

ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР
ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Меркульева Юлия Александровна

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

1.5.3 – Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук
Щербаков Дмитрий Николаевич

Кольцово – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Общие сведения о коронавирусе SARS-CoV-2.....	12
1.1.1. Семейство <i>Coronaviridae</i> : характеристика и классификация	12
1.1.2. Структура и жизненный цикл SARS-CoV-2	14
1.1.3. Биологическая, клиническая и эпидемиологическая характеристика коронавирусной инфекции COVID-19	19
1.2. Рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка как место уязвимости высокопатогенных для человека коронавирусов.....	22
1.2.1. Структура, свойства и функции RBD MERS-CoV, SARS-CoV и SARS- CoV-2	22
1.2.2. Особенности иммунного ответа на RBD у инфицированных лиц	26
1.3. Роль RBD в разработке средств противодействия COVID-19	29
1.3.1. Методы специфической лабораторной диагностики COVID-19 на основе RBD SARS-CoV-2.....	29
1.3.2. Молекулярные аспекты использования RBD для создания вакцин	31
1.3.3. RBD как мишень для разработки терапевтических препаратов.....	34
1.4. Заключение	36
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	39
2.1. Материалы	39
2.1.1. Олигонуклеотиды.....	39
2.1.2. Синтетические пептиды.....	39
2.1.3. Моноклональные антитела, нейтрализующие SARS-CoV-2.....	40
2.1.4. Коммерческие наборы, ферменты и реактивы	41
2.1.5. Клеточные линии, штаммы бактерий и вирусов.....	43
2.1.6. Питательные среды.....	43
2.1.7. Растворы и буферы.....	44
2.1.8. Сыворотки реконвалесцентов COVID-19.....	45

2.1.9. Лабораторные животные.....	45
2.1.10. Программное обеспечение	46
2.2. Методы.....	46
2.2.1. Дизайн и конструирование плазмидных векторов	46
2.2.2. Трансфекция клеток CHO-K1	48
2.2.3. Отбор высокопродуктивных клонов CHO-K1-RBD.....	48
2.2.4. Роллерное культивирование культур продуцентов	49
2.2.5. Хроматографическая очистка рекомбинантных белков.....	50
2.2.6. Эксклюзионная хроматография белков.....	50
2.2.7. Электрофорез и иммуноблоттинг	51
2.2.8. Ферментативное дегликозилирование белков.....	52
2.2.9. Спектроскопия кругового дихроизма	52
2.2.10. Жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией. 53	
2.2.11. Малоугловое рентгеновское рассеяние.....	54
2.2.12. Биослойная интерферометрия	54
2.2.13. Синтез конъюгатов RBD с полиглобулином, спермидином и dsРНК.. 55	
2.2.14. Иммунизация животных	55
2.2.15. Твердофазный иммуноферментный анализ.....	56
2.2.16. Анализ ингибирования цитопатического действия вируса	57
2.2.17. Анализ ELISpot.....	58
2.2.18. Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS).....	59
2.2.19. Статистическая обработка результатов	59
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	60
3.1. Конструирование плазмидного вектора pVEAL2-RBD для экспрессии RBD S-белка SARS-CoV-2 в клетках млекопитающих.....	60
3.2. Разработка штамма CHO-K1-RBD – продуцента RBD SARS-CoV-2.....	61
3.3. Очистка и характеристика препарата рекомбинантного RBD, полученного в клетках CHO-K1	62
3.4. Первичная структура рекомбинантного RBD.....	65
3.5. Вторичная и третичная структуры рекомбинантного RBD.....	67

3.6. Взаимодействие RBD с клеточным рецептором ACE2.....	69
3.7. Взаимодействие RBD с сыворотками реконвалесцентов COVID-19 и нейтрализующими моноклональными антителами.....	70
3.8. Гуморальный иммунный ответ на RBD у сирийских хомячков, мышей BALB/c, кроликов и хорьков.....	71
3.9. Динамика гуморального иммунного ответа на RBD у кроликов.....	73
3.10. Влияние адъювантов на иммунный ответ на RBD у мышей линии BALB/c	74
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	78
4.1. Получение рекомбинантного RBD SARS-CoV-2 в клетках CHO-K1.....	78
4.2. Структура и физико-химические свойства рекомбинантного RBD.....	79
4.3. Антигенные свойства рекомбинантного RBD.....	85
4.4. Иммуногенные свойства рекомбинантного RBD.....	85
4.5 Влияние адъювантов на иммунный ответ на RBD у мышей линии BALB/c	89
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	92
ВЫВОДЫ.....	94
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	95
Приложение 1.....	120
Приложение 2.....	121

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

А.о. – аминокислотный остаток;

АПФ2, АСЕ2 – ангиотензин-превращающий фермент 2;

БВРС – ближневосточный респираторный синдром;

БОЕ – бляшкообразующие единицы;

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ВПЧ – вирусоподобные частицы;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

SDS – додецилсульфат натрия;

ДТТ – дитиотриетол;

дсРНК – двуспиральная рибонуклеиновая кислота;

дНТФ – дезоксинуклеозидтрифосфаты;

ИФА – твердофазный иммуноферментный анализ

КД – круговой дихроизм;

МКА – моноклональные антитела;

МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние;

ОРТ – открытая рамка трансляции;

ОР-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией;

оцРНК – одноцепочечная рибонуклеиновая кислота;

П.н. – пары нуклеотидов;

ПААГ – полиакриламидный гель;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ТОРС – тяжелый острый респираторный синдром;

УФ – ультрафиолет;

ФСБ – фосфатно-солевой буфер;

ЦПД – цитопатическое действие;

ЭПР – эндоплазматический ретикулум;

ADE – antibody-dependent enhancement / антитело-зависимое усиление инфекции;

FBS – fetal bovine serum / фетальная бычья сыворотка;

GMT – geometric mean titer / среднегеометрический титр;

ICS – intracellular cytokine staining / внутриклеточное окрашивание цитокинов;

ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses / Международный комитет по таксономии вирусов;

Ig – иммуноглобулины;

KD – равновесная константа диссоциации;

PGS – комплекс полиглюкин-спермидин;

RBD – рецептор-связывающий домен;

RBM – рецептор-связывающий мотив;

SD – стандартное отклонение;

TCID₅₀ – 50% тканевая цитопатическая инфекционная доза;

TMB – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Новый коронавирус SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), впервые выявленный в 2019 году в Китае, 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 [1].

Как и все бетакоронавирусы, SARS-CoV-2 использует для проникновения в клетки поверхностный спайковый (от английского «spike» – шип) белок S. Критическим этапом инфекции является взаимодействие рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (АПФ2, ACE2) на поверхности клеток-мишеней, которое запускает конформационные изменения в структуре шипа и тем самым опосредует проникновение вируса в клетки [2].

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 [3].

Рекомбинантный белок RBD, получаемый в системах экспрессии бактерий, дрожжей, клеток растений и млекопитающих, используют в качестве компонента вакцин против COVID-19, мишени для поиска нейтрализующих моноклональных антител и других средств терапии и профилактики. Кроме того, рекомбинантный RBD используют для создания диагностических тест-систем для оценки специфических и нейтрализующих антител в сыворотке крови инфицированных [3-6].

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 вычлениении 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 распространенным продуцентом терапевтических препаратов, подтвердившей свою безопасность и эффективность [7, 8].

Цели и задачи

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 адьюванта, 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 (Приложение 1).

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.

Методология и методы диссертационного исследования

Работа выполнена с помощью общенаучных методов исследования и 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, нейтрализующих антител.

3. Рекомбинантный RBD, конъюгированный с комплексом полиглюкин-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.). Получен патент РФ.

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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Общие сведения о коронавирусе SARS-CoV-2

1.1.1. Семейство *Coronaviridae*: характеристика и классификация

Семейство *Coronaviridae* отряда *Nidovirales* объединяет зоонозные оболочечные вирусы с большим одноцепочечным (+)РНК геномом. Коронавирусы имеют широкий круг хозяев, включающий млекопитающих, рыб, птиц и земноводных, и являются возбудителями респираторных, кишечных, кардиоваскулярных и неврологических заболеваний (по данным ICTV, viralzone.expasy.org). При электронной микроскопии коронавирусы обнаруживаются в виде плеоморфных сферических частиц диаметром 120-160 нм, или бациллоподобных частиц размером 170-200 × 75-88 нм, или в виде смеси тех и других (рисунок 1). Свое название коронавирусы получили от латинского слова «*corona*» из-за характерного строения поверхностных шиповидных белков, которые на электронных микрофотографиях создают изображение, напоминающее солнечную корону [9].

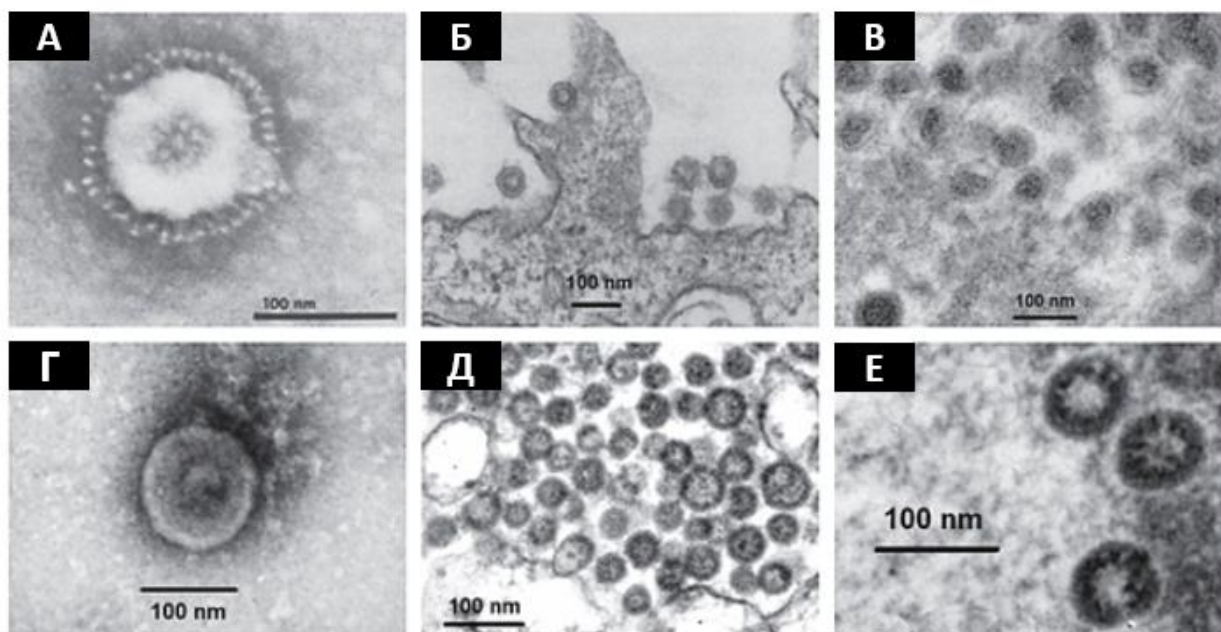


Рисунок 1. Электронно-микроскопические фотографии коронавирусов. А. Вирус инфекционного бронхита кур ACoV; Б. Почкующиеся частицы вируса трансмиссивного гастроэнтерита свиней TGEV; В. Коронавирус белуги SW1; Г. Коронавирус человека NL63; Д. MERS-CoV; Е. SARS-CoV-2. Адаптировано из статьи М.Ю. Щелканова с соавторами [10].

По данным международного комитета по таксономии вирусов (ICTV) на 2022 год, семейство *Coronaviridae* включает 54 вида вирусов и подразделяется на три генетически однородных подсемейства: *Letovirinae*, *Pitovirinae* и *Orthocoronavirinae*. Первые два включают по одному роду. Подсемейство *Orthocoronavirinae* (ранее *Coronavirinae*) – большая группа так называемых «настоящих коронавирусов» включает 4 рода: альфа-, бета-, дельта- и гаммакоронавирусы (рисунок 2). Альфа- и бетакоронавирусы заражают или вызывают заболевания у млекопитающих, включая человека. Среди них слабопатогенные коронавирусы человека HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-NKU1, а также вирусы MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2, которые, как известно, вызывают тяжелые заболевания [11].

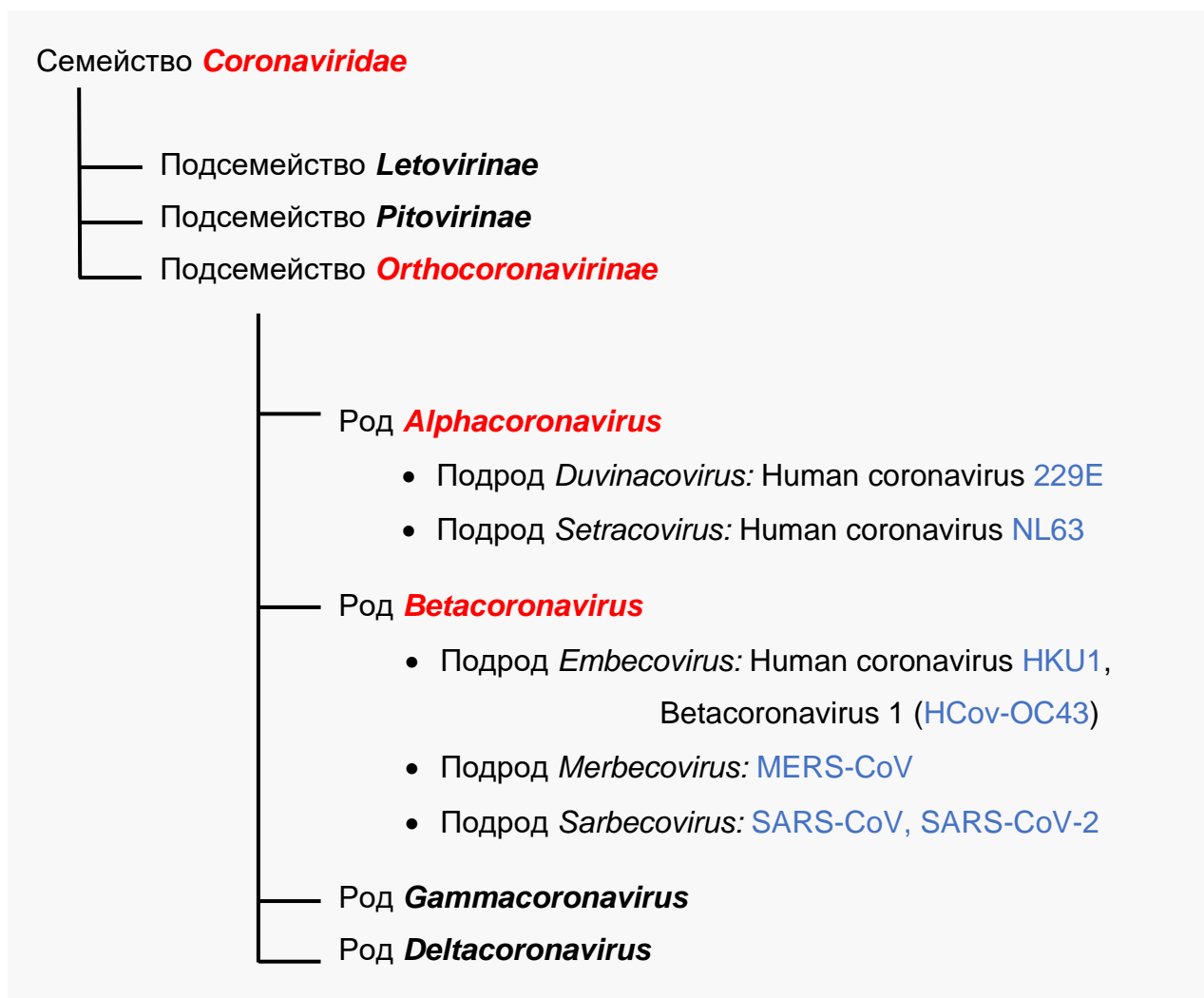


Рисунок 2. Таксономическое положение коронавирусов человека в семействе *Coronaviridae* (ICTV, выпуск 2021 г.).

Дельтакоронавирусы связаны с заболеваниями у птиц и свиней, а гаммакоронавирусы – с болезнями птиц, дельфинов и китов [12–14]. Анализ тенденций эволюции коронавирусов показал, что происхождение альфа- и бетакоронавирусов связано с летучими мышами и грызунами, тогда как гамма- и дельтакоронавирусов – с птицами [15].

1.1.2. Структура и жизненный цикл SARS-CoV-2

SARS-CoV-2, как типичный член семейства коронавирусов, представляет собой оболочечный вирус сферической или эллиптической формы диаметром 108 ± 8 нм с большим РНК геномом (рисунок 3). Размер генома SARS-CoV-2 составляет примерно 29,8-29,9 т.п.н. и представлен одноцепочечной не фрагментированной плюс-РНК (+оцРНК) [1, 16-17]. РНК кодирует 28 белков, в том числе 4 структурных белка: спайковый белок (S), белок оболочки (E), мембранный белок (M) и нуклеокапсидный белок (N) [18, 19].

Внешняя поверхность вириона покрыта характерными поверхностными шиповидными структурами, которые состоят из трех копий белка S [20]. S-белок (~175 кДа) содержит большой гликозилированный N-концевой эктодомен и небольшие трансмембранный (TM) и интравирсионный (IN) домены. Электрофорез нативных белков вириона в денатурирующих условиях показал наличие фракции непротессированного S-белка, и более крупной фракции, представленной двумя протессированными субъединицами S-белка: S1 и S2 [21, 22]. Процессинг происходит во время биосинтеза S-белка и осуществляется клеточной протеазой фурином. Субъединица S1, содержащая рецептор-связывающий домен RBD, обеспечивает взаимодействие с клеточным рецептором, а S2 отвечает за слияние вирусной и клеточной мембран, обеспечивая транслокацию вирусного генома в цитоплазму клетки [23]. S-белок также способствует адгезии инфицированных клеток к соседним неинфицированным клеткам, усиливая распространение инфекции [24].

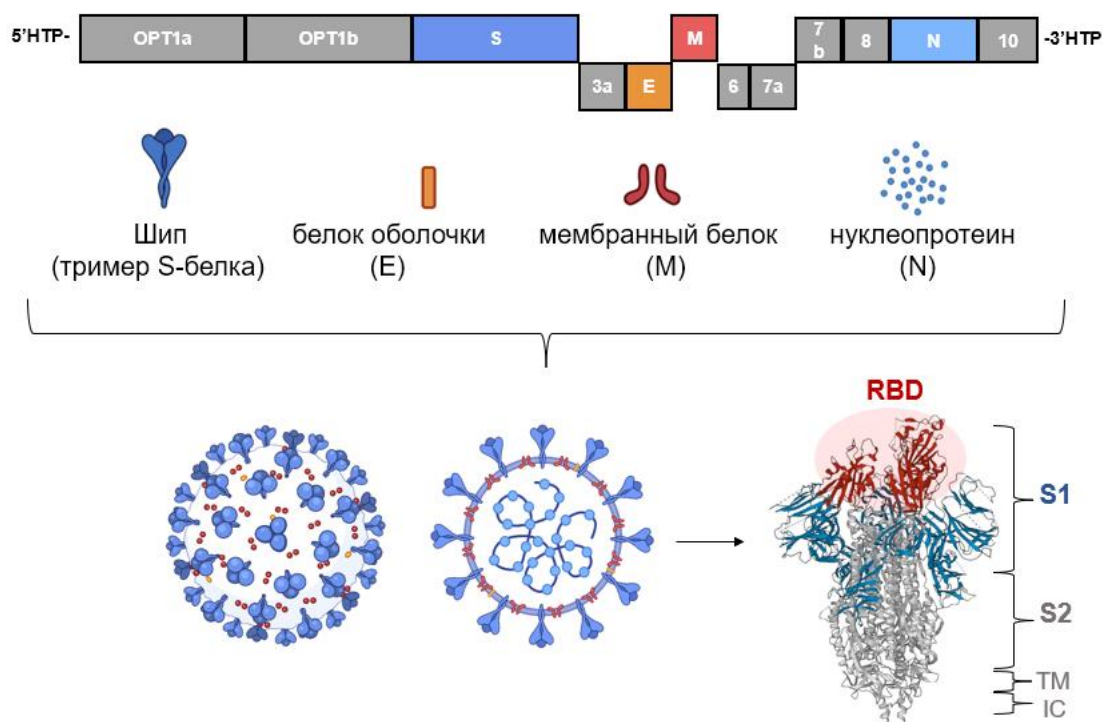


Рисунок 3. Структура генома коронавируса SARS-CoV-2 и поверхностного шипа. S1 и S2 – субъединицы S-белков, TM – трансмембранные домены, IC – внутриклеточные домены.

Белок мембраны М (~25-30 кДа) представляет собой гомодимер из двух полипептидных цепей. Он имеет небольшой N-концевой гликозилированный эктодомен, три трансмембранных домена и более крупный С-концевой эндодомен, который простирается на 6-8 нм внутрь вирусной частицы [25, 26]. Структурный анализ этого белка показывает, что он может принимать длинную или компактную формы, различающиеся по конформации. За изменение конформации ответственен эндодомен, который способен подвергаться удлинению или сжатию. М белок формирует двумерную решетку, а его длинная форма изгибает мембрану, обеспечивая сборку частиц и интеграцию шипов S-белка в мембрану [27, 28].

Белок оболочки Е (~8-12 кДа) представляет собой крошечный интегральный мембранный белок, который имеет маленький N-концевой эктодомен (всего ~16 а.о.), трансмембранный домен и С-концевой домен [29]. Белок Е образует виropорины – пентамерные ионные каналы в липидной мембране, необходимые для сборки и почкования вирусных частиц. Виropорины влияют на патогенные процессы во время инфекции, оказывая цитотоксический эффект на клетки [30]. Было показано, что ко-экспрессия белков М и Е обеспечивает продукцию

вирулентных сферических частиц [24]. Белки E и M также оказывают влияние на внутриклеточный транспорт, протеолиз и гликозилирование S-белка [31].

Белок нуклеопротеина N (~46-48 кДа) связывается с вирусной РНК и образует рибонуклеопротеин, который способствует проникновению генома вирусных частиц в клетку-хозяина и взаимодействию с клеточными процессами [32]. Последовательность белка N SARS-CoV-2 имеет примерно 90% сходства с белком N SARS-CoV [20]. Белок состоит из богатой серином линкерной области, расположенной между N-концевым и C-концевым доменами. N-концевой домен образует орторомбические кристаллы и связывается с вирусным геномом, линкерная область участвует в регуляции синтеза вирусной РНК, а C-концевой домен способствует сборке нуклеокапсида. Белок N взаимодействует с M-белком во время почкования вируса [33].

Геном SARS-CoV-2 кодирует также 16 неструктурных белков nsp1-16 (OPT1a и OPT1b) и 8 дополнительных белков, участвующих в образовании новых вирусных частиц. Среди них РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp), катализирующая репликацию вирусной РНК, и две протеазы – PLpro (папаиноподобная цистеиновая протеаза) и 3CLpro/Mpro (химотрипсин-подобная протеаза/основная протеаза), ответственные за автолитическое расщепление вирусной РНК и полипротеинов на функциональные фрагменты [34]. Жизненный цикл коронавирусов начинается с момента проникновения вируса в клетку (рисунок 4). Основным рецептором для SARS-CoV-2 является ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) на поверхности клеток человека. Белок ACE2 представляет собой мембранную экзопептидазу, которая катализирует расщепление ангиотензина I и II, вовлеченных в ренин-ангиотензиновую систему регулирующую кровяное давление, водно-электролитный баланс и системное сосудистое сопротивление [35]. ACE2 в большом количестве представлен на клетках желудочно-кишечного тракта, почек, яичек и сердца. В легких ACE2 в основном обнаруживается в альвеолярных клетках II типа и реснитчатых клетках. В носовой области/верхних дыхательных путях ACE2 преимущественно

представлен в эпителиальных клетках носа и подвижных ресничках эпителиальных клеток дыхательных путей [36].

Кроме человеческого ACE2, SARS-CoV-2 также распознает ACE2 свиней, хомячков, макак-резус, кошек, панголинов, цивет, кроликов и собак [16, 37, 38].

Итак, после того как RBD распознает и связывает ACE2, запускается процесс интернализации вируса, сопровождающийся диссоциацией субъединицы S1 S-белка и рядом конформационных перестроек в субъединице S2. Перестройку S2 инициирует расщепление на участке S2', которое может осуществляться разными путями. Если комплекс вирус-ACE2 сталкивается с протеазой TMPRSS2 на плазматической мембране, она расщепляет сайт S2' и интернализация вируса происходит через слияние поверхностных мембран, а если этого не происходит, вирус проникает посредством ACE2-опосредованного эндоцитоза, и расщепление по сайту S2' осуществляется в эндосомах pH-зависимыми катепсинами, преимущественно катепсином L. Оба процесса приводят к высвобождению пептида слияния, инициируя образование пор слияния в мембранах [39, 40]. После высвобождения генома в цитоплазме клетки вирусная (+)оцРНК служит матрицей для трансляции полипротеинов (ОРТ1а и ОРТ1b), которые аутопротеолизом расщепляются на 16 неструктурных белков.

Эти белки, в свою очередь, индуцируют перестройку клеточной мембраны с образованием двумембранных везикул, в которых формируется комплекс репликации-транскрипции коронавируса (RTC) с собственной РНК-зависимой РНК-полимеразой. Вирусная полимераза на матрице (+)РНК синтезирует (-)цепь, которая служит затем матрицей для амплификации (+)РНК генома. В то же время с (+)РНК синтезируются субгеномные РНК, с которых идет трансляция вирусных белков.

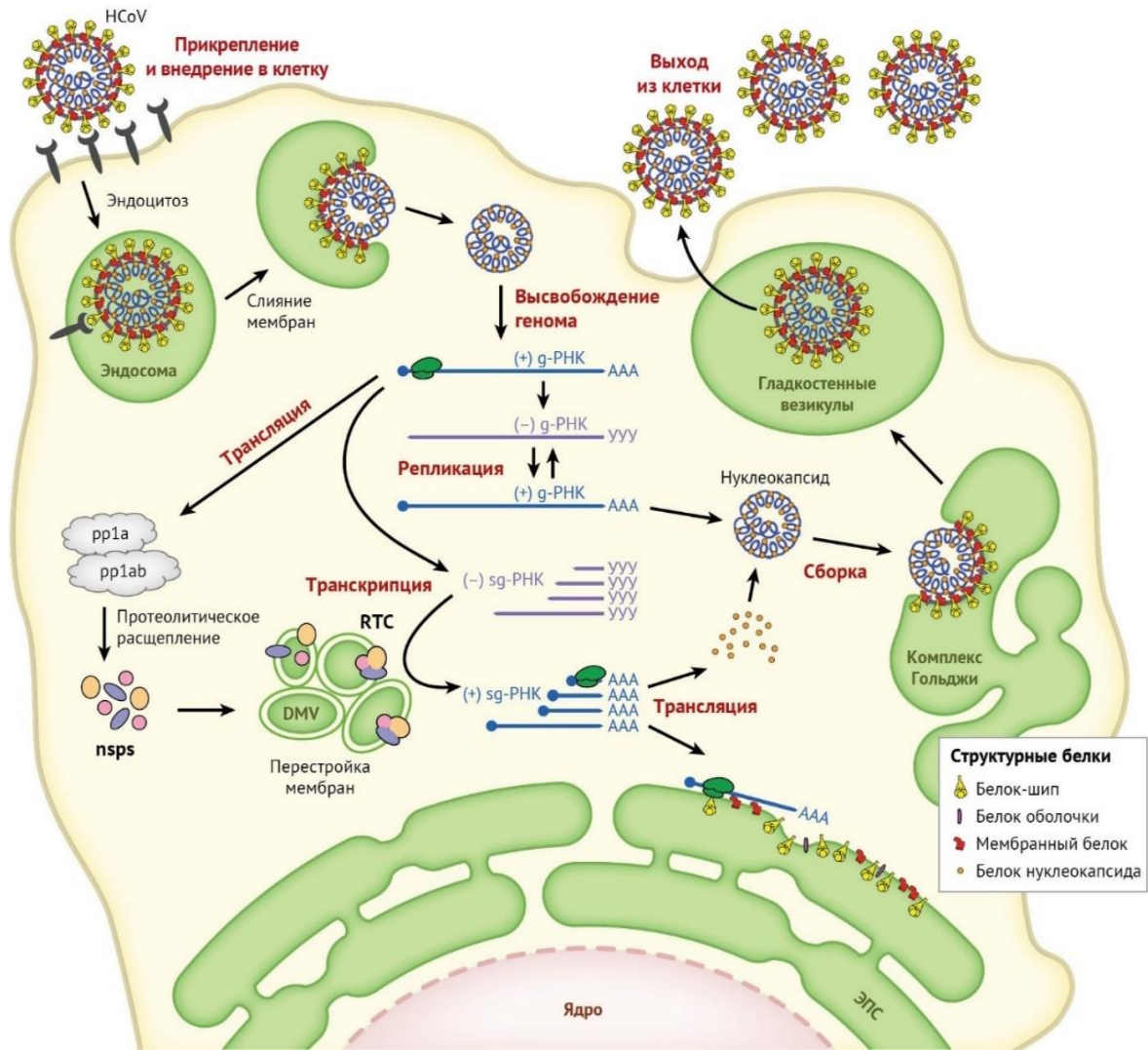


Рисунок 4. Цикл репликации коронавируса SARS-CoV-2. Адаптировано из статьи Gurta A. и Kannoji P. [41].

Помимо вирусных белков, в этом процессе также принимают участие различные факторы клетки-хозяина [42-44]. Белок N, как и неструктурные белки коронавируса, синтезируются в цитоплазме, тогда как белки вирусной оболочки синтезируются на мембране эндоплазматического ретикулума (ЭПР). Тримеры S-белка собираются в цистернах ЭПР и, вероятно, участвуют в организации сайтов почкования вирусных частиц в промежуточном компартменте ЭПР-Гольджи. Потомство вирионов отпочковывается от цистерн компартмента ЭПР-Гольджи и транспортируется во внеклеточную среду посредством экзоцитоза [43].

1.1.3. Биологическая, клиническая и эпидемиологическая характеристика коронавирусной инфекции COVID-19

В настоящее время известно 7 коронавирусов, способных инфицировать человека. Коронавирусы HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63 и HCoV-NKU1 циркулируют среди населения всего мира и вызывают бессимптомные или относительно легкие заболевания верхних и нижних дыхательных путей. Предполагают, что на их долю приходится около трети всех «простудных заболеваний» у людей. В некоторых случаях, особенно у лиц с ослабленным иммунитетом, детей или лиц с уже имеющимися легочными заболеваниями, эти вирусы могут приводить к острой дыхательной недостаточности [11, 45].

Высокопатогенные коронавирусы SARS-CoV и MERS-CoV вызвали в 2002 и 2012 годах крупные эпидемии с высоким уровнем смертности (~10% для SARS-CoV и ~36% для MERS-CoV) [46, 47]. Клинические проявления заболеваний, вызванных обоими вирусами, в большинстве случаев схожи с симптомами гриппа или атипичной пневмонии. При этом при тяжелом остром респираторном синдроме (ТОРС), вызванном SARS-CoV, часто наблюдают тяжелую вирусную пневмонию, быстро прогрессирующую до дыхательной недостаточности, и расстройства желудочно-кишечного тракта. А при ближневосточном респираторном синдроме (БВРС), вызванном MERS-CoV, часто возникают головные боли и осложнения в мочевыделительной системе. Наибольшей угрозой при БВРС считается острая почечная недостаточность, которая часто заканчивается летальным исходом [48].

Новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, при меньшем уровне смертности (~3.8% по данным ВОЗ на июнь 2022) показала высокий уровень инфекционности в отличие от инфекций ТОРС и БВРС [49, 50]. Инкубационный период при COVID-19 длится 2-14 дней, проявление симптомов и тяжесть течения сильно различаются в популяции. У большинства инфицированных наблюдаются неспецифические коронавирусные симптомы: повышение температуры тела, озноб, непродуктивный кашель, головная боль, недомогание [49, 51]. У некоторых пациентов вообще нет никаких физических симптомов или проявлений. Бессимптомные случаи COVID-19 могут составлять от

15 до 80% [52-55]. В других случаях симптомы инфекции развиваются от легких до тяжелых, со все более прогрессирующим и молниеносным течением заболевания. Вирус также вызывает различные желудочно-кишечные, сердечно-сосудистые и неврологические симптомы. Что касается неврологических симптомов, сообщалось о головной боли, недомогании, вялости и даже инфаркте мозга и кровоизлиянии в мозг [56]. Потеря обоняния и изменение вкуса также были одними из часто сообщаемых симптомов при COVID-19 [51, 57]. Среди желудочно-кишечных частыми симптомами были диарея, рвота, отрыжка, анорексия [58]. Среди кардиальных осложнений наиболее часто встречались сердечная недостаточность и аритмии. По большей части преобладают гематологические нарушения, включая нарушения свертывания, лимфопению и тромбоцитопению [59]. COVID-19 также может вызвать коагулопатию, которая считается опасным осложнением и в крайнем проявлении часто приводит к органной недостаточности [60]. У лиц с диабетом и хронической обструктивной болезнью легких, т. е. заболеваниями, сопровождающимися повышенной экспрессией рецепторов ACE2, чаще развиваются осложнения при COVID-19. Также к факторам риска относятся пожилой возраст и дефицит витамина D. Исследования на животных моделях выявили гормонально-опосредованную активацию экспрессии ACE2 у мужчин, что указывает на возможность более тяжелого течения COVID-19 у мужчин [61].

