

На правах рукописи

Меркульева Юлия Александровна

**СВОЙСТВА РЕКОМБИНАНТНОГО РЕЦЕПТОР-
СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА S-БЕЛКА SARS-COV-2,
ПОЛУЧЕННОГО В КЛЕТКАХ СНО-K1**

1.5.3 – Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2022

Работа выполнена в Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: **Щербаков Дмитрий Николаевич,** кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник ФБУН «ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

Официальные оппоненты: **Гуляева Людмила Федоровна,** доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией молекулярных механизмов канцерогенеза Научно-исследовательского института молекулярной биологии и биофизики ФГБУН «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Орищенко Константин Евгеньевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией Структурно-функциональной организации генома ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный государственный университет»
Ведущая организация: ФГБУН «Институт молекулярной и клеточной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук

Защита состоится «17» февраля 2023 г. в 09-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.1 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Т.С. Непомнящих

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Новый коронавирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), впервые выявленный в Китае в 2019 году, вызвал пандемию, крупнейшую за столетие.

Исследования показали, что SARS-CoV-2 относится к роду бетакоронавирусов, который включает SARS-CoV, MERS-CoV и другие коронавирусы человека и животных (Lu et al., 2020). Как и все бетакоронавирусы, SARS-CoV-2 использует для проникновения в клетки поверхностный спайковый белок S (от английского «spike» – шип). Критическим этапом инфекции является взаимодействие рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ2, ACE2) на поверхности клетки-мишеней, которое запускает конформационные изменения в структуре шипа и тем самым опосредует проникновение вируса в клетки (Shang et al., 2020). Учитывая роль RBD в инфицировании клеток, а также тот факт, что большинство нейтрализующих антител, вырабатываемых при инфекции или вакцинации, направлены на этот регион, RBD считается ключевым местом уязвимости SARS-CoV-2 (Kleanthous et al., 2021).

Рекомбинантный белок RBD, получаемый в системах экспрессии бактерий, дрожжей, клеток растений и млекопитающих используют для создания средств диагностики, терапии и профилактики COVID-19 (He et al., 2021; Kleanthous et al., 2021; Malladi et al., 2021; Min and Sun, 2021). Однако, рекомбинантные варианты RBD, полученные при помощи разных систем экспрессии, могут значительно отличаться по структуре и свойствам. Во-первых, это связано с особенностями посттрансляционных модификаций или их отсутствием в той или иной системе экспрессии. Во-вторых, несмотря на то, что домен является функционально и структурно обособленной единицей белка, при его вычленении из структуры целого белка также могут произойти структурные изменения, критически влияющие на свойства и функции молекулы.

В данной работе мы сосредоточились на изучении рекомбинантного RBD, полученного в клетках CHO-K1, поскольку эта клеточная линия на сегодняшний день является самым

распространенными продуцентом терапевтических препаратов, подтвердившей свою безопасность и эффективность (Jayaral et al., 2007; Kim, Kim and Lee, 2012).

Целью данной работы было получение рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка SARS-CoV-2 в клеточной линии CHO-K1 и изучение его свойств.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Получить стабильный продуцент рекомбинантного белка RBD SARS-CoV-2 на основе клеточной линии CHO-K1.

2. Охарактеризовать структурные и физико-химические свойства полученного RBD.

3. Исследовать взаимодействие RBD с сыворотками реконвалесцентов COVID-19 и рецептором ACE2 клеток человека.

4. Оценить иммунный ответ на RBD у разных модельных животных.

5. Исследовать влияние адъювантов на иммунный ответ на RBD у модельных животных.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. В данном исследовании получен оригинальный интегративный плазмидный вектор pVEAL2-RBD, обеспечивающий геномную интеграцию и экспрессию последовательности RBD SARS-CoV-2 в клетках CHO-K1. Получен оригинальный продуцент CHO-K1-RBD, обеспечивающий стабильную секрецию RBD SARS-CoV-2 в культуральную среду, который позволяет получить до 100 мг белка с литра культуральной среды при роллерном культивировании.

В работе впервые комплексно охарактеризованы структурные, антигенные, иммуногенные и некоторые физико-химические свойства рекомбинантного RBD, полученного в клетках CHO-K1.

Впервые проведен сравнительный анализ моделей животных (мыши BALB/c, сирийские хомячки, хорьки и кролики) для оценки иммуногенности RBD SARS-CoV-2 и исследован феномен слабо выраженного гуморального иммунного ответа на RBD у сирийских хомячков. Разработан конъюгат RBD с полиглюкином, спермидином и дсРНК киллерного штамма Y 448 дрожжей *S. cerevisiae* в качестве адъюванта, который способен значительно усиливать специфический гуморальный и Т-клеточный иммунные ответы у мышей линии

BALB/c и потенциально может рассматриваться как вариант субъединичной вакцины против COVID-19.

Штамм CHO-K1-RBD депонирован в банк Коллекции культур клеток ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, на изобретение получен патент РФ № 2752858.

Практическая ценность работы состоит в получении клеточной линии CHO-K1-RBD – продуцента белка RBD, обладающего антигенными и иммуногенными свойствами, подобными природному домену SARS-CoV-2. Продуцент подходит для производства белка RBD, который может быть использован для создания отечественных ИФА тест-систем и вакцин на основе RBD.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с помощью общенаучных методов исследования и широкого спектра специальных методов, включая методы генетической инженерии, молекулярной биологии, иммунохимии, методы работы с культурами клеток.

Положения, выносимые на защиту:

1. Рекомбинантный штамм клеток CHO-K1-RBD с геномной интеграцией нуклеотидной последовательности, кодирующей RBD SARS-CoV-2 (308V-541F), обеспечивает синтез и секрецию гликозилированной формы RBD молекулярной массой ~33 кДа.

2. Двукратная иммунизация мышей линии BALB/c, кроликов породы Шиншилла и хорьков дозой 50 мкг RBD с гидроокисью алюминия приводит к индукции специфических, в том числе, и нейтрализующих антител.

3. Рекомбинантный RBD, конъюгированный с комплексом полиглокин-спермидин и дсРНК из дрожжей *S. cerevisiae* Y 448 (RBD-ПГС+дсРНК) значительно усиливает гуморальный и клеточный иммунные ответы на RBD у мышей линии BALB/c.

Степень достоверности и апробация результатов. Положения и выводы являются научно обоснованными. Полученные результаты являются достоверными и опираются на экспериментальные и литературные данные. Результаты диссертационной работы были представлены на международной конференции OpenBio (Кольцово, 2021 г.), международном онлайн-симпозиуме «Chronic viral infection and cancer, openings for vaccines» (онлайн, 2021 г.), Всероссийской конференции молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (VirToAll-2021), посвященной 55-летию со

дня основания НИИ гриппа им. А. А. Смородинцева (Санкт-Петербург, 2022 г.).

Результаты работы отражены в 14 публикациях в отечественных и зарубежных изданиях, из которых: 5 статей в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, 9 тезисов докладов на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов исследования, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка цитируемой литературы и приложений. Работа изложена на 122 страницах, включает 26 рисунков, 5 таблиц и 2 приложения. Список литературы включает 232 источника.

Личный вклад автора. Основная часть экспериментальной работы и анализ результатов выполнены лично автором или при его участии.

