

На правах рукописи

Боргоякова Мария Борисовна

ДНК и ДНК/белковая вакцины для профилактики COVID-19

1.5.3 – молекулярная биология

Автореферат диссертации
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово – 2024

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

**Научный
руководитель:**

Ильичев Александр Алексеевич
доктор биологических наук, профессор,
заведующий отделом биоинженерии ФБУН ГНЦ
ВБ «Вектор» Роспотребнадзора

**Официальные
оппоненты:**

Глотова Татьяна Ивановна
доктор биологических наук, профессор, главный
научный сотрудник лаборатории биотехнологии -
диагностический центр Института
экспериментальной ветеринарии Сибири и
Дальнего Востока ФГБУН Сибирского
федерального научного центра агробиотехнологий
РАН

**Ведущая
организация:**

Соболев Иван Андреевич
кандидат биологических наук, старший научный
сотрудник НИИ вирусологии ФГБНУ
«Федеральный исследовательский центр
фундаментальной и трансляционной медицины»
ФГБУН Институт химической биологии и
фундаментальной медицины СО РАН

Защита состоится «24» мая 2024 г. в 9-00 на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р.п. Кольцово, Новосибирская область, тел. (383) 363-47-00.

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

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук,
доцент

Ильичёва Т.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. COVID-19 – острое вирусное заболевание, вызванное коронавирусом SARS-CoV-2, было впервые диагностировано в декабре 2019 г. в китайском городе Ухань, а уже в марте 2020 года ВОЗ присвоила вспышке данного заболевания статус пандемии. По состоянию на конец 2023 года в мире зарегистрировано свыше 700 млн случаев заболевания и около 7 млн летальных исходов, а смертность, связанная с заболеванием, оценивается дополнительно в 15 млн человек. Несмотря на то, что в мае 2023 года было объявлено, что COVID-19 больше не является чрезвычайной угрозой в области здравоохранения, ситуация сохраняет серьёзность угрозы здоровью населения планеты.

После объявления пандемии многие страны приняли ряд мер по ограничению распространения заболевания: ввели карантин, принудительную самоизоляцию, обязательное использование средств индивидуальной защиты и так далее. Несмотря на это заболеваемость очень быстро росла и реально ограничить её смогли лишь проведением массовой вакцинации, которая привела не только к снижению заболеваемости, но и к уменьшению проявления симптомов всех видов тяжести.

Необходимость срочного создания эффективных вакцин привела к беспрецедентному скачку в развитии различных платформ, ранее используемых для решения узких задач и опробованных на ранних стадиях клинических испытаний. Большое количество вакцин прошло чрезвычайно быстро через все степени одобрений, и они получили разрешение для массового использования. Помимо традиционных вакцин, основанных на инактивированных вирусах или рекомбинантных белках, широкое распространение получили мРНК-вакцины, а также вакцины на основе вирусных векторов. Во время пандемии также было получено одобрение для применения на людях первой в мире ДНК-вакцины, что является сигналом о перспективах данной платформы в создании средств вакцинопрофилактики.

Вакцины на основе ДНК обладают большими преимуществами: их быстро и легко создать, они безопасны, стабильны в широком температурном диапазоне, способны индуцировать как гуморальный, так и клеточный иммунитет, включая Т-хелперы и цитотоксические Т-лимфоциты (Kumru O.S. et al, 2014; Tebas P. et al, 2019; Tejada-Mansir A. et al, 2019; Chavda V.P. et al, 2021). Определённым недостатком ДНК-вакцин является их низкая иммуногенность в случае инъекции в виде «голой» плазмидной ДНК (Kutzler M.A. & Weiner D.B., 2008; Hobernik D. & Bros M., 2018). Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин был опробован широкий спектр стратегий, включая упаковку в липосомы, использование адьювантных плазмид, кодирующих цитокины, а также доставку с

помощью генной пушки, электропорации или инжектора. Эти способы помогают решить проблему иммуногенности, но при их применении иногда возникают некоторые проблемы безопасности, технологические сложности и увеличение стоимости разрабатываемой вакцины.

В данной работе были использованы как классические приёмы повышения иммуногенности ДНК-вакцин, заключающиеся в оптимизации нуклеотидных последовательностей, кодирующих иммуноген, и включении в состав различных сигнальных последовательностей, так и оригинальные подходы с использованием поликатионных конъюгатов.

Цель данной работы заключалась в разработке экспериментальных ДНК и ДНК/белковых вакцин для профилактики COVID-19 и в изучении их иммуногенных и протективных свойств на мышах линии BALB/c.

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

1. Сконструировать плазмидные ДНК, кодирующие иммуногены вируса SARS-CoV-2.
2. Исследовать экспрессию целевых генов *in vitro*.
3. Сконструировать комбинированные частицы, содержащие ДНК-вакцины в качестве ядра и рекомбинантный белок на поверхности.
4. Изучить физико-химические свойства созданных частиц.
5. Оценить иммуногенность и протективность созданных экспериментальных конструкций.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы. В данном исследовании получена плаزمида pVAXrbd, которая обеспечивает не только эффективный синтез белка RBD в эукариотических клетках, но и секрецию белка во внеклеточное пространство за счёт введения в состав иммуногена оригинальной сигнальной последовательности, представляющей из себя гибридную сигнальную последовательность люциферазы и фиброина. Получен патент на изобретение РФ №2754230 от 30.08.2021 г.

Получена плаزمида pBSI-COV-Ub, которая обеспечивает синтез искусственного полиэпитопного иммуногена, разработанного Бажаном С.И. в ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». Данный иммуноген представляет из себя последовательность, собранную из эпитопов белков E, M, N, S вируса SARS-CoV-2, рестриктируемых мышинными и человеческими МНС I и II класса. Плазмиды депонированы в банк Коллекции бактерий, бактериофагов и грибов ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Получены патенты на изобретение РФ: №2806556 и №2806590 от 01.11.2023 г.

Впервые для вакцины против COVID-19 разработаны самособирающиеся частицы, представляющие из себя комплекс ДНК-вакцины и рекомбинантного белка RBD, конъюгированного с полиглокин-спермидином. Получен патент на изобретение РФ №2781294 от 11.10.2022 г.

Практическая ценность работы заключается в получении ДНК-вакцин для профилактики COVID-19, которые могут стать компонентами более сложных конструкций и обеспечивать Т-клеточный ответ, очень важный для формирования защитного противовирусного иммунитета. Также было показано, что использование компьютерного подхода для проектирования искусственного полиэпитопного антигена, состоящего из разных белков вируса SARS-CoV-2, может обеспечить создание эффективной ДНК-вакциной конструкции для индукции Т-клеточного ответа.