С самого начала предполагали, что в отличие от SARS-CoV-1 и MERS-CoV, SARS-CoV-2 может вызвать глобальную пандемию с огромными последствиями для общественного здравоохранения. Хронологическая картина развития пандемии, вызванной SARS-CoV-2, представлена на рисунке 5.

Особенностью этой пандемии является быстрое возникновение генетических вариантов вируса (рисунок 5, А). Это, в первую очередь, обусловлено его биологическими особенностями: механизмом репликации и рекомбинации вирусного генома [62].

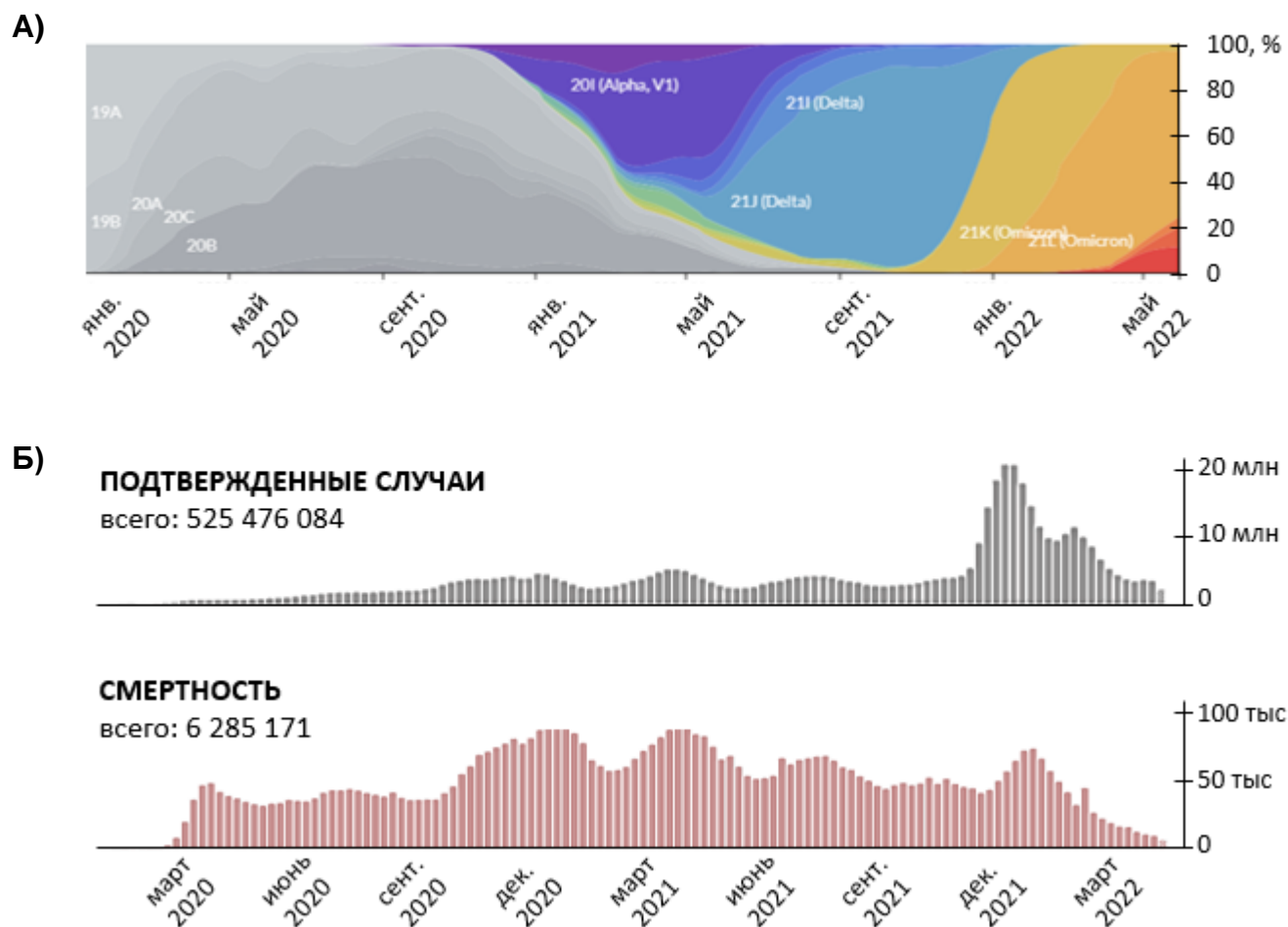


Рисунок 5. Характеристика пандемии COVID-19 в динамике. **А.** Циркуляция превалирующих вариантов коронавируса SARS-CoV-2 в мировой популяции за декабрь 2019 – май 2022 гг. (<https://nextstrain.org/>); **Б.** Динамика заболеваемости и смертности от COVID-19 в мире за декабрь 2019 – май 2022 гг. (по данным ВОЗ).

Для репликации генома коронавирусы используют собственную РНК-зависимую РНК-полимеразу, которая по своей природе способна совершать ошибки в процессе работы. Несмотря на то, что SARS-CoV-2 имеет корректирующий механизм в виде 3'-экзорибонуклеазы *nsr14*, вирусная РНК со временем накапливает генетические изменения [62, 63]. Однако жизненно важную роль в выборе вариантов мутаций в SARS-CoV-2, конечно, играет множество внешних факторов, таких как индивидуальный и популяционный иммунитет.

К более резким изменениям может привести рекомбинация геномной РНК коронавирусов. Прерывистая транскрипция геномов коронавирусов обеспечивает рекомбинацию в клетке, ко-инфицированной более чем одним видом или вариантом коронавируса, посредством «переключения цепи» РНК-полимеразами

[64]. Этот процесс приводит к продукции химерных субгеномных РНК и белков. Геномы SARS-CoV-2 также могут подвергаться гомологичной рекомбинации, при которой молекулы РНК рекомбинируют через участки с высоким сходством. События рекомбинации обычны для бетакоронавирусов и наблюдались внутри коронавирусов летучих мышей и внутри коронавирусов человека, включая SARS-CoV-2 [65-67].

Как видно из рисунка 5, волны вариантов SARS-CoV-2 сменяют друг друга, довольно быстро вытесняя предыдущие из популяции. Следует отметить, что закрепляющиеся мутации значительно влияют на показатели инфекционности и смертности. Так, последний на момент написания диссертации, вариант Omicron распространяется очень быстро, однако, тяжесть клинических проявлений и смертность значительно ниже по сравнению с предшествующим ему вариантом Delta. Сегодня многие эксперты предполагают, что SARS-CoV-2 продолжит свою адаптацию и останется в человеческой популяции как сезонный коронавирус [68].

1.2. Рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка как место уязвимости высокопатогенных для человека коронавирусов

1.2.1. Структура, свойства и функции RBD MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2

Тримеры S-белка высокопатогенных для человека коронавирусов MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 имеют общую архитектуру и механизм конформационных изменений (см. раздел 1.1.2.). В субъединице S1 S-белка выделяют N-концевой домен (NTD), рецептор-связывающий домен (RBD) и C-концевые домены CTD1 и CTD2. В конформации шипа до слияния с клеточной мембраной субъединицы S1 мономеров оборачиваются вокруг субъединиц S2 и при этом три RBD образуют вершину шипа (рисунок 6) [69-72].

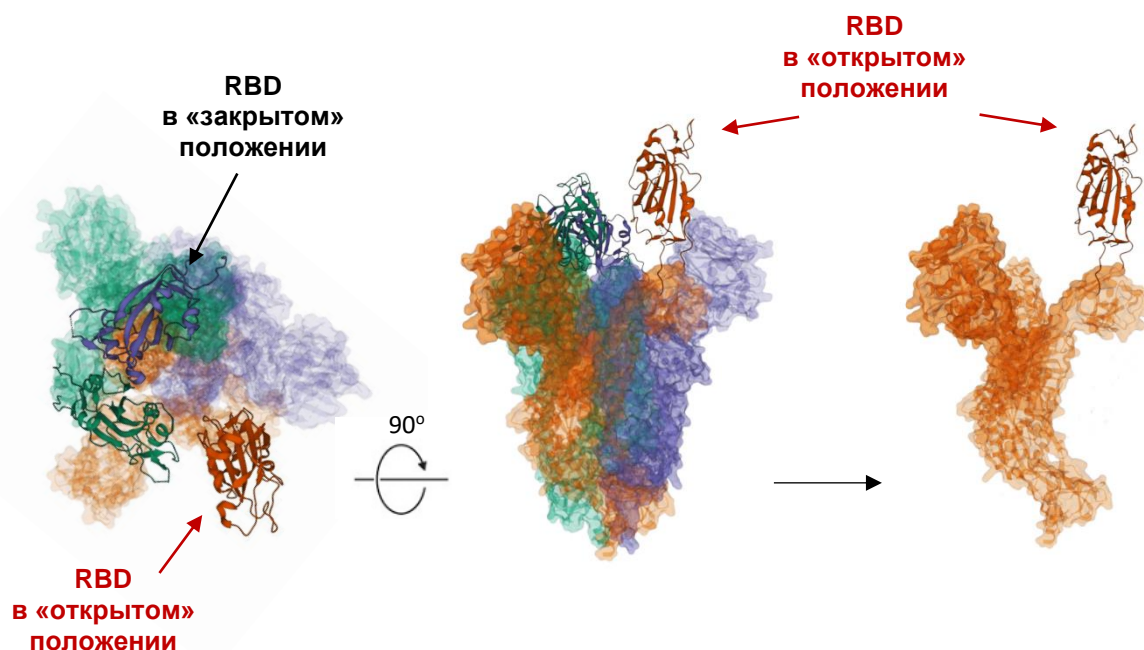


Рисунок 6. Третичная структура шипа SARS-CoV-2 (PDB: 6VYB): полупрозрачными цветами обозначены мономеры S-белков, домены RBD с элементами вторичной структуры обозначены непрозрачными цветами.

Среди кристаллизованных S-тримеров всех трех вирусов были обнаружены 4 конформационных состояния доменов RBD: полностью закрытая (все RBD утоплены вглубь шипа и недоступны для связывания), полностью открытая (все RBD экспонированы наружу и доступны для связывания) и частично открытые конформации с 1 или 2 RBD одновременно в «открытом» положении. Переход этих конформационных состояний модулируется присутствием рецептора, а конформация с одним RBD в открытом положении, как считают, является стабильным промежуточным состоянием S-тримера [69, 73, 74]. Многочисленные исследования указывали на роль различных а.о. в обеспечении конформационных переходов, однако ни одна из отдельных мутаций в этих а.о. полностью не ингибировала связывание с ACE2, что указывает на то, что вирусы развили механизм, задействующий несколько остатков для координации открытия шипа. Кроме того, важную роль в изменении связывания вируса и его инфекционности играют гликаны S-белка. Мономеры S-белка всех трех коронавирусов содержат около двух десятков сайтов N- и O-гликозилирования, 4 из них расположены в RBD. Притом, для SARS-CoV-2 было показано, что наибольшей гетерогенностью O-гликанов отличается именно домен RBD. При закрытом положении RBD

частично скрыт гликановым щитом, а при открытом гликане, по-видимому, выполняют роль механической поддержки открытого RBD [75-77]. По-видимому, все три RBD скрытые вглубь в отсутствие ACE2 и притом закрытые гликановым щитом уклоняются таким образом от иммунного ответа. Важно отметить, что различия в структурах гликанов могут иметь решающее значение для биологических функций [77, 78]. И, вероятно, гетерогенность в этом регионе может критично повлиять на свойства RBD.

Что касается первичной и вторичной структуры RBD MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2, здесь имеются важные отличия, на которых следует остановиться подробнее. RBD SARS-CoV и SARS-CoV-2 имеют 73.5% идентичности по аминокислотным последовательностям и распознают один и тот же клеточный рецептор ACE2 [79, 80]. RBD MERS-CoV связывается с рецептором дипептидил пептидазой 4 (DPP-4/CD26), а его первичная структура имеет слабое сходство с доменами SARS-CoV и SARS-CoV-2 (рисунок 7, А). Некоторые исследования показывают, что бетакоронавирусы могут также использовать для проникновения в клетки и дополнительные ко-рецепторы или другие рецепторы, отличные от основных [81-85]. В структуре RBD выделяют основную часть – кор и рецептор-связывающий мотив (от англ. «receptor binding motive», RBM), который формирует интерфейс взаимодействия с рецептором, притом мутации в области RBM регулируют инфекционность, патогенез, межвидовую передачу вируса и передачу от человека к человеку [86-88]. RBM является наиболее вариабельной областью RBD (идентичность у SARS-CoV и SARS-CoV-2 составляет всего 47,8%) и отличается пятью критическими для связывания с ACE2 заменами Y455L, L486F, N493Q, D494S и T501N (рисунок 7, А-Б). Эти а.о. стабилизируют взаимодействие RBD с его рецептором [71, 70]. Более того, а.о. 482C–485G в RBM SARS-CoV-2 приводят к более компактной конформации гребня RBD, связывающего ACE2, и обеспечивают дополнительный контакт с N-концевой спиралью ACE2 (рисунок 7, В).

A)

```

MERS QAEGVECDFSPLLSG-TPPQVYNFKRLVFTNCNYNLTKLLSLFSVNDFTCSQISPAAIASNCYSSLILDYFS 447
SARS -NITNLCPFGEVFNATKFPSVYAWERKKISNCVADYSVLYNSTFFSTFKCYGVSATKLNLDLCSFNVDYADSFV 398
SARS2 -NITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRRKRISNCVADYSVLYNSASFSTFKCYGVSPTKLNLDLCSFTNVYADSFV 401
      * * . . . . . ** : * : * * : : * . . . * * : * : : . * : : : * *

```

```

MERS YPLSMKSDLSSVSSAGPISQFNKYQSFNSPTCLILATVPHNLTITKPLKYSYINKCSRFLSDDRTEVPQLVN 519
SARS VKGDDVRQIAPGQTGVIADYNYKLPDDFMGCVLAWNTRNIDATSTGNVNYKYRYLRHGKLRPFERDISNVPF 460
SARS2 IRGDEVRQIAPGQTKGIADYNYKLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGNYNYLYRFLRKSNLKPFERDISTEIV 473
      . : : . . * * : : * * * . * : : . : : . * * * . : :

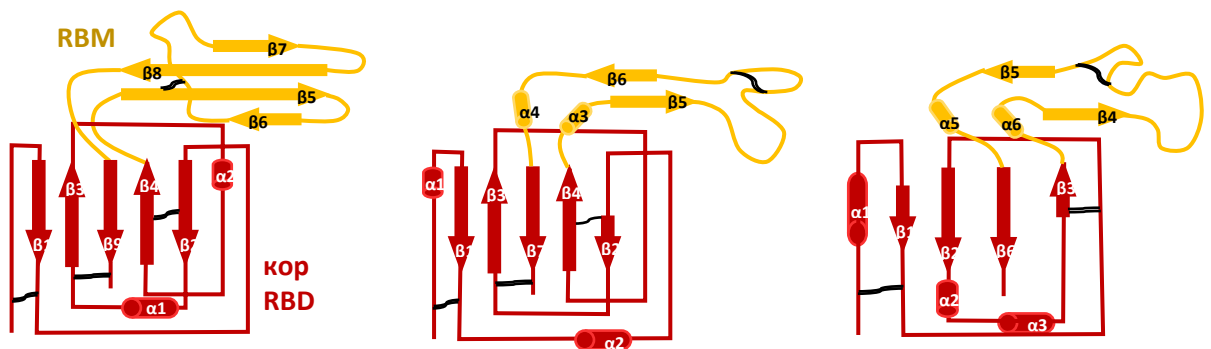
```

```

MERS ANQYSPCVSIVPST-VWEDGDYRQKLSPLLEGGWLVASGSTVAMTEQLQMGFGITVQYGTDTNSVCPKL 588
SARS SPDGKPCTP-PALNCYWP-----LNDYGFYTTTGIGYQPYRVVWLSFELLNAPAT----V----- 510
SARS2 QAGSTPCNGVEGFNCYFP-----LQSYGFQPTNGVGYQPYRVVWLSFELLHAPAT----V----- 524
      . ** . : * : . * : : * . : : * : : * *

```

B)



B)

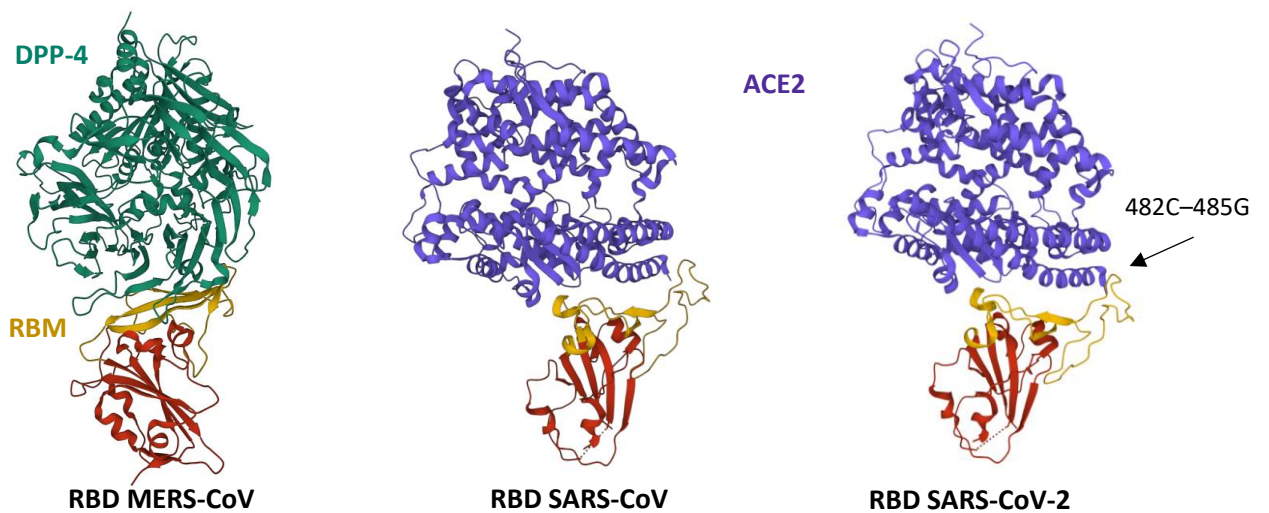


Рисунок 7. А. Выравнивание аминокислотных последовательностей RBD MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 (GenBank: K9N5Q8, P59594, P0DTC2) (CLUSTAL W): желтым цветом выделен участок RBM, красным шрифтом – консервативные а.о., полужирным шрифтом – замены а.о. в SARS-CoV-2, повышающие аффинность RBD к ACE2. **Б-Б.** Топология вторичной структуры и третичная структура RBD MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2 (PDB: 4KR0, 2AJF, 6VYB), связанных с рецепторами.

Биохимические данные подтвердили, что структурные особенности RBD SARS-CoV-2 усилили его аффинность к ACE2 по сравнению с SARS-CoV в ~10-20 раз [70-72].

Мотив RBM MERS-CoV сильно отличается своей конформацией и состоит из 4-х β -структур, притом кор RBD преимущественно представлен β -структурами схожими с таковыми у SARS-CoV и SARS-CoV-2 (рисунок 7, Б). Критическими для взаимодействия с DPP-4 являются а.о. D510, E536, D537 и D539 [89]. Таким образом, несмотря на схожесть структуры и механизмов процессинга S-белков MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV-2, в ряду S – S1 – RBD – RBM эта идентичность стремительно убывает. Гетерогенность в регионе RBD приводит как к структурным, так и функциональным изменениям шипа. Так MERS в отличие от SARS-CoV и SARS-CoV-2 связывает другой рецептор, а SARS-CoV-2 в свою очередь приобрел мутации, усиливающие его аффинность к ACE2, что, по-видимому, внесло весомый вклад в усиление контагиозности нового коронавируса.

1.2.2. Особенности иммунного ответа на RBD у инфицированных лиц

Иммунный ответ на разные коронавирусы у человека показал ряд сходств. После контакта с бетакоронавирусом в организме инфицированного развивается локализованный иммунный ответ, который в основном представлен врожденным иммунитетом (нейтрофилами, дендритными клетками и макрофагами) или IgA на слизистых оболочках. Затем развивается гуморальный иммунный ответ – продукция В-лимфоцитами антител IgM и IgG, направленных в основном против шиповидного (S) и нуклеокапсидного (N) белков, и клеточный – CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, направленные против всех белков вируса [90-92]. Кроме того, эти три коронавирусные инфекции имеют схожие иммунологические особенности, оказывающие патологическое воздействие: репликация вируса в клетках врожденного иммунитета, нарушение регуляции иммунного ответа, цитокиновый шторм и антитело-зависимое усиление инфекции (ADE) [93].

Полноразмерный гликопротеин S, субъединица S1 и особенно RBD способны индуцировать опосредованный Т-клетками иммунный ответ, а также мощные нейтрализующие антитела у лиц, инфицированных MERS-CoV, SARS-CoV и

SARS-CoV-2 [94-96]. При этом сообщалось, что специфические антитела к полноразмерному S-белку, могут быть вовлечены в ADE, тогда как антитела к RBD, по видимому не связаны с ADE [97, 98]. В целом же достаточно противоречивая информация относительно роли антител к RBD в ADE была получена в исследованиях на животных, однако в недавнем крупном исследовании было показано, антитела к S-белку, но не RBD положительно коррелировали с тяжестью инфекции SARS-CoV-2 у людей, при этом антитела к RBD в ранние сроки гарантировали положительный исход заболевания [99].

Исследование образцов реконвалесцентов COVID-19 показало, что количество В-клеток памяти, распознающих S-белок SARS-CoV-2 увеличивается в период 1-8 месяцев после заражения, при этом 10–90% В-клеток памяти специфичных к S-белку распознают домен RBD [100, 101]. Интересным феноменом при инфекции является ускользание SARS-CoV-2 от иммунного ответа из-за вновь-возникающих мутаций в S-белке и RBD, которые приводят к снижению кинетики связывания нейтрализующих антител [102]. Однако, было установлено, что клоны В-клеток памяти реконвалесцентов COVID-19 экспрессируют антитела с признаками соматической гипермутации, причем некоторые из них обладают повышенной нейтрализующей активностью и устойчивостью к мутациям в RBD или способны нейтрализовать гетерологичные сарбековirusы [103, 104]. Эффективная стимуляция продукции нейтрализующих антител включает CD4+ Т-лимфоциты, поскольку для всех трех вирусов показано, что титры нейтрализующих антител сильно коррелируют с уровнями CD4+, но не CD8+ Т-клеток [105-107].

По-видимому, и CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты играют большую роль в модулировании тяжести заболевания, и меньшую в предотвращении бессимптомных и легких инфекций. Однако, роль Т-клеточного ответа может стать доминантной в отсутствие адекватных нейтрализующих антител, например, при низких общих титрах антител. Так сообщалось, что в отсутствие врожденного иммунного ответа, активация Т-клеточного ответа была достаточной для повышения выживаемости хозяина и приводила к улучшению течения болезни при

инфекциях ТОРС и БВРС [108, 109]. А в долгосрочном 6-летнем наблюдении у реконвалесцентов ТОРС только два из 23 пациентов имели специфические IgG к SARS-CoV и притом у 14 из 23 пациентов обнаружены специфические Т-клетки памяти, что говорит о роли Т-клеток в формировании иммунологической памяти [110]. При исследовании вакцины mRNA-1273 COVE (Moderna) против SARS-CoV-2 нейтрализующие антитела не определялись, однако эффективность вакцины при этом составила 50,8% [111]. Аналогичным образом, вакцина Ad26.COV2.S (Janssen) показала 52% защиту в клинических испытаниях в Южной Африке, где было много случаев заражения бета-вариантом, даже несмотря на то, что она не обеспечивала формирование высоких уровней антител против этого варианта вируса [112, 113]. В то же время вакцина компании Novavax показала клиническую эффективность 86,3% против альфа (В.1.1.7) и 50% против бета (В.1.351) вариантов SARS-CoV-2 при отсутствии каких-либо заметных ответов CD8⁺ Т-лимфоцитов [114, 115]. В компаниях Sinovac и Bharat также сообщали о клинической эффективности в отсутствие заметных ответов CD8⁺ Т-лимфоцитов [116–118]. Таким образом, ответы CD8⁺ Т-клеток могут быть полезными, но не являются абсолютно необходимыми для защиты.

Роль RBD в клеточном иммунном ответе наиболее ясно была определена для вируса SARS-CoV-2 с помощью картирования Т-клеточных эпитопов. Было установлено, что эпитопы CD4⁺ Т-клеток распределены по последовательности S-белка неравномерно и образуют несколько иммунодоминантных регионов, одним из которых является RBD [119, 120]. RBD, по определению, содержит меньше иммунодоминантных эпитопов CD4⁺ Т-клеток, чем полноразмерный S-белок, притом, достаточно доказательств того, что RBD индуцирует хороший ответ CD4⁺ Т-лимфоцитов, и одновременно повышенный уровень нейтрализующих антител [99, 121, 122]. Картирование эпитопов CD8⁺ Т-клеток не выявило иммунодоминантной области в S-белке – эпитопы были примерно одинаково распределены по последовательности [119].

Важно отметить, что наличие противоречивой информации о роли компонентов иммунного ответа для всех трех вирусов, говорит о том, что

иммунный ответ довольно сложный и различия в нем зависят от многих факторов, в первую очередь от стадии заболевания и индивидуальных особенностей пациентов. Стоит учитывать и то, что нарушения иммунного ответа, вызванные различными механизмами всех трех вирусов, могут быть вовлечены в патогенез заболевания. Поэтому абсолютных коррелятов защиты на сегодняшний день не установлено. Однако, в случае и Т-клеточного и гуморального иммунных ответов RBD играет важную и даже определяющую роль в исходе заболевания.

Подытожив данный раздел, можно заключить, что изучение структуры и свойств RBD коронавирусов показало, что связывание RBD со специфическим рецептором является критическим этапом инфекции и формирование быстрого иммунного ответа, направленного на этот регион S белка способно обеспечить эффективную защиту от высокопатогенных коронавирусов.

1.3. Роль RBD в разработке средств противодействия COVID-19

1.3.1. Методы специфической лабораторной диагностики COVID-19 на основе RBD SARS-CoV-2

В начале следует заметить, что белок RBD может быть как мишенью, так и инструментом для диагностики SARS-CoV-2. В первом случае, подразумевают иммунохроматографические анализы, биосенсоры и другие иммунологические методы, нацеленные на выявление RBD S белка в биологических образцах, то есть тест-системы для прямой индикации вируса [123-129]. Во втором случае рекомбинантный RBD рассматривают как инструмент для детекции антител в сыворотках крови инфицированных с помощью иммунологических анализов.

Еще в начале пандемии были разработаны ИФА тест-системы на основе RBD или фрагментов RBD для выявления специфических IgG, IgA антител и с меньшим успехом IgM. Эти анализы позволяли детектировать антитела начиная с первого дня появления симптомов и установить раннее или позднее течение инфекции. Кроме того ИФА тест-системы на основе RBD обладали высокой специфичностью: перекрестной реактивности антител к RBD SARS-CoV-2 с другими коронавирусами выявлено не было [130, 131].

Следом были предложены хемилюминесцентный, иммунофлюоресцентный и электролюминесцентный анализы, а также латеральный проточный иммуноанализ на основе RBD, которые в клинической практике показали высокую чувствительность и специфичность, сравнимые с таковыми для наборов на основе полноразмерного S-белка или субъединицы S1 [132].

Помимо тестирования общего уровня специфических антител, были попытки прогнозировать уровень нейтрализующих антител на основе результатов иммуноанализов с использованием RBD. Это предложение основано на том, что титр специфических антител к RBD коррелирует с титром нейтрализующих антител в организме [133, 134]. Однако, такая грубая оценка позже была заменена на подходы, имитирующие анализ вируснейтрализации: например, конкурентный ИФА с использованием RBD и ACE2 или клеточные тест-системы на основе RBD [135, 136].

Широкое распространение, особенно в странах с низким и средним уровнем дохода, получили экспресс-тесты для выявления антител к SARS-CoV-2 на основе RBD, S-белка, N-белка или их сочетания. Как правило, такие тесты представляют собой тест-полоски на основе иммунохроматографического анализа. Однако, в недавнем исследовании было показано, что эти экспресс-тесты в независимости от производителя и антигена, могут давать ложноположительные результаты для сывороток пациентов, переболевших малярией, шистосомозом или лихорадкой Денге. Перекрестная реактивность составила 20,3%, 18,1% и 7,5% соответственно [137]. Такой результат в некотором смысле ожидаем, поскольку возбудители этих заболеваний вызывают активацию поликлональных В-клеток и продукцию антител, которые могут вызывать ложноположительные реакции в тестах антиген-антитело, что было неоднократно показано для экспресс-тестов для других инфекций. Хотя нельзя отрицать и возможные перекрестные антигенные детерминанты [137-139]. Притом, ИФА и иммунофлюоресцентный анализ сывороток переболевших малярией, шистосомозом или лихорадкой Денге, с использованием этих же антигенов дают значительно меньше ложноположительных результатов [140, 141].

1.3.2. Молекулярные аспекты использования RBD для создания вакцин

Несмотря на то, что еще в начале пандемии COVID-19 был одобрен ряд вакцин на основе полноразмерного S-белка SARS-CoV-2, вакцины на основе RBD могут быть предпочтительнее [3]. На сегодняшний день как минимум 7 вакцин на основе RBD одобрены для применения (таблица 1).

Использование RBD в качестве вакцины позволяет добиться индукции высоких титров нейтрализующих антител, поскольку основные эпитопы нейтрализующих антител сосредоточены именно в регионе RBD (по данным IEDB). Показано, что использование тримера S или фрагмента S1 дает сходные или худшие результаты [142-144]. А эффект ADE, наблюдаемый в экспериментах на животных, при иммунизации полноразмерным S-белком, говорит о более безопасном профиле вакцин на основе RBD [97, 145]. И наконец, RBD в отличие от полноразмерного S-белка, может быть получен в больших количествах с использованием различных систем экспрессии, таких как клетки насекомых, клетки млекопитающих, дрожжи, растения и *E. coli* [146-148].

Однако из-за маленького размера, RBD сам по себе обладает относительно слабой иммуногенностью. Поэтому были предложены различные адъюванты и методы мультивалентного дисплея антигенов для повышения эффективности вакцин на основе RBD.

Использование мономерного RBD в качестве антигена действительно является наиболее простым подходом. И в целом, такие версии антигена дополненные различными адъювантами индуцировали достаточно хорошую продукцию нейтрализующих антител у модельных животных и людей, однако T-клеточный ответ был не детектируемым или очень слабым и проявлялся наличием только CD4⁺ T-клеток [155-157].

Таблица 1. Субъединичные вакцины на основе RBD SARS-CoV-2, одобренные для профилактики COVID-19

№ п/п	Наименование, страна-производитель	Состав	Продуцент	Страны (одобрены)	Литературные источники
1	Zifivax (ZF2001), Китай	Димер RBD	CHOZN, CHO-K1	Китай, Колумбия, Индонезия, Узбекистан	[117]
2	Corbevax (BECOV2A), Индия	RBD с гидроокисью алюминия и CpG 1018	Pichia pastoris	Индия	[146, 149]
3	Abdala (CIGB-66), Куба	RBD	Pichia pastoris	Куба, Мексика, Никарагуа, Венесуэла, Вьетнам	[153]
4	Soberana 02 или Soberana 2 (FINLAY-FR-2), Куба	RBD конъюгированный со столбнячным токсином	CHO	Куба, Иран, Никарагуа, Венесуэла	[154]
5	Soberana Plus (FINLAY-FR-1A), Куба	RBD димер с гидроокисью алюминия	CHO	Куба	[155]
6	Recombinant SARS-CoV-2 Vaccine (CHO Cell, NVSI-06-08), ОАЭ	Гетерологичный тример RBD	CHO	Объединенные Арабские Эмираты	[156]
7	Noora vaccine или COVID-19 Recombinant RBD Protein Vaccine, Иран	RBD	нет данных	Иран	[157]

Позже было показано, что мультивалентные версии RBD эффективнее индуцируют иммунный ответ, чем мономерные версии у лабораторных животных. Мультивалентные форматы RBD способны усиливать активацию В-клеток за счет перекрестного связывания их рецепторов, однако ключевую роль играет не мультимеризация антигена как таковая, а дизайн антигена, позволяющий экспонировать RBD лучше, чем эпитопы кора RBD [158]. Для ковалентной димеризации использовали последовательные тандемы RBD или RBD, соединенные N- или C-концами. Такие димерные формы приводили к индукции титров антител в 10–100 раз выше, чем мономерные варианты [117, 158]. Так же были предложены вакцины на основе нековалентных димеров RBD, соединенных между собой дисульфидной связью или путем получения слитого белка RBD-Fc человеческого антитела и прочие [159]. Тримеры RBD получали путем введения фолдона фибронектина бактериофага T4 в C-конец RBD [160]. Помимо субъединичных вакцин, были представлены ДНК и РНК вакцины, экспрессирующие олигомерные формы RBD [161, 162]. Димерный и тримерный варианты RBD вызывали не только высокие титры нейтрализующих антител но и устойчивые ответы CD4+ и CD8+ Т-клеток [163].