Исследование иммунного ответа у животных выполнено совместно с к.б.н. Старостиной Е.В. и Боргояковой М.Б. (ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Все работы с живым вирусом проводили сотрудники отдела «Коллекция микроорганизмов» ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Определение структуры RBD методом LC-MS/MS выполнено к.х.н. Фоминым А.А. (ООО «Биолабмикс»), спектры кругового дихроизма RBD получены к.ф.-м.н. Ломзовым А.А. (Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН). Данные малоуглового рентгеновского рассеяния получены коллективом исследователей под руководством д.б.н. Кичкайло А. С. (ФИЦ Красноярский научный центр СО РАН). Ионообменную и эксклюзионную хроматографию препаратов RBD, а также синтез конъюгатов RBD с полиглюкином, спермидином и дсРНК проводила к.б.н. Волосникова Е.А. (ИМБТ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. Обзор литературы включает 3 раздела и заключение. В первом разделе изложены общие сведения о новом коронавирусе SARS-CoV-2, его таксономическое положение, структура вириона и жизненный цикл. Также в первом разделе рассматриваются клинические проявления инфекции COVID-19, вызванной SARS-CoV-2, и характеристика текущей пандемии.

Во втором разделе RBD рассматривается как место уязвимости высокопатогенных для человека коронавирусов. В этом разделе описаны структура и свойства RBD MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 и особенности иммунного ответа на регион RBD при инфекциях, вызванных высокопатогенными коронавирусами.

Третий раздел литературного обзора посвящает текущие разработки средств противодействия COVID-19 на основе рекомбинантных вариантов белка RBD, включая средства диагностики, вакцины и противовирусные препараты различной природы.

Материалы и методы. Глава содержит описание материалов, использованных в работе, и методов молекулярной биологии и иммунологии и вирусологии (получение генно-инженерных конструкций, электрофорез белков и нуклеиновых кислот, ИФА, иммуноблоттинг, ELISpot, ICS, метод ингибирования цитопатического действия вируса *in vitro*), методов работы с животными и культурами клеток млекопитающих (трансфекция, клонирование и культивирование продуцентов), физико-химических методов анализа белков (хроматография, биослойная интерферометрия, круговой дихроизм, малоугловое рентгеновское рассеяние и масс-спектрометрия), методов статистической обработки результатов.

Результаты исследования и обсуждение результатов. Результаты исследования и обсуждение полученных результатов изложены в отдельных главах диссертации. Глава «Результаты исследования» включает краткое изложение всех полученных результатов, графики и рисунки. Глава «Обсуждение результатов» содержит подробное обсуждение полученных результатов.

Получение рекомбинантного RBD SARS-CoV-2 в клетках линии CHO-K1.

Для стабильной продукции RBD в клетках CHO-K1 получали генетическую конструкцию pVEAL2-RBD на основе интеграционного плазмидного вектора pVEAL, содержащего последовательности инвертированных повторов/прямых повторов (IR/DR) транспозона Sleeping Beauty (Патент РФ № 2749459). В конструкции pVEAL заменили фактор резистентности к антибиотику Zeocin на фактор резистентности к пурамицину для ускорения процесса селективного отбора трансформантов. Вектор получил название pVEAL2 и был использован для получения продуцентов RBD и других белков в данной работе.

Нуклеотидную последовательность гена S-белка SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1 (GB:MN908947) извлекали из базы данных и оптимизировали по кодонному составу для экспрессии в клетках китайского хомячка (*Cricetulus griseus*). Итоговую последовательность синтезировали в ООО «ДНК-синтез» (Москва). Фрагмент ДНК, кодирующий домен RBD S-белка (а.о. 308V–541F), амплифицировали в перекрывающейся ПЦП, одновременно вводя последовательности, кодирующие сигнальный пептид S-белка (MFVFLVLLPLVSSQC) и 10×his-метки на 5'- и 3'-концы соответственно, и затем встраивали в вектор pVEAL2 (рисунок 1).

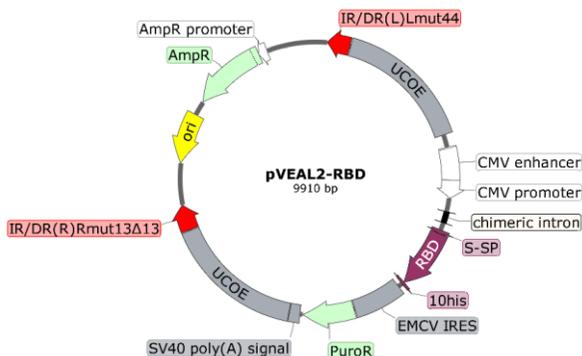


Рисунок 1. Карта рекомбинантной плазмиды pVEAL2-RBD: S-SP – сигнальный пептид S-белка, EMCV IRES – участок внутренней посадки рибосомы, PuroR – фактор устойчивости к пурамицину, UCOE – элементы, предотвращающие хромосомное «замалчивание» экспрессионной кассеты, IR/DR – сайты рекомбинации транспозона Sleeping Beauty.

Структуру плазмиды pVEAL2-RBD подтверждали с помощью секвенирования по методу Сэнгера.

На основе клеточной линии CHO-K1 с использованием данной плазмиды получили культуру клеток CHO-K1-RBD, которая обеспечивает секрецию RBD в культуральную среду (рисунок 2). Белок имеет молекулярную массу ~33 кДа при расчетной 27,8 кДа, что, вероятно, свидетельствует о гликозилировании полученного RBD.

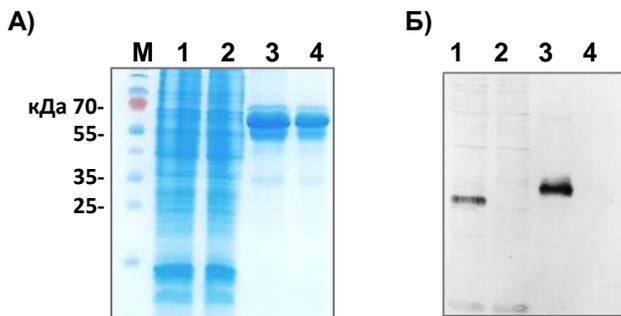


Рисунок 2. Разделение белков клеток и культуральной жидкости CHO-K1 и CHO-K1-RBD в 10% ДСН-ПААГ при окрашивании кумасси (А) и иммуноблоттинг (Б) указанных белков с антителами к His-метке: М – маркер молекулярной массы (PageRuller 10-180 kDa, Thermo Scientific), 1 и 2 – образцы лизатов клеток CHO-K1-RBD и CHO-K1 соответственно, 3 и 4 – образцы культуральной среды клеток CHO-K1-RBD и CHO-K1.

Затем из пула полученных клеток был проведен отбор наиболее продуктивных клонов продуцента методом предельного разведения и последующей оценки продуктивности индивидуальных клонов в ИФА. При роллерном культивировании отобранных клонов выход белка составил ~50-100 мг с литра культуральной среды.

Структура и физико-химические свойства рекомбинантного RBD. Очистку белка RBD из культуральной среды проводили с помощью аффинной хроматографии на сорбенте Ni-NTA и последующей ионообменной хроматографии на SP-сефарозе и Q-сефарозе. При анализе полученного препарата RBD с помощью электрофореза в ДСН-ПААГ в нередуцирующих условиях на электрофореграмме наблюдали мажорный бэнд с ожидаемой молекулярной массой ~33 кДа и минорные бэнды ~55 и ~90 кДа

(рисунок 3, А). При иммуноблоттинге белков с антителами к His-метке также обнаружили бэнды массой более 100 кДа (рисунок 3, Б).

