

УДК 577.112

РАЗРАБОТКА ПЛАТФОРМЫ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ – КОМПОНЕНТОВ ЭПИТОПНЫХ ВАКЦИН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ COVID-19

© 2021 А.С. Карягина^{1,2,3*}, А.В. Громов¹, Т.М. Грунина^{1,2}, А.М. Ляшук¹, А.В. Гришин¹, Н.В. Струкова¹, М.С. Генералова¹, З.М. Галушкина¹, Л.А. Соболева¹, О.Ю. Добрынина¹, Т.Н. Большакова¹, М.Е. Субботина^{1,2*}, Е.А. Романовская-Романько⁴, И.В. Красильников⁵, Н.Б. Поляков^{1,6}, А.И. Соловьев¹, Д.А. Грумов¹, В.Г. Жуховицкий¹, Е.И. Рябова¹, В.В. Прокофьев¹, В.Г. Лунин^{1,2}

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098 Москва, Россия; электронная почта: akaryagina@gmail.com, subbotinat@gmail.com

² Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии, 127550 Москва, Россия

³ НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

⁴ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева Минздрава России, 197376 Санкт-Петербург, Россия

⁵ Санкт-Петербургский институт вакцин и сывороток ФМБА России, 198320 Санкт-Петербург, Россия

⁶ Институт геохимии и аналитической химии имени В.И. Вернадского РАН, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 08.06.2021

После доработки 11.07.2021

Принята к публикации 28.07.2021

Нами разработана новая платформа для создания антикоронавирусных эпитопных вакцин. Из рецептор-связывающего мотива Spike-белка вируса SARS-CoV-2 были выбраны два петлеобразных эпитопа длиной 22 и 42 аминокислотных остатка, реализующих большое количество белок-белковых взаимодействий в комплексах с ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2) и нейтрализующими антителами. Нами проведено конструирование двух типов гибридных белков, включающих один из двух выбранных эпитопов. Для фиксации конформации выбранных эпитопов применялся подход с использованием белковых каркасов. В качестве эпитопного каркаса для сближения C- и N-концов петлеобразных эпитопов использован гомолог белка Rop из плазмиды *Escherichia coli* ColE1, в структуре которого присутствует мотив «спираль–поворот–спираль». Петлеобразные эпитопы встраивали в область поворота; конформация дополнительно фиксировалась дисульфидной связью, образующейся между остатками цистеинов, присутствующих в составе эпитопов. С целью мультимеризации к эпитопам, встроенным в Rop-подобный белок, присоединяли либо альдолазу из *Thermotoga maritima*, формирующую в растворе тример, либо α -спиральный тримеризатор Spike-белка SARS-CoV-2. Для обеспечения возможности очистки на гепарин-содержащих сорбентах на C-конец гибридных белков ввели короткий фрагмент из гепарин-связывающего гемагглютинина *Mycobacterium tuberculosis*. Все полученные белки демонстрировали высокий уровень иммуногенности после трехкратного парентерального введения мышам. Сыворотки мышей, иммунизированных обоими гибридными белками на основе альдолазы, а также белком на основе тримеризатора Spike-белка SARS-CoV-2, несущим более длинный эпитоп, в высоком титре взаимодействовали как с инактивированным вирусом SARS-CoV-2, так и с рецептор-связывающим доменом Spike-белка. Представленная разработка в перспективе может быть использована для создания новых эпитопных вакцин для профилактики вирусных инфекций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: SARS-CoV-2, Spike-белок, RBD, RBM, эпитопная вакцина, эпитоп, альдолаза.

DOI: 10.31857/S0320972521100043

Принятые сокращения: ДТТ – дитиотреитол; ИАА – иодацетамид; ИПТГ – изопропил- β -D-тиогалактопиранозид; ACE2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; ALD – альдолаза; ВСА – бицинониновая кислота; COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 г. (CoronaVirus Disease 2019); DPBS – физиологический раствор Дульбекко с фосфатным буфером; HBD – гепарин-связывающий домен; MALDI – матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; PBS – натрий-фосфатный буфер; RBD – рецептор-связывающий домен; RBM – рецептор-связывающий мотив; Tri – α -спираль, опосредующая тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2.

* Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

В случае перехода COVID-19 в разряд сезонных заболеваний население всего мира будет нуждаться в периодической вакцинации подобно тому, как это происходит в рамках профилактики гриппа, что делает разработку новых вариантов высокоэффективных, безопасных и недорогих вакцин для профилактики COVID-19 чрезвычайно актуальной задачей. Одна из проблем цельновирионных вакцин (белковых вакцин, включающих полноразмерные вирусные белки) и векторных вакцин (РНК-вакцин, приводящих к выработке в организме вирусных белков) заключается в том, что не все индуцируемые ими антитела являются протективными [1]. Более того, в определенных обстоятельствах могут образовываться антитела, способствующие более тяжелому течению заболевания при заражении после вакцинирования (феномен антителозависимого усиления инфекции) [2–4]. Одним из перспективных подходов, позволяющих заведомо избежать ряда проблем, включая вышеперечисленные, является разработка так называемых эпитопных вакцин – вакцин, действующим началом которых являются отдельные небольшие белковые эпитопы инфекционного агента. У них нет недостатков, характерных для живых вакцин (реверсия патогенных свойств, остаточная вирулентность, неполная инаktivация и т.п.). К тому же такие вакцины отличаются высокой стандартностью, обладают слабой реактогенностью, с их помощью можно избежать как развития аутоиммунных процессов при иммунизации, так и образования непротективных антител и антител, способствующих развитию антителозависимого усиления инфекции.

Основой успешного функционирования эпитопных вакцин является правильный подбор эпитопов – участков поверхности вирусных белков, способных эффективно индуцировать образование нужного спектра антител. Адекватный выбор эпитопов может нацелить иммунную систему на выработку только вируснейтрализующих антител. В случае вируса SARS-CoV-2 выбор эпитопов может быть основан непосредственно на данных о структуре комплексов поверхностного, отвечающего за проникновение в клетку, белка Spike с вируснейтрализующими антителами человека. Такая возможность обеспечивается быстрым накоплением необходимых структурных данных: так, весной–летом 2020 г. были опубликованы первые данные, описывающие структуру комплексов [5], а на конец мая 2021 г. в базе данных Protein Data Bank (PDB, <https://www.rcsb.org/>) было депонировано уже 200 структур комплексов Spike-белка с антителами. Нейтрализующие антитела, взаимодействующие со Spike-белком, можно разделить

на несколько классов в соответствии с областью взаимодействия. Многочисленным является класс нейтрализующих антител, которые непосредственно препятствуют взаимодействию Spike-белка с ACE2 (ангиотензинпревращающий фермент 2), инициирующему проникновение вируса в клетку. Эти антитела контактируют с аминокислотными остатками (а.о.), расположенными в так называемом рецептор-связывающем мотиве (RBM, 437–508 а.о.), поэтому выбирать детерминанты для эпитопных вакцин представляется целесообразным в пределах данного мотива.

Другим важным аспектом успешности эпитопных вакцин является решение проблемы низкой иммуногенности за счет обеспечения оптимального экспонирования эпитопов и их мультимеризации. Наиболее перспективные современные разработки в этой области связаны с использованием подходов на основе так называемых эпитопных каркасов. Под эпитопными каркасами, как правило, подразумеваются белки-носители, к которым генно-инженерным или другим способом присоединяются пептидные эпитопы [6, 7]. В качестве белков-носителей часто используют белки, формирующие тримерные, тетрамерные или гексамерные структуры. При этом короткие линейные детерминанты, по-видимому, за счет самопроизвольного формирования нативной укладки, способны индуцировать выработку протективных антител даже просто при *N*-концевом расположении относительно каркасного белка [6]. Достаточно протяженные линейные эпитопы вирусных белков, образующие многочисленные контакты в комплексах с антителами, в структуре вирусного белка могут быть представлены петлеобразными структурами со сближенными *N*- и *C*-концами. В этом случае каркасный белок может быть использован для фиксации вблизи друг друга концов петлеобразных участков белка подобно тому, как это сделано в работе Juraja et al. [8]. Можно надеяться, что при таком подходе в значительной мере будет обеспечено конформационное соответствие эпитопа его нативной конформации в составе полноразмерного антигена.

Целью настоящей работы являлась разработка новой платформы для создания белковых компонентов эпитопных антикоронавирусных вакцин на основе эпитопного каркаса для фиксации конформации, а также домена для мультимеризации (тримеризации) эпитопов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм и векторы. В работе использовали бактериальный штамм *Escherichia coli* BL21

(DE3) (*E. coli* В F– *dcm ompT hsdS*(r_{BmB}) *gal* λ (DE3) («Agilent Technologies», США), модифицированный плазмидный вектор pQE6 («Qiagen», США), в котором промотор T5 заменен на T7, и плазмиду pRep4 из *E. coli* M15 [pRep4] («Qiagen»).

Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD. Белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD включает аминокислотную последовательность α -спирали Rop-подобного белка из *Methylococcus capsulatus* (2–34 а.о., PDB-код: 2JS5_A, идентификатор RefSeq: WP_010959602), последовательность детерминанты D2 рецептор-связывающего мотива (RBM, receptor-binding motif) Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (470–490 а.о., идентификатор UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2), последовательность второй α -спирали Rop-подобного белка (34–65 а.о.), последовательность α -спирали, опосредующей тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri) (958–991 а.о., идентификатор UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2) и короткий участок гепарин-связывающего гемагглютинаина HBHA из *Mycobacterium tuberculosis*, соответствующий гепарин-связывающему домену (HBD, heparin-binding domain) (160–174 а.о., идентификатор UniProtKB/Swiss-Prot: A1KFU9), а также дополнительные остатки, представляющие собой линкерные последовательности, и остатки, соответствующие нуклеотидным последовательностям с введенными рестрикционными сайтами. Нуклеотидная последовательность соответствующего химерного гена была спланирована таким образом, чтобы на ее 5'-конце находились сайты NcoI и BamHI, а на 3'-конце – сайты BglII и Kpn2I. Участок, кодирующий детерминанту D2, был фланкирован сайтами AgeI и Eco81I. Оптимизацию кодонного состава синтетического гена проводили с помощью программы JCat (<http://www.jcat.de/>), корректировку вторичной структуры транскрибируемой РНК – с помощью веб-сервера DINAMelt (<http://www.unafold.org/Dinamelt/applications/two-state-melting-folding.php>). Синтетический ген встраивали в модифицированный плазмидный вектор pQE6 по сайтам NcoI и Kpn2I, в результате была получена плаزمида pL1003, кодирующая белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD. Все синтетические гены, использованные в работе, получены в компании «Евроген» (Россия).

Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белок Rop-D3-Rop-Tri-HBD. Фрагмент ДНК, кодирующий детерминанту D3 рецептор-связывающего мотива (RBM) Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (453–494 а.о., идентифи-

катор UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2), фланкированную сайтами AgeI и Eco81I, был оптимизирован по кодонному составу и вторичной структуре мРНК (синтезирован компанией «Евроген») и клонирован в плазмиду pL1003 по сайтам AgeI и Eco81I. В результате была получена плазмиды pL1008, кодирующая белок Rop-D3-Rop-Tri-HBD, аналогичный по структуре белку Rop-D2-Rop-Tri-HBD, за исключением участка антигенной детерминанты Spike-белка вируса SARS-CoV-2.

Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD. Белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD включает те же участки аминокислотных последовательностей различных белков, что и белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD, за исключением того, что последовательность α -спирали, опосредующей тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri), заменена на последовательность альдолазы из *Thermotoga maritima* (2–201 а.о., PDB-код: 1WA3). Нуклеотидная последовательность гена была оптимизирована по кодонному составу и вторичной структуре мРНК и спланирована таким образом, чтобы на ее 5'-конце находились сайты NcoI и BamHI, а на 3'-конце – сайты BglII и Kpn2I. Участок, кодирующий детерминанту D2, был фланкирован сайтами AgeI и Eco81I. Синтетический ген встраивали в модифицированную плазмиду pQE6 по сайтам NcoI и Kpn2I. В результате была получена плазмиды pL989, кодирующая белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD.

Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD. Фрагмент, кодирующий детерминанту D3 из плазмиды pL1008, был клонирован в плазмиду pL989 по сайтам AgeI и Eco81I. Полученная плазмиды pL990 кодирует белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD, аналогичный по структуре белку Rop-D2-Rop-ALD-HBD, за исключением участка антигенной детерминанты Spike-белка вируса SARS-CoV-2.

Получение генно-инженерной конструкции, кодирующей белок Rop-RBM-Rop. Белок Rop-RBM-Rop включает две аминокислотные последовательности Rop-подобного белка из *M. capsulatus* (2–34 и 35–66 а.о., PDB-код: 2JS5_A, идентификатор RefSeq: WP_010959602), участок, включающий RBM белка вируса SARS-CoV-2 (433–511 а.о., идентификатор UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2), а также аминокислотные остатки линкерных последовательностей и остатки, соответствующие нуклеотидным последовательностям с рестрикционными сайтами. На 5'-конце нуклеотидной последовательности были вставлены сайты NcoI и BamHI, а на 3'-конце – BglII и Kpn2I. Синтетический ген встраивали в модифициро-

ванный плазмидный вектор pQE6, несущий T7-промотор вместо T5-промотора, по сайтам NcoI и Kpn2I. В результате была получена плазида pL926, кодирующая белок Rop-RBM-Rop.

Во всех случаях правильность сборки последовательностей подтверждали секвенированием по Сэнгеру.

Выращивание штаммов-продуцентов. Культуры трансформированных клеток *E. coli* выращивали в среде LB (lysogeny broth) с добавлением канамицина (25 мг/л) и ампициллина (200 мг/л) на качалке при 180 об./мин и 37 °С до достижения OD₆₀₀ 1,0–1,2. Синтез белка индуцировали добавлением 0,5 мМ ИПТГ (изопропил-β-D-тиогалактопиранозид), затем культуры выращивали еще 4 ч при 180 об./мин. Продуценты нерастворимых белков культивировали при 37 °С, растворимых – при 30 °С. Полученные культуры клеток центрифугировали в течение 30 мин при 5000 g и 10 °С. Биомассу хранили при –20 °С.