Мультивалентные вакцины на основе RBD получали либо с помощью самособирающихся частиц, мономеры которых были генно-инженерными методами слиты с RBD, либо с помощью технологии лигирования белков, когда RBD пришивают к уже собранным наночастицам.

Например, сообщали о получении капсидоподобных частиц бактериофага AP205, покрытых множественными копиями RBD и о многокомпонентных наночастицах на основе ферритина экспонирующих RBD SARS-CoV-2 [164, 165]. Одобренная к применению вакцина Soberana02 представляет собой несколько RBD сайт-селективно конъюгированных со столбнячным анатоксином. В этой конструкции экспозиция нейтрализующих эпитопов максимальна, в то время как иммуногенный носитель способствует выработке CD4+ Т-хелперных клеток, необходимых для мощного гуморального ответа. Клинические испытания

Soberana02 показали хорошую сероконверсию нейтрализующих антител у людей [154].

Обсуждаемые здесь наночастицы, экспонирующие RBD, обычно представляют собой монодисперсные и стабильные составы, которые вызывают сильные нейтрализующие иммунные ответы у мышей, хорьков и приматов. Вероятно, защитные свойства будут воспроизведены и на людях, как это было показано для других противовирусных вакцин на основе наночастиц.

1.3.3. RBD как мишень для разработки терапевтических препаратов

Ингибирование RBD считается наиболее рациональной стратегией блокирования проникновения вируса в клетки и, таким образом, многообещающей терапевтической стратегией борьбы с COVID-19.

На заре пандемии рекомбинантный вариант самого RBD предлагали использовать в качестве ингибитора проникновения SARS-CoV и SARS-CoV-2 в клетки [166]. Похоже, что эта идея не нашла своего применения, однако работа подчеркнула важную роль взаимодействия RBD-ACE2 в проникновении вируса и успешность такой терапевтической стратегии.

Огромные усилия были направлены на разработку препаратов нейтрализующих моноклональных антител, нацеленных на RBD. Уже в 2020 году Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (FDA) США одобрило препараты Bamlanivimab и REGEN-COV (Casirivimab и Imdevimab) для экстренного использования для групп пациентов с риском развития серьезных осложнений при COVID-19 [167, 168]. Однако, разрешение на Bamlanivimab было отменено в течение года, поскольку при более широком исследовании его эффективность при монотерапии не была доказана [169]. С течением времени очевидным недостатком препаратов антител стало снижение эффективности в отношении вновь возникающих вариантов коронавируса [102, 170]. Таким образом, усилия исследователей были перенаправлены на поиск криптоэпитопов в RBD. Например, антитела, эпитопы которых находятся за пределами мотива RBM, нейтрализовали широкий

спектр вариантов вируса, поскольку основные мутации, опосредующие уклонение вариантов вируса расположены как раз в RBM мотиве RBD [171, 172].

Если канонические антитела, как правило, получали из крови переболевших доноров, то наноантитела, получали в основном от лам, иммунизированных RBD. Так в России были разработаны уникальные наноантитела взаимодействующие с RBD и нейтрализующие широкий спектр вариантов SARS-CoV-2 [173, 174].

Многочисленные испытания показывают, что моноклональные антитела могут быть эффективны на ранней стадии инфекции до 2-х недель после заражения, затем их эффективность сильно снижается и пока нет точного понимания почему это происходит [99].

С эффективностью используемых в клинической практике препаратов антител bamlanivimab, bebtelovimab, casirivimab, cilgavimab, etesevimab, imdevimab, sotrovimab и tixagevimab в отношении вновь-возникающих вариантов SARS-CoV-2 можно ознакомиться на сайте www.covid19treatmentguidelines.nih.gov.

В качестве ингибиторов RBD были предложены варианты растворимого ACE2, минипротеины и пептиды. Преимущество использования растворимого ACE2 и его производных заключается в устойчивости к вирусным мутациям: препараты ACE2 увеличивают свою эффективность с ростом сродства вируса к мембраносвязанному ACE2 [175]. Однако, на другой чаше весов оказываются побочные эффекты таких препаратов, ввиду функциональной активности ACE2 в организме.

В отличие от ACE2 и антител, минипротеины и пептиды не требуют экспрессии в клетках млекопитающих, а их небольшой размер и высокая стабильность позволяют создавать составы для прямой доставки в назальную полость или дыхательную систему [176-178]. Такие ингибиторы разрабатывают с помощью методов высокопропускной аффинной селекции и стратегии рационального дизайна. Рациональный подход предполагает дизайн ингибиторов с использованием данных третичной структуры RBD с помощью вычислительных технологий, который затем может быть дополнен мутагенезом и аффинной

селекцией с использованием RBD. Это касается как *de novo* разработки минипротеинов и пептидов, так и получения производных ACE2 [175].

Помимо препаратов белковой природы были предложены аптамеры – короткие одноцепочечные олигонуклеотиды (ДНК, РНК или ксенонуклеиновые кислоты), которые с высокой аффинностью связывают RBD. В отличие от препаратов белковой природы, аптамеры обладают низкой иммуногенностью, к тому же достигнуты определенные успехи в повышении их стабильности и специфичности [179]. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* РНК-, ДНК-, и ксеноаптамеры показали высокую эффективность в ингибировании живого вируса SARS-CoV-2 [180-184].

В качестве ингибиторов взаимодействия RBD-ACE2 могут выступать и малые молекулы. Так с помощью крио-электронной микроскопии было установлено, что линолевая кислота (C18:2, незаменимая жирная кислота) связывает RBD и стабилизирует закрытую конформацию S-белка, препятствуя взаимодействию вируса с рецептором ACE2 *in vitro* [185]. Вычислительные технологии были применены для поиска малых молекул-ингибиторов в имеющихся базах данных, а с помощью инструментов молекулярного моделирования был проведен дизайн большого количества таких ингибиторов [186, 187]. Однако на сегодняшний день, малые молекулы-ингибиторы, связывающие S-белок или RBD, еще не использовали в клинической практике.

1.4. Заключение

Коронавирусы были впервые идентифицированы в середине прошлого века и долгое время считались патогенами животных, неопасными для человека [9]. Однако, появление двух высокопатогенных для человека коронавирусов SARS-CoV и MERS-CoV привело в 2002 и 2012 годах к крупным эпидемиям с высоким уровнем смертности.

Новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, при меньшем уровне смертности показала высокий уровень инфекционности, и в отличие от ТОРС и БВРС быстро достигла уровня пандемии.

Усилия исследователей позволили быстро охарактеризовать SARS-CoV-2 и его патогенные механизмы. Было установлено, что вирион SARS-CoV-2 имеет типичное для бетакоронавирусов строение и наибольшее генетическое сходство с коронавирусом SARS-CoV. Внешняя поверхность вириона SARS-CoV-2 покрыта характерными поверхностными шиповидными структурами, которые состоят из трех копий белка S [20]. Рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка SARS-CoV и SARS-CoV-2 имеет высокий процент идентичности и распознает один и тот же клеточный рецептор ACE2, однако, SARS-CoV-2 приобрел мутации в RBD, которые усилили его аффинность к ACE2 в ~10-20 раз, что, по-видимому, внесло весомый вклад в усиление контагиозности нового коронавируса [70-72].

Рецептор связывающий домен, который бетакоронавирусы используют для проникновения в клетки, вместе с тем является ключевым местом их уязвимости. Согласно исследованиям, при инфекции или вакцинации, большинство вырабатываемых нейтрализующих антител направлены именно на RBD. Так же показано, что у инфицированных развивается Т-клеточный иммунный ответ на RBD: эпитопы CD8+ Т-клеток обнаруживают в RBD с той же частотой, что и в других участках S-белка, притом RBD является одним из регионов концентрации эпитопов CD4+ Т-клеток [94-96].

Исследования показывают, что нацеливание на S-белок или его RBD является многообещающей стратегией нейтрализации инфекционности коронавирусов. Поэтому рекомбинантный RBD используют как мишень для разработки терапевтических средств на основе белков, пептидов, минипротеинов (в т.ч. фрагментов ACE2), ДНК-, РНК- и ксено-аптамеров и малых молекул.

Важным направлением работ по противодействию COVID-19 является получение терапевтических моноклональных антител к RBD SARS-CoV-2. Несмотря на то, что первые препараты моноклональных антител утратили свою эффективность из-за возникающих мутаций, были достигнуты значительные успехи в поиске антител, нейтрализующих широкий спектр генетических вариантов вируса.

В начале пандемии было одобрено сразу несколько вакцин на основе полноразмерного S-белка, однако, многие исследователи считают, что вакцины на основе RBD могут быть предпочтительнее, поскольку использование RBD в качестве вакцины позволяет добиться индукции высоких титров нейтрализующих антител. К тому же, в отличие от полноразмерного S-белка, иммунизация RBD не связана с возникновением антитело-зависимого усиления инфекции у людей.

Первая субъединичная вакцина на основе RBD Zifivax 2002 была разработана в Китае, и на сегодняшний день как минимум еще 6 субъединичных вакцин на основе RBD одобрены для применения в разных странах.

Основным недостатком белка RBD считают слабую иммуногенность и невыраженный T-клеточный иммунный ответ после вакцинации, однако, применение различных адъювантов и метода мультивалентного дисплея антигенов позволили повысить эффективность вакцин на основе RBD. Также распространено мнение, что RBD или RBM могут быть более привлекательны для разработки мультивалентных вакцин против нескольких геновариантов вируса SARS-CoV-2.

Таким образом, рекомбинантные варианты RBD SARS-CoV-2 или фрагменты S-белка, содержащие RBD, могут послужить для создания новых средств диагностики, терапии и профилактики коронавирусной инфекции COVID-19.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Олигонуклеотиды

Все олигонуклеотиды и гены, использованные в работе, были синтезированы ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва).

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
IRES-F	AAAAAAGGATCCATATTAAGTCGACCGAGCGGTTCCCGCCCCTC
IRES-R	GGTTGTGGCCATATTATCATCGTG
Pur-F	GATGATAATATGGCCACAACCATGACCGAGTACAAGCCCAC
Pur-R	AAAAAACATATGCGAATCAGGCACCGGGCTT
PA-F	AAAAAACATATGGGTTAATGCTTCGAGCAGACATGAT
PA-R	AAAAAACCGGCCGTGGAACCTTGTTT
pVL-F	GACCGCCATGTTGGCATTG
S-SP-R	TAGTGGCAATAAAACAAGAAAAACAACATGGCTAGCCAGCGAATTC TCGAGGC
S-SPRBD-F	TTTCTTGTTTTATTGCCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTGGAAAAGGGCA TCTACCAGACCA
RBDH-R	AAAAAGTCGACGAGGCTGATCAGCGGTTTAAACTTAAGCTTAGTGGTG GTGATGGTGATGATGGTGGTGATGGAAGTTCACGCATTTGTTCTTCACG

2.1.2. Синтетические пептиды

Для стимуляции спленоцитов мышей BALB/c в ELISpot и ICS использовали синтетические пептиды из белка RBD (таблица 3). Пептиды были рассчитаны заведующим теоретическим отделом ГНЦ ВБ «Вектор» д.б.н. Бажаном С.И. с помощью ресурса IEDBAnalysis из числа наиболее часто встречающихся эпитопов CD4+ и CD8+ Т-клеток и синтезированы (AtaGenix Laboratories, Китай).

Таблица 3. Пептиды из белка RBD для ELISpot и ICS анализов

№ п/п	Последовательность пептида	Рестриктурирующие молекулы ГКГ
1	VYAWNRKRI	H2-Kd2
2	FERDISTEI	H2-Ld
3	CGPKKSTNL	H2-Dd
4	KNIDGYFKIYSKHTP	H2-IEd
5	RFASVYAWNRKRISN	H2-IEd, H2-IAd
6	VGGNYNYLYRLFRKS	H2-IEd
7	GGNYNYLYRLFRKSN	H2-IEd
8	YNYKLPDDFTGCVIA	H2-IEd
9	NATRFASVYAWNRKR	H2-IEd, H2-IAd
10	KNKCVNFNFNGLTGT	H2-IEd

2.1.3. Моноклональные антитела, нейтрализующие SARS-CoV-2

Для изучения антигенных свойств RBD использовали варианты моноклональных антител, полученные в отделе биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора на основе опубликованных последовательностей VH/VL доменов антител, нейтрализующих SARS-CoV-2.

Таблица 4. RBD-специфические нейтрализующие моноклональные антитела, использованные в работе

№ п/п	Наименование антитела	Формат	Литературные источники
1	DA	наноантитело	[188]
2	Y	наноантитело-Fc	[189]
3	161	scFv-Fc	[190]
4	181	scFv-Fc	GenBank: KQ15165
5	521	scFv-Fc	[191]
6	524	scFv-Fc	[192]

2.1.4. Коммерческие наборы, ферменты и реактивы

- PfuSE ДНК-полимераза с прилагаемым буфером и смесь дНТФ (Сибэнзим, Россия);
- Эндонуклеазы рестрикции BamHI, FauNDI, Sfr274I, SalI, BseX3I в комплекте с буферами, (Сибэнзим, Россия);
- Высокоактивная ДНК-лигаза фага T4 (Сибэнзим, Россия);
- Буфер для быстрого лигирования 5X Quick ligation buffer (Евроген, Россия);
- Маркер молекулярного веса ДНК M12 (Сибэнзим, Россия);
- Набор Cleanup Standard для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей (Евроген, Россия);
- Набор для выделения плазмидной ДНК Plasmid miniprep (Евроген, Россия);
- Маркеры молекулярной массы белка PageRuler Prestained Protein Ladder 10-180 kDa, 10-250 kDa (Thermo Fisher Scientific, США);
- Реагент для трансфекции эукариотических клеток Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США);
- Сорбент для аффинной хроматографии Ni-NTA (Qiagen, Германия);
- Сорбенты для ионообменной хроматографии: SP Sepharose Fast Flow (Cytiva, Швеция) и Q Sepharose Fast Flow (Cytiva, Швеция);
- Сорбенты для гель-фильтрации: Sephacryl S-200 HR (Cytiva, Швеция) и Sephadex G-25 (Cytiva, Швеция);
- Нитроцеллюлозная мембрана 0,45 мкм (Millipore, США);
- Буфер ФСБ, pH 7,4-7,5 в таблетках (Росмедбио, Россия);
- Гликозидаза PNGase F (New England Biolabs, США).
- Набор для дегликозилирования белка Protein Deglycosylation Mix II (New England Biolabs, США).
- Хромогенный субстрат для щелочной фосфатазы 1-Step NBT/BCIP Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific, США);

- Хромогенный субстрат для пероксидазы хрена 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (ТМВ) (Amresco, США);
- Моноклональные антитела к 6×his-метке конъюгированные с щелочной фосфатазой (Cat. No R932-25, Invitrogen, США);
- Поликлональные антитела к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с щелочной фосфатазой (Cat. No A16069, Invitrogen, США);
- Моноклональные антитела к 6×his-метке, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cat. No MA1-21315-HRP, Invitrogen, США);
- Козьи поликлональные антитела к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cat. No A00166, GenScript, США);
- Козьи поликлональные антитела к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cat. No 62-6520, Invitrogen, США);
- Козьи поликлональные антитела к IgG кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cat. No 12-348, Sigma-Aldrich, США);
- Поликлональные антитела к IgG хомяка, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cat. No PA1-28823, Invitrogen, США);
- Козьи поликлональные антитела к IgG, IgA и IgM хорька, конъюгированные с пероксидазой хрена (Cat. No SAB3700801, Sigma-Aldrich, США);
- Препарат дрожжевой двуцепочечной РНК киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y 448 (ООО «Диафарм», г. Бердск);
- Препарат белка ACE2 человека (а.о. 18Q–740S, GenBank: AF291820) с С-концевой His-меткой и препараты моноклональных антител к RBD SARS-CoV-2 предоставлены сотрудниками отдела биоинженерии Шаньшиным Д.В. и к.б.н. Беленькой С.В;
- Препарат лизата вируса SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 любезно предоставлен д.б.н. Чепурновым А.А;
- Препарат преактивированного биотина EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Scientific, США);

- Mouse IFN γ ELISPOT Set (Becton Dickinson, США);
- Конъюгированные моноклональные антитела FITC Rat Anti-Mouse CD8a, PE Hamster Anti-Mouse CD3e и APC Rat Anti-Mouse IFN γ (BD Biosciences, США);
- Набор для фиксации и пермеабилзации клеток Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit (Becton Dickinson, США).

2.1.5. Клеточные линии, штаммы бактерий и вирусов

Для генно-инженерных работ использовали клетки *E. coli* штамм NEB Stable (генотип: F' proA+B+ lacIq Δ (lacZ)M15 zsf::Tn10 (TetR) Δ (ara-leu) 7697 araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- Ф80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ (mrrhsdRMS-mcrBC)) (New England Biolabs, США).

Для получения продуцентов рекомбинантных белков использовали перевиваемую клеточную линию СНО-К1 (китайский хомячок, яичник) из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, НСО, Россия).

Для анализа вируснейтрализующих свойств сывороток животных *in vitro* использовали перевиваемую клеточную линию Vero Еб (африканская зеленая мартышка, почка) из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, НСО, Россия) и штамм коронавируса SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, НСО, Россия).

2.1.6. Питательные среды

Для работ с клетками *E. coli*:

- Бактериальная среда LB: 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl;
- Бактериальная среда LB-агар: 1% триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 1% NaCl, 1,5% агар.

Для работ с клетками млекопитающих использовали среды производства ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, НСО, Россия). Культуру CHO-K1 вели на среде DMEM/F12 (1:1) с L-глутамином, для работы с клетками Vero E6 использовали питательную среду MEM с L-глутамином, спленоциты мышей культивировали на среде RPMI-1640. Все среды содержали антибиотик гентамицин (50 мкг/мл) и перед использованием были дополнены 2 или 10% инактивированной эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США).

2.1.7. Растворы и буферы

- ТАЕ буфер для электрофореза ДНК в агарозном геле: 40 мМ Трис-(гидроксиметил) аминотетан, 20 мМ уксусная кислота, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0;
- Электродный буфер для электрофореза белков в SDS-ПААГ: 25 мМ Трис-(гидроксиметил) аминотетан, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, pH 8,3;
- Разрешающий гель для SDS-ПААГ: 44% акриламид, 1,5 М Трис-НСl (pH=8,8), 50 мг персульфата аммония, 1 мкл/мл TEMED;
- Концентрирующий гель для SDS-ПААГ: 30% акриламид, 0,5 М Трис-НСl pH=6,8, 50 мг персульфата аммония, 1 мкл/мл TEMED;
- Буфер для загрузки образцов белка в полиакриламидный гель: 12% SDS, 0,06% бромфенолового синего, 47% глицерина, 60 мМ Трис-НСl pH 6,8;
- Раствор кумасси Brilliant Blue R-250 для окрашивания белков в SDS-ПААГ: 400 мг Кумасси R-250 растворяли в 20 мл 96% этилового спирта, добавляли 80 мл H₂O и 25 мл HClO₄, перемешивали на магнитной мешалке, после чего доводили 200 мл водой;
- Электродный буфер для иммуноблоттинга: 38 мМ Трис-НСl, 48 мМ глицин, 0,05% SDS, 20% этанол, pH 8,3;
- Базовый буфер для аффинной хроматографии: 30 мМ NaH₂PO₄, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол;
- Элюирующий буфер для аффинной хроматографии: 30 мМ NaH₂PO₄, 0,5 М NaCl, 0,5 М имидазол;

- Базовый буфер для ионообменной хроматографии: 20 mM Трис-НСl, pH 8,2;
- Элюирующий буфер для ионообменной хроматографии: 1 M NaCl в 20mM Трис-НСl, pH 8,2;
- Денатурирующий буфер для хромато-масс-спектрометрии: 7 M мочевины, 50 mM Трис-НСl, pH 8,0;
- Буфер ФСБТ: 0.1% Tween-20 в ФСБТ;
- Блокирующий буфер для иммуноблоттинга: 3% бычьего сывороточного альбумина в буфере ФСБТ;
- Блокирующий буфер для ИФА: 1% казеина в буфере ФСБТ;
- Раствор Трипсина-Версена: 0,25% трипсин, 0.02% версен (1:1) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, Россия);
- Раствор ампициллина, 100 мг/мл (Биосинтез, Россия);
- Раствор гентамицина, 40 мг/мл (Дальхимфарм, Россия);
- Раствор пурамицина, 10 мг/мл (InvivoGen, США);
- 0,02% раствор генцианвиолета: 1 г генцианвиолета в 20 мл 96% этилового спирта, 120 мл 40% формалина и 350 мл раствора Хенкса;
- Раствор 30% азидата натрия.

2.1.8. Сыворотки реконвалесцентов COVID-19

Сыворотки венозной крови реконвалесцентов COVID-19 были получены от жителей Алтайского края, имеющих диагноз COVID-19 подтвержденный методом ОТ-ПЦР. Сыворотки были получены в январе 2020 года спустя 3-6 недель после проявления первых симптомов инфекции. Исследование было одобрено на заседании этического комитета Алтайского государственного медицинского университета (Протокол №9 от 23.10.2020).

2.1.9. Лабораторные животные

Для исследования иммунного ответа на RBD использовали 4 вида лабораторных животных: мыши линии BALB/c (самцы и самки, 1,5-2 месяца),

сирийские хомячки (самцы, 1 месяц), хорьки (самцы, 4,5 месяца) и кролики породы Шиншилла (самцы, 2,5 месяца). Животные были получены из питомника лабораторных животных ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

2.1.10. Программное обеспечение

Дизайн генетических конструкций проводили с использованием SnapGene 3.2.1. Статистические анализы и визуализацию результатов в виде графиков проводили с помощью GraphPad Prism 8.0. Денситометрический анализ выполняли с помощью программы ImageJ. Третичную структуру RBD предсказывали с помощью программы AlphaFold v2.1.0 (DeepMind, Великобритания).

Программное обеспечение для отдельных видов работ указано в разделе 2.2 в описании к каждому конкретному методу.

2.2. Методы

2.2.1. Дизайн и конструирование плазмидных векторов

Плазмидные векторы для экспрессии RBD и тримеров S-белка SARS-CoV-2 получали на основе интегративного вектора pVEAL, использующего систему транспозонов Sleeping Beauty, ранее разработанного в лаборатории иммунохимии ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора [193]. На первом этапе работы модифицировали данный вектор чтобы ускорить селекцию положительных клонов клеток млекопитающих. Для этого нуклеотидную последовательность, кодирующую фактор резистентности к антибиотику Zeocin, заменили на фактор резистентности к пурамицину. ДНК фрагменты, кодирующие пурамицин и IRES получали в ПЦР с использованием пар праймеров Pur_F и Pur_R, IRES-F и IRES-R на матрицах pSBbi-Pur и pVEAL соответственно. ПЦР проводили с помощью PfuSE ДНК-полимеразы в соответствии с рекомендациями производителя. Затем проводили отжиг и амплификацию слитой последовательности IRES-пурамицин с помощью праймеров IRES-F и Pur_R и гидролиз эндонуклеазами рестрикции BamHI и FauNDI. Так же из вектора pVEAL в ПЦР с помощью праймеров PA-F и PA-R получали второй ДНК-фрагмент и гидролизовали по сайтам FauNDI и

VseX3I. Вектор pVEAL гидролизовали по сайтам BamHI и VseX3I. Продукты гидролиза разделяли в 1% агарозном геле, вырезали фрагменты нужной длины и выделяли из агарозного геля с помощью набора Cleanup Standard. Затем сшивали фрагменты с помощью ДНК-лигазы и проводили трансформацию компетентных клеток *E. coli* NEB stable методом теплового шока. Клетки высевали на селективную среду LB-агар с ампициллином (100 мкг/мл). Затем отбирали единичные колонии, растили в течение ночи, выделяли плазмидную ДНК набором Plasmid Miniprep и проводили секвенирование по методу Сэнгера для подтверждения структуры плазмид. Вектор получил название pVEAL2 и был использован в дальнейшей работе.

Дизайн нуклеотидной последовательности для получения тримеров S-белка проводили как описано у T. Li с соавторами [194]. Вкратце, аминокислотную последовательность S-белка SARS-CoV-2 (а.о. 1M-P1213) штамма Wuhan-1 извлекали из базы данных GenBank (MN908947), удаляли фрагмент, кодирующий сайт расщепления протеазой, и вводили стабилизирующие аминокислотные замены K986P и V987P. На С-конец фрагмента добавляли последовательности тримеризующего домена фибритина бактериофага T4 (GYIPEAPRDGQAYVRKDGWVLLSTFL) и 10×his-метки. Затем с помощью веб-инструмента GeneOptimizer (<https://www.thermofisher.com/ru/en/home/life-science/cloning/gene-synthesis/geneart-gene-synthesis/geneoptimizer.html>) рассчитывали оптимизированную по кодонному составу нуклеотидную последовательность для экспрессии в клетках CHO, фланкировали сайтами узнавания эндонуклеаз рестрикции Sfr274I и SalI и синтезировали в составе вектора pGH (ООО ДНК-синтез, Россия). Из плазмиды pGH-S вырезали последовательность S-белка и рестриктазно-лигазным методом встраивали по сайтам Sfr274I и SalI в вектор pVEAL2 как было описано выше.

Далее на основе вектора pVEAL2 получали конструкцию pVEAL2-S-RBD, кодирующую домен RBD, содержащий 10xHis-метку на С-конце и лидерный пептид S-SP белка S SARS-CoV-2 (MFVFLVLLPLVSSQC) на N-конце. Нуклеотидную последовательность сигнального пептида S-SP, 10xHis и сайтов

рестрикции Sfr274I и SalI вводили одновременно с помощью ПЦР и последующего отжига продуктов амплификации. С использованием праймеров pVL-F и S-SP-R получали ПЦР-продукты на матрице вектора pVEAL2, а с использованием праймеров S-SPRBD-F и RBDH-R на матрице pGH-S. Далее проводили отжиг соответствующих ПЦР-фрагментов и амплификацию полученных фрагментов с использованием праймеров pVL-F и RBDH-R. Затем проводили встройку в вектор pVEAL2 рестриктазно-лигазным методом по сайтам рестрикции Sfr274I и SalI.

Подтверждение структуры векторов pVEAL2-S и pVEAL2-S-RBD проводили с помощью секвенирования по методу Сэнгера. Плазмиды амплифицировали в клетках *E.coli* NEB stable и выделяли препаративные количества пДНК набором Plasmid Miniprep. Концентрацию ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США).

2.2.2. Трансфекция клеток CHO-K1

Клетки CHO-K1 растили в 12-луночной планшете в полной питательной среде DMEM/F-12 (1:2), содержащей 10% FBS, в течение суток в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂. При достижении 70-80% монослоя, среду меняли на поддерживающую, содержащую 2% FBS, и проводили трансфекцию клеток с помощью реагента Lipofectamine 3000 в соответствии с инструкцией производителя. Для интеграции экспрессионной кассеты вектора в геном клеток совместно с плазмидами с pVEAL2-S или pVEAL2-RBD добавляли плазмиду pCMV(CAT)T7-SB100 (в соотношении 10:1), кодирующую транспозазу Sleeping Beauty SB100. Через 3 дня в культуральную среду добавляли селективный антибиотик пурамицин в конечной концентрации 10 мкг/мл. Селекцию устойчивых клонов проводили в течение трех суток и анализировали наличие целевого белка в культуральной среде с помощью иммуноблоттинга.

2.2.3. Отбор высокопродуктивных клонов CHO-K1-RBD

Поликлональную культуру CHO-K1-RBD рассеивали в 96 луночные планшеты из расчета 1 клетка на лунку и культивировали в течение 2 недель. Визуально

анализировали наличие единичных колоний в лунках, отбирали культуральную среду и оценивали продуктивность клонов в «сэндвич»-ИФА. Для этого в 96-луночные планшеты сорбировали антитело Y в концентрации 100 нг/лун в течение ночи при 4°C. Трижды промывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0,1% Tween-20 (ФСБТ), добавляли блокирующий буфер (1% казеин в ФСБТ) и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем вносили 10-тикратные разведения образцов культуральной жидкости индивидуальных клонов в трех повторах и инкубировали 1 ч при 37°C. Промывали планшеты ФСБТ и добавляли моноклональные антитела к bхhis метке, конъюгированные с пероксидазой хрена и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем вносили раствор субстрата ТМВ и инкубировали в течение 10 мин, реакцию терминировали раствором 1N HCl и сразу измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм на планшетном ридере Varioskan Lux multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific, США). Клоны, показавшие наиболее высокие численные значения OD450, использовали для наработки белков.

2.2.4. Роллерное культивирование культур продуцентов

Клетки штаммов-продуцентов CHO-K1-RBD и CHO-K1-S масштабировали на культуральных матрасах и готовили посевной материал с концентрацией 500 ± 1 млн клеток на литр DMEM/F-12, дополненной 10% FBS и антибиотиком гентамицином. В роллерные бутылки, объемом 2 л, вносили по 200 мл питательной среды и помещали на роллерную установку. Клетки культивировали в течение 5-7 суток до достижения 70-80% монослоя при 37°C с ротацией 0,8 об/мин. Затем проводили замену ростовой среды на свежую, содержащую 2% FBS, каждые 5-7 дней и продолжали культивирование в заданных условиях. Культуральную среду собирали и центрифугировали при $10\,000 \times g$ при 4°C в течение 20 мин для удаления клеток и клеточного дебриса. Осветленный супернатант фильтровали с помощью фильтр-систем с диаметром пор 0,45 мкм, добавляли раствор 30% азида натрия (1:1000) и хранили при 4°C.

2.2.5. Хроматографическая очистка рекомбинантных белков

Очистку белков из культуральной среды проводили последовательно с помощью аффинной и ионообменной хроматографии. Аффинную хроматографию на сорбенте Ni-NTA проводили с помощью фосфатных буферов в соответствии с рекомендациями производителя. Затем проводили дополнительную очистку ионообменной хроматографией на соединенных последовательно колонках с катионообменным (SP-сефароза) и анионообменным (Q-сефароза) сорбентами, уравновешенными 20мМ Трис-НСl, рН 8,2. После нанесения белка колонки промывали 20мМ Трис-НСl, рН 8,2. Затем колонку с сорбентом SP-сефароза, на которую RBD не сорбируется в этих условиях (рН 8,2), отсоединяли, а белки, связавшиеся с сорбентом Q-сефароза, элюировали в линейном градиенте концентрации NaCl от 0 до 1 М в 20 мМ Трис-НСl, рН 8,2.

Фракции элюатов после каждого этапа хроматографии анализировали при помощи белкового электрофореза в денатурирующих условиях в 15% SDS-ПААГ. Фракции, содержащие целевой белок, диализовали против ФСБ и стерилизовали фильтрацией (диаметр пор фильтра 0,22 мкм). Концентрацию белка определяли на спектрофотометре NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific, США), чистоту и гомогенность оценивали с помощью Gel-Pro Analyzer, V. 3.1.

2.2.6. Эксклюзионная хроматография белков

Эксклюзионную хроматографию белка в нативном состоянии проводили путем гель-фильтрации на колонке с Sephacryl S-200 HR объемом 10 мл на хроматографе Acta Pure 150 (Cytiva, Швеция) в буфере 50 мМ NaHCO₃, рН 7,6. Колонку калибровали белками с известными молекулярными массами: лизоцим (14,3 кДа), β-лактоглобулин (18,4 кДа), альбумин яичный (45 кДа), бычий свороточный альбумин (66 кДа), γ-глобулин (150 кДа). На основании этих данных строили калибровочную кривую и использовали ее для определения молекулярного веса искомого белка.

2.2.7. Электрофорез и иммуноблоттинг

Электрофоретическое разделение белков проводили в SDS-ПААГ по Лэммли в редуцирующих и нередуцирующих условиях. Образцы белков для электрофореза в нередуцирующих условиях смешивали с равным объемом буфера для нанесения и прогревали смесь 15 мин при 95°C или 15 мин при 70°C.

Разделение белков в SDS-ПААГ проводили в камере Mini-PROTEAN (BioRad, США) при постоянном напряжении 120 V. Визуализацию белков проводили при окрашивании геля кумасси Brilliant Blue R-250.