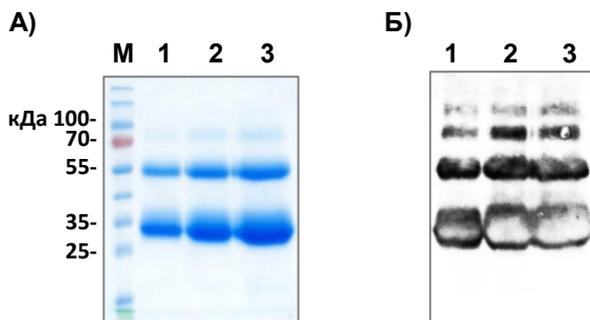


Рисунок 3. А. Анализ препарата RBD в 10% SDS-ПААГ в нередуцирующих условиях (А) и иммуноблоттинг с антителами к His-метке (Б): М – маркер молекулярной массы (PageRuller 10-180 kDa, Thermo Scientific), 1-3 – 10, 20 и 30 мкг RBD на дорожку.

Затем анализировали препарат RBD в редуцирующих условиях. Для разрыва дисульфидных связей между остатками цистеина образцы белка обрабатывали восстанавливающим агентом дитиотреитолом (DTT), а затем алкилирующим – 2-йодацетамидом. По данным денситометрического анализа электрофореграммы мажорный бэнд (~33 кДа) составил $91,3 \pm 1,2\%$ белка в редуцирующих условиях, притом в данных условиях обнаруживали только один минорный бэнд (~65 кДа) (рисунок 4, А). По результатам иммуноблоттинга с использованием антител к His-метке и сыворотки крови мыши, иммунизированной S-белком SARS-CoV-2, также наблюдали один минорный бэнд, составляющий не более 10% препарата RBD по данным денситометрического анализа (рисунок 4, Б-В).

После обработки препарата RBD N-гликозидазой PNGase и смесью N- и O-гликозидаз наблюдали сдвиг электрофоретической подвижности трех форм RBD, свидетельствующий о наличии N- и O-гликозилирования белка (рисунок 5).

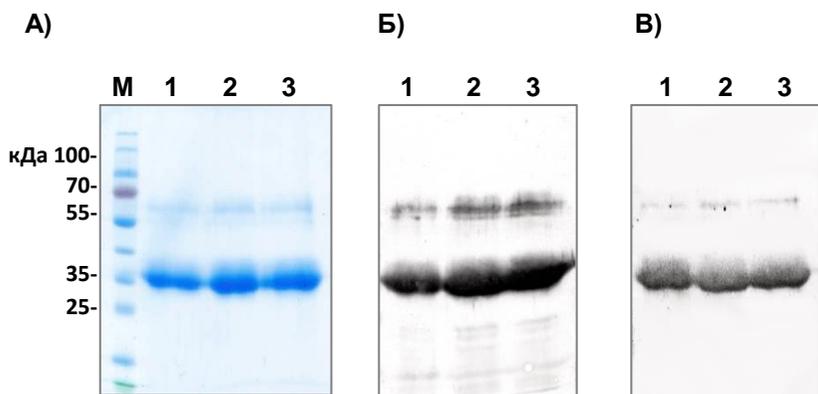


Рисунок 4. Анализ препарата RBD в 10% SDS-ПААГ в редуцирующих условиях (А), иммуноблоттинг с антителами к His-метке (Б) и гипериммунной сывороткой мыши (В): М – маркер молекулярной массы (PageRuller 10-180 kDa, Thermo Scientific). Нанесены: RBD после обработки DTT (1), RBD после обработки DTT и 2-йодацетамидом (2), RBD после денатурации в присутствии 8 М мочевины и DTT с последующей обработкой 2-йодацетамидом (3).

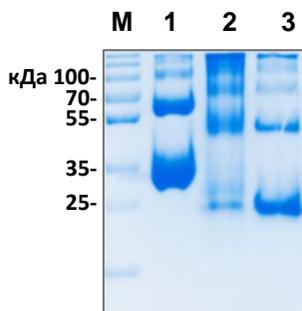
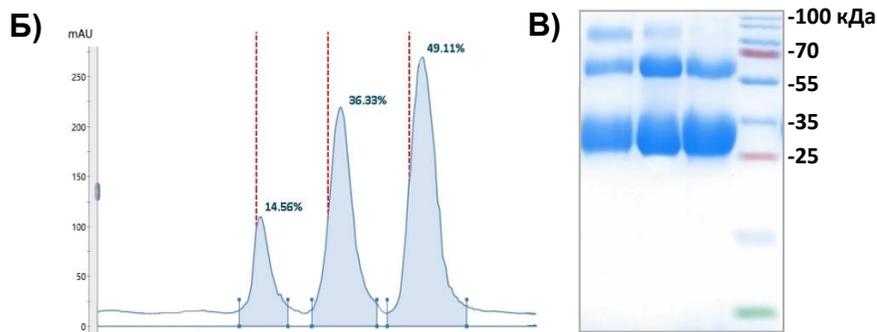
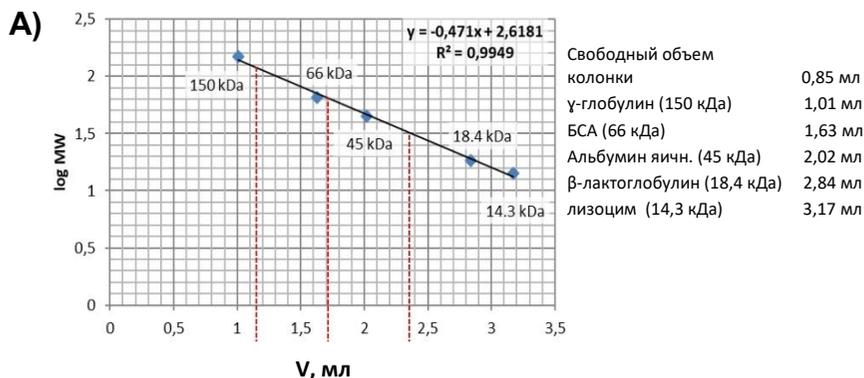


Рисунок 5. Анализ RBD в 6 % ДСН-ПААГ в нередуцирующих условиях после ферментативного дегликозилирования: 1 – исходный препарат RBD, 2 – RBD после обработки N-гликозидазой PNGase F, 3 – RBD после обработки коктейлем N- и O-гликозидаз (Protein Deglycosylation Mix II, New England Biolabs).

Нативный препарат RBD анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке с сефакилом S-200. Колонка с сорбентом была откалибрована белками с известными молекулярными массами: лизоцим (14,3 кДа), β -лактоглобулин (18,4 кДа), альбумин яичный (45 кДа), бычий сывороточный альбумин (66 кДа), γ -глобулин (150 кДа). На основании этих данных строили

калибровочную кривую для определения молекулярного веса искомого белка. Исследуемый белок элюировался в виде трех фракций с молекулярными массами $32,3 \pm 0,3$ кДа, $65,2 \pm 0,9$ кДа и $119,7 \pm 4,3$ кДа, которые приблизительно соответствуют мономерной, димерной и тримерной формам RBD (рисунок 6).



| | | | |
|---------------------|--------------|-------------|-------------|
| V элюата, мл | 1,15 | 1,71 | 2,36 |
| MW, кДа | 119,7 | 65,2 | 32,3 |

Рисунок 6. А-Б. Калибровочная кривая и хроматограмма гель-фильтрации препарата RBD на сефакириле S-200. **В.** Анализ собранных фракций в 15% SDS-ПААГ: М – маркер молекулярного веса (PageRuller 10-250 kDa, Thermo Scientific), 1-3 – фракции RBD, в том же порядке, что и пики хроматограммы.