Разрушение клеток *E. coli*. Размороженную биомассу бактериальных клеток (1 г) суспендировали в лизирующем буфере (20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 100 мМ NaCl, 1% Triton X-100, 1 мМ фенолметилсульфонилфторид (PMSF)) в соотношении не менее чем 1 : 10 (w/v) соответственно, добавляли 100 мкг/мл лизоцима, инкубировали 20 мин при комнатной температуре и разрушали на ультразвуковой установке Vibra-Cell VCX750 («Sonic», США) (40%-ная амплитуда, 2,5 мин с перерывами 3 с через 2 с) во льду. Смесь центрифугировали в течение 30 мин при 20 000 g и 10 °С, при этом белки растворимой фракции оставались в надосадочной жидкости, а нерастворимой фракции – в осадке в виде телец включения. Оба белка с α-спиралью-тримеризатором (Rop-D2-Rop-Tri-HBD и Rop-D3-Rop-Tri-HBD), а также белок Rop-RBM-Rop были получены в виде телец включения, белки с альдолазой (Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD) – преимущественно в растворимой форме, поэтому они оставались в супернатанте.

Подготовка к хроматографии белков в форме телец включений. Отмывку телец включения проводили дважды лизирующим буфером и один раз 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Отмытые тельца включения, содержащие белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD и Rop-D3-Rop-Tri-HBD, растворяли в 8 М мочевины и 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0) в объеме, равном объему, использованному для лизиса биомассы клеток, центрифугировали в течение 30 мин при 9000 g.

Подготовка к хроматографии растворимых белков. Фракции супернатанта белков Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD после лизиса разводили буфером (20 мМ Tris-HCl

(pH 8,0), 1% Triton X-100) до концентрации ~1 мг/мл и прогревали при 65 °С в течение 15 мин на магнитной мешалке с подогревом MR 3001 («Heidolph», Германия). Центрифугировали при 9000 g в течение 30 мин, при этом целевой белок оставался преимущественно в надосадочной жидкости, а примесные белки штамма – в основном в осадке.

Колоночная хроматография. Колоночную хроматографию проводили с применением хроматографической установки низкого давления ÄKTA start («GE Healthcare Life Sciences», США). Концентрацию белка определяли по поглощению при 280 нм с помощью набора Bicinchoninic acid (BCA) Protein Assay («AppliChem», Германия). Для подготовки образцов белка к электрофорезу в ПААГ по Лэмбли использовали буфер с восстановителем 0,2 М дитиотреитолом (ДТТ) или без него в растворе, содержащем 2 мМ ЭДТА, 125 мМ Tris-HCl (pH 6,8), 20%-ный глицерин, 4%-ный додецилсульфат натрия и 0,015%-ный бромфеноловый синий. Пробы белка разводили буфером в соотношении 1 : 1, прогревали 5 мин при 95 °С и центрифугировали 5 мин при 16 000 g, супернатант наносили на ПААГ. Электрофорез проводили с использованием прибора SE 260 Mighty Small II («Amersham», США) и набора аксессуаров компании «GE Healthcare» (США). После электрофореза гели окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R250 («Bio-Rad», США). Для оценки кажущейся молекулярной массы использовали белковые маркеры 14–97 кДа («Bio-Rad»). Документирование гелей проводили с помощью системы гель-документирования Gel Doc™ XR+ («Bio-Rad»). Денситометрическую оценку полос на геле осуществляли с помощью программного обеспечения Quantity One («Bio-Rad»).

Хроматография белков из телец включений на сорбенте WorkBeads 40S. Подготовленные для хроматографии белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD и Rop-RBM-Rop наносили на колонку с 6 мл сорбента WorkBeads 40S («Bio-Works», Швеция), уравновешенного раствором 8 М мочевины и 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), со скоростью 1 мл/мин, промывали со скоростью 2 мл/мин до выхода поглощения на плато. С той же скоростью проводили элюцию раствором NaCl (линейным градиентом концентрации 0–1 М в объеме 60 мл) в том же буферном растворе. Элюат с колонки собирали фракциями объемом по 5 мл, затем фракции элюата с максимальным поглощением при 280 нм объединяли и диализовали против раствора 4 М мочевины в 25 мМ Tris-HCl буфере (pH 8,0) в течение 24 ч при 4 °С и центрифугировали в течение

30 мин при 9 000 g. Соотношение объемов диализуемого образца и буфера для диализа составляло 1 : 10 соответственно. Растворы белков (здесь и далее) диализовали с использованием целлюлозной диализной мембраны Zellu Trans/ROTH 3,5 E657.1 («Carl Roth», Германия) толщиной 25 мкм и нижним порогом пропускания 3500 Да. После диализа проводили электрофорез объединенных фракций и оценку концентрации белка по поглощению раствора при 280 нм с помощью ВСА.