Для иммуноблоттинга белки после разделения в SDS-ПААГ переносили на нитроцеллюлозную мембрану методом полусухого переноса при постоянной силе тока 100 мА в течение 1 ч. Мембрану инкубировали в течение ночи при 4°C в блокирующем буфере (1% казеина в ФСБТ). Затем отмывали мембрану трижды ФСБТ, добавляли специфические антитела к His-метке (1:1000) или сыворотки крови интактных или иммунизированных мышей (1:10 000) в ФСБТ и инкубировали 40 мин при комнатной температуре. Мембрану промывали ФСБТ 3-5 раз и добавляли видоспецифические вторичные антитела, конъюгированные с щелочной фосфатазой. Инкубировали мембрану 40 мин, промывали ФСБТ и добавляли субстрат BCIP/NBT. Изображения обрабатывали и анализировали с помощью системы обработки изображений IBright FL1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

Образцы белков для электрофореза в редуцирующих условиях смешивали с буфером для нанесения, содержащим 20 мМ дитиотреитола (DTT) для редукции s-s мостиков и 8 М мочевины при необходимости. Инкубировали смесь 15 мин при 70°C, затем добавляли 2-йодацетамид до финальной концентрации 20 мМ и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре для алкилирования остатков цистеина. Электродный буфер для редуцирующего электрофореза содержал 10 мМ DTT. Электрофорез и перенос на нитроцеллюлозную мембрану проводили при условиях, указанных ранее. После этого нитроцеллюлозную

мембрану инкубировали в течение 2 ч в буфере ФСБ, содержащем 10 мМ DTT, трижды промывали ФСБТ и проводили иммуноблоттинг как описано выше.

2.2.8. Ферментативное дегликозилирование белков

Дегликозилирование препарата RBD проводили с помощью фермента N-гликозидазы PNGase F, а также набора «Protein Deglycosylation Mix II», содержащего как N-гликозидазы, так и O-гликозидазы. Реакционную смесь готовили в денатурирующих и не денатурирующих условиях в соответствии с инструкцией производителя, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре и в течение ночи при 37°C. Затем анализировали препарат RBD электрофорезом в SDS-ПААГ.

2.2.9. Спектроскопия кругового дихроизма

Спектры кругового дихроизма и кривые абсорбции УФ излучения получали при комнатной температуре в буфере ФСБ (pH 7,4) на спектрополяриметре Jasco J-600 (Jasco, Япония) в интервале 185–260 нм с шагом 1 нм. Для измерений использовали круглую кварцевую кювету объемом 250 мкл и длиной оптического пути равной 0.1 мм.

Каждое измерение повторяли двадцать раз, после чего спектры усредняли.

При обработке спектров использовали стандартное программное обеспечение, поставляемое с прибором. Теоретический спектр рассчитывали с использованием веб-сервера BeStSel, основанном на декомпозиции спектра на восемь типов вторичных структур [195].

Термическую устойчивость RBD определяли с помощью КД спектроскопии в дальней УФ области в диапазоне температур 40-90°C. Температуру поддерживали путем прокачки теплоносителя жидкостного термостата ССЗ (Huber, Германия) через рубашку кюветы.

2.2.10. Жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией

Препарат белка RBD, массой 1 мг, растворяли в 200 мкл буфера для денатурации и инкубировали в течении 30 мин при 95°C. К раствору добавляли DTT в финальной концентрации 4 mM и инкубировали 30 мин при 95°C, охлаждали раствор до комнатной температуры, добавляли раствор 2-йодацетамида в финальной концентрации 15 mM и инкубировали 30 мин в темноте. Затем к раствору добавляли 1200 мкл 50 mM Трис-НСl, pH = 8,0.

Гидролиз белка трипсином (10 мкг фермента на 700 мкл раствора белка) или химотрипсином (10 мкг фермента на 700 мкл раствора белка, CaCl₂ в финальной концентрации 1 mM) проводили в течении 18 ч при 37°C. Хроматографическое разделение продуктов гидролиза RBD проводили на колонке C18, AdvancedBio Peptide Plus (Agilent) в системе растворителей: буфер А – 0,1% муравьиной кислоты в H₂O (Sigma), буфер Б – 0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле (таблица 5).

Таблица 5. Условия хроматографического разделения продуктов протеолиза RBD трипсином и химотрипсином

Время, мин	% буфера А	% буфера Б	Поток, мл/мин
0	100	0	0,2
4	95	5	0,2
44	60	40	0,2
48	5	95	0,2
52	100	0	0,2
56	100	0	0,2

Масс-спектрометрический анализ проводили с помощью времяпролетного масс-спектрометра LC/qTOF 6530 (Agilent). Анализ масс-спектров проводили в программе comet (<http://comet-ms.sourceforge.net/>). В качестве базы данных использовали аминокислотную последовательность рекомбинантного белка RBD. Поиск гликозидных модификаций проводили с помощью Comet. Алгоритм поиска автоматизировали на Python. Опорную базу данных гликозидных модификаций белка RBD взяли из работы Gstöttner с соавторами [196].

2.2.11. Малоугловое рентгеновское рассеяние

Для формирования комплекса RBD/Apt31 смешивали 0,7 мкл раствора Apt31 и 70 мкл RBD (5 мг/мл) и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре, а затем хранили при 4 °С перед анализом.

Данные МУРР для образцов RBD, Apt31 и комплекса RBD/Apt31 были получены на линии пучка BioMUR в НИЦ «Курчатовский институт» (г. Москва). Длина волны на линии луча составляла 0,14 нм, что соответствует энергии 8,58 кэВ. Расстояние от образца до детектора составляло 700 мм. Данные МУРР регистрировали детектором Dectris Pilatus1M во время экспозиций рентгеновских лучей в течение 300 с для каждого изображения. Температуру каждого образца во время экспозиции устанавливали равной 20°С. Изображения были радиально усреднены относительно центра пучка. Аптамер и белок измеряли при концентрациях 8, 4 и 2 мг/мл. Для комплекса RBD/Apt31 концентрации составляли 5, 2,5 и 1,25 мг/мл. Картина МУРР из буфера была записана и вычтена из сигнала раствора. Данные измерений МУРР при концентрациях 4 мг/мл для аптамера и белка по отдельности и 2,5 мг/мл для комплекса позволили получить монодисперсность раствора для каждого образца и рассчитать структурные параметры аптамера, белка и их комплекса. Обработка и анализ экспериментальных данных МУРР были выполнены с использованием пакета программ ATSAS.

2.2.12. Биослойная интерферометрия

Рекомбинантный белок ACE2 человека (а.о. 18Q–740S, GenBank: AF291820) химически биотинилировали пятикратным молярным избытком EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin в ФСБ в течение 1 ч при комнатной температуре. Подготовленный ACE2 и контрольный нерелевантный белок разводили до 30 мкг/мл в буфере BLI (ФСБ с 0,1% Tween-20) и наносили на стрептавидиновые стрипы в системе Octet K2 (Pall ForteBio, США). Затем добавляли RBD в концентрации 30 мкг/мл (285 нМ) для измерения кинетики ассоциации. Использовали следующую 6-ступенчатую

схему: исходный уровень 60 с, нагрузка 300 с, исходный уровень 2 30 с, ассоциация 180 с, диссоциация 320 с, регенерация 6×5 с.

2.2.13. Синтез конъюгатов RBD с полиглюкином, спермидином и дсРНК

Полиглюкин (декстран с молекулярной массой 40 кДа) активировали периодатом натрия в течение 1 ч, очищали гель-фильтрацией на сефадексе G-25, смешивали с раствором белка RBD в ФСБ и инкубировали в течение часа. Для придания конъюгату положительного заряда полиглюкин функционализировали спермидином. Для этого к раствору конъюгата RBD с полиглюкином добавляли растворы спермидина и боргидрида натрия, инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч и очищали полученный конъюгат RBD-ПГС гель-фильтрацией на сефадексе G-25, уравновешенном ФСБ.

В качестве ядра для формирования частиц использовали препарат двуцепочечной РНК, выделенной из киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* Y 448. Препарат дсРНК смешивали с конъюгатом RBD-ПГС и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч.

Эффективность образования комплексов RBD-ПГС+дсРНК оценивали по изменению электрофоретической подвижности дсРНК в 1% агарозном геле и белка в 15% SDS-ПААГ и с помощью электронной микроскопии (JEM 1400 electron microscope, Jeol, Япония).

2.2.14. Иммунизация животных

Эксперименты с использованием животных были одобрены на заседании Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Разрешение ГНЦ ВБ «Вектор»/10-09.2020, утверждено протоколом Биоэтической комиссии №5 от 01.10.2020) и выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Все растворы и препараты для инъекций подвергали стерилизующей фильтрации через фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

В первом эксперименте группы мышей BALB/c ($n = 8$ животных в группе), кроликов породы Шиншилла ($n = 6$), сирийских хомячков ($n = 10$) и хорьков ($n = 6$) иммунизировали дважды с трехнедельным интервалом дозой 50 мкг RBD с $Al(OH)_3$. Инъекции препарата вводили внутримышечно, по полдозы иммуногена в оба бедра.

Во втором эксперименте определяли влияние дозы иммуногена RBD на иммунный ответ у сирийских хомячков. Группы животных ($n = 4$) получали 10, 50 или 250 мкг RBD с гидроокисью алюминия внутримышечно двукратно с интервалом 14 дней.

В третьем эксперименте оценивали эффект адъювантов на иммунный ответ на RBD. Группы мышей линии BALB/c иммунизировали дважды 50 мкг RBD с различными адъювантами. Первая группа получила RBD с гидроокисью алюминия, вторая группа получила RBD с неполным адъювантом Фрейнда, третья группа получила RBD, конъюгированный с комплексом полиглюкин-спермидин и дсРНК киллерного штамма дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* в качестве адъюванта. Четвертая группа получала RBD, конъюгированный с комплексом полиглюкин-спермидин. Две контрольные группы получали голый белок RBD и ФСБ соответственно.

Во всех экспериментах через две недели после каждой иммунизации получали образцы крови животных, инкубировали в течение 1 ч при $37^{\circ}C$ и 2 ч при $4^{\circ}C$, а затем центрифугировали при $7000 \times g$ в течение 10 мин. Сыворотку собирали и дезактивировали нагреванием в течение 30 мин при $56^{\circ}C$ и хранили при $-20^{\circ}C$. Для изучения Т-клеточного иммунного ответа после декапитации из селезенки мышей выделяли спленоциты и культивировали для последующих анализов ELISpot и ICS.

2.2.15. Твердофазный иммуноферментный анализ

Титры специфических антител в сыворотках людей и животных определяли в прямом ИФА.

Препараты RBD или тримеров S-белка (1 мкг/мл), либо лизат вируса SARS-CoV-2 штамм SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020 сорбировали в лунках 96-луночного планшета в ФСБ при 4°C в течение ночи. Затем отмывали буфером ФСБТ и блокировали 1% раствором казеина в буфере ФСБТ в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого образцы сывороток вносили в трёхкратном последовательном разведении и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Затем добавляли антитела конъюгированные с пероксидазой хрена. После каждого этапа проводили отмывку не связавшихся белков буфером ФСБТ. Затем вносили раствор субстрата ТМВ и инкубировали в течение 10 мин, реакцию терминировали раствором 1Н HCl и сразу измеряли оптическую плотность при длине волны 450 нм на планшетном ридере Varioskan Lux multimode microplate reader (Thermo Fisher Scientific, США). Графики строили с помощью программы GraphPad Prism 8.0.

Для изучения взаимодействия RBD и нейтрализующих моноклональных антител использовали метод конкурентного ИФА. Для этого к сорбированному RBD после блокировки добавляли последовательные разведения нейтрализующих моноклональных антител. После инкубации в течение 1 ч при 37°C, лунки трижды отмывали ФСБТ и добавляли биотинилированный белок ACE2 (100 нг/лун), инкубировали 1 ч при 37°C. После отмывки вносили стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем вносили субстрат ТМВ, терминировали реакцию раствором 1Н HCl и регистрировали сигнал как описано выше.

2.2.16. Анализ ингибирования цитопатического действия вируса

Титры нейтрализующих антител в сыворотках крови животных определяли с помощью анализа ингибирования цитопатического действия (ЦПД) вируса на культуре клеток Vero E6 *in vitro*.

Клетки Vero E6 высевали в 96-луночные культуральные планшеты в полной ростовой среде MEM и культивировали в течение 24 ч до образования монослоя. Серийные двукратные разведения образцов сыворотки (от 1/10 до 1/5120) смешивали с равными объемами вирусной суспензии, содержащей 100 TCID₅₀

штамма коронавируса SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020. Смесь инкубировали при 37 °С в течение 1 ч, затем добавляли к клеткам Vero E6. Планшеты инкубировали в течение 4 суток при +37°C, 5% CO₂, затем проводили окрашивание клеток. Для этого в каждую лунку планшета вносили по 150 мкл 0,2% раствора генцианвиолета. Через 30 мин удаляли жидкость из лунок и промывали водой. Наличие специфического цитопатического действия (ЦПД) оценивали визуально при микроскопическом исследовании. Титром сыворотки считали ее разведение, при котором регистрировали защиту в 50% лунок с культурой клеток от ЦПД вируса.

Расчет титра нейтрализующих антител проводили по формуле Рида-Менча [197].

2.2.17. Анализ ELISpot

Селезенки иммунизированных мышей извлекали, измельчали и пропускали под прессом через сетчатый нейлоновый фильтр с размером пор 70 мкм (BD Falcon, США) для получения спленоцитов. Эритроциты удаляли с помощью лизирующего буфера ACK Lysing Buffer. Затем проводили анализ ELISpot с использованием набора Mouse IFN γ ELISPOT Set согласно инструкции производителя. Для этого в лунки 96-луночных планшетов сорбировали антитела FITC Rat Anti-Mouse CD8a, PE Hamster Anti-Mouse CD3e и APC Rat Anti-Mouse IFN γ , блокировали средой RPMI и вносили суспензию спленоцитов в концентрации $1,0 \times 10^6$ клеток на лунку. В лунки добавляли смесь пептидов (20 мкг/лун каждого), входящих в состав RBD (таблица 2), и культивировали в течение 20 ч при 37°C, 5% CO₂. Затем планшеты отмывали ФБС и добавляли биотинилированные антитела против мышинового IFN γ , после инкубации отмывки добавляли конъюгат стрептавидин-HRP. Для идентификации IFN γ -продуцирующих клеток, добавляли субстрат для HRP и подсчитывали количество окрашенных клеток с помощью ELISpot-ридера (Carl Zeiss, Germany).

2.2.18. Внутриклеточное окрашивание цитокинов (ICS)

Спленоциты, выделенные от иммунизированных мышей, стимулировали в суспензии пептидами из состава RBD, как описано выше. Затем к активированным спленоцитам добавляли ингибитор транспорта белков (Cytofix/Cytoper Plus Fixation/Permeabilization Kit) и инкубировали в течение 5 ч в CO₂-инкубаторе. Клетки отделяли центрифугированием 5 мин 1600 об/мин при +4°C и дважды промывали ФСБ. Надосадочную жидкость удаляли и проводили фиксацию и пермеабиллизацию мембраны клеток с использованием набора Cytofix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit. В темноте к клеткам добавляли 250 мкл буфера Cytofix/Cytoperm и инкубировали 20 мин при комнатной температуре. Клетки отделяли центрифугированием и дважды отмывали 750 мкл промывочного буфера. Осадок ресуспендировали в 80 мкл промывочного буфера и добавляли моноклональные антитела: PerCP Rat AntiMouse CD4 (2 мкл/1 млн клеток), FITC Rat Anti-Mouse CD8a (2 мкл/1 млн клеток), PE Hamster Anti-Mouse CD3ε (1 мкл/1 млн клеток), APC Rat AntiMouse IFN γ (3 мкл/1 млн клеток). Клетки инкубировали с моноклональными антителами в течение 30 мин при +4°C, промывали промывочным буфером и ресуспендировали в 350 мкл ФСБ. После этого проводили анализ клеток на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (Becton Dickinson, США).

2.2.19. Статистическая обработка результатов

Все статистические анализы выполняли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8.0. Статистическую значимость при сравнении разных групп животных определяли с помощью двустороннего непараметрического U-критерия Манна-Уитни с доверительным интервалом 95% или критерия Краскела-Уоллиса (для >2 групп). При $p < 0,05$ разницу считали статистически значимой.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Конструирование плазмидного вектора pVEAL2-RBD для экспрессии RBD S-белка SARS-CoV-2 в клетках млекопитающих

На первом этапе в интегративном плазмидном векторе pVEAL заменили фактор резистентности к антибиотику Zeocin на фактор резистентности к пурамицину и тем самым получили вектор pVEAL2, который позволяет ускорить процесс отбора трансформантов.

Нуклеотидную последовательность гена S-белка SARS-CoV-2 штамма Wuhan-Hu-1 (GB:MN908947) оптимизировали по кодонному составу для экспрессии в клетках китайского хомячка (*Cricetulus griseus*) и синтезировали полученную последовательность в ООО «ДНК-синтез» (Москва). Фрагмент ДНК, кодирующий домен RBD S-белка (а.о. 308V–541F), амплифицировали в перекрывающейся ПЦР, 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 по сайтам рестрикции Sfr274I и Sall (рисунок 8).

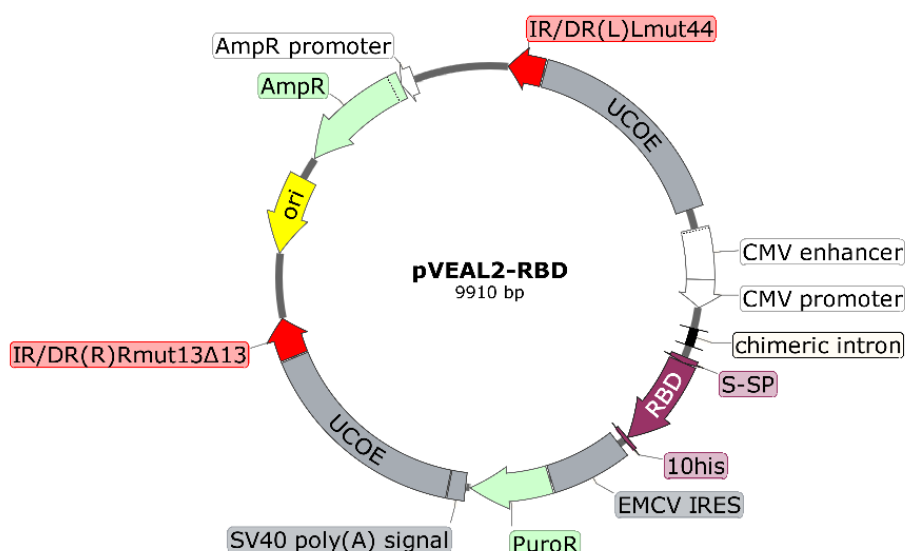


Рисунок 8. Карта рекомбинантной плазмиды pVEAL2-RBD: S-SP – сигнальный пептид S-белка SARS-CoV-2, EMCV IRES – участок внутренней посадки рибосомы, PuroR – фактор устойчивости к пурамицину, UCOE – элементы, предотвращающие хромосомное «замалчивание» экспрессионной кассеты, IR/DR – сайты рекомбинации транспозона Sleeping Beauty.

Нуклеотидную последовательность плазмиды pVEAL2-RBD подтверждали с помощью секвенирования по методу Сэнгера и затем клонировали плазмидную ДНК в клетках *E.coli* NEB stable.

3.2. Разработка штамма CHO-K1-RBD – продуцента RBD SARS-CoV-2

Штамм-продуцент RBD получали на основе клеточной линии CHO-K1. Для этого проводили ко-трансфекцию клеток плазмидой pVEAL2-RBD и плазмидой pCMV(CAT)T7-SB100, кодирующей транспозазу SB100, которая обеспечивает интеграцию экспрессионной кассеты вектора в геном клеток. Клоны-трансформанты отбирали под селективным давлением антибиотика пурамицина.

Иммуноблоттинг белков лизата клеток и культуральной среды с антителами к His-метке подтвердил секрецию RBD в культуральную среду (рисунок 9).

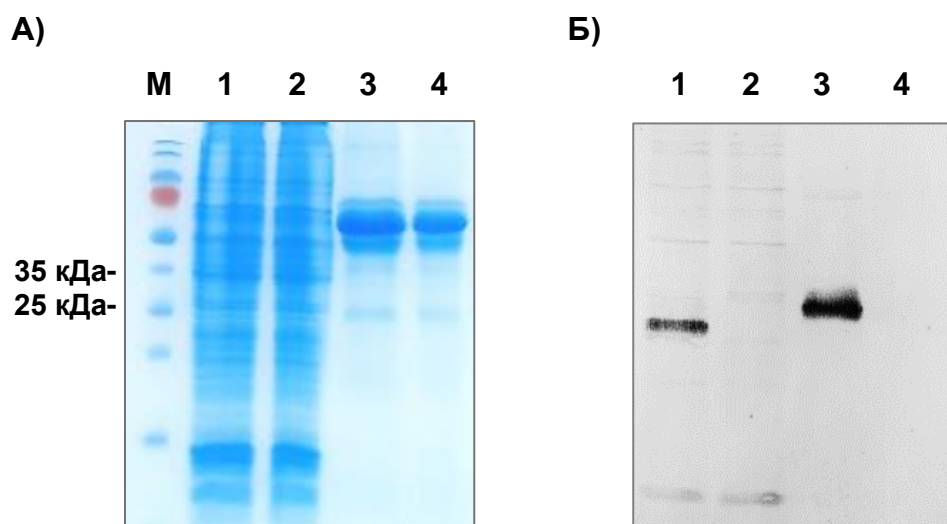


Рисунок 9. Разделение белков клеток и культуральной среды CHO-K1 и CHO-K1-RBD в 10% SDS-ПААГ при окрашивании кумасси (А) и иммуноблоттинг (Б) указанных белков с антителами к His-метке: М – маркер молекулярной массы (PageRuller 10-180 kDa, Thermo Scientific), 1 и 2 – образцы лизатов клеток CHO-K1-RBD и CHO-K1 соответственно, 3 и 4 – образцы культуральной среды клеток CHO- K1-RBD и CHO-K1.

Белок RBD в культуральной среде имеет молекулярную массу ~33 кДа при расчетной 27,8 кДа, что свидетельствует о вероятном гликозилировании белка. Как можно заметить на рисунке 9, в клеточном экстракте белок имеет меньшую молекулярную массу, это свидетельствует о том, что заключительный этап гликозилирования молекул RBD происходит при выходе белка из клеток.

Чтобы увеличить выход RBD, из пула полученных клеток отобрали наиболее продуктивные клоны продуцентов. Для этого клетки CHO-K1-RBD рассеивали в концентрации 1 клетка на лунку в 96-луночные культуральные планшеты и, после формирования единичных колоний, анализировали культуральную среду с помощью «сэндвич»-ИФА с использованием двух препаратов моноклональных антител: специфичных к His-метке и специфичных к RBD. Клон, показавший наибольшее значение оптической плотности в «сэндвич»-ИФА, масштабировали и культивировали на роллерных бутылках.

3.3. Очистка и характеристика препарата рекомбинантного RBD, полученного в клетках CHO-K1

Очистку RBD из культуральной среды продуцента CHO-K1-RBD проводили с помощью металл-хеллатной аффинной хроматографии на сорбенте Ni-NTA и последующей ионообменной хроматографии на SP-сефарозе и Q-сефарозе. Препарат очищенного RBD анализировали с помощью электрофореза в SDS-ПААГ в нередуцирующих и редуцирующих условиях и иммуноблоттинга (рисунок 10, 11).



Рисунок 10. 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. Денситометрический анализ выполнен с помощью программного обеспечения ImageJ.

В нередуцирующих условиях на электрофореграмме наблюдали мажорный бэнд с ожидаемой молекулярной массой ~33 кДа и минорные бэнды ~55 и ~100 кДа (рисунок 10, А). При иммуноблоттинге белков с антителами к His-метке также наблюдали бэнды массой более 100 кДа (рисунок 10, Б).

Затем анализировали препарат RBD в редуцирующих условиях. Для разрыва дисульфидных связей между остатками цистеина образцы белка обрабатывали восстанавливающим агентом 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 11, 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 11, Б-В).

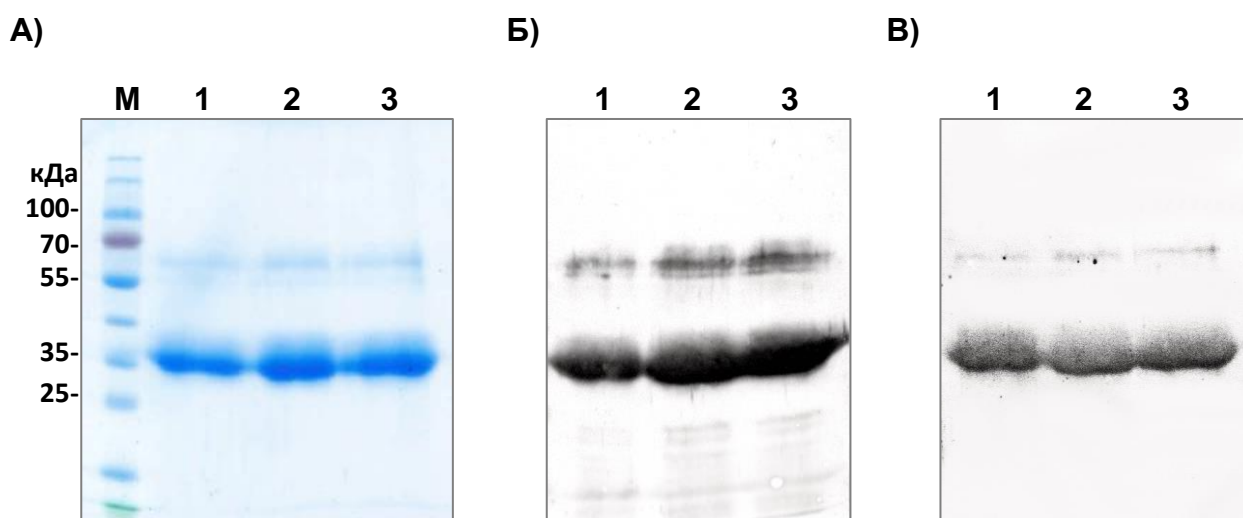


Рисунок 11. Анализ препарата RBD в 10% SDS-ПААГ в редуцирующих условиях (А), иммуноблоттинг с антителами к His-метке (Б) и гипериммунной сывороткой мыши (В): М – маркер молекулярной массы (PageRuller 10-180 kDa, Thermo Scientific). Нанесены: RBD после обработки DTT (1), RBD после обработки DTT и 2-йодацетамидом (2), RBD после денатурации в присутствии 8 М мочевины и DTT с последующей обработкой 2-йодацетамидом (3).

Чтобы оценить наличие гликозилирования, препарат RBD обрабатывали N-гликозидазой PNGase или реагентом для дегликозилирования Protein Deglycosylation Mix II (New England Biolabs), содержащим N- и O-гликозидазы. При этом наблюдали сдвиг электрофоретической подвижности RBD, свидетельствующий о наличии как N-, так и O-гликозилирования белка (рисунок 12).

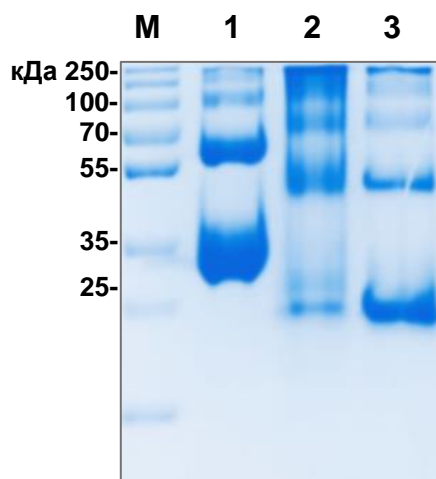


Рисунок 12. Анализ RBD в 6 % SDS-ПААГ в нередуцирующих условиях после ферментативного дегликозилирования: 1 – исходный препарат RBD, 2 – RBD после обработки N-гликозидазой PNGase F, 3 – RBD после обработки коктейлем N- и O-гликозидаз (Protein Deglycosylation Mix II, New England Biolabs).

Нативный препарат RBD анализировали с помощью эксклюзионной хроматографии на колонке с сефакрилом 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 13, А-Б). Анализ собранных фракций в SDS-ПААГ вновь показал присутствие разных форм в каждой из фракций с преобладанием мономера (рисунок 13, В).

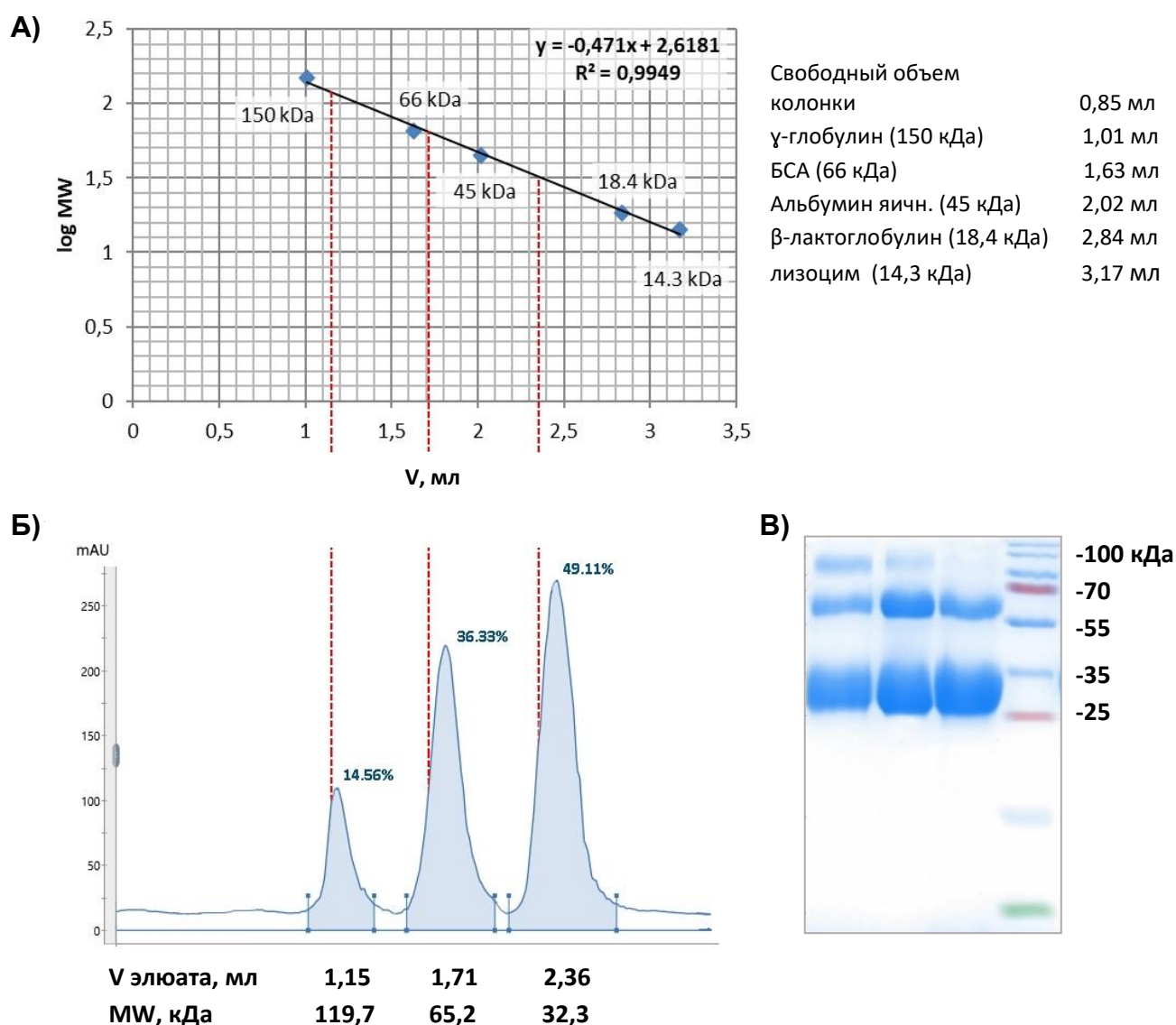


Рисунок 13. А-Б. Калибровочная кривая и хроматограмма гель-фильтрации препарата RBD на сефакиле S-200. **В.** Анализ собранных фракций в 15% SDS-ПААГ: М – маркер молекулярного веса (PageRuler 10-250 kDa, Thermo Scientific), 1-3 – фракции RBD, в том же порядке, что и пики хроматограммы.

Интересно, что при повторной гель-фильтрации каждой из собранных фракций, на хроматограмме снова наблюдали три соответствующих пика (данные не показаны). Таким образом, можно предположить, что мономерная и мультимерные формы RBD находятся в динамическом равновесии в растворе.