Однако электрофорез собранных фракций вновь показал присутствие разных форм в каждой из фракций с преобладанием мономера (рисунок 6, Б). При повторной гель-фильтрации каждой из

трех собранных фракций на хроматограмме снова наблюдали три соответствующих пика. Таким образом, можно предположить, что формы RBD находятся в динамическом равновесии в растворе.

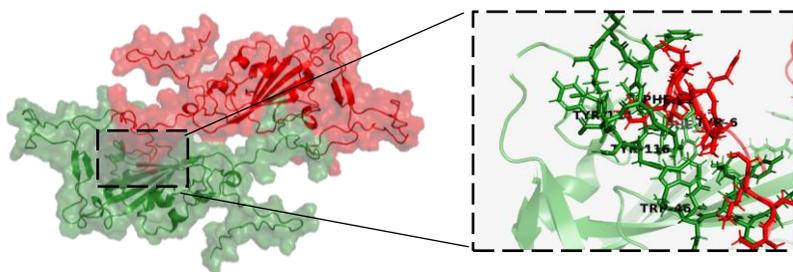
Ранее образование димеров и тримеров уже наблюдали для RBD MERS-CoV и SARS-CoV-2, полученных в эукариотических системах экспрессии (Dai et al., 2020; Lan et al., 2020; Camacho-Sandoval et al., 2021). Считается, что димеризацию RBD можно объяснить образованием межмолекулярных дисульфидных связей между свободными остатками Cys538, однако, упоминалось, что и в отсутствие Cys538 также образуются димеры RBD (Sinigubova et al., 2021). Вероятно, мультимеризация RBD может происходить и за счет нековалентных взаимодействий или за счет формирования временных солевых мостиков между аминокислотными остатками, а также между аминокислотными остатками и гликанами молекул RBD, подобно взаимодействию RBD разных цепей в составе коронавирусного шипа (Dokainish et al., 2022).

С помощью программы AlphaFold v2.1.0 были предсказаны вероятные модели димеров и тримеров, полученного RBD (рисунок 7) (Jumper et al., 2021). Согласно данным моделирования образование димеров и тримеров в первую очередь может быть обусловлено гидрофобными и стекинг взаимодействиями, а также ионными взаимодействиями, а не дисульфидными связями. Остатки ароматических аминокислот Phe, Tyr, Trp разных цепей могут образовывать гидрофобное ядро димера, притом, мотивы RBM остаются экспонированными наружу и сохраняют топологию вторичных структур. Примечательно, что в интерфейс взаимодействия двух молекул RBD входят преимущественно первые 13 N-концевых аминокислотных остатков обеих молекул. Многие исследователи получали фрагменты RBD, лишённые этого участка, что, возможно, исключило образование мультимерных форм RBD. Предсказанные модели тримера RBD (рисунок 7, Б) показывают похожий механизм формирования тримеров.

По-видимому, фрагмент RBD (308V-541F), полученный в клетках CHO-K1, потенциально может образовывать межмолекулярные связи в растворе и приводить к образованию некоторого количества мультимеров. При этом часть димеров окончательно не разрушается при воздействии восстанавливающих и алкилирующих агентов (ДТТ и 2-йодацетамида). Вероятно, в данном случае образование димеров обусловлено нековалентными взаимодействиями.

Методом LC-MS/MS (жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией) было установлено, что полученный RBD состоит из 244 а.о. соответствующих расчетной последовательности (за исключением трех неидентифицированных а.о.) (рисунок 8).

А)



Б)

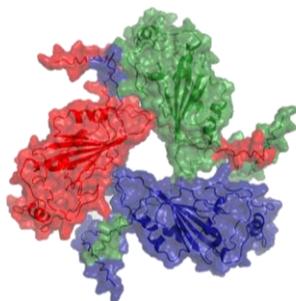


Рисунок 7. Структура димера (А) и тримера (Б) RBD (308V-542N), предсказанная AlphaFold v2.1.0 (Jumper et al., 2021).

Поскольку в процессе получения гликопротеинов наблюдают неоднородность гликанов (из-за отсутствия матричного управления процессом гликозилирования) мы предприняли попытку обнаружить вероятные сайты гликозилирования и гликозидные модификации

RBD с помощью LC-MS/MS. Было установлено, что как минимум 2 из 4 сайтов гликозилирования (T16, S18), фигурирующих в литературе, присутствуют в полученном RBD и имеют гликозидные модификации, согласующиеся с литературными данными (Gstöttner et al., 2021).



Рисунок 8. Результирующее покрытие RBD идентифицированными пептидами – продуктами гидролиза рекомбинантного RBD трипсином и химо трипсином: черным шрифтом обозначена расчетная аминокислотная последовательность, красным шрифтом – идентифицированные а.о. Голубым цветом выделены потенциальные О-гликозилированные а.о., * - неидентифицированные а.о.

Для исследования вторичной структуры RBD использовали спектроскопию кругового дихроизма (КД) в дальней УФ-области. Спектры КД RBD в буфере ФСБ (рН 7,4) при комнатной температуре имеют близкие характеристики к спектрам КД, полученным для других рекомбинантных RBD с максимумами поглощения на длинах волн (λ) 190 и 230 нм из-за ароматических а.о. и минимумом в районе 208 нм (He et al., 2021). Согласно данным КД вторичная структура RBD содержит антипараллельные β -складчатые структуры (45,8), α -спирали (15,9%) и повороты (7,2%) (рисунок 9). В целом, аналогичное распределение вторичных структур характерно и для вариантов RBD (фрагмент 319R-541F S-белка), полученных в клетках человеческой линии HEK293, клетках насекомых и бактерий (Maffei et al., 2021). Небольшую разницу в содержании вторичных структур можно объяснить различием первичной структуры молекул RBD, а также сниженным отношением сигнал/шум, наблюдаемым ниже 210 нм.

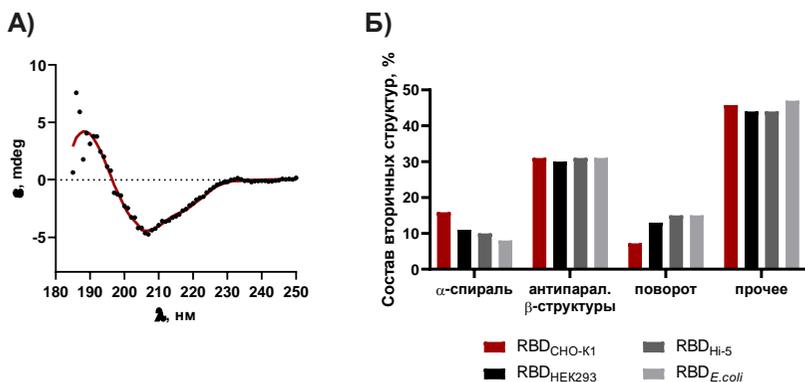


Рисунок 9. Анализ вторичной структуры рекомбинантного RBD методом кругового дихроизма (КД). **А.** Спектры КД RBD в ФСБ (рН 7,4) при комнатной температуре. **Б.** Состав вторичных структур RBD, полученного в клетках CHO-K1, а также вариантов RBD, полученных с помощью человеческой клеточной линии HEK293, клеток насекомых HI-5 и бактерий *E.coli* BL21 по данным статьи Maffei с соавторами (Maffei et al., 2021).