Хроматография растворимых белков на сорбенте WorkBeads 40S. Подготовленные для хроматографии белки Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD фильтровали продавливанием через мембранный шприцевый фильтр из полиэфирсульфона (PES) с диаметром пор 0,45 мкм («Corning», США). Фильтрат наносили на колонку с 10 мл сорбента WorkBeads 40S, уравновешенного 20 мМ Tris-HCl, pH 8,0, со скоростью 1 мл/мин, промывали со скоростью 2 мл/мин до выхода поглощения на плато. С той же скоростью проводили элюцию раствором NaCl (линейным градиентом концентрации 0–1 М в объеме 100 мл) в том же буферном растворе, элюат с колонки собирали фракциями объемом по 4 мл, затем объединяли фракции, соответствующие максимуму поглощения при 280 нм, и диализовали против буфера, содержавшего 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), в течение 24 ч, центрифугировали в течение 30 мин при 9000 g. Соотношение объемов диализуемого образца и буфера для диализа составляло 1 : 10 соответственно. Затем отбирали супернатант и проводили электрофорез полученных белков и оценку концентрации белков по поглощению раствора при 280 нм с помощью ВСА.

Аффинная хроматография белков Rop-D2-Rop-Tri-HBD и Rop-D3-Rop-Tri-HBD на гепарин-сефарозе CL-6B. Полученный раствор белка после диализа подвергали колоночной аффинной хроматографии на гепарин-сефарозе CL-6B («GE Healthcare»). Колонку с 10 мл сорбента уравновешивали раствором 4 М мочевины в 20 мМ Tris-HCl буфере (pH 8,0), связывание белка и промывание колонки проводили в том же буфере, все операции – со скоростью 1 мл/мин. Белок элюировали градиентом концентрации NaCl 0–1 М в растворе 4 М мочевины в Tris-HCl буфере (pH 8,0) со скоростью 1 мл/мин. Фракции белка общим объемом 3 мл диализовали против буфера 25 мМ Tris-HCl (pH 6,8), постепенно снижая концентрацию мочевины в диализном буфере (ступенями по 0,5 М) в течение 24 ч при 4 °С. Соотношение диализуемого образца и диализного буфера состав-

ляло 1 : 10 соответственно на всех ступенях диализа. После диализа определяли концентрацию и общее количество белка по поглощению раствора при 280 нм с помощью ВСА. Полученные препараты белка лиофильно высушивали и использовали для дальнейших исследований.

Аффинная хроматография растворимых белков на гепарин-сефарозе CL-6B. Полученный раствор белков Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD после диализа наносили на колонку с 10 мл сорбента гепарин-сефароза, уравновешенного 20 мМ Tris-HCl буфером (pH 8,0). Связывание белка и промывание колонки проводили в том же буфере, все операции – со скоростью 1 мл/мин. Белок элюировали градиентом концентрации NaCl 0–1 М в буфере 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) со скоростью 1 мл/мин. В результате элюции были собраны три фракции по 2 мл. Фракции белка общим объемом 6 мл объединяли и диализовали против буфера 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl в соотношении 1 : 10 соответственно в течение 24 ч при температуре 4 °С с трехкратной сменой буфера. После диализа определяли концентрацию и общее количество белка по поглощению раствора при 280 нм с использованием ВСА. Полученные препараты белка лиофильно высушивали и использовали для дальнейших исследований.

Хроматография белка Rop-RBM-Rop на сорбенте WorkBeads 40 DEAE. Раствор белка Rop-RBM-Rop в буфере, содержащем 4 М мочевины и 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), полученный при диализе фракций после хроматографии на WorkBeads 40S, наносили на колонку с 5 мл сорбента WorkBeads 40 DEAE («Bio-Works»), предварительно уравновешенную буфером, содержащим 4 М мочевины, 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Все манипуляции с колонкой проводили при скорости потока 1 мл/мин. Промывали сорбент с иммобилизованным на нем белком тем же буфером (50 мл) до падения и стабилизации сигнала УФ-детектора. Элюцию целевого белка проводили градиентом NaCl 0–1 М в 4 М мочевины в том же буфере в пяти объемах колонки. Чистый белок Rop-RBM-Rop содержался во фракции несвязавшегося белка. При элюции с сорбента наряду с целевым белком элюировались также примесные белки. Объединенные белковые фракции (14 мл) несвязавшегося белка инкубировали в буфере для элюции в течение суток, после чего раствор белка диализовали против 1 л 20 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 5,5) при температуре 4 °С с двукратной сменой буфера.

