M., Robbiani D.F., Rice C.M., Nussenzweig M.C., Hatziioannou T., Bieniasz P.D. Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife*. 2021. **9**. e61312. <https://doi.org/10.7554/eLife.61312>
9. Dai L., Gao G.F. Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.* 2021. **21**, № 2. P. 73–82. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>
10. Zhang Y., Zeng G., Pan H., Li C., Hu Y., Chu K., Han W., Chen Z., Tang R., Yin W., Chen X., Hu Y., Liu X., Jiang C., Li J., Yang M., Song Y., Wang X., Gao Q., Zhu F. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.* 2021. **21**. P. 181–192. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30843-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30843-4)
11. Souillard A., Lechler T., Spiridonov V., Shevchenko A., Shevchenko A., Li R., Winsor B. *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery *in vitro*. *Mol. Cell Biol.* 2002. **22**. P. 7889–7906. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.22.7889-7906.2002>
12. The immunoassay handbook (4th ed.): Wild D. (Ed.). Amsterdam: Elsevier, 2013. 1036 p.
13. Farnós O., Venereo-Sánchez A., Xu X., Chan C., Dash S., Chaabane H., Sauvageau J., Brahimi F., Saragovi U., Leclerc D., Kamen A.A. Rapid high-yield production of functional SARS-CoV-2 receptor binding domain by viral and non-viral transient expression for pre-clinical evaluation. *Vaccines* (Basel). 2020. **8**. 654. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040654>

14. Pino P, Kint J., Kiseljak D., Agnolon V., Corradin G., Kajava A.V., Rovero P., Dijkman R., den Hartog G., McLellan J.S., Byrne P.O., Wurm M.J., Wurm F.M. Trimeric SARS-CoV-2 spike proteins produced from CHO cells in bioreactors are high-quality antigens. *Processes*. 2020. 8. 1539. <https://doi.org/10.3390/pr8121539>

Надійшло до редакції 13.04.2021

REFERENCES

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. World Health Organization. Retrieved from <https://covid19.who.int>
2. Lu, R., Zhao, X., Li, J., Niu, P., Yang, B., Wu, H., Wang, W., Song, H., Huang, B., Zhu, N., Bi, Y., Ma, X., Zhan, F., Wang, L., Hu, T., Zhou, H., Hu, Z., Zhou, W., Zhao, L., Chen, J., Meng, Y., Wang, J., Lin, Y., Yuan, J., Xie, Z., Ma, J., Liu, W. J., Wang, D., Xu, W., Holmes, E. C., Gao, G. F., Wu, G., Chen, W., Shi, W. & Tan, W. (2020). Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*, 395, pp. 565-574. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)
3. Shih, Y.-P., Chen, C.-Y., Liu, S.-J., Chen, K.-H., Lee, Y.-M., Chao, Y.-C. & Chen, Y.-M. A. (2006). Identifying epitopes responsible for neutralizing antibody and DC-SIGN binding on the spike glycoprotein of the severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.*, 80, No. 21, pp. 10315-10324. <https://doi.org/10.1128/JVI.01138-06>
4. Premkumar, L., Segovia-Chumbez, B., Jadi, R., Martinez, D. R., Raut, R., Markmann, A., Cornaby, C., Bartelt, L., Weiss, S., Park, Y., Edwards, C. E., Weimer, E., Scherer, E. M., Roupheal, N., Edupuganti, S., Weiskopf, D., Tse, L. V., Hou, Y. J., Margolis, D., Sette, A., Collins, M. H., Schmitz, J., Baric, R. S. & de Silva, A. M. (2020). The receptor-binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.*, 5, eabc8413. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc8413>
5. Walls, A. C., Tortorici, M. A., Snijder, J., Xiong, X., Bosch B.-J., Rey, F. A. & Velesler, D. (2017). Tectonic conformational changes of a coronavirus spike glycoprotein promote membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 114, No. 42, pp. 11157-11162. <https://doi.org/10.1073/pnas.1708727114>
6. Chen, W. H., Hotez, P. J. & Bottazzi, M. A. (2020). Potential for developing a SARS-CoV receptor-binding domain (RBD) recombinant protein as a heterologous human vaccine against coronavirus infectious disease (COVID)-19. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 16, No. 6, pp. 1239-1242. <https://doi.org/10.1080/21645515.2020.1740560>
7. Liu, Y., Liu, J., Plante, K. S., Plante, J. A., Xie, X., Zhang, X., Ku, Z., An, Z., Scharton, D., Schindewolf, C., Menachery, V. D., Shi, P.-Y. & Weaver, S. C. (2021). The N501Y spike substitution enhances SARS-CoV-2 transmission. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2021.03.08.434499>
8. Weisblum, Y., Schmidt, F., Zhang, F., DaSilva, J., Poston, D., Lorenzi, J. C., Muecksch, F., Rutkowska, M., Hoffmann, H.-H., Michailidis, E., Gaebler, C., Agudelo, M., Cho, A., Wang, Z., Gazumyan, A., Cipolla, M., Luchsinger, L., Hillyer, C. D., Caskey, M., Robbani, D. F., Rice, C. M., Nussenzweig, M. C., Hatziioannou, T. & Bieniasz, P. D. (2021). Escape from neutralizing antibodies by SARS-CoV-2 spike protein variants. *Elife*, 9, e61312. <https://doi.org/10.7554/eLife.61312>
9. Dai, L. & Gao, G. F. (2021). Viral targets for vaccines against COVID-19. *Nat. Rev. Immunol.*, 21, No. 2, pp. 73-82. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-00480-0>
10. Zhang, Y., Zeng, G., Pan, H., Li, C., Hu, Y., Chu, K., Han, W., Chen, Z., Tang, R., Yin, W., Chen, X., Hu, Y., Liu, X., Jiang, C., Li, J., Yang, M., Song, Y., Wang, X., Gao, Q. & Zhu, F. (2021). Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect. Dis.*, 21, pp. 181-192. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30843-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30843-4)
11. Soulard, A., Lechler, T., Spiridonov, V., Shevchenko, A., Shevchenko, A., Li, R. & Winsor, B. (2002). *Saccharomyces cerevisiae* Bzz1p is implicated with type I myosins in actin patch polarization and is able to recruit actin-polymerizing machinery *in vitro*. *Mol. Cell Biol.*, 22, pp. 7889-7906. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.22.7889-7906.2002>
12. Wild D., (Ed.). (2013). *The immunoassay handbook* (4th ed.). Amsterdam: Elsevier.
13. Farnós, O., Venereo-Sánchez, A., Xu, X., Chan, C., Dash, S., Chaabane, H., Sauvageau, J., Brahimi, F., Saragovi, U., Leclerc, D. & Kamen, A. A. (2020). Rapid high-yield production of functional SARS-CoV-2 receptor