С помощью КД исследовали структурные изменения RBD при температурной денатурации в диапазоне 40-90°C (рисунок 9). При температуре образца 40-45°C на спектрах КД наблюдали увеличение вклада β-структур (провал на 208 нм), которые, как известно, часто коррелируют с агрегацией белка. При повышении температуры раствора белка наблюдали заметное увеличение отрицательного провала на $\lambda=208$ нм и положительного при $\lambda=230$ нм.

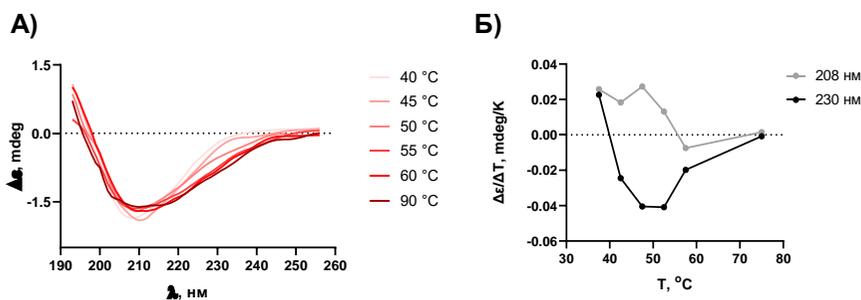


Рисунок 10. **А.** Температурная серия спектров КД RBD, полученного в клетках CHO-K1. **Б.** Изменение эллиптичности на длинах волн 208 и 230 нм при температурной денатурации RBD.

Температура плавления (T_m) RBD составила $47,82 \pm 0,17^\circ\text{C}$. В той же статье Maffei с соавторами T_m по результатам КД составила $46,65 \pm 0,2^\circ\text{C}$, $50,15 \pm 0,1^\circ\text{C}$ и $50,65 \pm 0,4^\circ\text{C}$ для RBD из *E.coli*, HEK293 и HI-5 соответственно (Maffei et al., 2021).

Анализ третичной структуры RBD методом малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) показал, что RBD имеет складчатую структуру, максимальный диаметр равный $\sim 8,3$ нм, радиус вращения $\sim 2,48$ нм и молекулярную массу в пределах 20,8-33,5 кДа. Биологический банк данных МУРР (SASBDB) содержит данные о RBD SARS-CoV-2 (SASDJG4), со следующими параметрами: максимальный диаметр – 13,1 нм, радиус вращения – 3,1 нм и молекулярная масса 33 кДа. Однако, этот вариант RBD был получен в клетках HEK293-F и представлял собой фрагмент R319-G566 S-белка с сайтом протеолиза сортазы и $6 \times \text{his}$ -меткой на С-конце (Custódio et al., 2020).

С помощью МУРР также было показано специфическое взаимодействие полученного RBD с РНК-аптамером Apt31, который был рассчитан с помощью метода моделирования молекулярной динамики на основе геометрических параметров RBD SARS-CoV-2 из базы данных PDB (6MOJ).

Взаимодействие RBD с рекомбинантным рецептором ACE2 анализировали в режиме реального времени с помощью метода биослойной интерферометрии. RBD связывался с ACE2 с наномолярным сродством ($KD = 58.2 \pm 1.3$ нМ). Ранее сообщалось, что RBD, полученный в человеческих клетках HEK293 или клетках насекомых имеет близкие значения KD, в то время как RBD, полученный в *E.coli*, отличается более низкой аффинностью (He et al., 2021; Maffei et al., 2021; Merkuleva et al., 2022). По-видимому, для корректного фолдинга мотива связывания RBD с ACE2 необходимы корректное гликозилирование и формирование дисульфидных связей, которые не могут обеспечить прокариотические системы экспрессии.

Антигенные свойства рекомбинантного RBD. В ИФА оценивали взаимодействие RBD, полученного в клетках CHO-K1, с сыворотками реконвалесцентов COVID-19 (рисунок 11). В качестве положительного контроля использовали препарат рекомбинантного тримера S-белка SARS-CoV-2, полученного в отделе биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Merkuleva et al., 2022).

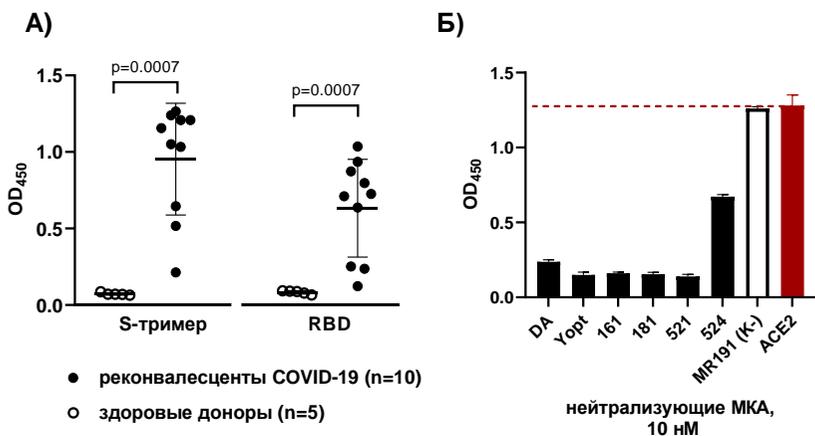


Рисунок 11. А. Взаимодействие IgG сывороток крови реконвалесцентов COVID-19 и здоровых доноров с RBD и тримером S-белка. Статистическую значимость рассчитывали с использованием U критерия Манна-Уитни. **Б.** Взаимодействие RBD с нейтрализующими моноклональными антителами в конкурентном ИФА с использованием ACE2.

По результатам ИФА сывороточные IgG реконвалесцентов достоверно связывались с RBD ($p=0.0007$) и S-тримером ($p=0.0007$) в отличие от IgG здоровых доноров (рисунок 11, А). Это подтверждает, что домен RBD, даже при вычлениении его из структуры S-белка сохраняет антигенные свойства.

Антигенные свойства полученного RBD также исследовали с помощью конкурентного ИФА с использованием рекомбинантного человеческого рецептора ACE2 и RBD-специфичных нейтрализующих моноклональных антител DA, Y, 161, 181, 521 и 524, которые ранее были получены в отделе биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на основе опубликованных нуклеотидных последовательностей (Xiang et al., 2020; Liu et al., 2021; Rapp et al., 2021; Liu et al., 2020). В качестве отрицательного контроля использовали моноклональное антитело MR191, нейтрализующее Марбург марбургвирус. ИФА подтвердил, что антитела нейтрализующие антитела связываются с RBD, полученным в клетках CHO-K1, и тем самым блокируют его

взаимодействие с рекомбинантным рецептором ACE2 (рисунок 11, Б).