Методология и методы исследования. Работа выполнена с помощью современных методов исследования, включающих биоинформационные подходы, методы молекулярной биологии, генной инженерии, иммунохимические и иммунологические методы, методы работы с культурами клеток и гуманной работы с животными.

Положения, выносимые на защиту:

1. ДНК-конструкция pVAXrbd, кодирующая рецептор-связывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2, обеспечивает экспрессию целевого гена, а также синтез и секрецию целевого белка в эукариотических клетках.

2. ДНК-конструкция pBSI-COV-Ub, кодирующая искусственный Т-клеточный иммуноген вируса SARS-CoV-2, обеспечивает экспрессию целевого гена, синтез целевого белка и его эффективное расщепление протеасомой.

3. ДНК-вакцина pVAXrbd как сама по себе, так и в комплексе с конъюгатами PGS и PGS-RBD, индуцирует у иммунизированных мышей гуморальный и Т-клеточный ответ, а также обеспечивает снижение вирусной нагрузки при заражении животных.

4. ДНК-вакцина pBSI-COV-Ub как сама по себе, так и в комплексе с конъюгатом PGS-RBD, индуцирует у иммунизированных мышей специфический гуморальный и Т-клеточный ответ.

Степень достоверности и апробация результатов. Положения и выводы являются научно обоснованными. Достоверность результатов подтверждена статистической обработкой и воспроизводимостью в повторах. Результаты всех экспериментов получены с применением современных биохимических, молекулярно-биологических, иммунологических и биоинформационных методов исследования на сертифицированном оборудовании.

Результаты были устно представлены на Международной конференции молодых ученых биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio» (Кольцово, Россия, в 2020 и 2021 году доклад занял первое место в конкурсе за лучший доклад, в 2023 г. - участие), международном онлайн-симпозиуме «Chronic viral infection and cancer,

openings for vaccines» (онлайн, 2021 г.), VII Внеочередном онлайн конгрессе Евро-азиатского общества по инфекционным болезням (онлайн, 2021 г.), Второй Санкт-Петербургской молодежной конференции «Актуальные вопросы эпидемиологии, иммунологии, профилактики и лечения COVID-19 (г. Санкт-Петербург, 2022 г., второе место за лучший доклад).

По материалам диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, в том числе шесть статей в российских и международных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ для защиты диссертаций, и шесть тезисов в сборниках трудов научных конференций. Получено четыре патента на изобретение РФ.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы. Работа изложена на 127 страницах, включает 20 рисунков, 6 таблиц. Список литературы включает 275 источников.

Личный вклад автора. Основная часть экспериментов и анализ результатов выполнены лично автором или при его участии, включая конструирование, наработку и очистку рекомбинантных плазмид, исследование экспрессии целевых генов в составе полученных ДНК-вакцинных конструкций, трансфекцию клеток НЕК293Т, иммунизацию животных и забор органов, подготовку образцов к исследованию, оценку иммуногенности и специфической активности сконструированных рекомбинантных плазмид, статистическую обработку результатов, а также подготовку научных статей для публикации и докладов для выступления на конференциях.

Автор выражает благодарность сотрудникам отдела «Коллекция микроорганизмов» под руководством к.б.н. Пьянкова О.В.: Зайковской А.В. за анализ вируснейтрализующей активности сывороток, Кудрову Г.А. и Шиповалову А.В. за исследование протективности конструкций на мышах линии BALB/c (ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора); сотрудникам лаборатории иммунохимии отдела биоинженерии под руководством к.б.н. Щербакова Д.Н. за получение и очистку рекомбинантных белков S и RBD (ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора); к.б.н. Волосниковой Е.А. за синтез и очистку конъюгатов полиглобулин-спермидин и PGS с белком RBD (ИМБТ ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора); к.ф.м.н. Зайцеву Б.Н. за проведение электронной микроскопии частиц (Отдел микроскопических исследований ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора); к.б.н. Баранову К.О. за исследование кинетики связывания методом биослойной интерферометрии (Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Обзор литературы. В обзоре литературы представлены подходы, которые реализованы в ходе пандемии COVID-19 для создания профилактических вакцинных препаратов. Приведены принципы создания различных вакцин на основе самого вирусного агента, на основе известных и широко используемых вирусных векторов, на основе белков или нуклеиновых кислот, а также эффективность разработанных вакцин, наблюдаемая в ходе клинических испытаний.

Материалы и методы. Глава содержит описание материалов, использованных в работе (олигонуклеотиды, синтетические пептиды, наборы, ферменты, реактивы, клеточные линии, питательные среды, растворы и буферы), и методов молекулярной биологии (получение генно-инженерных конструкций, рестрикционный анализ, электрофорез белков и нуклеиновых кислот, выделение нуклеиновых кислот, ПЦР (стандартная, с обратной транскрипцией, в реальном времени)), физико-химических методов (спектрофотометрия, биослойная интерферометрия, синтез конъюгатов), микроскопических методов (электронная микроскопия частиц), иммунологических методов (ИФА, иммуноблоттинг, ELISpot, ICS), микробиологических методов (трансформация *E. coli*, наработка препаративных количеств плазмид), методов культуральных работ (ведение линий, трансфекция клеток, получение и ведение линий-продуцентов), вирусологических методов (постановка вируснейтрализации и оценка протективности), методов работы с животными (иммунизации, выведение животных из эксперимента с забором образцов или заражением живым вирусом), компьютерных методов (проектирование генов, оптимизация генетических последовательностей, расчёт пептидов, статистическая обработка результатов).

Результаты исследования и обсуждение результатов.

Данный раздел представлен в виде двух частей. Первая часть посвящена конструированию комбинированной вакцины CCV-RBD, содержащей в качестве ядра плазмиду pVAXrbd, кодирующую рецепторсвязывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2, и рекомбинантный белок RBD на поверхности, а также изучению физико-химических и иммуногенных свойств данной конструкции и её компонентов. Вторая часть посвящена конструированию и исследованию свойств ДНК-вакцины, кодирующей искусственный полиэпитопный иммуноген, спроектированный на основе белков S, N, M и E вируса SARS-CoV-2.

Комбинированная ДНК/белок вакцина

Дизайн pVAXrbd и оценка экспрессии целевого гена. Для дизайна первого иммуногена была использована последовательность, кодирующая рецепторсвязывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2, опубликованная

в GenBank (320V–542N, MN908947). Для обеспечения эффективного транспорта белка RBD из клетки в его состав была введена сигнальная последовательность, являющаяся гибридом лидерных последовательностей двух активно секретируемых белков: люциферазы и фиброина. После оптимизации кодонной последовательности, ген синтезировали и клонировали в составе вектора pVAX1, получив плазмиду pVAXrbd. Структуру плазмиды подтверждали с помощью секвенирования по методу Сэнгера.