Гидролиз белка Rop-RBM-Rop трипсином в ПААГ перед масс-спектрометрическим исследованием. Белки, разделенные электрофорезом в ПААГ, гидролизовали внутри фрагментов геля

по методике, предложенной Shevchenko et al. [9], с добавлением и без добавления ДТТ и иодацетамида (ИАА). Триптические пептиды экстрагировали из геля по методике, опубликованной нами ранее [10]. Полученный экстракт высушивали досуха с помощью вакуумного концентратора Savant SPD121P («Thermo Scientific», США) и растворяли в 20 мкл 0,1%-ной муравьиной кислоты. Образец обессоливали на колонках собственного изготовления с обращенно-фазовой мембраной (аналог C18), образец элюировали 90%-ным раствором ацетонитрила в воде. Для нанесения брали 4 мкл образца в 90%-ном ацетонитриле и смешивали их с 1 мкл насыщенного раствора 2,5-дигидроксibenзойной кислоты в 30%-ном растворе ацетонитрила, содержащем 0,5% ледяной уксусной кислоты (v/v), на стальной мишени, которую затем подсушивали на воздухе при комнатной температуре.

MALDI масс-спектрометрический анализ.

Анализ пептидов проводили на времяпролетном MALDI масс-спектрометре Ultraflextreme («Bruker Daltonik GmbH», Германия). Детектирование положительных ионов проводили в режиме рефлектрона при следующих значениях напряжения: IS1 – 20,12 кВ, IS2 – 17,82 кВ; Lens – 7,47 кВ, Ref1 – 21,07 кВ, Ref2 – 10,80 кВ.

Ионы детектировали в диапазоне m/z 650–5000. В качестве внутреннего стандарта использовали пики автолитических фрагментов трипсина и кератина, которые затем были исключены из окончательных списков детектируемых масс.

Фрагментацию отдельных ионов проводили в условиях диссоциации, индуцируемой соударением ионов с молекулами аргона, в режиме детектирования положительных ионов при следующих значениях напряжения: IS1 – 7,50 кВ, IS2 – 6,7 кВ; Lens – 3,50 кВ, Ref1 – 29,50 кВ, Ref2 – 14,00 кВ; Lift1 – 19 кВ, Lift2 – 2,80 кВ. Мощность лазера в процессе съемки масс-спектров варьировали для достижения наилучшей фрагментации исследуемых ионов.

Анализ данных масс-спектрометрии. Обработку масс-спектров проводили с помощью программного обеспечения Flex Analysis 3.4 («Bruker Daltonik GmbH»). К масс-спектрам применяли сглаживание по алгоритму Савицкого–Голе (Savitzky–Golay; ширина 0,2 m/z , 1 цикл) и вычитание базовой линии согласно алгоритму TopHat. Использовали следующие параметры детекции пиков: алгоритм детекции пиков – SNAP2, соотношение сигнал/шум – 3, максимальное число пиков в спектре – 500. Поиск и идентификацию белков методом «пептидного отпечатка» («peptide mass fingerprint») в базе данных осуществляли с помощью програм-

многo комплекса MASCOT (локальная версия 2.1.03, «Matrix Science», Великобритания). При этом использовали следующие параметры поиска: точность определения массы – 50 ppm, возможные посттрансляционные модификации – окисление метионина, гистидина, триптофана, Glu → pyro-Glu, Gln → pyro-Gln. Достоверно идентифицированными (95%, $p < 0,05$) считали белки с вероятностным параметром MOWSE score > 32. Дополнительными критериями достоверности определения первичной структуры белка было совпадение его молекулярной массы со значением, определенным экспериментально.

Интерпретацию масс-спектров, в частности фрагментации, дополнительно проводили с использованием программ Biotoools (версия 3.2) и Proteinscape (версия 4.1) («Bruker Daltonik GmbH»).