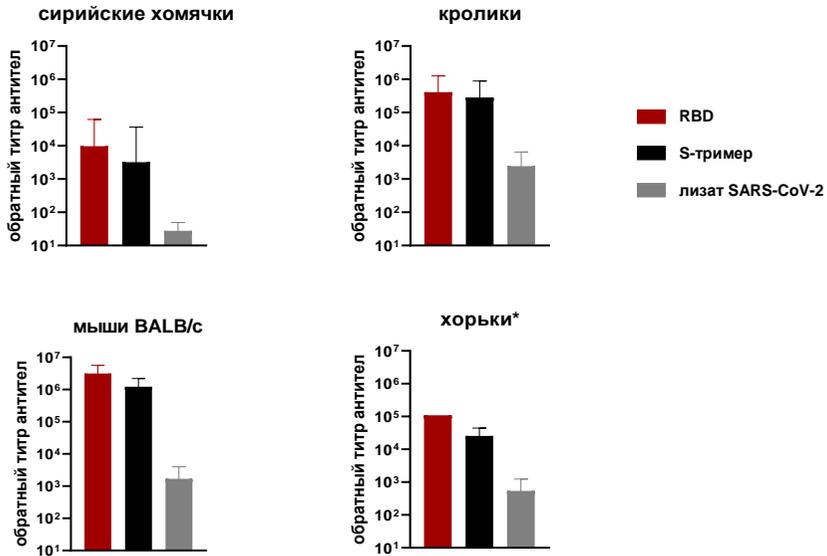
Таким образом RBD, полученный в клетках CHO-K1, воспроизводит антигенные детерминанты нативного вирусного RBD в составе S-белка.

Иммуногенные свойства рекомбинантного RBD.

Иммуногенность рекомбинантного RBD исследовали на четырех моделях мелких лабораторных животных: сирийских хомячках, мышах линии BALB/c, хорьках и кроликах породы Шиншилла. Животных иммунизировали дважды с двухнедельным интервалом дозой 50 мкг RBD на животное в комбинации с гидроокисью алюминия. Через две недели после бустерной иммунизации сыворотки крови животных исследовали на наличие специфических антител в ИФА с использованием тримеров S-белка, RBD и лизата вируса SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 (рисунок 12, А). Титр вируснейтрализующих антител определяли в анализе ингибирования цитопатического действия (ЦПД) коронавируса штамма nCoV/Victoria/1/2020 на культуре клеток Vero *in vitro* (рисунок 12, Б). По результатам анализов установлено, что только у сирийских хомячков развивается относительно слабый гуморальный иммунный ответ на RBD. Среднегеометрический титр (GMT) RBD-специфических IgG в сыворотке хомячков составил $0,97 \times 10^4$, мыши, кролики и хорьки, напротив, имели сравнительно высокие титры специфических антител (GMT = $2,9 \times 10^6$, $0,4 \times 10^6$, и $0,1 \times 10^6$ соответственно). Сероконверсия нейтрализующих антител у хомячков составила 30% (диапазон титров: 10–40) по сравнению со 100% сероконверсией у других видов животных: GMT = 640 (диапазон: 160–2560) у мышей, GMT = 1016 (диапазон: 320–40) у кроликов и GMT = 640 (диапазон: 160–1280) у хорьков.

В отдельном эксперименте иммунизация дозой 250 или 50 мкг RBD на животное вызывала специфические ответы IgG антител у хомячков, тогда как при иммунизации дозой 10 мкг белка специфические антитела не выявлялись (рисунок 13). Увеличение количества иммуногена в данном эксперименте не привело к 100% сероконверсии нейтрализующих антител у животных.

А)



Б)

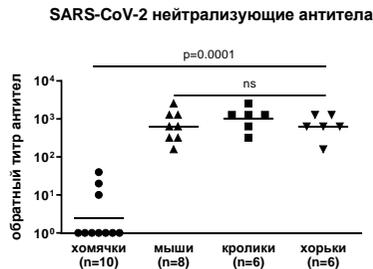
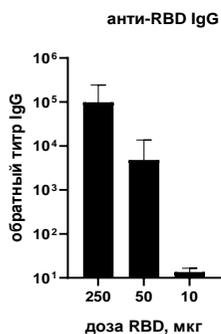


Рисунок 12. А. Титры специфических антител после двукратной иммунизации 50 мкг RBD с $Al(OH)_3$ в ИФА (среднее геометрическое \pm SD). За титр принимали разведение сыворотки, при котором OD450 имело значение больше, чем среднее значение контрольной группы + 3 SD. **Б.** Титры вируснейтрализующих антител в реакции ингибирования ЦПД вируса (100 TCID₅₀ Victoria/1/2020 SARS-CoV-2). Горизонтальные линии представляют средние геометрические значения. Статистическую значимость рассчитывали с использованием критерия Краскела-Уоллиса (ns, недостоверно ($p > 0,05$)). Отрицательные образцы (титр $< 1/10$) принимали за 1.

*титры IgA, IgG, IgM

А)



Б)

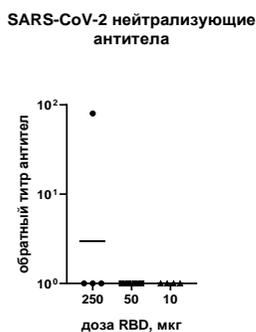


Рисунок 13. Титры RBD-специфических IgG (А) и нейтрализующих антител (Б) у сирийских хомячков (n=4) после двукратной иммунизации (среднее геометрическое \pm SD). Отрицательные образцы (титр $< 1/10$) принимали за 1.

В научной литературе опубликовано несколько статей, подтверждающих полученные нами данные. Так сообщалось, что хомячки имели слабо выраженный гуморальный иммунный ответ на иммунизацию тримерами RBD и вирусоподобными частицами, содержащими RBD (Wu et al., 2020; Dalvie et al., 2021). Так же сообщали об отсутствии нейтрализующих антител у сирийских хомячков при иммунизации цельновирусными вакцинами с гидроокисью алюминия или формальдегидом, или при иммунизации слитым белком RBD/N-белок (Muñoz-Fontela et al., 2022; Castro et al., 2021).

За исключением упомянутых ранее публикаций, данные об экспериментах по исследованию вакцин на основе RBD на хомячках не встречаются, притом иммуногенность различных рекомбинантных вариантов RBD неоднократно была показана на широком спектре других животных, включая приматов, мышей, кроликов, хорьков и лошадей (J et al., 2020; Pan et al., 2020; Kim et al., 2021; Malladi et al., 2021; Sun et al., 2021).

По завершении эксперимента по иммунизации разных видов животных продолжили наблюдение за динамикой гуморального иммунного ответа на RBD у кроликов, поскольку из всех использованных животных кролики довольно дружелюбны и от них легче получать образцы крови в течение длительного времени.

Среднегеометрический титр RBD-специфических IgG в сыворотках крови кроликов достиг максимума ($2,8 \times 10^5$) после второй иммунизации (рисунок 14) и сохранялся как минимум в течение 4 месяцев после иммунизации (GMT = $0,1 \times 10^5$ на 16-й неделе).