Для оценки экспрессии нуклеотидной последовательности, кодирующей RBD, трансфицировали полученной плазмидой клетки линии HEK293T. Наличие экспрессии определяли как на уровне мРНК с помощью ОТ-ПЦР, так и на уровне белка с помощью иммуноблотинга. С помощью специфических праймеров был получен продукт, размер которого соответствовал размеру последовательности, кодирующей RBD (750 kb), см. рис. 1а. Для выявления белкового продукта лизаты трансфицированных клеток и культуральные среды, в которых они росли, исследовали с использованием сывороток мышей, иммунизированных вирусом SARS-CoV-2. Белок RBD был выявлен и в лизате клеток, и в культуральной среде, что говорит о высокой степени секреции белка (рис. 1б).

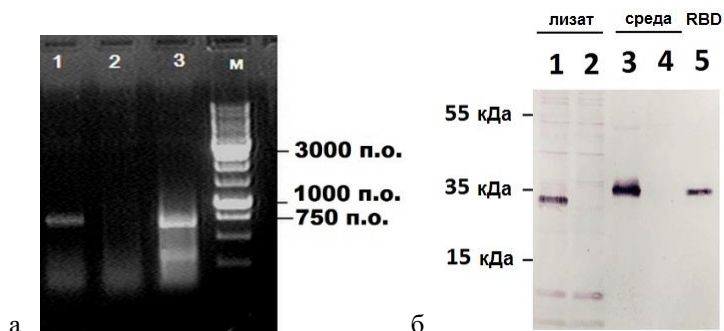


Рисунок 1. Оценка экспрессии целевого гена в эукариотической клеточной культуре HEK293T. (а) Электрофоретический анализ продуктов ОТ-ПЦР в 1%-ном агарозном геле. Дорожки 1 и 2 – продукты, полученные из суммарной РНК клеток, трансфицированных pVAXrbd и pVAX соответственно; дорожка 3 – продукт, полученный с помощью ПЦР из плазмиды pVAXrbd, кодирующей RBD, в качестве положительного контроля. М – маркер молекулярных масс ДНК M12 (“СибЭнзим”, Россия). (б) Анализ экспрессии белка RBD в клетках HEK293T, трансфицированных pVAXrbd и pVAX, методом вестерн-блота. Дорожки 1 и 2 – лизат клеток, трансфицированных pVAXrbd и pVAX соответственно; 3 и 4 – культуральная среда клеток, трансфицированных pVAXrbd и pVAX соответственно; 5 – рекомбинантный белок RBD.

Получение комплексов ДНК с полимерными конъюгатами и изучение их характеристик. Катионный полимер полиглюкин-спермидин (PGS) подтвердил свою безопасность в клинических испытаниях и зарекомендовал себя как перспективное средство доставки нуклеиновых кислот *in vivo*. Низкая стоимость, безопасность и возможность лиофилизации с длительным хранением при 4°C дают дополнительные технологические преимущества при производстве и транспортировке вакцинных препаратов, содержащих PGS. Поэтому полиглюкин-спермидин был выбран в качестве средства доставки ДНК-вакцины pVAXrbd. Благодаря тому, что активированные альдегиды декстрана способны ковалентно связываться с аминогруппами в составе белковых молекул, был получен конъюгат PGS с рекомбинантным белком RBD, который также использовали в качестве средства доставки ДНК-вакцины pVAXrbd. Присоединение белка к полиглюкин-спермидину наблюдали по изменению выхода фракции из гель-фильтрующей колонки и «размытию» бэнда белка в 15% PAGE электрофорезе в денатурирующих условиях (рис. 2а). Наличие белка в структуре также было подтверждено с помощью ультрафиолетовой (УФ) спектроскопии: белок RBD и конъюгат PGS-RBD имели характерный для белков пик поглощения при 280 нм (рис. 2б, стрелки 2 и 3).

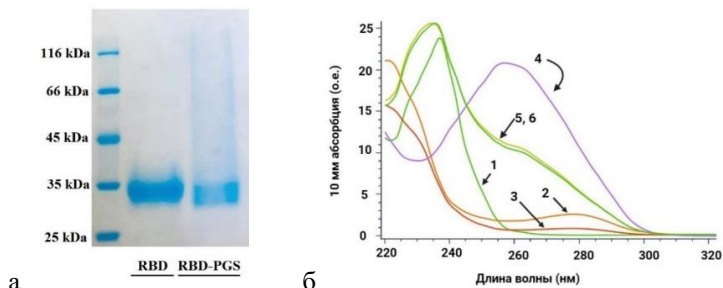


Рисунок 2. УФ-спектры комплексов CCV-RBD и pVAXrbd-PGS, а также их компонентов. 1 – PGS; 2 – белок RBD; 3 – PGS-RBD; 4 – плазида pVAXrbd; 5 и 6 – частицы CCV-RBD и pVAXrbd-PGS соответственно.

Сборка частиц. Соотношение масс ДНК:PGS для образования комплексов (рис. 3а) было подобрано эмпирически в предыдущих исследованиях и составило 1:10. Для формирования комплексов, включающих pVAXrbd и PGS-RBD (далее такой комплекс будет называться CCV-RBD, что расшифровывается как CombiCoronaVac-RBD (рис. 3б)), сначала смешивали компоненты в массовом соотношении ДНК:белок – 2:1, а затем добавляли избыток PGS в массовом соотношении 1:10 относительно ДНК. Формирование самоорганизующихся частиц оценивали по смещению

их подвижности в агарозном геле: инкапсулированные плазмиды теряли свою подвижность в электрическом поле (рис. 3в).

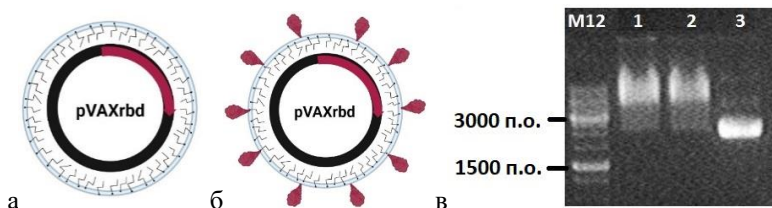


Рисунок 3. Сборка частиц. (а) Схематическое изображение частицы pVAXrbd-PGS. (б) Схематическое изображение частицы CCV-RBD. (в) Подтверждение инкапсуляции ДНК в оболочке PGS и PGS-RBD с помощью электрофореза в 1% агарозном геле: 1 – CCV-RBD; 2 – pVAXrbd-PGS; 3 – «голая» плаزمида pVAXrbd; M12 – маркер молекулярных масс ДНК M12 (“СибЭнзим”, Россия).