Получение рецептор-связывающего домена (RBD) поверхностного Spike-белка вируса SARS-CoV-2. Аминокислотную последовательность рецептор-связывающего домена (RBD) поверхностного Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (319–541 а.о., идентификатор UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2) модифицировали с N-конца сигнальным пептидом щелочной фосфатазы SEAP (MLLLLLLGLRLQLSLGI) и с C-конца – последовательностью глицин-серинового линкера и гистидиновой метки (GSHH-NNNNNN). Нуклеотидную последовательность полученного полипептида синтезировали в компании «Евроген» и клонировали в плазмиду рСЕР по сайтам рестрикции XbaI и HindIII, получая таким образом плазмиду рСЕР-RBD. Далее культуру клеток CHO-S («Thermo Fisher Scientific», США) транзientно трансфицировали плазмидой рСЕР-RBD с использованием системы CHOgro («Mirus Bio», США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки культивировали в колбах Эрленмейера при 125 об./мин, 5% CO₂, 80%-ной влажности, 37 °С, спустя 24 ч снижали температуру до 32 °С и продолжали культивирование в течение 10 дней. Начиная с 3-го дня, добавляли подпитки Cell boosts 7a (2%), 7b (0,2%) («HyClone», США) и 0,5% CHO Bioreactor Feed («Sigma», США) один раз в день. По истечении 10 дней культуральную жидкость осветляли центрифугированием при 5000 g. Рецептор-связывающий домен очищали металл-аффинной хроматографией на системе ÄKTA start («GE Healthcare Life Sciences»), используя колонки HisTrap FF 5 мл («GE Healthcare Life Sciences») в соответствии с протоколом производителя. Дополнительную очистку и замену буфера на 20 мМ фосфат натрия, 500 мМ натрия хлорид (рН 7,2) проводили на ко-

лонке ХК 26/100 («GE Healthcare Life Sciences»), заполненной сорбентом Superdex 200 pg («GE Healthcare Life Sciences»).

Подготовка рекомбинантных белков для иммунизации. На основе каждого из четырех полученных рекомбинантных белков были подготовлены иммуногенные композиции, содержащие в одной дозе объемом 150 мкл 1 нмоль белка (Rop-D2-Rop-Tri-HBD – 18,7 мкг, Rop-D3-Rop-Tri-HBD – 21,4 мкг, Rop-D2-Rop-ALD-HBD – 36,1 мкг, Rop-D3-Rop-ALD-HBD – 38,7 мкг), а также диэтиламиноэтиловый (ДЭАЭ) декстран 500 – 1 мг, монтанид ISA 201 («Seppic», Франция) – 75 мкл, ретинола пальмитат (100 000 МЕ/мл) производства АО «Ретиноиды» (Россия) – 1,5 мкл.

Иммунизация лабораторных животных. В работе использовали самок мышей сингенной инбредной линии BALB/c в возрасте 5–6 недель весом 18–20 г ($n = 35$, НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России). Мышам четырех опытных групп ($n = 7$) трехкратно вводили иммуногенные композиции, содержащие рекомбинантные белки, с интервалом в две недели. Инъекцию производили одноразовым стерильным инсулиновым шприцом подкожно в холку животного. Объем раствора для введения составлял 150 мкл. Животным контрольной группы ($n = 7$) по описанной схеме вводили физиологический раствор. Иммунный ответ исследовали через две недели после последней инъекции. В течение всего эксперимента проводили постоянный мониторинг физиологического состояния экспериментальных животных. По истечении двух недель с момента последней инъекции лабораторных животных опытных и контрольной групп вводили в наркоз ингаляцией изофлурана («Piramal Enterprises», Индия) и проводили сбор образцов крови из сердечной полости для определения титра антител в сыворотке крови. После сбора всех индивидуальных образцов крови в вакуумные пробирки их оставляли при комнатной температуре на 20 мин, затем центрифугировали в течение 30 мин при 1500 g без охлаждения. Надосадочную жидкость переносили в стерильные пробирки объемом 1,5 мл и замораживали при $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Иммуноферментный анализ. Наличие специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) определяли в образцах сыворотки мышей после трехкратной иммунизации. В качестве антигенов на планшеты сорбировали белки, использованные для иммунизации, вирус SARS-CoV-2, инактивированный формалином, и RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2.

Препарат вируса был получен путем накопления SARS-CoV-2 в культуре клеток Vero (банк

ATCC, линия CCL-81) в течение 4 сут. После чего супернатант собирали, центрифугировали при комнатной температуре на скорости 3500 об./мин (1900 g) в течение 10 мин. Для инактивации вируса в надосадочную жидкость добавляли формалин (37%-ный формальдегид) в соотношении 1 : 1000 соответственно. После инкубации вируса с формалином в течение 96 ч проводили ультрацентрифугирование в роторе JA-30.50 в режиме 28 700 об./мин ($\sim 100\ 000\text{ g}$) в течение 3 ч при $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$ через подушку из 30%-ной сахарозы. Супернатант удаляли, осадок суспендировали в буфере DPBS. Концентрацию белка измеряли на флуориметре Qubit («Invitrogen», США) с использованием набора реагентов Quant-iT Protein Assay Kit («Invitrogen») согласно рекомендациям производителя. Для постановки ИФА использовали препарат формалин-инактивированного вируса в концентрации 1 мкг/мл.