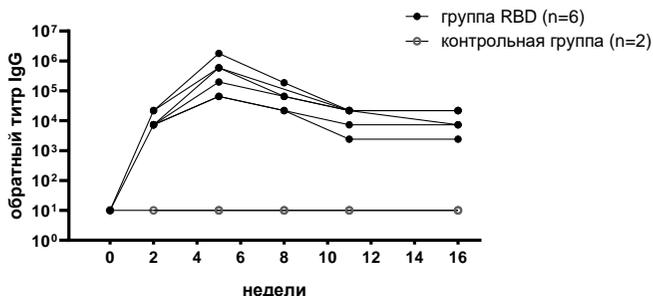


Рисунок 14. Индивидуальные графики динамики титров специфических IgG в сыворотке крови кроликов, иммунизированных RBD.

Таким образом, кролики могут быть подходящей моделью для долгосрочного наблюдения за гуморальным иммунным ответом на антигены SARS-CoV-2.

Влияние адъювантов на иммуногенные свойства RBD. Как и в случае любых субъединичных вакцин в состав вакцин на основе RBD вводят адъюванты для усиления индукции иммунного ответа (Valdes-Balbin et al., 2021; Kleanthous et al., 2021). Поэтому следующим этапом работы было исследование влияния адъювантов различной природы на усиление иммунного ответа на RBD. Для этого готовили субстанции RBD с гидроокисью алюминия – минеральным адъювантом, разрешенным для человека, а также RBD в комбинации с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ) – классическим адъювантом для ветеринарных вакцин, который представляет собой эмульсию «вода в масле» (Chang et al., 1998). Учитывая, что мономерные форматы RBD даже в присутствии адъювантов не способны вызвать выраженный Т-клеточный иммунный ответ, мы предложили оригинальную стратегию, объединяющую природный адъювант и мультимеризацию антигенов. Для этого синтезировали конъюгат RBD с полиглюкином-спермидином (ПГС) и двуспиральной РНК (дсРНК) из киллерного штамма дрожжей *S.*

cerevisiae Y 448 в качестве адьюванта. Полиглюкин обеспечивает пролонгированное высвобождение действующего вещества, а также является иммуномодулятором гуморального и клеточного иммунных ответов, а дсРНК, выделенная из киллерного штамма *S. cerevisiae*, является индуктором врожденного иммунного ответа (Knudsen et al., 2016; Cordeiro, Alonso and de la Fuente, 2015; Bateneva et al., 2020). К полиглюкину ковалентно присоединяли молекулы RBD и спермидин для формирования положительного заряда. Затем к комплексу добавляли дсРНК, которая, вероятно, образовывала ядро частицы (Волосникова Е.А., 2011). Формирование частиц RBD-ПГС+дсРНК подтверждали с помощью анализа сдвига электрофоретической подвижности белка и РНК. Методом электронной микроскопии было показано, что полученные комплексы имеют округлую форму размером 20-30 нм.

Мышей линии BALB/c иммунизировали дважды с двухнедельным интервалом RBD-ПГС+дсРНК, RBD-ПГС, RBD с $Al(OH)_3$ или RBD с НАФ. Контрольные группы получали инъекции белка RBD без каких-либо адьювантов или инъекции ФСБ. По результатам эксперимента не обнаружено статистически достоверной разницы между гуморальным иммунным ответом в группах мышей, иммунизированных RBD+НАФ, RBD+ $Al(OH)_3$ и RBD-ПГС+дсРНК, в то время как группа мышей, получавших RBD без адьювантов, имела GMT нейтрализующих антител и специфических IgG на два порядка ниже (рисунок 15, А).

Для исследования Т-клеточного иммунного ответа получали спленоциты мышей, иммунизированных RBD-ПГС+дсРНК и RBD без адьювантов. Анализ внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) на антиген-специфическую секрецию $IFN-\gamma$ CD4+ и CD8+ популяциями Т-клеток и ELISpot анализ на специфическую секрецию $IFN-\gamma$ в спленоцитах иммунизированных мышей показали, что конъюгат RBD-ПГС+дсРНК усиливает специфический Т-клеточный иммунный ответ у мышей линии BALB/c (рисунок 15, Б). Притом клеточный ответ смещен в сторону CD4+ Т-лимфоцитов, которые усиливают элиминацию вируса нейтрализующими антителами *in vivo*.

Таким образом, RBD, полученный в клетках CHO-K1, как и ожидалось, нуждается в адьювантах для индукции высоких титров антител, а предложенный в данной работе конъюгат RBD-

ПГС+дсРНК способен усилить не только В- но и Т-клеточный специфический иммунный ответ.

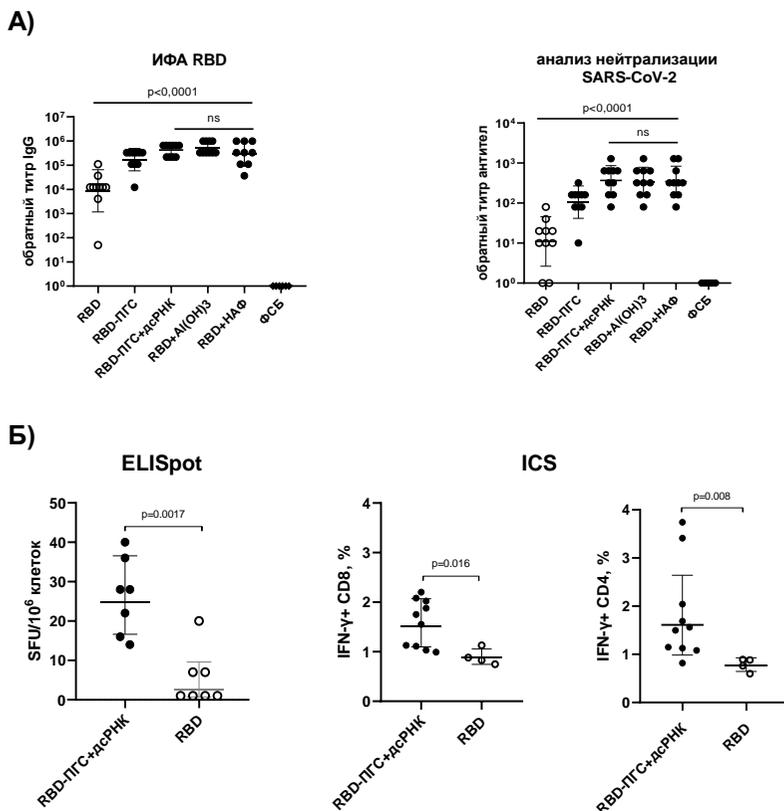


Рисунок 15. А. Гуморальный иммунный ответ на конъюгат RBD-ПГС+дсРНК у мышей BALB/c: титры RBD-специфических IgG в ИФА и нейтрализующих антител (100 TCID₅₀ SARS-CoV-2/Victoria/1/2020). Б. Т-клеточный иммунный ответ на конъюгат RBD-ПГС+дсРНК у мышей BALB/c: количество спленоцитов, высвобождающих IFN- γ в ответ на специфическую стимуляцию пептидами из белка RBD по результатам ELISpot, процент SARS-CoV-2-специфических IFN- γ -продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток по результатам анализа ISC. Данные представлены как средние геометрические значения \pm SD. Статистическую значимость различий ($p < 0.05$) определяли с помощью U критерия Манна-Уитни и критерия Краскела-Уоллиса (для >2 групп).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последние годы были детально изучены все белки нового коронавируса и исследован их потенциал для создания средств противодействия COVID-19. Рекомбинантные варианты RBD, а также фрагменты S-белка, содержащие RBD, показали точность в диагностике коронавирусной инфекции и эффективность в профилактике тяжелого течения заболевания в составе вакцин. Однако для совершенствования и поиска новых средств терапии и профилактики на основе RBD необходимо выбрать наиболее подходящие системы экспрессии, которые позволят получать белок, сохраняющий природную структуру и биологические свойства.