Сохранение структуры ДНК плазмиды в комплексах CCV-RBD и pVAXrbd-PGS также показано с помощью УФ-спектроскопии (рис. 2б, стрелки 4, 5 и 6 соответственно): спектры данных препаратов имеют характерный для ДНК пик при 260 нм. Экспонирование белка на поверхности частиц было подтверждено с помощью биослойной интерферометрии, что потенциально может значительно усилить RBD-специфический гуморальный иммунный ответ (рис. 4).

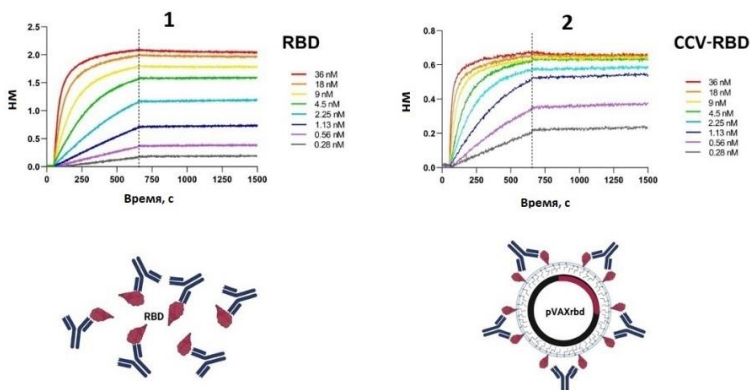


Рисунок 4. Связывание RBD (1) и CCV-RBD (2) с iB14, нейтрализующими SARS-CoV-2 антителам, в исследовании с помощью Octet K2. Внизу – схематическое представление взаимодействия белка RBD и частиц CCV-RBD с антителом iB14.

Размеры частиц были установлены в диапазоне 50-200 нм с помощью электронной микроскопии (рис. 5).

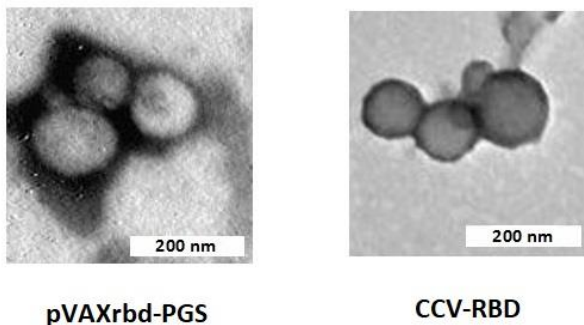


Рисунок 5. Электронные микрофотографии частиц.

Исследование иммуногенности полученных препаратов. Для оценки иммуногенности созданных конструкций иммунизировали самок мышей BALB/c массой 16–18 г. следующими препаратами: группа CCV-RBD – комбинированной вакциной, содержащей 100 мкг ДНК и 50 мкг белка; группа pVAXrbd-PGS – 100 мкг плазмиды pVAXrbd, инкапсулированной в оболочку из PGS; группа pVAXrbd – 100 мкг «голой» ДНК-вакцины; группа RBD – 50 мкг белка RBD. В группе intact были не иммунизированные животные. Мышей иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом три недели в бедро задней конечности. Спустя 10 дней после второй иммунизации у животных были взяты кровь и селезёнки для исследования вирус-специфического иммунного ответа.

Гуморальный иммунный ответ. По результатам RBD- и S-специфического ИФА, а также анализа вируснейтрализации в конечной точке эксперимента можно заключить, что использование полиглокин-спермидина в качестве средства доставки значительно увеличивает средние титры специфических и нейтрализующих антител у животных. Так, наиболее высокие значения титров были зарегистрированы в группе, получавшей комбинированный препарат CCV-RBD: они составили в среднем 1:369900 (рис. 6). Наблюдаемый эффект синергизма в отношении гуморального ответа может говорить об эффективном захвате антигенпрезентирующими клетками (АПК) вирусоподобных частиц CCV, а также о стимуляции Т-хелперного ответа за счёт ДНК компонента. Многократное представление белка RBD на поверхности частицы, видимо, также играет роль в усилении гуморального иммунного ответа на CCV-RBD.

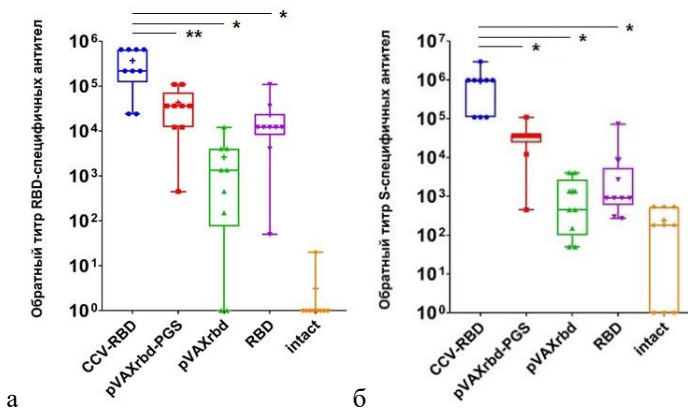


Рисунок 6. Титры специфических антител IgG к RBD (а) и S (б) SARS-CoV-2 в сыворотках мышей, иммунизированных CCV-RBD, pVAXrbd-PGS, pVAXrbd и белком RBD, определяли с помощью ИФА. Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

Эффект синергизма проявился также при исследовании вируснейтрализующей активности сывороток, которая является наиболее важным критерием эффективности вакцины. В группе CCV-RBD средний нейтрализующий титр составил 1:133, что достоверно выше титров, показанных в группах pVAXrbd-PGS и RBD (1:36 и 1:22) ($p < 0.05$) (рис.7).

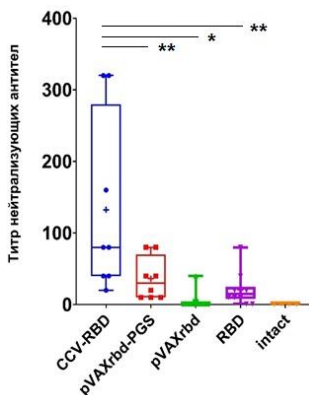


Рисунок 7. Вируснейтрализующую активность сывороток мышей, иммунизированных CCV-RBD, pVAXrbd-PGS, pVAXrbd и белком RBD, определяли с использованием штамма SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 (100 TCID₅₀).

Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

Клеточный иммунный ответ. С помощью метода ELISpot было показано, что высокий показатель клеточного иммунитета был зарегистрирован в группах животных, иммунизированных ДНК-вакциной в оболочке PGS и без неё: в среднем 172 и 125 спотообразующих единиц (SFUs) на 10^6 спленоцитов, соответственно (рис. 8а). В группе, получавшей комбинированную конструкцию, Т-клеточный ответ был ниже: 41 SFUs 1 млн спленоцитов. Самый низкий клеточный ответ наблюдали в группе мышей, иммунизированных белком RBD (7 SFUs на 1 млн спленоцитов). Полученные данные показывают, что иммунизация рекомбинантным белком RBD не вызывает формирование Т-клеточного ответа у мышей. Более низкий уровень Т-клеточного ответа в группе, получавшей комбинированную вакцину, по сравнению с группами, получавшими ДНК-вакцину, может быть связан с повышенным поглощением антигенпрезентирующими клетками комбинированных частиц и частичным разрушением плазмидной ДНК в лизосомах.

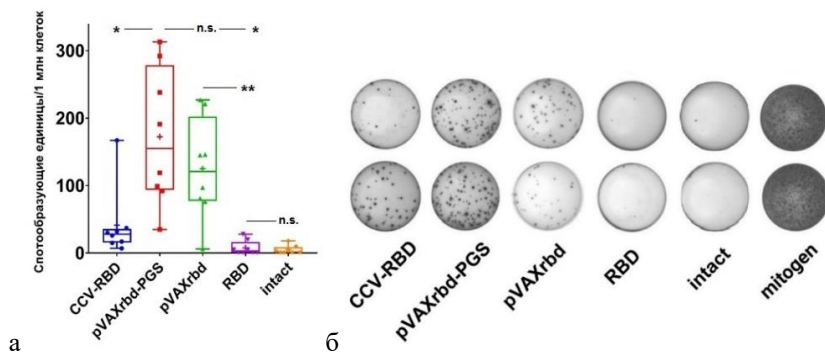


Рисунок 8. Оценка Т-клеточного ответа (а) Число спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на специфическую стимуляцию, на 10^6 клеток (в ELISpot). Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

Оценка протективности. В случае заражения опытных мышей штаммом hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 вируса SARS-CoV-2, относящимся к линии P.1 (гамма-вариант), в группах, иммунизированных CCV-RBD и pVAXrbd, показано достоверное ($p < 0.01$) значительное

снижение вирусной нагрузки по сравнению с интактным контролем (3,43 Ig и 3,18 Ig, соответственно). В группе, иммунизированной белком, показано снижение вирусной нагрузки, не являющееся достоверно значимым (2,79 Ig, $p>0.05$) (рис.9).

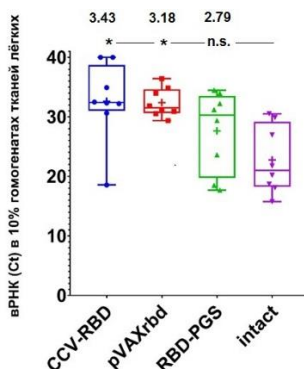


Рисунок 9. Вирусная нагрузка в тканях легких мышей BALB/c на 4-е сутки после заражения штаммом hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 вируса SARS-CoV-2. Индивидуальные значения Ct в ПЦР-РВ представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p<0.01$, ** $p<0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

Искусственный Т-клеточный иммуноген

Дизайн pBSI-COV-Ub и оценка экспрессии целевого гена. Для дизайна второго иммуногена применялась стратегия, основанная на выборе таких фрагментов белков S, N, M и E, чтобы они содержали кластеры перекрывающихся эпитопов. Предсказание Т-клеточных эпитопов было выполнено с использованием программы NetMHCpan-4.1 и базы данных Immune Epitope Database 2.22, IEDB 2.22. Использование минорных белков позволяет создать продукт, не чувствительный к изменчивости вируса, так как данные белки отличаются более высокой консервативностью. Отобранные фрагменты белков S, N, M и E обладали более чем 87% гомологичностью для разных штаммов вируса SARS-CoV-2 (Ухань, Гамма, Дельта, Омикрон) и содержали эпитопы, рестриктируемые системами МНС I и II человека и мыши. После объединения фрагментов в одну последовательность к её N-концу добавили универсальный Т-хелперный эпитоп PADRE, а к С-концу – маркерный эпитоп EPFRDYVDRFYKTLR из белка р24 ВИЧ-1, узнаваемый моноклональными антителами 29F2 (рис. 10). После оптимизации нуклеотидной последовательности ген синтезировали и клонировали в составе pVAX1, конструкция получила название pBSI-COV.

С помощью ДНК-матрицы, содержащей последовательность, кодирующую убиквитин, специфических праймеров и ПЦР в состав иммуногена был введён убиквитин, соответствующая плаزمиды была названа рBSI-COV-Ub. Структуру плазмиды подтверждали с помощью секвенирования по методу Сэнгера.

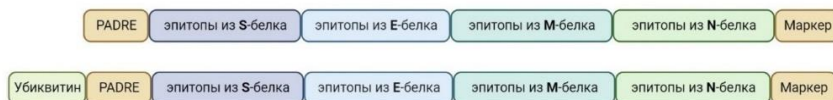


Рисунок 10. Схема расположения фрагментов белков вируса SARS-CoV-2 в составе последовательности полиэпитопного иммуногена BSI-COV (наверху) и BSI-COV-Ub (внизу).

Исследование экспрессии целевых генов проводили с использованием клеток HEK293T, трансфицированных плазмидами рBSI-CoV и рBSI-CoV-Ub (рис.11). Наличие экспрессии определяли как на уровне мРНК с помощью ОТ-ПЦР, так и на уровне белка с помощью иммуноблотинга. По результатам ОТ-ПЦР выявили, что размеры амплифицированных фрагментов соответствуют теоретически рассчитанным. Результаты иммуноблотинга свидетельствует об эффективном процессинге Т-клеточных иммуногенов в клетке, выявляя лесенку из дискретных белков с наибольшим весом 46 и 54,5 кДа, что соответствует теоретически рассчитанным продуктам генов bsi-cov и bsi-cov-ub соответственно.