3.4. Первичная структура рекомбинантного RBD

Первичную структуру RBD, полученного в клетках CHO-K1, анализировали методом LC-MS/MS (жидкостная хроматография с tandemной масс-спектрометрией). Для этого проводили гидролиз белка RBD с помощью двух

протеаз: трипсина и химотрипсина. Затем разделяли и анализировали полученные пептиды в LC-MS/MS (Приложение 2). Было установлено, что полученный RBD состоит из 244 а.о. соответствующих расчетной последовательности (за исключением трех неидентифицированных а.о.) (рисунок 14).

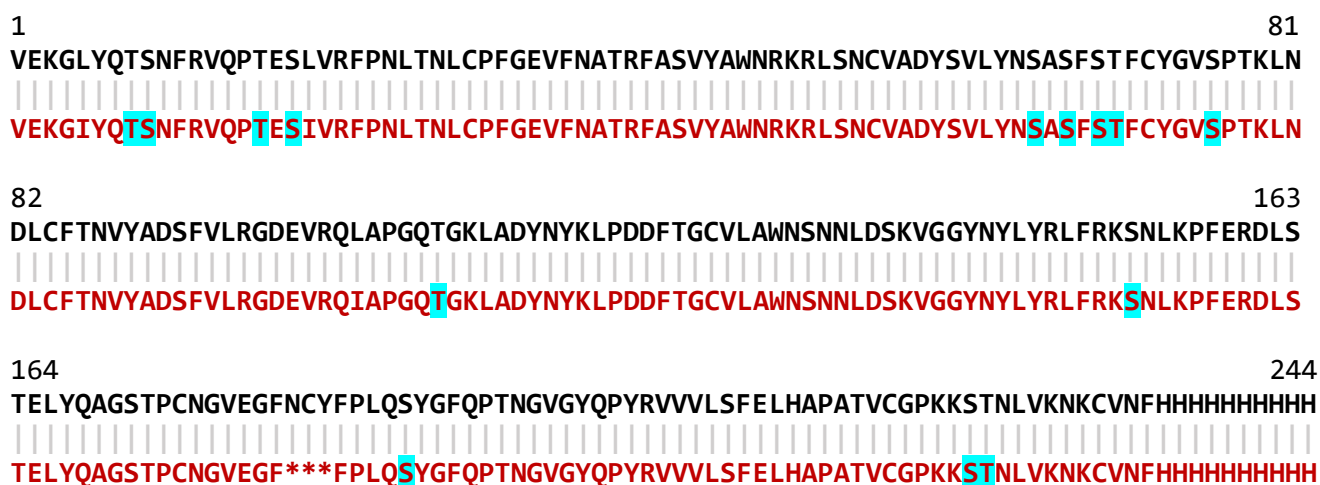


Рисунок 14. Результирующее покрытие RBD идентифицированными пептидами – продуктами гидролиза рекомбинантного RBD трипсином и химотрипсином: черным шрифтом обозначена расчетная аминокислотная последовательность, красным шрифтом – а.о., покрытые идентифицированными пептидами, * - неидентифицированные а.о. Голубым цветом выделены потенциальные сайты O-гликозилирования, полученные при анализе LC-MS/MS спектров с использованием базы данных из статьи Gstöttner С. с соавторами [196].

Была предпринята попытка определить вероятные сайты гликозилирования полученного RBD с помощью идентификации полученных спектров с данными из публикации Gstöttner С. с соавторами [196]. Алгоритм поиска включал идентификацию спектров трипсинолизата и химотрипсинолизата RBD со 130-ю единичными модификациями из сформированной базы данных, выбор девяти модификаций (допустимое программным обеспечением число) с наилучшими критериями качества и идентификацию спектров трипсинолизата и химотрипсинолизата RBD с девятью выбранными модификациями. Таким образом было установлено 12 вероятных сайтов O-гликозилирования, два из которых (T16, S18) часто фигурируют в литературе (рисунок 14). Кроме того, были определены потенциальные гликозидные модификации аминокислотных остатков

(Приложение 2). Определить вероятные сайты N-гликозилирования с помощью данного подхода не удалось.

3.5. Вторичная и третичная структуры рекомбинантного RBD

Вторичную структуру RBD исследовали с помощью спектроскопии 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 [198]. Согласно данным КД, вторичная структура RBD содержит антипараллельные β -складчатые структуры (45,8), α -спирали (15,9%) и повороты (7,2%) (рисунок 15).

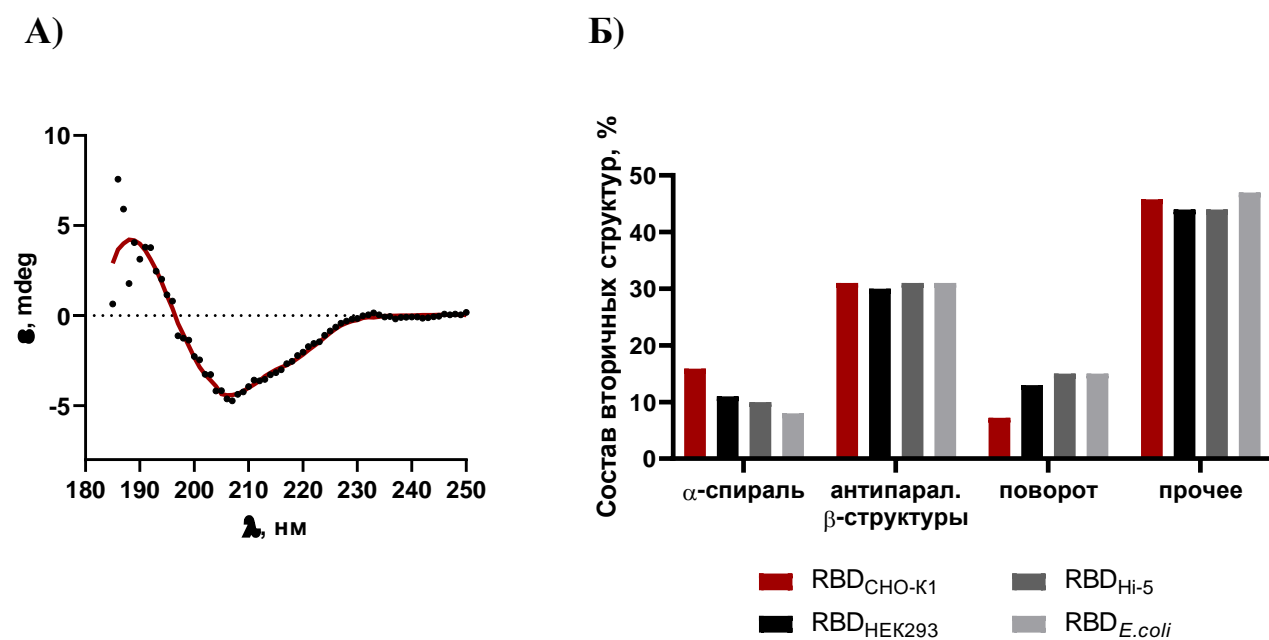


Рисунок 15. Анализ вторичной структуры рекомбинантного RBD методом кругового дихроизма (КД). **А.** Спектры КД RBD в ФСБ (рН 7,4) при комнатной температуре. **Б.** Состав вторичных структур RBD, полученного в клетках CHO-K1, а также вариантов RBD, полученных с помощью человеческой клеточной линии HEK293, клеток насекомых HI-5 и бактерий *E.coli* BL21 по данным статьи Maffei с соавторами [199].

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 [200]. Небольшую разницу в содержании вторичных структур можно объяснить различием первичной

структуры молекул RBD, а также сниженным отношением сигнал/шум, наблюдаемым ниже $\lambda=210$ нм.

С помощью КД исследовали структурные изменения RBD в диапазоне температур 40-90°C (рисунок 16). При температурной денатурации при 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, полученного примерно на $\lambda=208$ нм и положительного при $\lambda=230$ нм. Температура плавления (T_m) RBD составила $47,82 \pm 0,17^\circ\text{C}$.

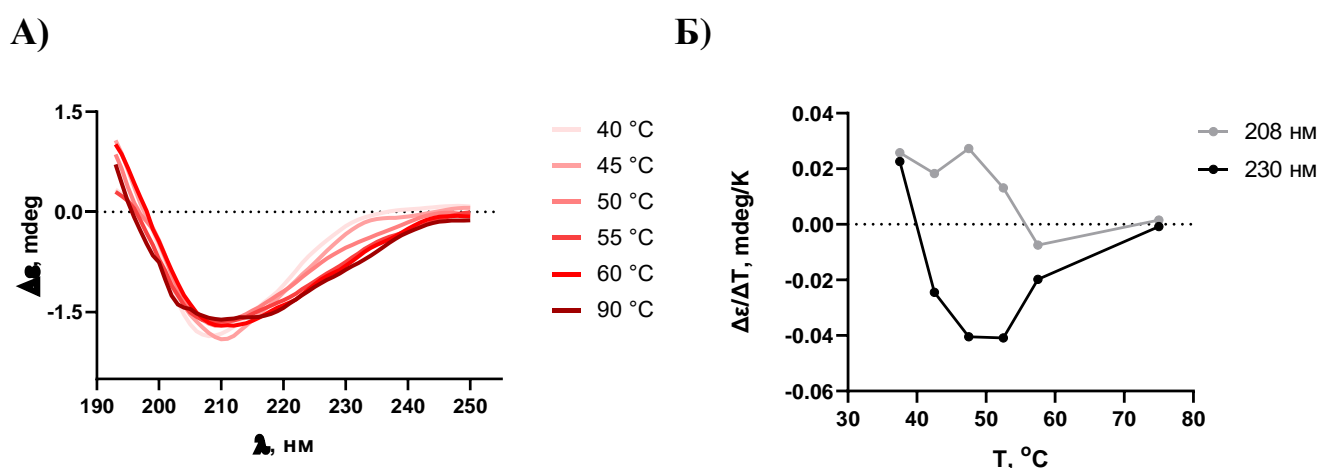


Рисунок 16. А. Температурная серия спектров КД белка RBD. Б. Изменение эллиптичности на длинах волн 208 и 230 нм при температурной денатурации RBD.

Затем с помощью метода малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР) проводили анализ параметров третичной структуры RBD. По данным МУРР RBD в растворе ФСБ (рН 7,0) 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. С помощью МУРР оценивали взаимодействие полученного RBD со специфическим РНК-аптамером Art31. Аптамер был рассчитан с помощью метода моделирования молекулярной динамики на основе геометрических параметров RBD SARS-CoV-2 из базы данных PDB (6M0J) [201]. Как видно из графиков на рисунке 17, комплекс Art31/RBD имеет отличный от отдельных молекул белка и РНК радиус и фактор формы, что свидетельствует о специфическом взаимодействии RBD и аптамера Art31.

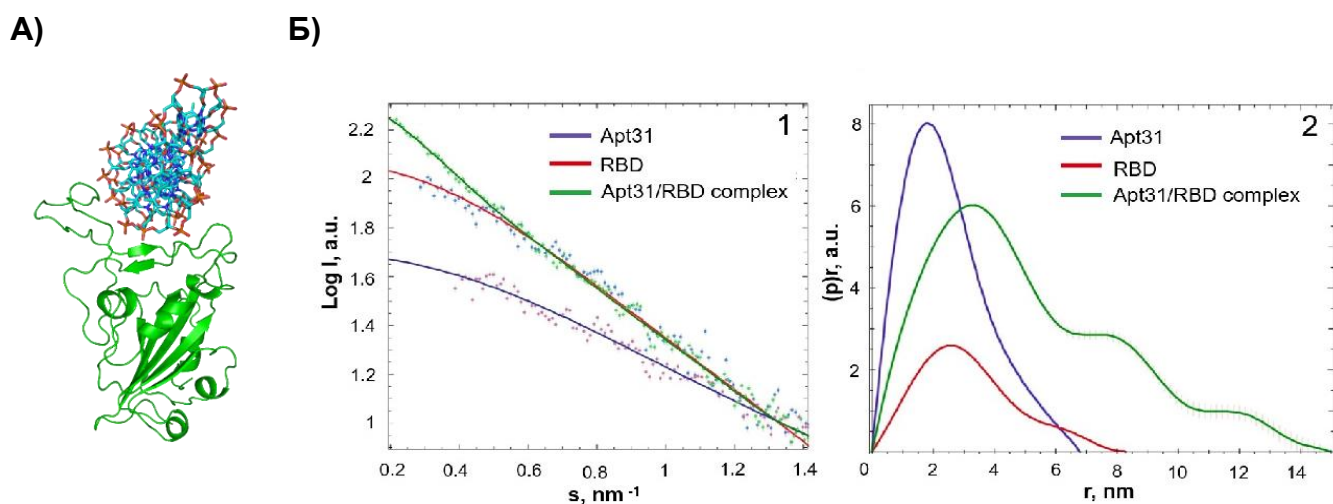


Рисунок 17. А. Модель комплекса Apt31/RBD. Б. Кривые МУРР (Б.1) и функции распределения парных расстояний $p(r)$ в реальном пространстве (Б.2) для РНК-аптамера Apt31, RBD и их комплекса.

3.6. Взаимодействие RBD с клеточным рецептором ACE2

Взаимодействие RBD с рекомбинантным рецептором ACE2 анализировали в режиме реального времени с помощью метода биослойной интерферометрии. Для этого рекомбинантный человеческий ACE2, меченый биотином, иммобилизовали на поверхности биосенсоров, покрытых стрептавидином, и добавляли раствор RBD в буфере ФСБ. При обработке полученных данных, было установлено, что RBD связывается с ACE2 с наномолярным сродством, равновесная константа диссоциации (KD) составила 58.2 ± 1.3 нМ (рисунок 18).

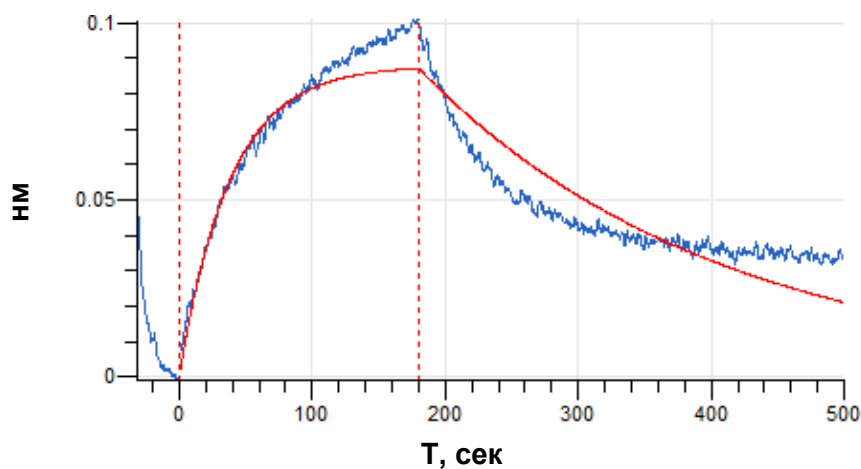


Рисунок 18. Сенсограмма связывания RBD с иммобилизованным ACE2 при исследовании методом биослойной интерферометрии.

3.7. Взаимодействие RBD с сыворотками реконвалесцентов COVID-19 и нейтрализующими моноклональными антителами

В ИФА оценивали взаимодействие RBD, полученного в клетках CHO-K1, с сыворотками реконвалесцентов COVID-19 (рисунок 19). В качестве положительного контроля использовали препарат рекомбинантного тримера S-белка SARS-CoV-2, полученного в отделе биоинженерии ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора [147]. 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 10, А). Это подтверждает, что домен RBD, даже при вычленении его из структуры S-белка сохраняет антигенные свойства.

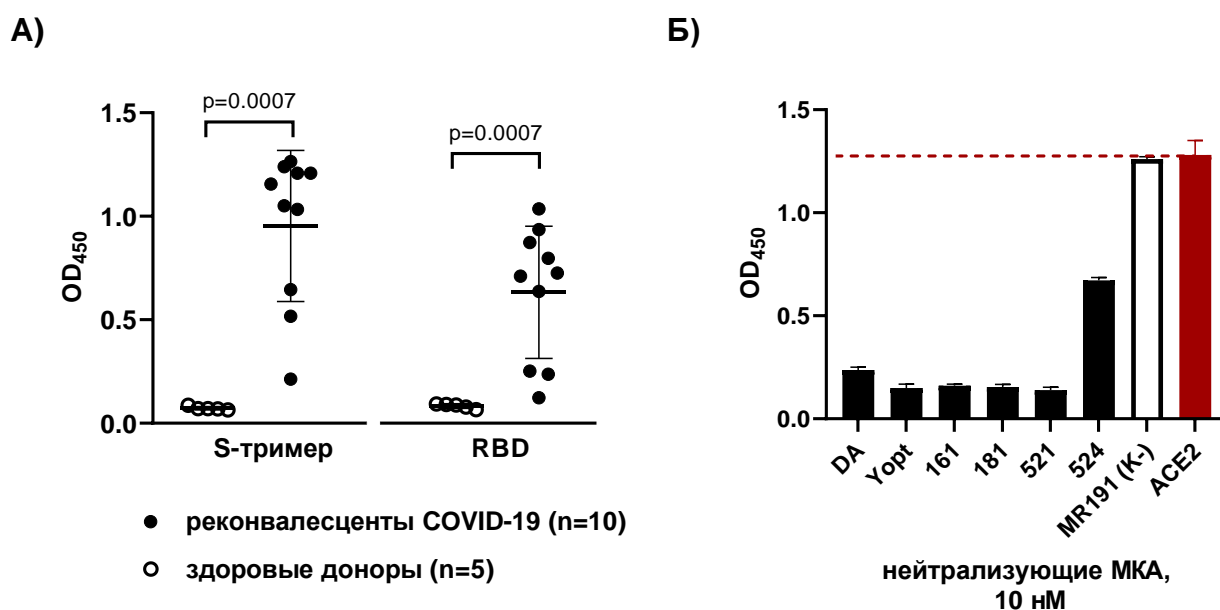


Рисунок 19. А. Взаимодействие IgG сывороток крови реконвалесцентов COVID-19 и здоровых доноров с RBD и тримером S-белка. Статистическую значимость рассчитывали с использованием U критерия Манна-Уитни. Б. Взаимодействие RBD с нейтрализующими моноклональными антителами в конкурентном ИФА с использованием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

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. В качестве отрицательного контроля использовали моноклональное антитело MR191, нейтрализующее Марбург марбургвирус. ИФА подтвердил, что антитела DA, Y, 161, 181, 521 и 524 действительно связываются с RBD, полученным в клетках CHO-K1, и тем самым блокируют его взаимодействие с рекомбинантным рецептором ACE2 (рисунок 19, Б).

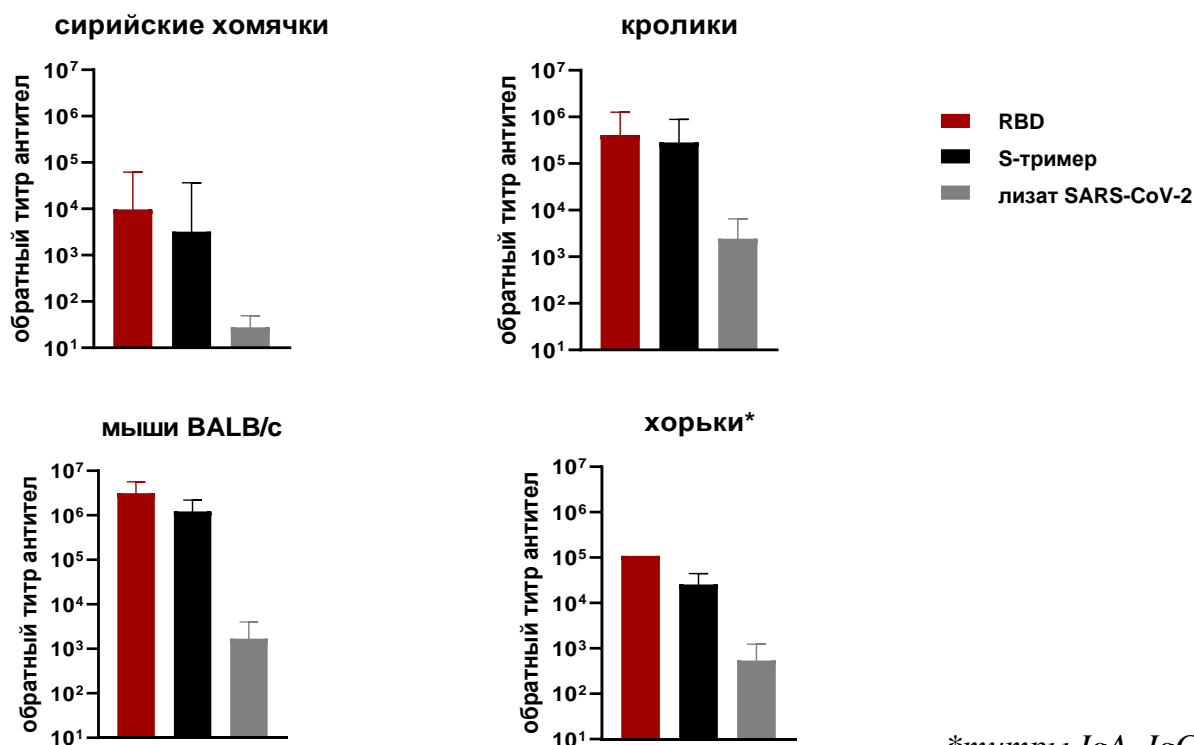
Таким образом RBD, полученный в клетках CHO-K1, воспроизводит эпитопы нативного вирусного RBD S-белка.

3.8. Гуморальный иммунный ответ на RBD у сирийских хомячков, мышей BALB/c, кроликов и хорьков

Сирийские хомячки, хорьки, мыши линии BALB/c и кролики породы Шиншилла получали внутримышечные инъекции RBD (50 мкг на животное) с гидроокисью алюминия ($Al(OH)_3$), дважды с двухнедельным интервалом. Контрольные группы животных получали инъекции ФСБ. Через две недели после второй иммунизации сыворотки крови животных исследовали на наличие специфических антител в ИФА с использованием RBD, тримеров S-белка и лизата вируса SARS-CoV-2 в качестве иммуносорбентов. Вируснейтрализующие свойства сывороток крови животных определяли в анализе ингибирования цитопатического действия (ЦПД) коронавируса штамм Victoria/1/2020 SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero *in vitro* (рисунок 20).

По результатам обоих анализов у сирийских хомячков наблюдали наименее выраженный гуморальный иммунный ответ на RBD. При этом, в отличие от других групп животных у хомячков был большой разброс титров специфических антител по данным ИФА, а в тесте на вируснейтрализующие свойства только 3 из 10 хомячков имели титр нейтрализующих антител $\geq 1/10$. Хотя мыши BALB/c, кролики и хорьки имели сравнительно высокие титры как специфических, так и нейтрализующих антител.

А)



*титры IgA, IgG, IgM

Б)

SARS-CoV-2 нейтрализующие антитела

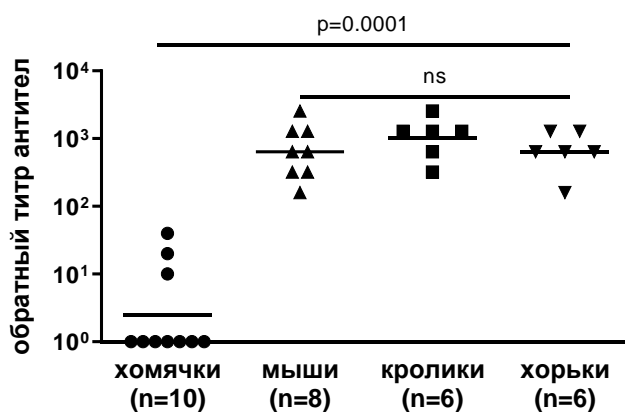
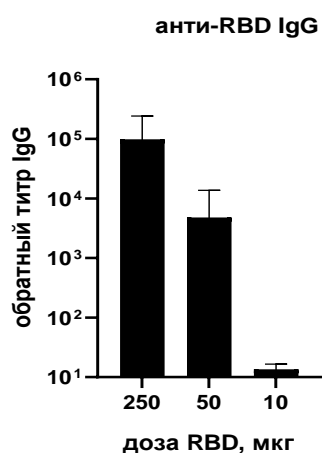


Рисунок 20. А. Титры специфических IgG у животных после двукратной иммунизации 50 мкг RBD с Al(OH)₃ в ИФА (среднее геометрическое \pm SD). За титр принимали разведение сыворотки, при котором значение OD₄₅₀ превышало среднее значение OD₄₅₀ сывороток контрольной группы + 3 SD. **Б.** Титры нейтрализующих антител в реакции ингибирования ЦПД SARS-CoV-2 (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.

В отдельном эксперименте иммунизировали группы сирийских хомячков ($n = 4$ в группе) разными дозами RBD (10, 50 и 250 мкг на животное) с гидроокисью алюминия. Было установлено, что увеличение дозы иммуногена до 250 мкг приводит к увеличению титров специфических IgG антител в крови животных, однако титры нейтрализующих антител остаются относительно низкими (рисунок 21). Сероконверсию нейтрализующих антител детектировали только у 1 из 4 животных. У группы, получавшей 10 мкг RBD, уровень специфических IgG и нейтрализующих антител был недетектируемым.

А)



Б)

SARS-CoV-2 нейтрализующие антитела

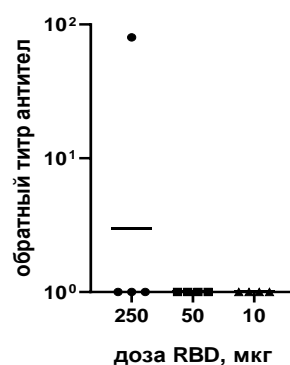


Рисунок 21. Титр RBD-специфических IgG (А) и нейтрализующих антител (Б) у хомячков ($n = 4$) после второй иммунизации разными дозами RBD (среднее геометрическое \pm SD). Отрицательные образцы (титр $< 1/10$) принимали за 1.

3.9. Динамика гуморального иммунного ответа на RBD у кроликов

Динамику специфического гуморального иммунного ответа на RBD оценивали на кроликах, дважды иммунизированных RBD из эксперимента упомянутого выше (см. раздел 3.8). Животных продолжали содержать в прежних условиях в течение 4 месяцев. Каждые ~ 2 недели получали образцы сывороток крови и анализировали титры RBD-специфических IgG в ИФА (рисунок 22). По результатам наблюдения среднегеометрический титр (GMT) RBD-специфических

IgG достигал максимума $2,8 \times 10^5$ после второй иммунизации и сохранялся на уровне $0,1 \times 10^5$ на 16-й неделе.

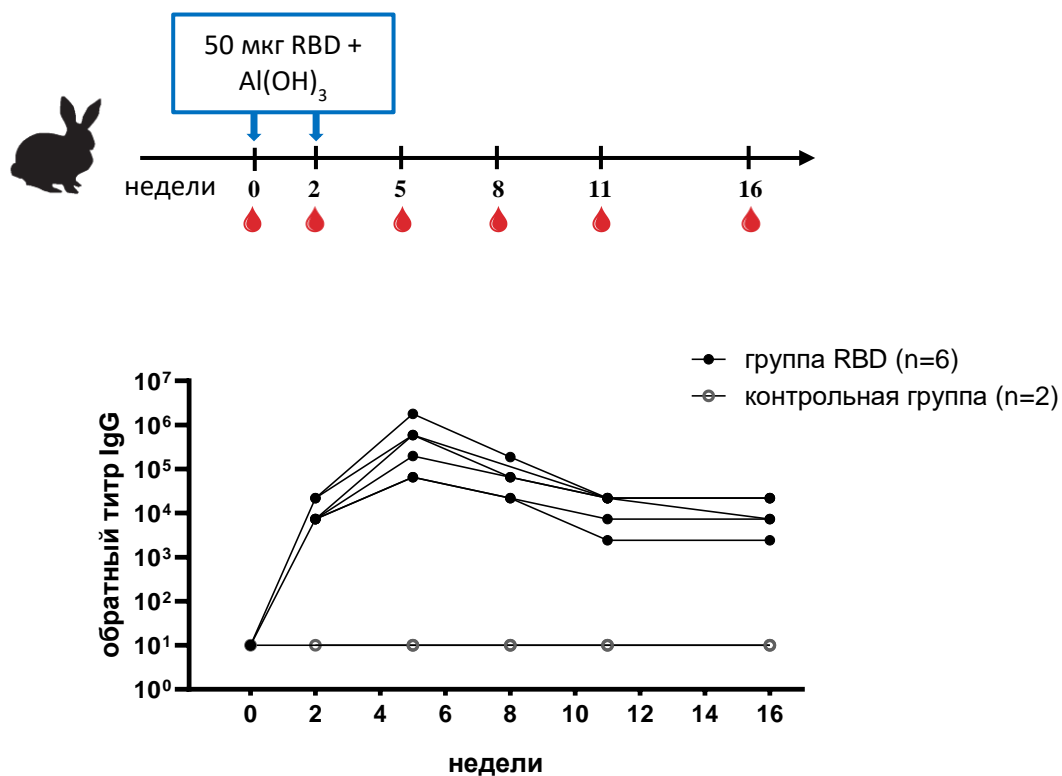


Рисунок 22. График иммунизации и индивидуальные графики динамики титров специфических IgG в сыворотке крови кроликов, иммунизированных RBD.

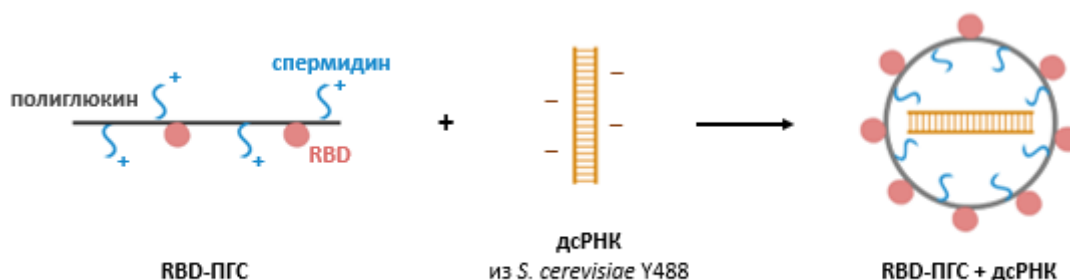
3.10. Влияние адъювантов на иммунный ответ на RBD у мышей линии BALB/c

На следующем этапе мы оценили влияние адъювантов на иммунный ответ на рекомбинантный RBD, полученный в клетках CHO-K1, в эксперименте по иммунизации мышей линии BALB/c.

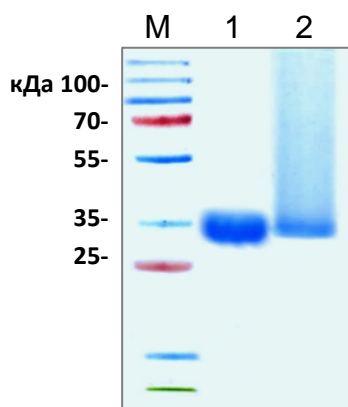
Поскольку в случае иммунизации мономерным вариантом RBD с адъювантами заметного усиления Т-клеточного иммунного ответа не наблюдают (см. раздел 1.3.2), мы разработали формат иммуногена, сочетающего природный адъювант и мультимеризацию антигенов. Для этого получали частицы, состоящие из дсРНК, выделенной из киллерного штамма *S. cerevisiae* Y 448, в оболочке из комплекса полиглюкина и спермидина, конъюгированного с RBD (рисунок 23, А). Синтез частиц включал формирование положительно заряженного комплекса

полиглюкин-спермидин (ПГС), конъюгацию комплекса с RBD и самосборку частиц при добавлении отрицательно заряженной дрожжевой дсРНК.

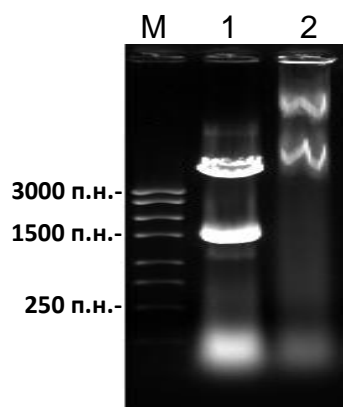
А)



Б)



В)



Г)

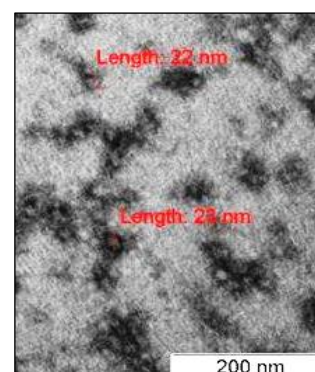


Рисунок 23. А. Схема получения конъюгата RBD с комплексом полиглюкин-спермидин и дсРНК *S. cerevisiae* Y 448. Представлена предполагаемая модель частиц. Б. Электрофорез конъюгата RBD-ПГС в 15% SDS-ПААГ: М – маркер молекулярных масс (PageRuller 10-250 kDa, Thermo Scientific), 1 – субстанция белка RBD (40 мкг), 2 – конъюгат RBD-ПГС (40 мкг). В. Электрофорез в 1% агарозном геле: М – маркер молекулярных масс, 1 – исходная субстанция дсРНК, 2 – комплекс RBD-ПГС+дсРНК. Г. Электронная микрофотография препарата RBD-ПГС+дсРНК.