binding domain by viral and non-viral transient expression for pre-clinical evaluation. *Vaccines (Basel)*, 8, 654. <https://doi.org/10.3390/vaccines8040654>

14. Pino, P., Kint, J., Kiseljak, D., Agnolon, V., Corradin, G., Kajava, A. V., Rovero, P., Dijkman, R., den Hartog, G., McLellan, J. S., Byrne, P. O., Wurm, M. J & Wurm, F. M. (2020). Trimeric SARS-CoV-2 spike proteins produced from CHO cells in bioreactors are high-quality antigens. *Processes*, 8, 1539. <https://doi.org/10.3390/pr8121539>

Received 13.04.2021

V.G. Spirydonov¹, M.D. Melnychuk²

¹ China-Ukraine Life Sciences Institute, Zuji, China

² All-Ukrainian Scientific-Educational Consortium, Vinnitsa

E-mail: spirydonov@ukr.net

CORONAVIRUS S ANTIGEN AS A MARKER OF EFFECTIVE VACCINATION

A yeast analog of the new coronavirus (SARS-CoV-2) Spike antigen, responsible for the binding to the ACE-2 cellular receptor is obtained. The identity of the yeast analog compared to the native viral one is demonstrated in indirect ELISA and Western blot analysis using commercial rabbit anti-SARS-CoV-2 S specific serum. The immunological reactivity of the yeast S antigen has been analyzed in indirect ELISA with volunteer Sera ($n = 8$) collected before the vaccination and on day 28 after the first vaccination. Vaccination was carried out with the Chinese Sinovac (CoronaVac) vaccine in two stages with an interval of 14 days. The results of the analysis have shown that the antibody titer on day 28 after the first vaccination is 4 times higher than before the vaccination, which confirms the seroconversion due to the use of the vaccine and indirectly serves as a marker of the effective vaccination with the formation of virus-neutralizing antibodies.

Keywords: COVID-19, coronavirus, recombinant antigens, *S. cerevisiae*, virus neutralizing antibodies, SinoVac, ELISA.