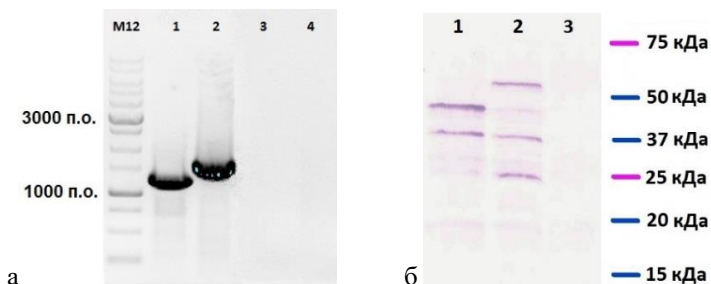


Рисунок 11. Анализ экспрессии целевых генов рBSI-COV и рBSI-COV-Ub после трансфекции клеток HEK293T. (а) Продукты ОТ-ПЦР с использованием тотальной РНК клеток HEK-293T, трансфицированных плазмидами рBSI-COV (1) и рBSI-COV-Ub (2) (электрофорез в 1% агарозном геле). На дорожках 3 и 4 – продукты ПЦР, поставленных на препаратах тотальной РНК без обратной транскрипции. (б) Белковые продукты, выявленные в клетках HEK293T, трансфицированных плазмидами рBSI-COV (1) и рBSI-COV-Ub (2), методом иммуноблота с

использованием МКА 29F2 к маркерному эпитопу. На дорожку 3 был нанесён лизат не трансфицированных клеток HEK293Т.

Оценка иммуногенности и протективности. Данные IFN- γ -ELISpot показали, что после двукратной иммунизации наблюдается формирование Т-клеточного иммунитета у мышей, которым вводили ДНК-конструкции pBSI-COV и pBSI-COV-Ub (рис.12): в среднем 315 и 375 спотов на 10^6 спленоцитов, соответственно. Значения в опытных группах достоверно отличались от контрольной группы.

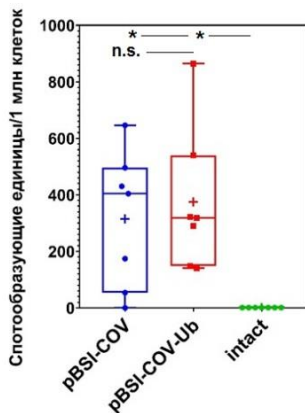


Рисунок 12. Оценка Т-клеточного ответа. Число спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на специфическую стимуляцию, на 10^6 клеток, определяли в ELISpot. Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

Анализ Т-клеточного ответа с помощью метода ICS показал, что при иммунизации мышей ДНК-вакцинами pBSI-COV и pBSI-COV-Ub формируются как CD3+/CD8+, так и CD3+/CD4+ лимфоциты, продуцирующие целый спектр цитокинов после стимуляции вирусными пептидами (рис. 13). Этот факт свидетельствует о формировании выраженного вирус-специфического Т-клеточного ответа.

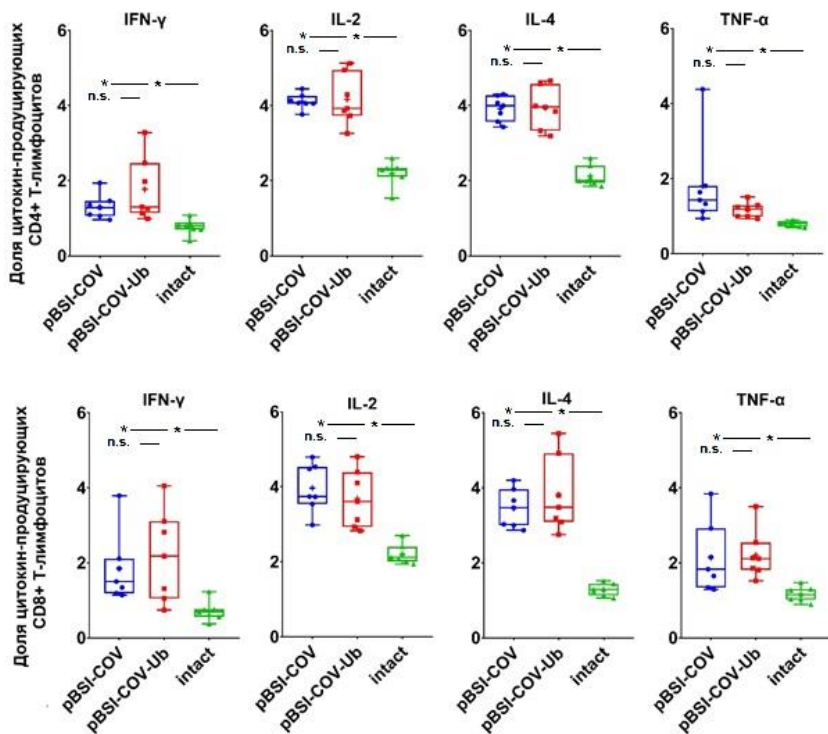


Рисунок 13. Оценка Т-клеточного ответа. Процент SARS-CoV-2-специфических цитокин-продуцирующих CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток (ISC и проточная цитометрия). Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

В случае заражения опытных мышей штаммом hCoV-19/Russia/SA-17620-080521/2021 вируса SARS-CoV-2, относящимся к линии P.1 (Гамма-вариант), в группе, иммунизированной pBSi-COV-Ub, показано достоверное ($p < 0.01$) значительное снижение вирусной нагрузки в лёгких животных по сравнению с контролем (3,45 lg) (рис. 14).

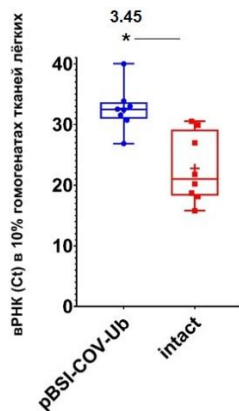


Рисунок 14. Вирусная нагрузка в тканях легких мышей BALB/c на 4-е сутки после заражения Гамма-вариантом SARS-CoV-2. Индивидуальные значения Ct в ПЦР-РВ представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют.

Исследование иммуногенности комбинированной конструкции, содержащей ДНК-вакцину rBSI-COV-Ub и рекомбинантный белок RBD, конъюгированный с полиглокин-спермидином.

Для оценки иммуногенности конструкции CCV-BSI иммунизировали самок мышей BALB/c массой 16–18 г. следующими препаратами: группа CCV-BSI – комбинированной вакциной, содержащей 100 мкг ДНК и 50 мкг белка; группа rBSI-COV-Ub – 100 мкг плазмиды rBSI-COV-Ub; группа PGS-RBD – 50 мкг белка RBD, конъюгированного с полиглокин-спермидином. В группе intact были не иммунизированные животные. Мышей иммунизировали внутримышечно дважды с интервалом три недели в бедро задней конечности. Спустя две недели после второй иммунизации у животных были взяты сыворотки и селезёнки для исследования вирус-специфического иммунного ответа.