Около 70% всех терапевтических препаратов, одобренных для клинического применения, получают с помощью клеточной линии яичника китайского хомячка CHO и ее производных (Jayapal et al., 2007; Kim, Kim and Lee, 2012).

В данной работе были исследованы структура и свойства рекомбинантного RBD S-белка SARS-CoV-2, полученного в клетках линии CHO-K1. Результаты работы подтвердили, что структура и свойства RBD, секретируемого клетками CHO-K1, аналогичны его природному варианту в составе коронавирусного S-белка.

Также наше исследование выявило неодинаковые иммунные реакции на RBD SARS-CoV-2 у разных моделей мелких модельных животных. Неожиданно, сирийские хомячки – одна из популярных моделей для изучения SARS-CoV-2 – оказались наименее восприимчивы к иммунизации RBD, по сравнению с мышами, хорьками и кроликами. Таким образом, хомячков следует использовать с осторожностью при оценке защитной эффективности вакцин на основе RBD, и, возможно, их следует заменить более подходящей моделью, например хорьками.

На модели кроликов мы показали, что RBD вызывает устойчивый специфический гуморальный иммунный ответ. Однако, отметим, что пригодность модели кролика для оценки защитных свойств вакцин требует дальнейшего изучения. Поскольку каждая животная модель имеет свои преимущества и ограничения, следует выбирать оптимальную модель с учетом целей конкретного исследования, и вероятно, эксперименты с использованием двух или даже трех

животных моделей часто могут быть необходимы, чтобы сделать окончательные выводы.

Исследование иммуногенных свойств RBD, подтвердило тезис о необходимости адъювантов для создания эффективных субъединичных вакцин. Удачной оказалась предложенная нами стратегия объединения природного адъюванта дсРНК и стратегии мультимеризации антигенов. Конъюгат RBD с комплексом полиглюкин-спермидин и дсРНК, выделенной из дрожжей *S. cerevisiae* Y 448, стимулировал выработку специфического В- и Т-клеточного иммунных ответов у мышей линии BALB/c.

Рекомбинантный RBD SARS-CoV-2, полученный в данной работе, был успешно опробован как мишень для поиска РНК-аптамеров и моноклональных антител, специфичных к SARS-CoV-2, а также для изучения особенностей иммунного ответа у инфицированных и разработки вакцин (Borgoyakova et al., 2022; Kolosova et al., 2022; Mironov et al., 2022; Арипов и др., 2022).

Подводя итог работы, можно утверждать, что RBD, полученный в клетках CHO-K1, может быть использован для любых исследовательских и практических приложений, включая поиск средств терапии и профилактики или создание тест-систем и вакцин против COVID-19.

Выводы:

1. Сконструирован интегративный плазмидный вектор pVEAL2-RBD и с использованием данного вектора на основе клеточной линии CHO-K1 получен штамм CHO-K1-RBD, обеспечивающий синтез и секрецию гликозилированной формы RBD SARS-CoV-2 молекулярной массой ~33 кДа в культуральную среду.

2. Вторичная структура RBD, полученного в клетках CHO-K1, представлена антипараллельными β-складчатыми структурами (31,1%), α-спиралями (15,9%) и поворотами (7,2%). Молекула RBD имеет максимальный диаметр равный 8,3 нм и радиус вращения равный 2,48 нм. Температура плавления RBD составляет $47,82 \pm 0,17^\circ\text{C}$.

3. RBD, полученный в клетках CHO-K1, специфически взаимодействует с человеческим рецептором ACE2 ($KD = 58.2 \pm 1.3$ нМ), сывороточными IgG реконвалесцентов COVID-19 и

нейтрализующими моноклональными антителами DA, Y, 161, 181, 521 и 524.

4. Двукратная иммунизация мышей линии BALB/c, кроликов породы Шиншилла и хорьков дозой 50 мкг RBD с гидроокисью алюминия обеспечивает индукцию специфического гуморального иммунного ответа у животных. Иммунизация сирийских хомячков дозами 50 и 250 мкг RBD вызывает слабый ответ как специфических IgG, так и нейтрализующих антител.

5. Гидроокись алюминия, неполный адъювант Фрейнда, а также конъюгат RBD с комплексом полиглобулин-спермидин и дсРНК из *S. cerevisiae* Y 448 в качестве адъюванта (RBD-ПГС+дсРНК) усиливают гуморальный иммунный ответ на RBD у мышей линии BALB/c. Статистически значимых различий между этими группами не выявлено. Установлено, что конъюгат RBD-ПГС+дсРНК также обеспечивает выработку RBD-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов у животных.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Статьи в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК

1. Comparative Immunogenicity of the Recombinant Receptor-Binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems / **I.A. Merkuleva**, D. N. Shcherbakov, M. B. Borgoyakova [et al.] // *Vaccines*. – 2022. – V. 10. – № 1. – P. 96.

2. Are Hamsters a Suitable Model for Evaluating the Immunogenicity of RBD-Based Anti-COVID-19 Subunit Vaccines? / **I.A. Merkuleva**, D. N. Shcherbakov, M. B. Borgoyakova [et al.] // *Viruses*. – 2022. – V. 14. – № 5. – P. e1060.

3. Structure- and Interaction-Based Design of Anti-SARS-CoV-2 Aptamers / V. Mironov, I. A. Shchugoreva, **I.A. Merkuleva** [et al.] // *Chemistry*. – 2022. – V. 28. – № 12. – P. e202104481.

4. Антитела к рецептор-связывающему домену спайкового белка SARS-COV-2: связь с возрастом, пневмонией, длительностью периода после COVID-19 / Е. А. Колосова, О. Н. Шапрова, **Ю.А. Меркульева** [и др.] // *Журнал инфектологии*. – 2022. – Т. 14. – № 1. – С. 69-77.

5. Antibodies to the Spike Protein Receptor-Binding Domain of SARS-CoV-2 at 4–13 Months after COVID-19 / Е. А. Kolosova, O. N. Shaprova, **Iu.A. Merkuleva** [et al.] // *Jornal of Clinical Medicine*. – 2022. – V. 11. – № 14. – P. 4053.

Патент

Патент N 2752858 Российская Федерация, МПК C12N15/74, C07K14/00, A61K39/215, A61P31/14, C07K16/10. Интегративный плазмидный вектор pVEAL2-S-RBD, обеспечивающий экспрессию и секрецию рекомбинантного рецепторсвязывающего домена (RBD) коронавируса SARS-CoV-2 в клетках млекопитающих, рекомбинантный штамм клеточной линии CHO-K1-RBD и рекомбинантный белок RBD SARS-CoV-2, продуцируемый указанным штаммом клеточной линии CHO-K1-RBD : N 2021102630 : заявл. 02.04.2021 : опубл. 11.08.2021 / **Меркульева Ю.А.**, Щербаков Д.Н., Беленькая С.В. [и др.]. – 23 с.