Формирование комплексов RBD-ПГС+дсРНК подтверждали с помощью анализа сдвига электрофоретической подвижности белка и РНК (рисунок 23, Б-В). Методом электронной микроскопии (рисунок 23, Г) установлено, что синтезированные частицы имеют сферическую форму и размер 20-30 нм.

Затем проводили иммунизацию мышей линии BALB/с. Группам животных вводили инъекции раствора RBD с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ), RBD с гидроксидом алюминия ($Al(OH)_3$), частицы RBD-ПГС+дсРНК или конъюгата RBD-

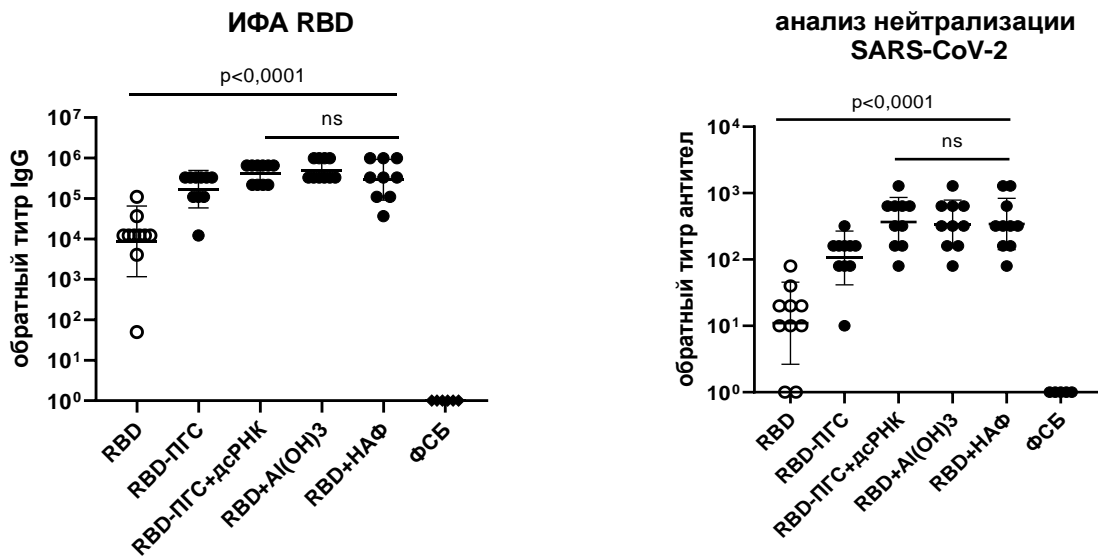
ПГС без добавления дсРНК. Контрольные группы иммунизировали ФСБ и белком RBD без каких-либо адъювантов.

После бустерной иммунизации получали сыворотки крови животных и анализировали титры RBD-специфических IgG в ИФА и нейтрализующих антител в тесте на вируснейтрализацию живого вируса SARS-CoV-2 на культуре клеток Vero.

По результатам обоих анализов существенной разницы в гуморальном иммунном ответе между группами мышей, иммунизированными частицами RBD-ПГС+дсРНК, а также RBD с адъювантами Al(OH)₃ или НАФ, выявлено не было (рисунок 24, А). Примечательно, что среднегеометрические титры (GMT) RBD-специфических IgG были в 2,5 раз выше, а титры нейтрализующих антител были в 3,5 раз выше в группе RBD-ПГС+дсРНК, чем в группе, получавшей RBD-ПГС без дсРНК.

Также оценили способность частиц RBD-ПГС+дсРНК индуцировать специфический Т-клеточный ответ. Для этого выделяли спленоциты мышей, иммунизированных частицами RBD-ПГС+дсРНК и белком RBD без адъювантов. Спленоциты культивировали и стимулировали специфическими пептидами из состава RBD, рестриктированными по главному комплексу гистосовместимости мышей. Анализ внутриклеточного окрашивания цитокинов (ICS) на антиген-специфическую секрецию IFN- γ в популяциях CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток и ELISpot анализ на специфическую секрецию IFN- γ в спленоцитах мышей показали, что конъюгат RBD-ПГС+дсРНК усиливает специфический Т-клеточный иммунный ответ у мышей линии BALB/c (рисунок 24, Б). Таким образом, гидроокись алюминия, неполный адъювант Фрейнда и конъюгат RBD-ПГС+дсРНК в равной степени усиливают гуморальный иммунный ответ на белок RBD. При этом предложенные конъюгаты RBD-ПГС+дсРНК вызывают выраженный специфический Т-клеточный иммунный ответ на RBD у мышей.

А)



Б)

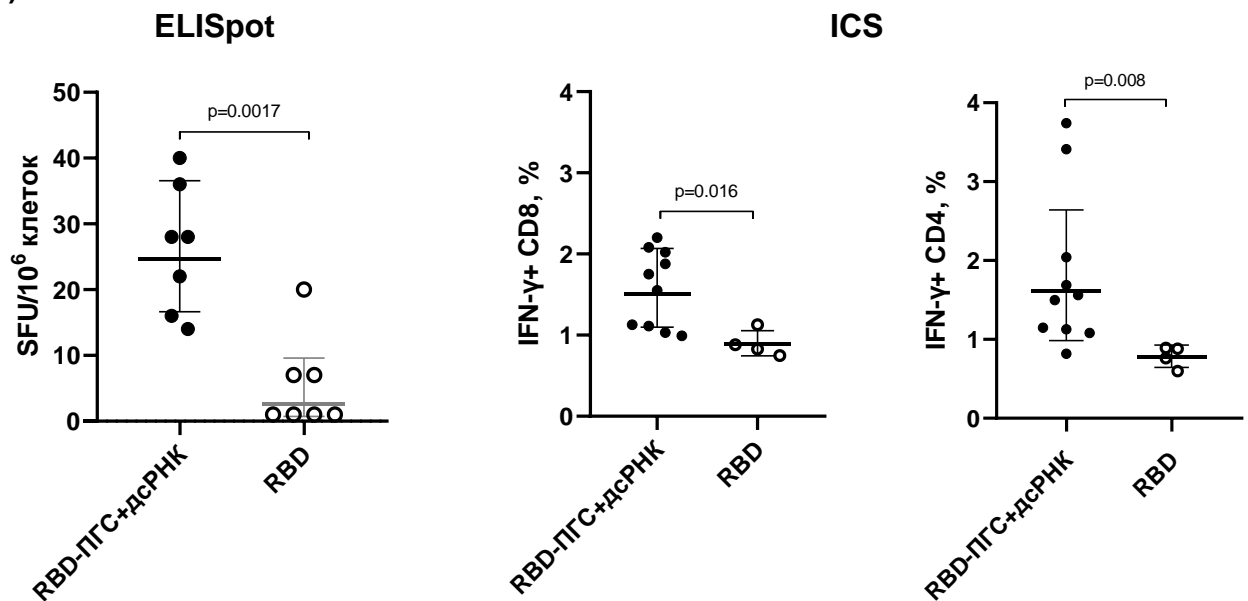


Рисунок 24. А. Гуморальный иммунный ответ на конъюгат RBD-ППГ+дсРНК у мышей BALB/c: титры RBD-специфических IgG в ИФА и нейтрализующих антител (100 TCID₅₀ SARS-CoV-2/Victoria/1/2020). Б. Т-клеточный иммунный ответ на конъюгат RBD-ППГ+дсРНК у мышей BALB/c: количество спленоцитов, высвобождающих IFN- γ 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 ICS. 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).

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

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

Клеточная линия CHO-K1 – субклон линии CHO, полученной Т.Т. Риск с коллегами из биопсийного материала яичника взрослого китайского хомячка [202]. В отличие от материнской линии, клетки CHO-K1 являются ауксотрофами по пролину, что позволяет использовать систему селекции без антибиотиков при получении трансгенных клеточных культур. В 2012 году был секвенирован геном CHO-K1 и обнаружено, что многие гены, связанные с проникновением вирусов, не экспрессируются в CHO-K1, это объяснило устойчивость клеточной линии к некоторым вирусам [203]. Контаминация вирусами человека является главным недостатком человеческих клеточных линий при производстве биофармацевтических препаратов. Хотя вирусные частицы можно инактивировать или удалить, например с помощью нанофильтрации, эти дополнительные этапы увеличивают производственные затраты. Кроме того, человеческие клеточные линии представляют умеренную опасность для здоровья работников производственных предприятий и поэтому требуют более строгих мер по локализации и безопасности [204].

Если линии клеток человека наиболее популярны для получения белка в исследовательских целях (так было и в случае RBD SARS-CoV-2), то субклоны CHO подходят для масштабирования процессов производства белка, поскольку они обладают непревзойденными технологическими характеристиками: легкой адаптацией к составу среды и методам культивирования, устойчивостью к изменениям концентрации кислорода, pH, температуры и давления. Кроме того клетки CHO-K1 имеют долгую историю одобрения регулирующими органами для продукции терапевтических рекомбинантных белков [205]. А по сравнению с другими часто используемыми линиями CHO-S и CHO-DG44 метаболизм клеток CHO-K1 в большей степени направлен на экспрессию белка, чем на образование биомассы [206].

Таким образом, получение продуцента RBD SARS-CoV-2 на основе линии CHO-K1 имеет важное практическое значение. При этом получение стабильных продуцентов предпочтительнее, поскольку в этом случае экспрессионную кассету интегрируют в геном клеток и получают трансгенную перевиваемую культуру клеток, которая обеспечивает стабильный и высокий выход целевого белка и в отличие от транзientно трансфицированных продуцентов может быть масштабирована для культивирования в промышленных масштабах.

В данной работе для получения продуцента RBD SARS-CoV-2 на основе клеточной линии CHO-K1 использовали интеграционный плазмидный вектор pVEAL, разработанный ранее в нашей лаборатории, который основан на системе транспозона *Sleeping Beauty* [193]. В векторе pVEAL мы заменили фактор резистентности к антибиотику Zeocin на фактор резистентности к пуромицину, что позволило ускорить процесс селекции трансформантов с 2-3 недель до 3 дней. Вектор получил название pVEAL2 и был использован для получения рекомбинантного RBD и других белков в данной работе. На основе клеточной линии CHO-K1 с использованием данного вектора был получен штамм-продуцент CHO-K1-RBD, который обеспечивал секрецию гликозилированной формы RBD (~33 кДа) в культуральную среду (рисунок 9). При роллерном культивировании клеток продуцента CHO-K1-RBD выход белка составил до 100 мг с литра культуральной среды.

Продуцент был депонирован в Коллекцию культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Приложение 1). На вектор pVEAL2-RBD и штамм-продуцент CHO-K1-RBD был получен патент РФ [207].

4.2. Структура и физико-химические свойства рекомбинантного RBD

При биосинтезе рекомбинантных белков в гетерологичных системах экспрессии существует риск изменения структуры белка и посттрансляционных модификаций, а также риск получить препарат с высокой гетерогенностью молекул. Такие изменения могут критически влиять на свойства и функции рекомбинантных белков. Это важно учитывать, особенно при разработке тест-

систем и вакцинных препаратов. Таким образом, следующим этапом работы было изучение структуры и свойств RBD, полученного с помощью клеток CHO-K1. RBD нарабатывали методом роллерного культивирования культуры-продуцента CHO-K1-RBD и очищали из культуральной среды с помощью аффинной и последующей ионообменной хроматографии. По результатам электрофореза итогового препарата RBD в SDS-ПААГ и иммуноблоттинга мы обнаружили, что молекулы RBD склонны к мультимеризации в растворе (рисунки 10-13). В SDS-ПААГ в нередуцирующих условиях ~ 67% белка имеет ожидаемую молекулярную массу ~33 кДа, притом присутствуют минорные бенды, которые по молекулярной массе приблизительно соответствуют димерной и тримерной формам RBD. Антитела к his-метке и поликлональная сыворотка мыши, иммунизированной S-белком SARS-CoV-2, специфически взаимодействовали со всеми бэндами. При гель-фильтрации нативного препарата RBD с использованием сефакрила S-200 установлен следующий состав: 49% мономеры, 36% димеры и 15% тримеры. Однако, когда образцы каждой фракции разделяли в SDS-ПААГ в нередуцирующих условиях, в каждой из фракций снова обнаруживали три формы RBD, с преобладанием мономера (~64-75%). Интересно, что при повторной гель-фильтрации каждой из трех собранных фракций с использованием сефакрила S-200 мы наблюдали на хроматограмме 3 пика примерно с тем-же соотношением мультимеров, что и исходный препарат RBD. Таким образом можно сделать вывод, что RBD в растворе склонен к мультимеризации и его формы, вероятно, находятся в динамическом равновесии. Наибольший интерес представляет димерная форма RBD, поскольку в редуцирующих условиях ~10% RBD остается в форме димера (рисунок 11).

Об образовании мультимерных форм при синтезе рекомбинантных вариантов RBD ранее сообщали и другие исследователи [158, 194, 195].

Во-первых, было показано, что димеры могут формироваться из-за образования межмолекулярных дисульфидных связей. Полученный в данной работе RBD включает 9 остатков цистеина (C336, C361, C379, C391, C432, C480, C488, C525 и C538). Основываясь на данных кристаллографии RBD (PDB:6M0J), 8 из указанных остатков цистеина формируют дисульфидные мостики в RBD (C336-

C361, C379-C432, C391-C525 и C480-C488). Свободный C538 может формировать дисульфидную связь с C538 другой цепи, что приводит к димеризации (рисунок 25). Формирование стабильных димеров RBD, связанных дисульфидной связью C538-C538, наблюдали для MERS-CoV RBD (E367-Y606), полученного в клетках CHO, и для SARS-CoV-2 RBD (R319-F541), полученного в бакуловирусной системе экспрессии [158, 194]. Однако в подавляющем количестве работ, в которых авторы получали подобные фрагменты RBD, не сообщалось о формировании димеров. Мономерные формы, как полагают, в таком случае образуются при цистеинилировании C538 свободным цистеином, присутствующим в культуральной среде [158, 194].

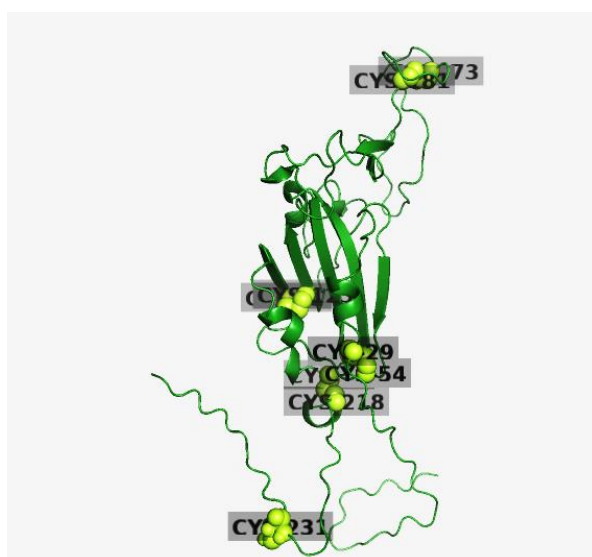


Рисунок 25. Структура RBD, предсказанная с помощью AlphaFold v2.1.0 [210]. Остатки цистеина отмечены порядковым номером в составе фрагмента RBD.

Во-вторых, объяснение феномену мультимеризации RBD в растворе можно найти в структуре самого шипа SARS-CoV-2. Так было показано, что RBD разных цепей S-тримера образуют временные солевые мостики между аминокислотными остатками, а также между аминокислотными остатками и гликанами RBD из разных цепей. При этом не менее десятка таких мостиков между RBD разных цепей образуется при переходных состояниях RBD [211]. Вероятно, аналогичные взаимодействия могут возникать и между молекулами RBD в растворе.

Тримеры RBD (R319-F541) SARS-CoV-2 наблюдали, например, при экспрессии в клетках линии HEK293, притом тримерный RBD преобладал, а димерной формы не наблюдали вовсе [209].

С помощью программы AlphaFold v2.1.0 мы предсказали вероятные модели димеров и тримеров RBD (рисунок 26) [210].

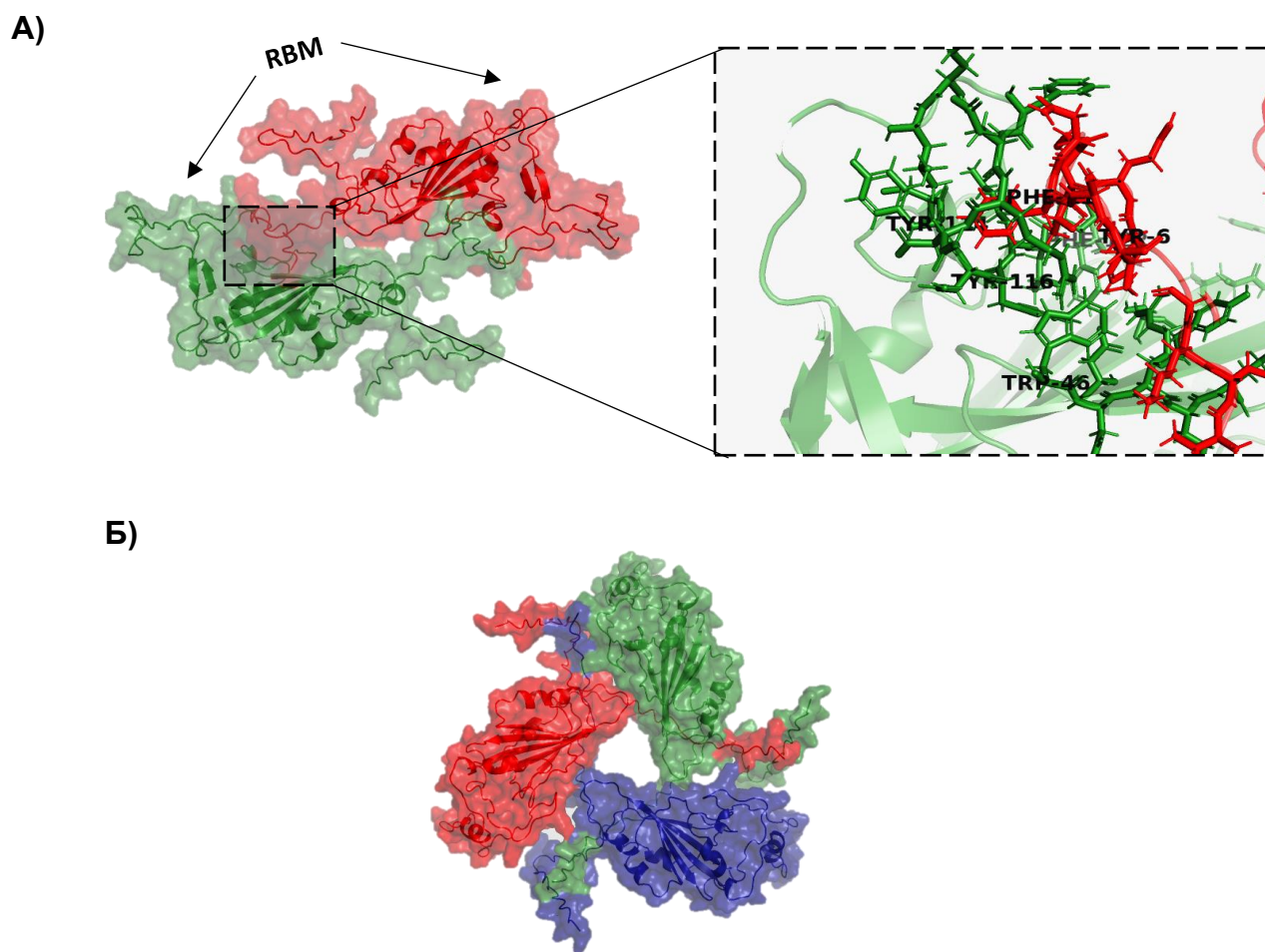


Рисунок 26. Структура димера (А) и тримера (Б) RBD, предсказанная AlphaFold v2.1.0 [210].

Анализируя полученные структуры, можно предположить, что образование димеров и тримеров в первую очередь может быть обусловлено гидрофобными и стекинг взаимодействиями, а также ионными взаимодействиями, а не дисульфидными связями. Как видно из рисунка остатки ароматических аминокислот Phe, Tyr, Trp разных цепей могут образовывать гидрофобное ядро димера. Притом, мотивы RBM экспонированы наружу и сохраняют топологию

вторичных структур. Примечательно, что в интерфейс взаимодействия двух молекул входят первые 13 N-концевых аминокислотных остатков обоих RBD. Многие исследователи, получали фрагменты RBD, лишённые этого участка, что, возможно, исключило образование мультимерных форм RBD.

Предсказанные модели тримера RBD (рисунок 26, Б) также показывают взаимодействие гидрофобных радикалов аминокислотных остатков. Как и в случае димера, мотивы RBM экспонированы наружу.

По всей видимости, 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.

Экспериментальное исследование структуры RBD, полученного в клетках CHO-K1, начали с идентификации аминокислотной последовательности белка методом LC-MS/MS. Первичная структура полученного белка соответствовала расчетной и содержала 244 а.о. (рисунок 14). 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, фигурирующих в литературе, присутствуют в полученном RBD и имеют гликозидные модификации, согласующиеся с литературными данными (Приложение 2) [196].

Вторичную структуру RBD изучали с помощью спектроскопии кругового дихроизма – наиболее информативного метода получения информации о вторичной структуре белков и пептидов в растворе. Спектры КД RBD, полученного в клетках CHO-K1, имели близкие характеристики к спектрам КД, полученным для других рекомбинантных RBD с максимумами поглощения на 190 и 230 нм из-за ароматических а.о. и минимумом в районе 208 нм (рисунок 15) [212]. Температура

плавления полученного RBD составила $47,5 \pm 2,5^\circ\text{C}$. В статье Maffei с соавторами T_m для похожего фрагмента RBD S-белка имела близкие значения и 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 (рисунок 16) [200].

Установление третичной структуры белков – достаточно сложный ресурсозатратный процесс. Одним из способов изучения третичной структуры является метод малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР), который позволяет проводить анализ структуры белка в растворе. По графикам интенсивности МУРР в зависимости от угла рассеяния оценивают размеры молекул и фактор формы в растворе. Исходя из результатов МУРР, 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 HEK293F и представлял собой фрагмент R319-G566 S-белка с сайтом протеолиза сортазы и 6×his-меткой на С-конце. Методом МУРР также было показано специфическое взаимодействие между RBD и аптамером Apt31, которое свидетельствует о том, что геометрические параметры RBD, полученного в клетках CHO-K1, соответствуют структуре RBD, которую он имеет в составе коронавирусного шипа (рисунок 17).

Взаимодействие RBD с человеческим рецептором ACE2 анализировали в режиме реального времени с помощью метода биослойной интерферометрии. В качестве биослоя использовали рекомбинантный ACE2, связанный со стрептавидиновым чипом через биотиновую метку (рисунок 18). По результатам данного анализа RBD взаимодействовал с ACE2 с наномолярным сродством ($KD = 58.2 \pm 1.3$ нМ). При этом 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 [6, 199]. В нашем предварительном исследовании RBD, полученный в *E.coli*, также обладал слабым

средством к ACE2 [147]. По-видимому, для корректного фолдинга рецептор-связывающего мотива RBD необходимы корректное гликозилирование и формирование дисульфидных связей, которые не могут обеспечить прокариотические системы экспрессии.

4.3. Антигенные свойства рекомбинантного RBD

Помимо корректного фолдинга рецептор-связывающего мотива, рекомбинантный RBD должен сохранять профиль эпитопов, соответствующих природному варианту, это особенно важно при использовании рекомбинантного белка в тест-системах и вакцинах. Для оценки антигенных свойств RBD, полученного в клетках CHO-K1, исследовали его взаимодействие с сыворотками реконвалесцентов COVID-19, а также нейтрализующими моноклональными антителами.

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 19, А). А конкурентный ИФА с использованием моноклональных антител DA, Y, 161, 181, 521 и 524, нейтрализующих SARS-CoV-2, показал, что моноклональные антитела действительно связываются с RBD и тем самым блокируют его взаимодействие с рекомбинантным рецептором ACE2 (рисунок 19, Б). Подводя итог, можно заключить, что RBD, полученный в клетках CHO-K1, имеет структуру рецептор-связывающего мотива идентичную природному варианту и воспроизводит его антигенные детерминанты.

4.4. Иммуногенные свойства рекомбинантного RBD

Рекомбинантные варианты RBD и фрагментов S-белка, содержащих RBD, используют в качестве компонентов вакцин для профилактики COVID-19, поэтому было важно исследовать иммуногенные свойства полученного RBD. Ключевым этапом проверки вакцин являются эксперименты на модельных животных. В феврале 2020 года ВОЗ определила четыре вида животных в качестве основных моделей COVID-19: мыши, хорьки, хомяки и приматы, не относящиеся к

человекообразным [213]. Хотя приматы являются более надежными моделями, поскольку они физиологически, иммунологически и генетически более тесно связаны с людьми, модели мелких животных имеют свои преимущества. Они существенно дешевле и могут быть использованы в больших количествах повышая достоверность исследования. Мелкие модели удобнее в содержании, на сегодняшний день широко доступны реагенты для изучения их иммунного ответа [214].

Для исследования иммуногенности RBD мы выбрали четыре доступные нам модели мелких животных, которые часто используют для исследования иммуногенности вакцин против SARS-CoV-2: сирийских хомячков, мышей линии BALB/c, хорьков и кроликов породы Шиншилла. Животных иммунизировали дозой 50 мкг RBD в комбинации с гидроокисью алюминия дважды с двухнедельным интервалом. Анализ сывороток крови, полученных через две недели после бустерной иммунизации, показал, что только у хомячков развился слабый гуморальный иммунный ответ на RBD (рисунок 20, А). Среднегеометрический титр (GMT) RBD-специфических IgG в сыворотке хомячков составил $0,97 \times 10^4$. Напротив, мыши, кролики и хорьки имели сравнительно высокие уровни специфических антител (GMT = $2,9 \times 10^6$, $0,4 \times 10^6$, и $0,1 \times 10^6$ соответственно). Уровень сероконверсии нейтрализующих антител в группе хомячков составил всего 30% (диапазон титров: 10–40) по сравнению со 100% сероконверсией во всех 3 группах: GMT = 640 (диапазон: 160–2560) у мышей, GMT = 1016 (диапазон: 320–40) у кроликов и GMT = 640 (диапазон: 160–1280) у хорьков (рисунок 20, Б). Суммарные титры специфических Ig у хорьков были ниже, чем титры IgG в сыворотках мышей и кроликов. Несмотря на это, не наблюдалось статистической значимости различий между хорьками и кроликами ($p > 0,29$) или хорьками и мышами ($p > 0,9$) в отношении титров вируснейтрализующих антител. Это показывает, что животная модель, которая естественным образом восприимчива к инфекции, вероятно, надлежащим образом отражает иммунный ответ на иммунизацию RBD. В отдельном эксперименте наблюдали дозозависимую сероконверсию RBD-специфических IgG у хомячков.

Иммунизация 250 или 50 мкг RBD вызывала специфические IgG-ответы, тогда как при иммунизации 10 мкг белка специфические антитела не выявлялись (рисунок 21). В то же время увеличение количества иммуногена не обеспечивало появления нейтрализующих антител у 100% животных. Аналогичные результаты были получены нами в эксперименте по иммунизации мышей BALB/c и сирийских хомячков ДНК-вакцинами, кодирующими RBD и S-белок SARS-CoV-2, в нашем раннем исследовании. Группы хомячков и мышей, получавшие ДНК, кодирующую S-белок, имели выраженный гуморальный иммунный ответ. Однако в группе хомячков, иммунизированных ДНК, кодирующей RBD, титры специфических IgG были очень низкими ($GMT = 16$), а нейтрализующие антитела не детектировались [215].

Результаты удивительны, особенно с учетом того, что хомячков довольно часто используют для исследований вакцин против COVID-19. Однако в научной литературе этот феномен ранее уже был замечен. Так опубликован препринт статьи Y. Wu с соавторами, в котором сообщается о неудачном испытании иммуногена на основе RBD. Авторы наблюдали слабый гуморальный иммунный ответ на 10 мкг тримерного RBD у хомячков, в то время как титры специфических антител у иммунизированных приматов были высокими. При этом при иммунизации S-белком гуморальный иммунный ответ как у хомячков, и приматов был одинаково выражен [216]. В своей работе Dalvey с соавторами получили вирусоподобные частицы (ВПЧ), содержащие вариант RBD с повышенной иммуногенностью. Мышей BALB/cJ и сирийских хомячков дважды иммунизировали ВПЧ (2 мкг) с гидроокисью алюминия или ВПЧ с гидроокисью алюминия и CpG. В случае обоих иммуногенов титры псевдовироз-нейтрализующих антител в группах хомячков были ниже, чем в группах мышей (10^1-10^3 против 10^3-10^7). После вакцинации хомячков заражали вирусом SARS-CoV-2 и отслеживали изменение массы тела и титр вируса после заражения. Животные, получавшие ВПЧ с гидроокисью алюминия и CpG, восстанавливали вес быстрее, чем контрольная группа, однако препарат, содержащий только гидроокись алюминия, не приводил к значительному изменению веса по сравнению с плацебо [217].

В нескольких экспериментах на животных, проведенных группой ученых ВОЗ, использовали экспериментальные цельновирусные вакцины с адъювантом из гидроокиси алюминия и формальдегида. Примечательно, что у хомячков после иммунизации не было нейтрализующих антител и защиты от последующего заражения SARS-CoV-2, но цитокины легких были заметно смещены в сторону Th2 [218]. В другом исследовании сообщалось, что хомячки и трансгенные мыши с человеческим рецептором ACE-2, иммунизированные слитым белком RBD/N-белок, имели высокий титр специфических антител с неопределяемым уровнем нейтрализующих антител, а защиту животных от заражения SARS-CoV-2 обеспечивал клеточный иммунный ответ [219]. Хотя ранее было показано, что заражение сирийских хомячков высокими и низкими дозами вируса SARS-CoV-2 ($10^{5.6}$ и 10^3 БОЕ) приводит к образованию защитных титров нейтрализующих антител (диапазон: 640–1280) [220], хомячки, за исключением упомянутых ранее публикаций, не фигурируют в экспериментах по исследованию вакцин на основе RBD. Притом иммуногенность различных вариантов рекомбинантного RBD неоднократно показана на широком спектре других животных, включая нечеловеческих приматов, мышей, кроликов, хорьков, лошадей и прочих [5, 53, 208-210].

Суммируя анализ литературных данных и полученные в данной работе результаты, использовать сирийских хомячков для исследования вакцин на основе RBD, вероятно, следует с осторожностью.

По завершению эксперимента мы предположили, что из всех, участвовавших животных, кролики могут быть удобными и подходящими моделями для долгосрочного изучения гуморального иммунного ответа на RBD. Поскольку кролики довольно крупные, от них легче получать образцы крови в течение длительного времени, а также они достаточно дружелюбны в обращении. Ранее А Мусутун А. с коллегами показали, что кролики могут быть восприимчивы к SARS-CoV-2. Хотя инфекция протекает бессимптомно, инфекционный вирус с пиковыми титрами, соответствующими $\sim 10^3$ TCID₅₀, может быть обнаружен до седьмого дня после инокуляции в нос. Однако использование в этом исследовании молодых,

иммунокомпетентных и здоровых новозеландских белых кроликов может не отражать выделение вируса и патогенез у кроликов других пород или кроликов разного возраста [224]. В недавнем исследовании сообщалось о первых доказательствах естественной инфекции SARS-CoV-2 среди домашних кроликов во Франции, которая, скорее всего, была получена от владельца, инфицированного COVID-19 [225]. Однако, все же вполне вероятно, что кролики довольно слабо восприимчивы к инфекции SARS-CoV-2.

В нашем эксперименте мы наблюдали, что иммунный ответ на RBD у кроликов был достаточно выраженным, а GMT RBD-специфических IgG достигал $2,8 \times 10^5$ после второй иммунизации (рисунок 22). Титры IgG сохранялись в течение 4 месяцев наблюдения после иммунизации (GMT = $0,1 \times 10^5$ на 16-й неделе). Таким образом, можно заключить, что кролики привлекательны для исследования динамики гуморального иммунного ответа на антигены SARS-CoV-2 и потенциально могут быть заражены коронавирусом для оценки защитных свойств вакцин против COVID-19.

4.5 Влияние адъювантов на иммунный ответ на RBD у мышей линии BALB/c

Согласно литературным данным в состав субъединичных вакцин на основе RBD вводят адъюванты для усиления индукции иммунного ответа (таблица 1, раздел 1.3.2) так как RBD сам по себе слабо иммуногенен. Поэтому следующим этапом данной работы было изучение влияния адъювантов различной природы на иммунный ответ на полученный RBD у мышей BALB/c. Животных иммунизировали RBD в отсутствие каких-либо адъювантов, а также RBD в комбинации с неполным адъювантом Фрейнда (НАФ) – классическим адъювантом для ветеринарных вакцин, который представляет собой эмульсию «вода в масле» и гидроокисью алюминия – минеральным адъювантом, разрешенным для человека [226].