С помощью RBD-специфического ИФА было показано, что иммунизация комбинированной конструкцией CCV-BSI приводит к формированию высокого уровня гуморального иммунитета. В группе, иммунизированной CCV-BSI, титр специфических IgG составил 1:2477679, а в группе, получавшей конъюгат PGS-RBD, – 1:1456250 (рис. 15а). Достоверного отличия между группами не было обнаружено.

Данные, полученные при исследовании вируснейтрализующей активности сывороток, также не показали наличия достоверного отличия между группами, получавшими CCV-BSI и PGS-RBD. Титры нейтрализующих антител в сыворотках мышей данных групп составили 1:309 и 1:537 (рис. 15б).

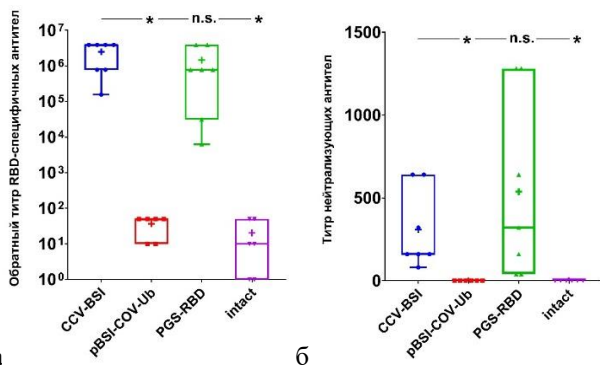


Рисунок 15. Гуморальный иммунный ответ у мышей, иммунизированных CCV-BSI, pBSI-COV-Ub и конъюгатом PGS-RBD. (а) Титры специфических антител IgG к RBD определяли с помощью ИФА. (б) Вируснейтрализующую активность сывороток мышей определяли с использованием штамма SARS-CoV-2 nCoV/Victoria/1/2020 (100 TCID₅₀). Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

Данные IFN- γ -ELISpot показали, что в группах, получавших ДНК-конструкцию pBSI-COV-Ub и комбинированную ДНК/белковую вакцину, формируется эквивалентный клеточный иммунитет: 105 и 93 SFUs на 1 млн спленоцитов, соответственно (рис. 16). В группе, получавшей белок, конъюгированный с полиглуктин-спермидином, и в интактной группе формирование Т-клеточного иммунитета не было зарегистрировано.

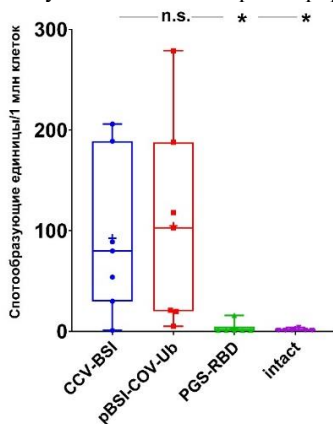


Рисунок 16. Оценка Т-клеточного ответа методом ELISpot. Число спленоцитов, продуцирующих IFN- γ в ответ на специфическую стимуляцию, на 10⁶

клеток. Индивидуальные значения представлены точками; медианы в группах – линиями; средние значения – плюсами. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$, n.s. статистически значимые отличия отсутствуют. Различия между группами определяли с использованием непараметрического метода Манна-Уитни.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Быстрое распространение SARS-CoV-2 по всему миру привело к беспрецедентному развитию различных платформ для создания вакцин, таких как вакцины на основе нуклеиновых кислот и векторные вакцины, а также к одобрению первой ДНК-вакцины для человека – ZyCoV-D. Однако проблемы, в том числе низкая иммуногенность ДНК-вакцин, все еще требуют решения.

В данной работе был предложен ряд стратегий повышения иммуногенности ДНК-вакцин против COVID-19. Одна из конструкций (pVAXrbd) кодирует рецептор-связывающий домен белка S, а другая (pBSI-COV-Ub) – искусственный полиэпитопный T-клеточный иммуноген вируса SARS-CoV-2.

Присоединение секреторного домена к RBD (в pVAXrbd) обеспечивало высокий уровень секреции белкового продукта из клетки и, как следствие, уровень гуморального иммунитета. Добавление убиквитина к искусственному полиэпитопному иммуногену (в pBSI-COV-Ub) обеспечивало эффективный процессинг продукта внутри клетки и его презентацию MHC I.

Использование катионного полимера полиглюкин-спермидин для доставки ДНК-вакцины pVAXrbd привело к повышению ее иммуногенности, особенно в отношении гуморального ответа. Оболочка PGS защищает ДНК от деградации нуклеазами, а частицы, образующиеся при взаимодействии ДНК и PGS, более эффективно поглощаются антигенпрезентирующими клетками. Наночастицы, состоящие из таких полимеров, демонстрируют хорошую биосовместимость, растворимость в воде, биоразлагаемость, отсутствие токсичности, а также их легко и недорого производить, и они стабильны в широком диапазоне температур.

Частицы, полученные с использованием конъюгата полиглюкин-спермидин-RBD, содержащего pVAXrbd/pBSI-COV-Ub внутри и белок RBD на поверхности, продемонстрировали высокую иммуногенность. Присоединение белка RBD к поликатионной оболочке привело к синергетическому усилению гуморального иммунного ответа по сравнению с его отдельными компонентами, а также к формированию защитного иммунитета у мышей, что позволило существенно снизить вирусную нагрузку в легких животных после заражения вирусом.

В целом полученные результаты показали, что применение различных стратегий, улучшающих иммуногенность ДНК-вакцин, будь то

оптимизация кодонного состава, присоединение к иммуногену различных сигнальных последовательностей или использование различных средств доставки, приводят к созданию вакцинных препаратов, способных индуцировать иммунный ответ, позволяющий значительно снизить вирусную нагрузку в лёгких при заражении лабораторных животных живым вирусом.

Выводы:

1. Сконструирована экспериментальная ДНК-вакцина pVAXrbd, несущая ген, кодирующий рецепторсвязывающий домен (RBD) белка S вируса SARS-CoV-2; показано, что иммунизация мышей линии BALB/c ДНК-вакциной pVAXrbd, индуцирует формирование вирус-специфического клеточного и гуморального ответа.

2. Получена и охарактеризована физико-химическими методами кандидатная комбинированная вакцина CCV-RBD, представляющая собой наночастицы, в центре которых находится ДНК-вакцина pVAXrbd, покрытая конъюгатом спермидин-полиглюкин-RBD. Размер частиц составил 50-200 нм.

3. Показано, что иммунизация мышей линии BALB/c комбинированной вакциной CCV-RBD приводит к усилению вирус-специфического гуморального иммунного ответа по сравнению с отдельными ее компонентами и к формированию Т-клеточного ответа, что вызывает достоверное снижение вирусной нагрузки в органе-мишени (легких) животных более, чем в 1000 раз.