Учитывая, что мономерные форматы иммуногенов на основе RBD даже в присутствии адъювантов не способны вызвать сильный Т-клеточный ответ, мы предложили стратегию, объединяющую природный адъювант и мультимеризацию

антигенов. Для этого синтезировали конъюгаты RBD с полиглюкином-спермидином (ПГС) и дсРНК киллерного штамма дрожжей *S. cerevisiae* штамм Y 448 в качестве адъюванта.

Полиглюкин (высокомолекулярный декстран) является одним из наиболее изученных α -глюканов, которые используются для доставки лекарств и иммуногенов [227]. Полиглюкин обеспечивает пролонгированное высвобождение действующего вещества, а также является иммуномодулятором гуморального и клеточного ответа [228]. А дсРНК киллерного штамма *S. cerevisiae* Y488 является индуктором врожденного иммунного ответа и интерферогенеза [229]. Полиглюкин функционализировали спермидином, для придания комплексу положительного заряда, обеспечивающего взаимодействие с дрожжевыми дсРНК, которые, вероятно, формируют ядро частицы [230]. В эксперименте по иммунизации мышей линии BALB/c мы не обнаружили 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 адъювантов имела GMT нейтрализующих антител и специфических IgG на два порядка ниже указанных. Интересно, что в группе мышей, получавших конъюгат RBD-ПГС без дсРНК специфический гуморальный иммунный ответ на RBD был несколько ниже, что подчеркивает более значительную роль адъювантов нежели мультимеризации антигена в нашем эксперименте.

Поскольку, для препаратов, содержащих дрожжевую дсРНК, ранее была показана индукция специфического Т-клеточного ответа мы исследовали индукцию специфических Т-клеток, синтезированными конъюгатами RBD-ПГС+дсРНК. Анализ ICS на антиген-специфическую секрецию IFN- γ CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетками и ELISpot анализ на специфическую секрецию IFN- γ в спленоцитах иммунизированных мышей показали, что конъюгат RBD-ПГС+дсРНК вызывает сильный специфический Т-клеточный иммунный ответ у мышей линии BALB/c (рисунок 23).

Таким образом, RBD, полученный в клетках CHO-K1, для индукции сильного специфического иммунитета нуждается в адьювантах для индукции гуморального иммунного ответа. Притом предложенный нами конъюгат RBD-ПГС+дсРНК был способен усиливать не только В- но и Т-клеточный специфический иммунный ответ, смещенный в сторону CD4+ Т-лимфоцитов, которые усиливают элиминацию вируса нейтрализующими антителами *in vivo*.

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 структуру и свойства его природного варианта.

Около 70% всех терапевтических препаратов, одобренных для клинического применения, получают с помощью клеточной линии яичника китайского хомячка CHO и ее производных [7, 8]. Клетки CHO обеспечивают высокий и стабильный выход белка, а также в отличие от человеческих клеточных линий имеют межвидовой барьер снижающий риск контаминации при производстве [231]. Вместе с тем, структура и свойства рекомбинантного белка, полученного в гетерологичной системе экспрессии, и его природного варианта могут довольно сильно отличаться.

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, близки домену RBD в составе коронавирусного S-белка.

Также исследование выявило неодинаковые иммунные реакции на RBD SARS-CoV-2 у разных моделей 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 показано, что RBD вызывает устойчивый специфический гуморальный иммунный ответ. Однако, следует отметить, 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. Удачным оказался предложенный подход объединения природного адъюванта дсРНК и стратегии мультимеризации антигенов. Конъюгат RBD с комплексом полиглюкин-спермидин и дсРНК, выделенной из дрожжей *S.cerevisiae* стимулировал выработку специфического В- и Т-клеточного иммунного ответа 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 [201, 215, 232].

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 полиглюкин-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 ЛИТЕРАТУРЫ

1. Genomic characterization and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding / R. Lu, X. Zhao, J. Li [et al.] // *The Lancet*. – 2020. – V. 395. – № 10224. – P. 565–574.
2. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 / J. Shang, Y. Wan, C. Luo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – V. 117. – № 21. – P. 11727–11734.
3. Scientific rationale for developing potent RBD –based vaccines targeting COVID-19 / H. Kleanthous, J.M. Silverman, K.W. Makar [et al.] // *Vaccines*. – 2021. – V. 6. – № 1. – P. 1–10.
4. Min L. Antibodies and Vaccines Target RBD of SARS-CoV-2 / L. Min and Q. Sun // *Frontiers in Molecular Biosciences*. – 2021. – V. 8. – P. 247.
5. Design of a highly thermotolerant, immunogenic SARS-CoV-2 spike fragment / S.K. Malladi, R. Singh, S. Pandey [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – V. 296. – P. 100025.
6. Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from *Escherichia coli* / Y. He, J. Qi, L. Xiao [et al.] // *Engineering in Life Sciences*. – 2021. – V. 21. – № 6. – P. 453–460.
7. Kim J.Y. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential / J.Y. Kim, Y.G. Kim, and G.M. Lee // *Applied microbiology and biotechnology*. – 2012. – V. 93. – № 3. – P. 917–930.
8. Recombinant Protein Therapeutics from CHO Cells – 20 Years and Counting / K. Jayapal, K.F. Wlaschin, W.S. Hu, M.G.S Yap // *Chemical Engineering Progress*. – 2007. – V. 103. – № 10. – P. 40–47.
9. Coronaviridae / S.G. Siddell, R. Anderson, D. Cavanagh [et al.] // *Intervirology*. – 1983. – V. 20. – № 4. – P. 181.
10. История изучения и современная классификация коронавирусов (Nidovirales: Coronaviridae) / М.Ю. Щелканов, А.Ю. Попова, В.Г. Дедков [и др.] // *Журнал Инфекция и иммунитет* – 2022. – V. 10. – № 10. – P. 221–246.

11. Coronaviridae—Old friends, new enemy! / J.C. Leao, T.P. de L. Gusmao, A.M. Zarzar [et al.] // *Oral Diseases*. – 2022. – V. 28. – № S1. – P. 858–866.
12. Abolnik C. Genomic and single nucleotide polymorphism analysis of infectious bronchitis coronavirus / C. Abolnik // *Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*. – 2015. – V. 32. – P. 416–424.
13. Epidemiology of Deltacoronaviruses (δ –CoV) and Gammacoronaviruses (γ – CoV) in Wild Birds in the United States / F.C. Paim, A.S. Bowman, L. Miller [et al.] // *Viruses*. – 2019. – V. 11. – № 10.
14. Identification of a novel coronavirus from a beluga whale by using a panviral microarray / K.A. Mihindukulasuriya, G. Wu, J. St. Leger [et al.] // *Journal of virology*. – 2008. – V. 82. – № 10. – P. 5084–5088.
15. Cui J. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses / J. Cui, F. Li, and Z.L. Shi // *Nature Reviews. Microbiology*. – 2019. – V. 17. – № 3. – P. 181.
16. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin / P. Zhou, X. Lou Yang, X.G. Wang [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 579. – № 7798. – P. 270–273.
17. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 from patient with coronavirus disease, United States / J. Harcourt, A. Tamin, X. Lu [et al.] // *Emerg Infect Dis*. – 2020. – V. 26. – № 6. – P. 1266–1273.
18. Insights into SARS-CoV-2 genome, structure, evolution, pathogenesis and therapies: Structural genomics approach / A.A.T. Naqvi, K. Fatima, T. Mohammad [et al.] // *Molecular Basis of Disease*. – 2020. – V. 1866. – № 10. – P. 165878.
19. Kordyukova L.V. COVID –19: Myths and Reality / L.V. Kordyukova and A.V. Shanko // *Biochemistry*. – 2021. – V. 86. – № 7. – P. 800–817.
20. Gralinski L.E. Return of the coronavirus: 2019 –nCoV / L.E. Gralinski and V.D. Menachery // *Viruses*. – 2020. – V. 12. – № 2. – P. 1–8.
21. Cryo –EM structure of the 2019 –nCoV spike in the prefusion conformation / S.S. Hwang, J. Lim, Z. Yu [et al.] // *Science*. – 2020. – V. 367. – № 6483. – P. 1260–1263.

22. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein / A.C. Walls, Y.J. Park, M.A. Tortorici [et al.] // *Cell*. – 2020. – V. 181. – № 2. – P. 281–292.
23. Structure analysis of the receptor binding of 2019-nCoV / Y. Chen, Y. Guo, Y. Pan [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2020. – V. 525. – № 1. – P. 135.
24. Schoeman D. Coronavirus envelope protein: current knowledge / D. Schoeman and B.C. Fielding // *Virology Journal*. – 2019. – V. 16. – № 1. – P. 69.
25. Structure and dynamics of membrane protein in SARS-CoV-2 / R. Mahtarin, S. Islam, M.J. Islam [et al.] // *J. Biomol. Struct. Dyn.* – 2022. – V. 40. – № 10. – P. 4725–4738.
26. Differential maturation and subcellular localization of severe acute respiratory syndrome coronavirus surface proteins S, M and E / B. Nal, C. Chan, F. Kien [et al.] // *J. Gen. Virol.* – 2005. – V. 86. – № 5. – P. 1423–1434.
27. Supramolecular Architecture of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Revealed by Electron Cryomicroscopy / B.W. Neuman, B.D. Adair, C. Yoshioka [et al.] // *Journal of Virology*. – 2006. – V. 80. – № 16. – P. 7918.
28. Self-assembly of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Membrane Protein / Y.T. Tseng, S.M. Wang, K.J. Huang [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. – 2010. – V. 285. – № 17. – P. 12862.
29. Fung T.S. Post-translational modifications of coronavirus proteins: roles and function / T.S. Fung, D.X. Liu // *Future Virol.* – 2018. – V. 13. – № 6. – P. 405–430.
30. Ye. Y. Role of the Coronavirus E Viroporin Protein Transmembrane Domain in Virus Assembly / Y. Ye and B.G. Hogue // *Journal of Virology*. – 2007. – V. 81. – № 7. – P. 3597.
31. The SARS-CoV-2 envelope and membrane proteins modulate maturation and retention of the spike protein, allowing assembly of virus-like particles / B. Boson, V. Legros, B. Zhou [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – V. 296. – P. 100111.
32. Structure of the N-terminal RNA-binding domain of the SARS CoV nucleocapsid protein / Q. Huang, L. Yu, A.M. Petros [et al.] // *Biochemistry*. – 2004. – V. 43. – № 20. – P. 6059–6063.

33. Crystal structure of SARS-CoV-2 nucleocapsid protein RNA binding domain reveals potential unique drug targeting sites / S. Kang, M. Yang, Z. Hong [et al.] // *Acta Pharmaceutica Sinica*. – 2020. – V. 10. – № 7. – P. 1228.
34. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2 / P. V'kovski, A. Kratzel, S. Steiner [et al.] // *Nature reviews. Microbiology*. – 2021. – V. 19. – № 3. – P. 155–170.
35. Angiotensin –Converting Enzyme 2: SARS-CoV-2 Receptor and Regulator of the Renin –Angiotensin System: Celebrating the 20th Anniversary of the Discovery of ACE2 / M. Gheblawi, K. Wang, A. Viveiros [et al.] // *Circulation research*. – 2020. – V. 126. – № 10. – P. 1456–1474.
36. Li R. Expression pattern and function of SARS-CoV-2 receptor ACE2 / R. Li and C. Qin // *Biosafety and Health*. – 2021. – V. 3. – № 6. – P. 312–318.
37. Shi J. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS –coronavirus 2 / J. Shi // *Science*. – 2020. – V. 368. – P. 1016–1020.
38. Zhao X. Broad and differential animal angiotensin –converting enzyme 2 receptor usage by SARS-CoV-2 / X. Zhao // *J. Virol*. – 2020. – V. 94. – № 18. – P. e00940 –20.
39. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2 / J. Shang, Y. Wan, C. Luo [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2020. – V. 117. – № 21. – P. 11727 –11734.
40. TMPRSS2 and furin are both essential for proteolytic activation of SARS-CoV-2 in human airway cells / D. Bestle, M.R. Heindl, H. Limburg [et al.] // *Life science alliance*. – 2020. – V. 3. – № 9. – P. e202000786.
41. Gupta A. A Review on COVID-19 and its Prevention / A. Gupta, P. Kannoja // *IJRDT*. – 2020. – V. 13. – № 5. – P. 309–312.
42. Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus / H. Yao, Y. Song, Y. Chen [et al.] // *Cell*. – 2020. – V. 183. – № 3. – P. 730 –738.e13.
43. SARS-CoV-2 structure and replication characterized by in situ cryo –electron tomography / S. Klein, M. Cortese, S.L. Winter [et al.] // *Nature communications*. – 2020. – V. 11. – № 1. – P. 5885.

44. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full –length human ACE2 / R. Yan, Y. Zhang, Y. Li [et al.] // *Science*. – 2020. – V. 367. – № 6485. – P. 1444–1448.
45. Corman V.M. Coronaviren als Ursache respiratorischer Infektionen / V.M. Corman, J. Lienau, and M. Witzenthath // *Der Internist*. – 2019. – V. 60. – № 11. – P. 1136.
46. Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group / R.J. de Groot, S.C. Baker, R.S. Baric [et al.] // *Journal of virology*. – 2013. – V. 87. – № 14. – P. 7790–7792.
47. Characterization of a novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome / P.A. Rota, M.S. Oberste, S.S. Monroe [et al.] // *Science*. – 2003. – V. 300. – № 5624. – P. 1394–1399.
48. SARS, MERS and CoVID –19: An overview and comparison of clinical, laboratory and radiological features / M. Pustake, I. Tambolkar, P. Giri [et al.] // *Journal of Family Medicine and Primary Care*. – 2022. – V. 11. – № 1. – P. 10.
49. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li [et al.] // *The Lancet*. – 2020. – V. 395. – № 10223. – P. 497–506.
50. The 2019 –new coronavirus epidemic: Evidence for virus evolution / D. Benvenuto, M. Giovanetti, A. Ciccozzi [et al.] // *Journal of medical virology*. – 2020. – V. 92. – № 4. – P. 455–459.
51. Self –reported COVID-19 symptoms on Twitter: an analysis and a research resource / A. Sarker, S. Lakamana, W. Hogg-Bremer [et al.] // *Journal of the American Medical Informatics Association: JAMIA*. – 2020. – V. 27. – № 8. – P. 1310.
52. Proportion of asymptomatic coronavirus disease 2019 (COVID-19): a systematic review and meta-analysis / J. He, Y. Guo, R. Mao [et al.] // *Journal of Medical Virology*. – 2021. – V. 93. – № 2. – P. 820–830.
53. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity / Y. J, W. W, C. Z [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 586. – № 7830. – P. 572–577.
54. Estimation of the asymptomatic ratio of novel coronavirus infections (COVID-19) / H. Nishiura, T. Kobayashi, T. Miyama [et al.] // *International journal of infectious diseases*. – 2020. – V. 94. – P. 154–155.

55. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2) / R. Li, S. Pei, B. Chen [et al.] // *Science*. – 2020. – V. 368. – № 6490. – P. 489–493.
56. Neurological manifestations of hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective case series study / L. Mao, M. Wang, S. Chen [et al.] // *JAMA Neurol*. – 2020. – V. 77. – № 6. – P. 683–690.
57. Anosmia in COVID-19 patients / D. Hornuss, B. Lange, N. Schröter [et al.] // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2020. – V. 26. – № 10. – P. 1426.
58. Schmulson M. Alerta: los síntomas gastrointestinales podrían ser una manifestación de la COVID-19 / M. Schmulson, M.F. Dávalos, and J. Berumen // *Revista De Gastroenterología De Mexico*. – 2020. – V. 85. – № 3. – P. 282.
59. Extra –respiratory manifestations of COVID-19 / C.C. Lai, W.C. Ko, P.I. Lee [et al.] // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2020. – V. 56. – № 2. – P. 106024.
60. Coagulopathy in COVID-19 / T. Iba, J.H. Levy, M. Levi [et al.] // *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. – 2020. – V. 18. – № 9. – P. 2103–2109.
61. Sex –specific SARS-CoV-2 mortality: among hormone –modulated ACE2 expression, risk of venous thromboembolism and hypovitaminosis D / S. La Vignera, R. Cannarella, R.A. Condorelli [et al.] // *Int. J. Mol. Sci*. – 2020. – V. 21. – № 8. – P. 2948.
62. Banerjee A. Molecular Determinants of SARS-CoV-2 Variants / A. Banerjee, K. Mossman, and N. Grandvaux // *Trends in Microbiology*. – 2021. – V. 29. – № 10. – P. 871.
63. Castonguay N. Meta –Analysis and Structural Dynamics of the Emergence of Genetic Variants of SARS-CoV-2 / N. Castonguay, W. Zhang, and M.A. Langlois // *Frontiers in Microbiology*. – 2021. – V. 12. – P. 1637.
64. Recombination between nonsegmented RNA genomes of murine coronaviruses. / M.M.C. Lai, R.S. Baric, S. Makino [et al.] // *Journal of Virology*. – 1985. – V. 56. – № 2. – P. 449.
65. Evolutionary origins of the SARS-CoV-2 sarbecovirus lineage responsible for the COVID-19 pandemic / M.F. Boni, P. Lemey, X. Jiang [et al.] // *Nature microbiology*. – 2020. – V. 5. – № 11. – P. 1408–1417.

66. Discovery of a rich gene pool of bat SARS –related coronaviruses provide new insights into the origin of SARS coronavirus / B. Hu, L.P. Zeng, X. Lou Yang [et al.] // PLoS Pathogens. – 2017. – V. 13. – № 11. – P. e1006698.
67. A comparative recombination analysis of human coronaviruses and implications for the SARS-CoV-2 pandemic / S. Pollett, M.A. Conte, M. Sanborn [et al.] // Scientific Reports. – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 17365.
68. The changing epidemiology of SARS-CoV-2 / K. Koelle, M.A. Martin, R. Antia [et al.] // Science. – 2022. – V. 375. – № 6585. – P. 1116–1121.
69. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 / J. Shang, G. Ye, K. Shi [et al.] // Nature. – 2020. – V. 581. – № 7807. – P. 221–224.
70. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade –Long Structural Studies of SARS Coronavirus / Y. Wan, J. Shang, R. Graham [et al.] // Journal of Virology. – 2020. – V. 94. – № 7. – P. 127–147.
71. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses / M. Letko, A. Marzi, and V. Munster // Nat. Microbiology. – 2020. – V. 5. – № 4. – P. 562–569.
72. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells / C.B. Jackson, M. Farzan, B. Chen [et al.] // Nature Reviews Molecular Cell Biology. – 2021. – V. 23. – № 1. – P. 3–20.
73. Cryo –EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains / Y. Yuan, D. Cao, Y. Zhang [et al.] // Nature Communications. – 2017. – V. 8. – № 1. – P. 1–9.
74. Comprehensive Structural and Molecular Comparison of Spike Proteins of SARS-CoV-2, SARS-CoV and MERS-CoV, and Their Interactions with ACE2 / M.M. Hatmal, W. Alshaer, M.A.I. Al-Hatamleh [et al.] // Cells. – 2020. – V. 9. – № 12. – P. 2638.
75. Structural O –Glycoform Heterogeneity of the SARS-CoV-2 Spike Protein receptor-binding Domain Revealed by Top –Down Mass Spectrometry / D.S. Roberts, M. Mann, J.A. Melby [et al.] // Journal of the American Chemical Society. – 2021. – V. 143. – № 31. – P. 12014–12024.

76. A glycan gate controls opening of the SARS-CoV-2 spike protein / T. Sztain, S.H. Ahn, A.T. Bogetti [et al.] // *Nature Chemistry* 2021 13:10. – 2021. – V. 13. – № 10. – P. 963–968.
77. Ray D. Distant residues modulate conformational opening in SARS-CoV-2 spike protein / D. Ray, L. Le, and I. Andricioaei // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2021. – V. 118. – № 43. – P. e2100943118.
78. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike / Y. Watanabe, J.D. Allen, D. Wrapp [et al.] // *Science*. – 2020. – V. 369. – № 6501. – P. 330.
79. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus / W. Li, M.J. Moore, N. Vasllieva [et al.] // *Nature*. – 2003. – V. 426. – № 6965. – P. 450–454.
80. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor / J. Lan, J. Ge, J. Yu [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 581. – № 7807. – P. 215–220.
81. Cuervo N.Z. Ace2: Evidence of role as entry receptor for SARS-CoV-2 and implications in comorbidities / N.Z. Cuervo and N. Grandvaux // *ELife*. – 2020. – V. 9. – P. 1–25.
82. The chaperone GRP78 is a host auxiliary factor for SARS-CoV – 2 and GRP78 depleting antibody blocks viral entry and infection / A.J. Carlos, D.P. Ha, D.W. Yeh [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – V. 296. – P. 100759.
83. CD209L/L –SIGN and CD209/DC –SIGN Act as Receptors for SARS-CoV-2 / R. Amraei, W. Yin, M.A. Napoleon [et al.] // *ACS Central Science*. – 2021. – V. 7. – № 7. – P. 1156–1165.
84. Neuropilin –1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection / J.L. Daly, B. Simonetti, K. Klein [et al.] // *Science*. – 2020. – V. 370. – № 6518. – P. 861–865.
85. Integrin mediates cell entry of the SARS-CoV-2 virus independent of cellular receptor ACE2 / J. Liu, F. Lu, Y. Chen [et al.] // *The Journal of biological chemistry*. – 2022. – V. 298. – № 3. – P. 101710.

86. Structure of SARS coronavirus spike receptor-binding domain complexed with receptor / F. Li, W. Li, M. Farzan [et al.] // *Science*. – 2005. – V. 309. – № 5742. – P. 1864–1868.
87. Li F. Structural analysis of major species barriers between humans and palm civets for severe acute respiratory syndrome coronavirus infections / F. Li // *J. Virol.* – 2008. – V. 82. – № 14. – P. 6984–6991.
88. Mechanisms of host receptor adaptation by severe acute respiratory syndrome coronavirus / K. Wu, G. Peng, M. Wilken [et al.] // *J. Biol. Chem.* – 2012. – V. 287. – № 12. – P. 8904–8911.
89. Structure of MERS-CoV spike receptor-binding domain complexed with human receptor DPP4 / N. Wang, X. Shi, L. Jiang [et al.] // *Cell Research*. – 2013. – V. 23. – № 8. – P. 986.
90. Moss P. The T cell immune response against SARS-CoV-2 / P. Moss // *Nature Immunology*. – 2022. – V. 23. – № 2. – P. 186–193.
91. Comparison of Immune Response between SARS, MERS, and COVID-19 Infection, Perspective on Vaccine Design and Development / H. Ansariniya, S.M. Seifati, E. Zaker [et al.] // *BioMed Research International*. – 2021. – V. 2021. – P. 8870425.
92. The immune response and immune evasion characteristics in SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2: Vaccine design strategies / S. Molaei, M. Dadkhah, V. Asghariazar [et al.] // *International Immunopharmacology*. – 2021. – V. 92. – P. 107051.
93. Zhang Y.Y. The Comparative Immunological Characteristics of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 Coronavirus Infections / Y.Y. Zhang, B.R. Li, and B.T. Ning // *Frontiers in Immunology*. – 2020. – V. 11. – P. 2033.
94. Detection of SARS-CoV-2 –Specific Humoral and Cellular Immunity in COVID-19 Convalescent Individuals / L. Ni, F. Ye, M.L. Cheng [et al.] // *Immunity*. – 2020. – V. 52. – № 6. – P. 971.
95. Inactivated SARS-CoV vaccine elicits high titers of spike protein –specific antibodies that block receptor binding and virus entry / Y. He, Y. Zhou, P. Siddiqui [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 2004. – V. 325. – № 2. – P. 445.

96. Recombinant Receptor Binding Domain Protein Induces Partial Protective Immunity in Rhesus Macaques Against Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Challenge / J. Lan, Y. Yao, Y. Deng [et al.] // *EBioMedicine*. – 2015. – V. 2. – № 10. – P. 1438.

97. SARS CoV subunit vaccine: antibody –mediated neutralisation and enhancement. / M. Jaume, M.S. Yip, Y.W. Kam [et al.] // *Hong Kong medical journal*. – 2012. – V. 18 (Suppl 2). – № 1. – P. 31–36.

98. SARS coronavirus has antibody –dependent enhancement (ADE) effect through the autologous antibodies against envelope spikes on Fcγ receptor expressing cells / C. – S. Yeh, J. –Y. Yang, W. –T. Liu [et al.] // *Journal of Virus Eradication*. – 2016. – V. 2. – P. 48.

99. Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19 / C. Lucas, J. Klein, M.E. Sundaram [et al.] // *Nature Medicine*. – 2021. – V. 27. – № 7. – P. 1178–1186.

100. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2 / C. Gaebler, Z. Wang, J.C.C. Lorenzi [et al.] // *Nature*. – 2021. – V. 591. – № 7851. – P. 639–644.

101. Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection / J.M. Dan, J. Mateus, Y. Kato [et al.] // *Science*. – 2021. – V. 371. – № 6529.

102. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies / Y. Cao, J. Wang, F. Jian [et al.] // *Nature*. – 2021. – V. 602. – № 7898. – P. 657–663.

103. Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals / D.F. Robbiani, C. Gaebler, F. Muecksch [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 584. – № 7821. – P. 437–442.

104. Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency, breadth, and resilience to viral escape mutations / F. Muecksch, Y. Weisblum, C.O. Barnes [et al.] // *Immunity*. – 2021. – V. 54. – № 8. – P. 1853–1868.

105. Recovery from the Middle East respiratory syndrome is associated with antibody and T –cell responses / J. Zhao, A.N. Alshukairi, S.A. Baharoon [et al.] // *Science immunology*. – 2017. – V. 2. – № 14.

106. T cell responses to whole SARS coronavirus in humans / C.K. Li, H. Wu, H. Yan [et al.] // *Journal of immunology*. – 2008. – V. 181. – № 8. – P. 5490–5500.
107. Broad and strong memory CD4(+) and CD8(+) T cells induced by SARS-CoV-2 in UK convalescent individuals following COVID-19 / Y. Peng, A.J. Mentzer, G. Liu [et al.] // *Nat. Immunol.* – 2020. – V. 21. – № 11. – P. 1336–1345.
108. Virus –specific memory CD8 T cells provide substantial protection from lethal severe acute respiratory syndrome coronavirus infection / R. Channappanavar, C. Fett, J. Zhao [et al.] // *Journal of virology*. – 2014. – V. 88. – № 19. – P. 11034–11044.
109. Evasion by stealth: inefficient immune activation underlies poor T cell response and severe disease in SARS-CoV –infected mice / J. Zhao, J. Zhao, N. Van Rooijen [et al.] // *PLoS pathogens*. – 2009. – V. 5. – № 10. – P. e1000636.
110. Lack of peripheral memory B cell responses in recovered patients with severe acute respiratory syndrome: a six –year follow –up study / F. Tang, Y. Quan, Z. –T. Xin [et al.] // *Journal of immunology*. – 2011. – V. 186. – № 12. – P. 7264–7268.
111. Immune correlates analysis of the mRNA –1273 COVID-19 vaccine efficacy clinical trial / P.B. Gilbert, D.C. Montefiori, A.B. McDermott [et al.] // *Science*. – 2022. – V. 375. – № 6576. – P. 43–50.
112. Immunogenicity of Ad26.COV2.S vaccine against SARS-CoV-2 variants in humans / G. Alter, J. Yu, J. Liu [et al.] // *Nature*. – 2021. – V. 596. – № 7871. – P. 268–272.
113. Safety and efficacy of single –dose Ad26.COV2.S vaccine against COVID-19 / J. Sadoff, G. Gray, A. Vandebosch [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2021. – V. 384. – № 23. – P. 2187–2201.
114. Safety and Efficacy of NVX –CoV2373 COVID-19 Vaccine / P.T. Heath, E.P. Galiza, D.N. Baxter [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – V. 385. – № 13. – P. 1172–1183.
115. Efficacy of NVX –CoV2373 COVID-19 vaccine against the B.1.351 variant / V. Shinde, S. Bhikha, Z. Hoosain [et al.] // *N. Engl. J. Med.* – 2021. – V. 384. – № 20. – P. 1899–1909.

116. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac) in healthy adults aged 60 years and older: a randomised, double –blind, placebo –controlled, phase 1/2 clinical trial / Z. Wu, Y. Hu, M. Xu [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2021. – V. 21. – № 6. – P. 803–812.

117. Safety and immunogenicity of a recombinant tandem –repeat dimeric RBD –based protein subunit vaccine (ZF2001) against COVID-19 in adults: two randomised, double –blind, placebo –controlled, phase 1 and 2 trials / S. Yang, Y. Li, L. Dai [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases.* – 2021. – V. 21. – № 8. – P. 1107–1119.

118. Safety and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine, BBV152: interim results from a double –blind, randomised, multicentre, phase 2 trial, and 3 –month follow –up of a double –blind, randomised phase 1 trial / R. Ella, S. Reddy, H. Jogdand [et al.] // *Lancet Infect. Dis.* – 2021. – V. 21. – № 7. – P. 950–961.

119. Comprehensive analysis of T cell immunodominance and immunoprevalence of SARS-CoV-2 epitopes in COVID-19 cases / A. Tarke, J. Sidney, C.K. Kidd [et al.] // *Cell Rep. Med.* – 2021. – V. 2. – № 2. – P. 100204.

120. Clonal analysis of immunodominance and cross –reactivity of the CD4 T cell response to SARS-CoV-2 / J.S. Low, D. Vaquerinho, F. Mele [et al.] // *Science.* – 2021. – V. 372. – № 6548. – P. 1336–1341.

121. Adjuvanting a subunit COVID-19 vaccine to induce protective immunity / P.S. Arunachalam, A.C. Walls, N. Golden [et al.] // *Nature.* – 2021. – V. 594. – № 7862. – P. 253–258.

122. Poland G.A. SARS-CoV-2 immunity: review and applications to phase 3 vaccine candidates / G.A. Poland, I.G. Ovsyannikova, and R.B. Kennedy // *Lancet.* – 2020. – V. 396. – № 10262. – P. 1595–1606.

123. A Novel Real –Time RT –PCR –Based Methodology for the Preliminary Typing of SARS-CoV-2 Variants, Employing Non –Extendable LNA Oligonucleotides and Three Signature Mutations at the Spike Protein receptor-binding Domain / S.C. Chaintoutis, T. Chassalevris, S. Balaska [et al.] // *Life.* – 2021. – V. 11. – № 10. – P. 1015.

124. Label free detection of SARS CoV –2 Receptor Binding Domain (RBD) protein by fabrication of gold nanorods deposited on electrochemical immunosensor (GDEI) / D. Shahdeo, A. Roberts, G.J. Archana [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2022. – V. 212. – P. 114406.
125. A one –step real –time RT –PCR assay for simultaneous typing of SARS-CoV-2 mutations associated with the E484K and N501Y spike protein amino –acid substitutions / S.C. Chaintoutis, T. Chassalevris, G. Tsiolas [et al.] // *Journal of Virological Methods*. – 2021. – V. 296. – P. 114242.
126. A novel rapid detection for SARS-CoV-2 spike 1 antigens using human angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) / J.H. Lee, M. Choi, Y. Jung [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2021. – V. 171. – P. 112715.
127. Detection of SARS-CoV-2 and the L452R spike mutation using reverse transcription loop –mediated isothermal amplification plus bioluminescent assay in real –time (RT –LAMP –BART) / T. Iijima, S. Ando, D. Kanamori [et al.] // *PLOS ONE*. – 2022. – V. 17. – № 3. – P. e0265748.
128. Jaisankar A. Design and Development of Nanoscale Aptasensors for Viral Diagnostics / A. Jaisankar, S. Krishnan, and M. Ramalingam – 2023. – V. 12. – № 2. – P. 34.
129. Nanoplasmonic biosensor for rapid detection of multiple viral variants in human serum / N. Bhalla, A.F. Payam, A. Morelli [et al.] // *Sensors and Actuators B: Chemical*. – 2022. – V. 365. – P. 131906.
130. Testing IgG antibodies against the RBD of SARS-CoV-2 is sufficient and necessary for COVID-19 diagnosis / V. Indenbaum, R. Koren, S. Katz –Likvornik [et al.] // *PLOS ONE*. – 2020. – V. 15. – № 11. – P. e0241164.
131. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients / L. Premkumar, B. Segovia –Chumbez, R. Jadi [et al.] // *Science immunology*. – 2020. – V. 5. – № 48. – P. eabc8413.
132. Serological testing for SARS-CoV-2 antibodies in clinical practice: A comparative diagnostic accuracy study / M.P. Horn, H.R. Jonsdottir, D. Brigger [et al.] // *Allergy*. – 2022. – V. 1. – P. 1–14.