4. Сконструированы две экспериментальные ДНК-вакцины pBSI-COV-Ub и pBSI-COV, несущие ген, кодирующий искусственный Т-клеточный полиэпитопный иммуноген с убиквитином (Ub) и без него, содержащий фрагменты белков S, N, М и Е вируса SARS-CoV-2. Иммунизация мышей линии BALB/c обеими ДНК-вакцинами приводит к формированию вирус-специфического клеточного иммунитета. Присоединение Ub к полиэпитопному белку-иммуногену не приводит к заметному усилению клеточного ответа. Иммунный ответ на ДНК-вакцину pBSI-COV-Ub обеспечивал снижение вирусной нагрузки в легких мышей линии BALB/c.

5. Показано, что иммунизация мышей линии BALB/c комбинированной вакциной CCV-BSI (pBSI-COV-Ub/RBD) приводит к формированию вирус-специфического гуморального и клеточного иммунного ответа.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Список статей в рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК

1. **Боргоякова М. Б.**, Карпенко Л. И., Рудомётов А. П., Шаньшин Д. В., Исаева А. А., Несмеянова В. С., Волкова Н. В., Беленькая С. В., Мурашкин Д. Е., Щербаков Д. Н., Волосникова Е. А., Старостина Е. В., Орлова Л. А., Данильченко Н. В., Зайковская А. В., Пьянков О. В., Ильичёв А. А. Иммуногенные свойства ДНК-конструкции, кодирующей рецепторсвязывающий домен белка шипа SARS-CoV-2 // Молекулярная биология. – 2021. – Т. 55. – № 6. – С. 987-998. doi: 10.31857/S0026898421060045
2. **Borgoyakova M.B.**, Karpenko L.I., Rudometov A.P., Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Starostina E.V., Zadorozhny A.M., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shanshin D.V., Baranov K.O., Volkova N.V., Zaitsev B.N., Orlova L.A., Zaykovskaya A.V., Pyankov O.V., Danilenko E.D., Bazhan S.I., Shcherbakov D.N., Taranin A.V., Ilyichev A.A. Self-Assembled Particles Combining SARS-CoV-2 RBD Protein and RBD DNA Vaccine Induce Synergistic Enhancement of the Humoral Response in Mice // Int J Mol Sci. – 2022. – V. 23. – N. 4. –P. 2188. doi: 10.3390/ijms23042188.
3. **Боргоякова М. Б.**, Карпенко Л. И., Старостина Е. В., Волосникова Е. А., Задорожный А.М., Орлова Л.А., Ильичев А.А. Клеточный иммунный ответ на ДНК-вакцину, кодирующую рецепторсвязывающий домен белка S вируса SARS-CoV-2, в зависимости от способа упаковки // Российский иммунологический журнал. – 2022. – Т. 25. – № 2. – С. 131-138. doi: 10.46235/1028-7221-1114-CIR
4. Задорожный А.М., **Боргоякова М.Б.**, Старостина Е. В., Карпенко Л. И. Клеточный иммунный ответ на комбинированные ДНК-белковые конструкции, несущие антигены SARS-CoV-2 // Медицинский академический журнал. – 2022. – Т. 22. – № 2. – С. 177-181. doi: 10.17816/MAJ108654
5. **Боргоякова М.Б.**, Карпенко Л.И., Рудометов А.П., Старостина Е.В., Задорожный А.М., Кисакова Л.А., Кисаков Д.Н., Шарабрин С.В., Ильичев А.А., Бажан С.И. Искусственный Т-клеточный иммуноген против COVID-19 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. – Т. 175. – № 6. – С. 767-772. doi: 10.47056/0365-9615-2023-175-6-767-772.
6. **Borgoyakova M.B.**, Volosnikova E.A., Ilyichev A.A., Karpenko L.I. Approaches to improve the immunogenicity of plasmid DNA-based vaccines against COVID-19 // Population Genetics - From DNA to

Патенты

1. Патент РФ №2754230, МПК А61К39/215; А61К39/385; А61К39/39; А61Р31/14; С12Н15/50; А61К9/00. Плазмидная ДНК-матрица рVAX-RBD, молекула мРНК-RBD, полученная с использованием ДНК-матрицы рVAX-RBD, обеспечивающая синтез и секрецию белка RBD SARS-CoV 2 в клетках организма млекопитающих и комплекс в виде наночастиц, содержащих молекулы мРНК-RBD, индуцирующих SARS-CoV-специфические антитела, обладающие вируснейтрализующей активностью : N 2021107796 : заявл. 23.03.2021 : опубл. 30.08.2021 / Карпенко Л.И., Рудометов А.П., Шарабрин С.В., Волосникова Е.А., Щербаков Д.Н., **Боргоякова М.Б.** [и др.].

2. Патент РФ №2781294, МПК С12Н 15/86, А61К 39/215. Конъюгат белка рецепторсвязывающего домена (RBD) поверхностного гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 с полимером полиглуконин-спермидин (PGS) и вакцинный комплекс против коронавирусной инфекции COVID-19 на основе указанного конъюгата и плазмидной ДНК рVAX-RBD : N 2022118553 : заявл. 06.07.2022 : опубл. 11.10.2022 / **Боргоякова М.Б.**, Карпенко Л.И., Щербаков Д.Н. [и др.].

3. Патент РФ №2806556, МПК А61К 39/215, С12Н 15/62, С07К 14/165, А61Р 31/14. Искусственный ген, кодирующий белок-иммуноген BSI-COV, рекомбинантная плазмидная ДНК рBSI-COV, обеспечивающая экспрессию целевого гена, и искусственный полиэпитопный белок-иммуноген BSI-COV, содержащий эпитопы антигенов вируса SARS-CoV-2 и индуцирующий SARS-CoV-2-специфический Т-клеточный иммунитет : N 2023114102 : заявл. 29.05.2023 : опубл. 01.11.2023 / Бажан С.И., **Боргоякова М.Б.** [и др.].

4. Патент РФ №2806590, МПК А61К 39/215, С12Н 15/62, С07К 14/165, А61Р 31/14. Искусственный иммуноген BSI-COV-Ub, содержащий убиквитин и эпитопы антигенов вируса SARS-CoV-2 и индуцирующий SARS-CoV-2-специфический Т-клеточный иммунитет, искусственный ген, кодирующий белок-иммуноген BSI-COV-Ub, рекомбинантная плазмидная ДНК рBSI-COV-Ub, обеспечивающая экспрессию целевого гена : N 2023114101 : заявл. 29.05.2023 : опубл. 01.11.2023 / Бажан С.И., **Боргоякова М.Б.** [и др.].