133. Evaluation of serological anti –SARS-CoV-2 chemiluminescent immunoassays correlated to live virus neutralization test, for the detection of anti –RBD antibodies as a relevant alternative in COVID-19 large –scale neutralizing activity monitoring / A. Cristiano, M. Pieri, S. Sarubbi [et al.] // *Clinical Immunology*. – 2022. – V. 234. – P. 108918.
134. Performance evaluation of novel fluorescent –based lateral flow immunoassay (LFIA) for rapid detection and quantification of total anti –SARS-CoV-2 S –RBD binding antibodies in infected individuals / F.M. Shurrab, N. Younes, D.W. Al –Sadeq [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2022. – V. 118. – P. 132–137.
135. Development and utilization of a surrogate SARS-CoV-2 viral neutralization assay to assess mRNA vaccine responses / A. V. Wisnewski, J. Liu, C. Lucas [et al.] // *PLOS ONE*. – 2022. – V. 17. – № 1. – P. e0262657.
136. A cell –based ELISA as surrogate of virus neutralization assay for RBD SARS-CoV-2 specific antibodies / F. Pi –Estopiñan, M.T. Pérez, A. Fraga [et al.] // *Vaccine*. – 2022. – V. 40. – № 13. – P. 1958–1967.
137. COVID-19 antibody detecting rapid diagnostic tests show high cross –reactivity when challenged with pre –pandemic malaria, schistosomiasis and dengue samples / F. Vanroye, D. Van den Bossche, I. Brosius [et al.] // *Diagnostics*. – 2021. – V. 11. – № 7. – P. 1163.
138. *Molecular microbiology: diagnostic principles and practice – 3th ed* / D. Persing, F. Tenover, R. Hayden [et al.] // John Wiley & Sons – 2020. – 835 p.
139. Silveira E.L.V. To B or Not to B: Understanding B Cell Responses in the Development of Malaria Infection / E.L.V. Silveira, M.R. Dominguez, and I.S. Soares // *Frontiers in Immunology*. – 2018. – V. 9. – P. 2961.
140. Clinical performance evaluation of a SARS-CoV-2 Rapid Antibody Test for determining past exposure to SARS-CoV-2 / P. Findeisen, H. Stiegler, E. Lopez –Calle [et al.] // *International Journal of Infectious Diseases*. – 2021. – V. 103. – P. 636.
141. Diagnostic accuracy of serological tests for covid –19: systematic review and meta –analysis / M. Lisboa Bastos, G. Tavaziva, S.K. Abidi [et al.] // *The BMJ*. – 2020. – V. 370. – P. 2516.

142. Immunization with the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 elicits antibodies cross –neutralizing SARS-CoV-2 and SARS-CoV without antibody –dependent enhancement / J. Zang, C. Gu, B. Zhou [et al.] // *Cell Discovery*. – 2020. – V. 6. – № 1. – P. 4–7.

143. A vaccine targeting the RBD of the S protein of SARS-CoV-2 induces protective immunity / J. Yang, W. Wang, Z. Chen [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 586. – № 7830. – P. 572–577.

144. Design of a highly thermotolerant, immunogenic SARS-CoV-2 spike fragment / S.K. Malladi, R. Singh, S. Pandey [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2021. – V. 296. – P. 100025.

145. The SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicits a potent neutralizing response without antibody –dependent enhancement / B.D. Quinlan, H. Mou, L. Zhang [et al.] // *BioRxiv* (препринт статьи). – 2020. – Режим доступа: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.04.10.036418v1>

146. Clinical trial 2020/11/029032 // [ctri.nic.in](http://www.ctri.nic.in) URL: <http://www.ctri.nic.in/Clinicaltrials/pmaindet2.php?trialid=48329> (дата обращения: 01.08.2022).

147. 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.

148. Recombinant receptor-binding domain of SARS-CoV spike protein expressed in mammalian, insect and E. coli cells elicits potent neutralizing antibody and protective immunity / L. Du, G. Zhao, C.C.S. Chan [et al.] // *Virology*. – 2009. – V. 393. – № 1. – P. 144.

149. Effect of Different Adjuvants on Immune Responses Elicited by Protein –Based Subunit Vaccines against SARS-CoV-2 and Its Delta Variant / N. Zhang, Q. Ji, Z. Liu [et al.] // *Viruses*. – 2022. – V. 14. – № 3. – P. 501.

150. Phosphate –mediated coanchoring of RBD immunogens and molecular adjuvants to alum potentiates humoral immunity against SARS-CoV-2 / K.A. Rodrigues, S.A.

Rodriguez –Aponte, N.C. Dalvie [et al.] // *Science Advances*. – 2021. – V. 7. – № 50. – P. eabj6538.

151. A Novel Bacterial Protease Inhibitor Adjuvant in RBD –Based COVID-19 Vaccine Formulations Containing Alum Increases Neutralizing Antibodies, Specific Germinal Center B Cells and Confers Protection Against SARS-CoV-2 Infection in Mice / L.M. Coria, L.M. Saposnik, C. Pueblas Castro [et al.] // *Frontiers in Immunology*. – 2022. – V. 13. – P. 604.

152. Selection of optimum formulation of RBD –based protein sub –unit covid19 vaccine (Corbevax) based on safety and immunogenicity in an open –label, randomized Phase –1 and 2 clinical studies / S. Thuluva, V. Paradkar, K. Turaga [et al.] // *MedRxiv* (препринт статъи). – 2022. – Режим доступа: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.03.03.22271313v2>.

153. ABDALA Clinical Study // rpsc.sld.cu URL: <https://rpsc.sld.cu/en/trials/RPCEC00000346> –En (дата обращения: 01.08.2022).

154. Safety and immunogenicity of anti –SARS CoV –2 conjugate vaccine SOBERANA 02 in a two –dose or three –dose heterologous scheme in adults: Phase IIb Clinical Trial / M.E. Toledo –Romani, M. García –Carmenate, L. Verdecia –Sánchez [et al.] // *MedRxiv* (препринт статъи). – 2022. – Режим доступа: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.01.01.21268271v1>.

155. Open label phase I/II clinical trial and predicted efficacy of SARS-CoV-2 RBD protein vaccines SOBERANA 02 and SOBERANA Plus in children / R. Puga –Gómez, Y. Ricardo –Delgado, C. Rojas –Iriarte [et al.] // *MedRxiv* (препринт статъи). – 2022. – Режим доступа: <https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2022.03.03.22271313v2>.

156. Early assessment of the safety and immunogenicity of a third dose (booster) of COVID-19 immunization in Chinese adults / Y. Zhang, Y. Yang, N. Qiao [et al.] // *Frontiers of Medicine*. – 2022. – V. 16. – № 1. – P. 93–101.

157. Phase 3 Clinical Trial to evaluate the Immunogenicity and Safety of Covid19 Recombinant RBD Protein Vaccine (Noora Vaccine) as a Booster Vaccine after injection of existing Vaccines in IRAN // en.irct.ir URL: <https://en.irct.ir/trial/60796> (дата обращения: 01.08.2022).

158. A Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID –19, MERS, and SARS / L. Dai, T. Zheng, K. Xu [et al.] // *Cell*. – 2020. – V. 182. – № 3. – P. 722 –733.
159. Molecular Aspects Concerning the Use of the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain as a Target for Preventive Vaccines / Y. Valdes –Balbin, D. Santana –Mederos, F. Paquet [et al.] // *ACS Central Science*. – 2021. – V. 7. – № 5. – P. 757.
160. SARS-CoV-2 RBD trimer protein adjuvanted with Alum –3M –052 protects from SARS-CoV-2 infection and immune pathology in the lung / N.K. Routhu, N. Cheedarla, V.S. Bollimpelli [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 1–15.
161. DNA vaccine protection against SARS-CoV-2 in rhesus macaques / J. Yu, L.H. Tostanosk, L. Peter [et al.] // *Science*. – 2020. – V. 369. – № 6505. – P. 806.
162. Phase I/II study of COVID-19 RNA vaccine BNT162b1 in adults / M.J. Mulligan, K.E. Lyke, N. Kitchin [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 586. – № 7830. – P. 589–593.
163. COVID-19 vaccine BNT162b1 elicits human antibody and T H 1 T cell responses / U. Sahin, A. Muik, E. Derhovanessian [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 586. – № 7830. – P. 594–599.
164. Capsid –like particles decorated with the SARS-CoV-2 receptor-binding domain elicit strong virus neutralization activity / C. Fougereux, L. Goksøyr, M. Idorn [et al.] // *Nature Communications*. – 2021. – V. 12. – № 1.
165. Mosaic nanoparticles elicit cross-reactive immune responses to zoonotic coronaviruses in mice / A.A. Cohen, P.N.P. Gnanaprasam, Y.E. Lee [et al.] // *Science*. – 2021. – V. 371. – № 6530. – P. 735–741.
166. Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine / W. Tai, L. He, X. Zhang [et al.] // *Cellular and Molecular Immunology*. – 2020. – V. 17. – № 6. – P. 613–620.
167. REGN –COV2, a Neutralizing Antibody Cocktail, in Outpatients with COVID-19 / D.M. Weinreich, S. Sivapalasingam, T. Norton [et al.] // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – V. 348. – № 3. – P. 238 –251.
168. LY –CoV555, a rapidly isolated potent neutralizing antibody, provides protection in a non –human primate model of SARS-CoV-2 infection. / B.E. Jones, P.L. Brown –

Augsburger, K.S. Corbett [et al.] // *BioRxiv* (препринт статьи) – 2020. – Режим доступа: doi: 10.1101/2020.09.30.318972.

169. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID –19: A randomized clinical trial / R.L. Gottlieb, A. Nirula, P. Chen [et al.] // *Journal of the American Medical Association*. – 2021. – V. 325. – № 7. – P. 632 –644.

170. Antibody resistance of SARS-CoV-2 variants B.1.351 and B.1.1.7 / P. Wang, M.S. Nair, L. Liu [et al.] // *Nature*. – 2021. – V. 593. – № 7857. – P. 130–135.

171. Broadly neutralizing antibodies overcome SARS-CoV-2 Omicron antigenic shift / E. Cameroni, J.E. Bowen, L.E. Rosen [et al.] // *Nature*. – 2021. – V. 602. – № 7898. – P. 664–670.

172. SARS-CoV-2 RBD antibodies that maximize breadth and resistance to escape / T.N. Starr, N. Czudnochowski, Z. Liu [et al.] // *Nature*. – 2021. – V. 597. – № 7874. – P. 97–102.

173. Isolation of a panel of ultra –potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern / A.A. Gorchakov, S. V. Kulemzin, S. V. Guselnikov [et al.] // *Cell Discovery*. – 2021. – V. 7. – № 1. – P. 1–15.

174. VH3 –53/66 –Class RBD –Specific Human Monoclonal Antibody iB20 Displays Cross –Neutralizing Activity against Emerging SARS-CoV-2 Lineages / S. V. Kulemzin, M. V. Sergeeva, K.O. Baranov [et al.] // *Journal of Personalized Medicine* – 2022. – V. 12. – № 6. – P. 895.

175. Pomplun S. Targeting the SARS-CoV-2 –spike protein: from antibodies to miniproteins and peptides / S. Pomplun // *RSC Medicinal Chemistry*. – 2021. – V. 12. – № 2. – P. 197–202.

176. Ultrapotent miniproteins targeting the SARS-CoV-2 receptor-binding domain protect against infection and disease / J.B. Case, R.E. Chen, L. Cao [et al.] // *Cell Host & Microbe*. – 2021. – V. 29. – № 7. – P. 1151 –1161.

177. De novo design of picomolar SARS-CoV-2 miniprotein inhibitors / L. Cao, I. Goreshnik, B. Coventry [et al.] // *Science*. – 2020. – V. 370. – № 6515. – P. 426 –431.

178. Computational Design of Miniproteins as SARS-CoV-2 Therapeutic Inhibitors / B. Jawad, P. Adhikari, K. Cheng [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – № 2. – P. 838.
179. Лахин А. В. Аптамеры: проблемы, пути их решения и перспективы / А. Лахин, В.З. Тарантул, Л.В. Генинг // *Acta Naturae*. – 2013. – Т. 5. – №4 (19). – С. 37–47.
180. A serum-stable RNA aptamer specific for SARS-CoV-2 neutralizes viral entry / J. Valero, L. Civit, D.M. Dupont [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2021. – V. 118. – № 50. – P. e2112942118.
181. Ferreira –Bravo L.A. Xeno –Nucleic Acid (XNA) 2' –Fluoro –Arabino Nucleic Acid (FANA) Aptamers to the receptor-binding Domain of SARS-CoV-2 S Protein Block ACE2 Binding / I.A. Ferreira –Bravo and J.J. Destefano // *Viruses* 2021, Vol. 13, Page 1983. – 2021. – V. 13. – № 10. – P. 1983.
182. A SARS-CoV-2 Spike Binding DNA Aptamer that Inhibits Pseudovirus Infection by an RBD –Independent Mechanism** / A. Schmitz, A. Weber, M. Bayin [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2021. – V. 60. – № 18. – P. 10279–10285.
183. Identification of SARS-CoV-2 –against aptamer with high neutralization activity by blocking the RBD domain of spike protein 1 / G. Yang, Z. Li, I. Mohammed [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. – 2021. – V. 6. – № 1. – P. 1–4.
184. Aptamer Blocking Strategy Inhibits SARS-CoV-2 Virus Infection / M. Sun, S. Liu, X. Wei [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2021. – V. 60. – № 18. – P. 10266–10272.
185. Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein / C. Toelzer, K. Gupta, S.K.N. Yadav [et al.] // *Science*. – 2020. – V. 370. – № 6517. – P. 725–730.
186. Small –Molecule Inhibitors of the Coronavirus Spike: ACE2 Protein –Protein Interaction as Blockers of Viral Attachment and Entry for SARS-CoV-2 / D. Bojadzic, O. Alcazar, J. Chen [et al.] // *ACS Infectious Diseases*. – 2021. – V. 7. – № 6. – P. 1519–1534.

187. An update review of emerging small –molecule therapeutic options for COVID-19 / D. Tian, Y. Liu, C. Liang [et al.] // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2021. – V. 137. – P. 111313.
188. Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2 / Y. Xiang, S. Nambulli, Z. Xiao [et al.] // *Science*. – 2020. – V. 370. – № 6523. – P. 1479–1484.
189. An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction / L. Hanke, L. Vidakovics Perez, D.J. Sheward [et al.] // *Nature communications*. – 2020. – V. 11. – № 1. – P. 2076 –2090.
190. A combination of cross –neutralizing antibodies synergizes to prevent SARS-CoV-2 and SARS-CoV pseudovirus infection / H. Liu, M. Yuan, D. Huang [et al.] // *Cell host & microbe*. – 2021. – V. 29. – № 5. – P. 806 –818.
191. Modular basis for potent SARS-CoV-2 neutralization by a prevalent VH1 –2 –derived antibody class / M. Rapp, Y. Guo, E.R. Reddem [et al.] // *Cell reports*. – 2021. – V. 35. – № 1. – P. 108950.
192. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike / L. Liu, P. Wang, M.S. Nair [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 584. – № 7821. – P. 450–456.
193. Пат. № 2749459 Российская Федерация, МПК С12N 15/74, С07К 14/00, А61К 39/215, А61Р 31/14, С07К 16/10. Универсальный интеграционный вектор pVEAL и рекомбинантная плазмида pVEAL –15742, обеспечивающая синтез и секрецию scFv –Fc антител ADI –15742 против вируса Эбола в клетках млекопитающих и полученная с использованием вектора pVEAL / Исаева А.А., Несмеянова В.С., Зыбкина А.В., Щербаков Д.Н., Шаньшин Д.В., Волкова Н.В.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. – опубл. 11.06.2021, Бюл. № 17.
194. SARS-CoV-2 spike produced in insect cells elicits high neutralization titres in non –human primates / T. Li, Q. Zheng, H. Yu [et al.] // *Emerg. Microbes Infect.* – 2020. – V. 9. – № 1. – P. 2076 –2090.

195. BeStSel: a web server for accurate protein secondary structure prediction and fold recognition from the circular dichroism spectra / A. Micsonai, F. Wien, É. Bulyáki [et al.] // *Nucleic acids research*. – 2018. – V. 46. – № W1. – P. W315–W322.
196. Structural and Functional Characterization of SARS-CoV-2 RBD Domains Produced in Mammalian Cells / C. Gstöttner, T. Zhang, A. Resemann [et al.] // *Analytical Chemistry*. – 2021. – V. 93. – № 17. – P. 6839–6847.
197. Reed L.J. A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS¹² / L.J. Reed and H. Muench // *American Journal of Epidemiology*. – 1938. – V. 27. – № 3. – P. 493–497.
198. Purification and characterization of the receptor-binding domain of SARS-CoV-2 spike protein from *Escherichia coli* / Y. He, J. Qi, L. Xiao [et al.] // *Engineering in Life Sciences*. – 2021. – V. 21. – № 6. – P. 453–460.
199. The Nuts and Bolts of SARS-CoV-2 Spike receptor-binding Domain Heterologous Expression / M. Maffei, L.C. Montemiglio, G. Vitagliano [et al.] // *Biomolecules*. – 2021. – V. 11. – № 12. – P. 1812.
200. The Nuts and Bolts of SARS-CoV-2 Spike receptor-binding Domain Heterologous Expression / M. Maffei, L.C. Montemiglio, G. Vitagliano [et al.] // *Biomolecules* 2021, Vol. 11, Page 1812. – 2021. – V. 11. – № 12. – P. 1812.
201. Structure – and Interaction –Based Design of Anti –SARS-CoV-2 Aptamers / V. Mironov, I.A. Shchugoreva, P. V. Artyushenko [et al.] // *Chemistry – A European Journal*. – 2022. – V. 28. – № 12. – P. e202104481.
202. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long –term cultivation of euploid cells from human and animal subjects / T.T. PUCK, S.J. CIECIURA, and A. ROBINSON // *The Journal of experimental medicine*. – 1958. – V. 108. – № 6. – P. 945–956.
203. The genomic sequence of the Chinese hamster ovary (CHO) –K1 cell line / X. Xu, H. Nagarajan, N.E. Lewis [et al.] // *Nature Biotechnology*. – 2011. – V. 29. – № 8. – P. 735–741.
204. Human cell lines for biopharmaceutical manufacturing: history, status, and future perspectives / J. Dumont, D. Euwart, B. Mei [et al.] // *Crit Rev Biotechnol*. – 2015. – V. 36. – № 6. – P. 1110–1122.

205. A novel regulatory element (E77) isolated from CHO –K1 genomic DNA enhances stable gene expression in Chinese hamster ovary cells / S.Y. Kang, Y.G. Kim, S. Kang [et al.] // *Biotechnology journal*. – 2016. – V. 11. – № 5. – P. 633–641.

206. Bioprocessing of Recombinant CHO –K1, CHO –DG44, and CHO –S: CHO Expression Hosts Favor Either mAb Production or Biomass Synthesis / D. Reinhart, L. Damjanovic, C. Kaisermayer [et al.] // *Biotechnology Journal*. – 2019. – V. 14. – № 3. – P. 1700686.

207. Пат. № 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 / Меркульева Ю.А., Щербаков Д.Н., Беленькая С.В., Исаева А.А., Несмеянова В.С., Шаньшин Д.В., Волкова Н.В., Ильичев А.А., Карпенко Л.Н.; заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. – опубл. 11.08.2021, Бюл. № 23.

208. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor / J. Lan, J. Ge, J. Yu [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 581. – № 7807. – P. 215–220.

209. Development and evaluation of a set of spike and receptor binding domain –based enzyme –linked immunosorbent assays for SARS-CoV-2 serological testing / R. Camacho –Sandoval, A. Nieto –Patlán, G. Carballo –Uicab [et al.] // *Diagnostics*. – 2021. – V. 11. – № 8. – P. 1506.

210. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold / J. Jumper, R. Evans, A. Pritzel [et al.] // *Nature*. – 2021. – V. 596. – № 7873. – P. 583–589.

211. The inherent flexibility of receptor binding domains in SARS-CoV – 2 spike protein / H.M. Dokainish, S. Re, T. Mori [et al.] // *ELife*. – 2022. – V. 11. – P. e75720.

212. Structural and functional comparison of SARS-CoV-2 –spike receptor binding domain produced in *Pichia pastoris* and mammalian cells / Argentinian AntiCovid Consortium // *Scientific reports*. – 2020. – V. 10. – № 1. – P. 21779.

213. Animal models for COVID-19 / C. Muñoz–Fontela, W.E. Dowling, S.G.P. Funnell [et al.] // *Nature*. – 2020. – V. 586. – № 7830. – P. 509–515.

214. Sutton T.C. Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus / T.C. Sutton and K. Subbarao // *Virology*. – 2015. – V. 479. – P. 247.

215. Self –Assembled Particles Combining SARS-CoV-2 RBD Protein and RBD DNA Vaccine Induce Synergistic Enhancement of the Humoral Response in Mice / M.B. Borgoyakova, L.I. Karpenko, A.P. Rudometov [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – V. 23. – № 4. – P. 2188.

216. Sterilizing immunity against SARS-CoV-2 in hamsters conferred by a novel recombinant subunit vaccine / Y. Wu, X. Huang, L. Yuan [et al.] // *BioRxiv* (препринт статьи). – 2020. – Режим доступа: doi.org/10.1101/2020.12.18.423552.

217. Engineered SARS-CoV-2 receptor binding domain improves manufacturability in yeast and immunogenicity in mice / N.C. Dalvie, S.A. Rodriguez –Aponte, B.L. Hartwell [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2021. – V. 118. – № 38. – P. e2106845118.

218. Advances and gaps in SARS-CoV-2 infection models / C. Muñoz –Fontela, L. Widerspick, R.A. Albrecht [et al.] // *PLOS Pathogens*. – 2022. – V. 18. – № 1. – P. e1010161.

219. Neutralizing antibody –independent immunity to SARS-CoV-2 in hamsters and hACE –2 transgenic mice immunized with a RBD/Nucleocapsid fusion protein / J.T. Castro, M.J. Fumagalli, N.S. Hojo –Souza [et al.] // *BioRxiv* (препринт статьи) – 2021. – Режим доступа: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.09.16.460663v1.full>.

220. Syrian hamsters as a small animal model for SARS-CoV-2 infection and countermeasure development / M. Imai, K. Iwatsuki –Horimoto, M. Hatta [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2020. – V. 117. – № 28. – P. 16587–16595.

221. Recombinant vaccine containing an RBD –Fc fusion induced protection against SARS-CoV-2 in nonhuman primates and mice / S. Sun, L. He, Z. Zhao [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. – 2021. – V. 18. – № 4. – P. 1070–1073.
222. Immunoglobulin fragment F(ab')₂ against RBD potently neutralizes SARS-CoV-2 in vitro / X. Pan, P. Zhou, T. Fan [et al.] // *Antiviral Res.* – 2020. – V. 182. – P. 104868.
223. Development of Spike receptor-binding Domain Nanoparticles as a Vaccine Candidate against SARS-CoV-2 Infection in Ferrets / Y. –I. Kim, D. Kim, K. –M. Yu [et al.] // *MBio*. – 2021. – V. 12. – № 2. – P. 1–13.
224. Susceptibility of rabbits to SARS-CoV-2 / A.Z. Mykytyn, M.M. Lamers, N.M.A. Okba [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. – 2021. – V. 10. – № 1. – P. 1–7.
225. First Evidence of Natural SARS-CoV-2 Infection in Domestic Rabbits / M. Fritz, D. de Riols de Fonclare, D. Garcia [et al.] // *Veterinary Sciences*. – 2022. – V. 9. – № 2. – P. 49.
226. Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant / J.C.C. Chang, J.P. Diveley, J.R. Savary [et al.] // *Advanced drug delivery reviews*. – 1998. – V. 32. – № 3. – P. 173–186.
227. Different human vaccine adjuvants promote distinct antigen –independent immunological signatures tailored to different pathogens / N.P.H. Knudsen, A. Olsen, C. Buonsanti [et al.] // *Scientific Reports*. – 2016. – V. 6. – № 1. – P. 1–13.
228. Nanoengineering of vaccines using natural polysaccharides / A.S. Cordeiro, M.J. Alonso, and M. de la Fuente // *Biotechnology advances*. – 2015. – V. 33. – № 6 Pt 3. – P. 1279–1293.
229. Стимулирующее влияние дрожжевой двуспиральной РНК на активность генов белков системы интерферона / A. V. Bateneva, S.G. Gamaley, R.L. Lebedev [et al.] // *Медицинская иммунология*. – 2020. – V. 22. – № 6. – P. 1155–1162.
230. Волосникова Е.А. Исследование процесса образования конъюгатов для создания вакцинных конструкций / Е.А. Волосникова // *Сиб. науч. мед. журнал*. – 2011. – V. 31. – № 6. – С. 141–145.

231. Durocher Y. Expression systems for therapeutic glycoprotein production / Y. Durocher and M. Butler // *Current opinion in biotechnology*. – 2009. – V. 20. – № 6. – P. 700–707.

232. Antibodies to the Spike Protein receptor-binding Domain of SARS-CoV-2 at 4 – 13 Months after COVID-19 / E.A. Kolosova, O.N. Shaprova, D. V. Shanshin [et al.] // *Journal of clinical medicine*. – 2022. – V. 11. – № 14. – P. 4053.

Приложение 1

Справка о депонировании штамма CHO –K1 –RBD



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ
И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**



ФБУН ГНЦ ВБ «ВЕКТОР» РОСПОТРЕБНАДЗОРА

Адрес: 630559 р.п. Кольцово Новосибирской области Телефон: (383) 363-47-00 Факс: (383) 336-74-09
E-mail: vector@vector.nsc.ru http://www.vector.nsc.ru ОГРН 1055475048122 ИНН 5433161342

От 26.01.2021 № 1400/198

На № _____ от _____

Справка о депонировании
штамма культуры клеток

СПРАВКА О ДЕПОНИРОВАНИИ ШТАММА КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК

Коллекция культур клеток Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) приняла на депонирование культуру клеток: «Штамм рекомбинантной клеточной линии CHO-K1-RBD – продуцент рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2»

Авторское название клеточной линии: CHO-K1-RBD

Вид депонирования: гарантийное хранение с целью патентования.

Клеточная культура получена коллективом авторов:

Щербаков Дмитрий Николаевич
Меркульева Юлия Александровна
Беленькая Светлана Валерьевна
Исаева Анастасия Александровна
Несмеянова Валентина Сергеевна

Дата депонирования: 19.01.2021 г.

Депозитор: Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Депозитор обязуется сохранять и поддерживать штамм до конца срока действия патента.

Продукт, синтезируемый штаммом: рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка SARS-CoV-2.

Принятая в коллекцию культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора культура клеток получила регистрационный номер 322

Культура клеток в количестве 2-х ампул хранится в отделе биоинженерии, корпус 107, в жидком азоте при температуре -196°C .

Культура клеток в количестве 3-х ампул хранится в Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора корпус 104/1, в жидком азоте при температуре -196°C .

Генеральный директор



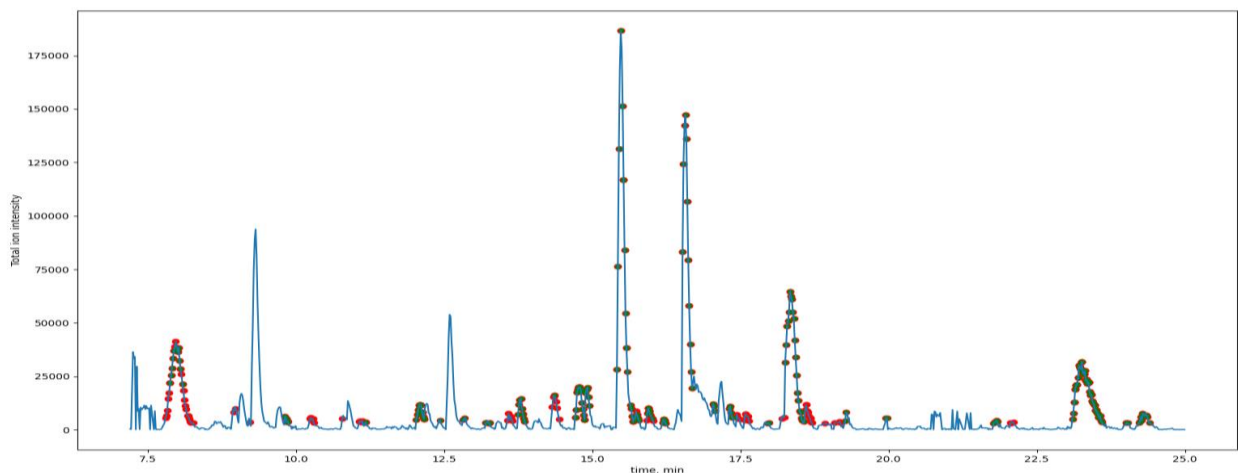
Handwritten signature of P.A. Maksyutov

Р.А. Максютлов

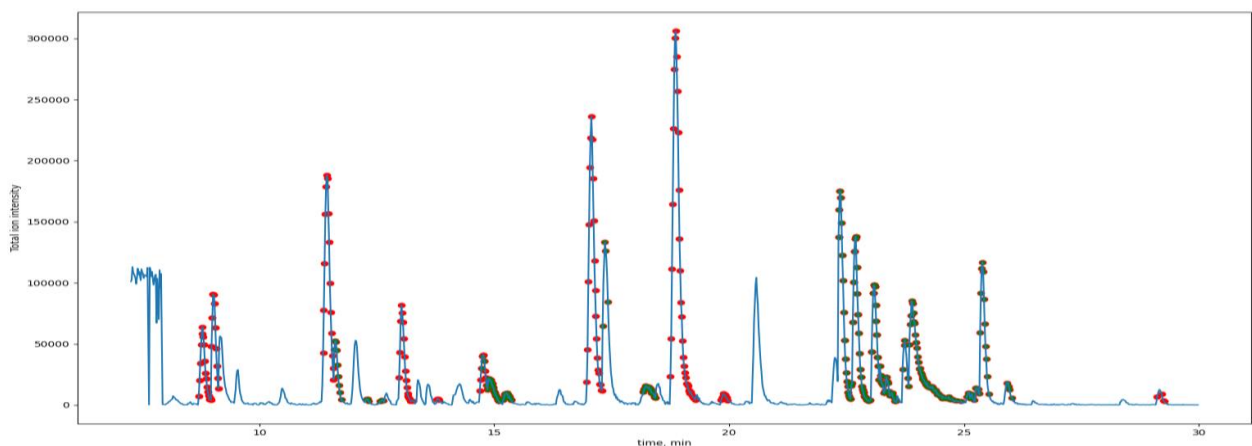
Приложение 2

Данные анализа первичной структуры RBD методом LC –SM/MS

1. Хроматограмма разделения продуктов гидролиза RBD химотрипсином. Красными точками обозначены немодифицированные пептиды, зелеными точками – пептиды, потенциально модифицированные гликозидными остатками.



2. Хроматограмма разделения продуктов гидролиза RBD трипсином. Красными точками обозначены немодифицированные пептиды, зелеными точками – пептиды, потенциально модифицированные гликозидными остатками.



3. Потенциальные гликозидные модификации RBD, полученные при анализе LC – MS/MS спектров. Н – гексоза, N – N –ацетилгексозамин, S – N –ацетиламиновая кислота, Su – сульфат.

позиция	модификация	пептид	оценка
S152	H1N1	RKSNL	10,6
S152	H1N3S1Su	KSNLKPFR	54,6
S18	H1N1	VQPTEIVR	14,2
S18	H1N1S1	VQPTEIVR	43,7
S18	N1S1	VQPTEIVR	16,9
S187	H1N1	FPLQSYGF	122,4
S223	H1N1S1	STNLVKNK	50,1
S223	H1N3S1Su	STNLVKNK	10,6
S223	H2N2	KSTNLVKNK	20
S223	N1S1	KSTNLVKNK	22,8
S64	H1N1	NSASFSTF	36,2
S64	H2N2	YNSASF	107,3
S64	N1S1	YNSASFSTF	22,5
S66	H1N1	NSASFSTF	14,9
S66	H1N1S1	YNSASF	15,3
S66	N1S1	YNSASFSTF	33,6
S68	N1S1	YNSASFSTF	55,6
S76	H1N1	KCYGVSPTKL	30
S76	H1N1S1	GVSPTKL	11,7
S9	H1N3S1Su	QTSNF	18,9
S9	N1S1	GIYQTSNFR	20,7
T108	H1N1S1	QIAPGQTGKIADYNYK	20
T16	H1N1S1	VQPTEIVR	69,2
T16	H1N1S2	VQPTEIVR	58,4
T16	H1N2	VQPTEIVR	16,9
T224	H1N1S1	STNLVKNK	23,1
T224	H1N1S2	STNLVK	50,1
T224	H1N2	KSTNLVKNK	37,7
T224	N1S1	KSTNLVKNK	20
T69	H1N2	STFKCY	38,6
T8	H1N1S2	GIYQTSNFR	39,1
T8	N1S1	QTSNF	27,1