Сорбцию антигенов, разведенных в DPBS до концентрации 1,0 мкг/мл, проводили в течение ночи при $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ в 96-луночных планшетах Maxisorp («Thermo Scientific», Дания) (по 100 мкл на лунку). Затем планшеты дважды отмывали раствором 0,1%-ного Tween-20 («Serva», Германия) в PBS с использованием автоматического промывателя ELx50 («BioTek», США) по 500 мкл на лунку. После отмывки планшеты инкубировали с блокирующим буфером, содержащим PBS и 5% сухого молока («ТФ Дитол», Россия), в течение 2 ч при комнатной температуре, затем повторно отмывали. После чего на планшет вносили серии десятикратных разведений сывороток экспериментальных мышей. Планшеты с сывороткой инкубировали 1 ч при комнатной температуре, затем 3 раза отмывали. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена Goat anti-Mouse IgG (H+L) («Invitrogen») в разведении 1 : 1200 по 100 мкл на лунку. После инкубации со вторичными антителами планшеты 4 раза отмывали. В качестве цветного субстрата использовали раствор тетраметилбензидина (ТМВ) («Биосервис», Россия) по 100 мкл на лунку с последующей инкубацией в течение 10 мин при комнатной температуре, затем реакцию останавливали добавлением 1 N H_2SO_4 . Оптическую плотность при длине волны 450 нм измеряли на мультипланшетном ридере с LVF-монокроматорами (на линейных переменных фильтрах) CLARIOstar («BMG Labtech», США).

Статистический анализ. Статистические расчеты проводили с помощью пакета программ Statistica 12.0 («Statsoft», США). Данные представляли как среднее \pm стандартное отклонение (SD) либо как среднее геометрическое \pm стандартное геометрическое отклонение логарифма по

основанию 2 титра сывороток антител. Проверку нормальности распределения проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Для оценки статистической значимости различий в данных применяли двухсторонний дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с апостериорным анализом по Тьюки. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дизайн рекомбинантных белков. В работе получены четыре генно-инженерные конструкции, кодирующие химерные белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD, иммуногенные свойства которых планировалось исследовать. Белки содержат выбранные нами участки RBM Spike-белка вируса SARS-CoV-2 D2 или D3, многие аминокислотные остатки которых формируют контакты в комплексах с ACE2 и нейтрализующими антителами (рис. 1). Эти участки мы будем далее называть антигенными детерминантами или эпитопами D2 и D3. Последовательности выбранных детерминант перекрываются: D2 соответствует 470–490 а.о., а последовательность D3 – 453–494 а.о. Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (идентификатор UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2) (рис. 1). В последовательности D3 в позиции 464 гидрофобный остаток фенилаланина, в нативной структуре Spike-белка обращенный своим гидрофобным радикалом вглубь молекулы и не образующий контактов с антителами, заменен на гидрофильный остаток серина с целью предупреждения возможного образования агрегатов вакцинных белков с D3 за счет гидрофобных взаимодействий. В позиции 484 находится остаток глутаминовой кислоты, во многих штаммах вируса SARS-CoV-2, в частности южно-африканской линии B.1.351, замененный на остаток лизина. В пределах выбранных детерминант находятся два остатка цистеина – в позициях 480 и 488, в нативной структуре Spike-

белка формирующие дисульфидную связь.

Обе детерминанты были выбраны таким образом, чтобы их N- и C-концы были сближены в пространстве в трехмерной структуре Spike-белка (рис. 2), и такое положение можно было зафиксировать за счет присоединенной к ним дополнительной каркасной структуры. Эпитопный каркас во всех четырех представлен двумя контактирующими между собой α -спиралями Rop-подобного белка из *M. capsulatus* (2–34 и 35–66 а.о., PDB-код: 2JS5_A, идентификатор RefSeq WP_010959602). Между 34 и 35 а.о. Rop-подобного белка вставляли последовательности D2 или D3. Таким образом, в последовательностях белков обе детерминанты фланкированы α -спиралями Rop-подобного белка. Помимо сближенности концов, петлеобразная конформация обеих детерминант должна фиксироваться также дисульфидной связью между остатками цистеинов 480 и 488. Наличие дополнительной дисульфидной связи позволяет надеяться на хорошее соответствие нативной конформации участков выбранных детерминант структуре данных участков в составе Spike-белка SARS-CoV-2.

К C-концам гибридных молекул Rop-D2/D3-Rop через линкерную последовательность присоединены домены, обеспечивающие тримеризацию – либо последовательность α -спирали, опосредующей тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri) (958–991 а.о., идентификатор UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2), либо последовательность альдолазы из *T. maritima* (2–201 а.о., PDB-код: 1WA3). На C-конце всех четырех белков находится короткий участок гепарин-связывающего домена (HBD) белка Heparin-binding hemagglutinin (HBHA) из *M. tuberculosis* (160–174 а.о., идентификатор UniProtKB/Swiss-Prot: A1KFU9), позволяющий проводить очистку полученных белков на гепарин-содержащих сорбентах. Характеристику четвертичной структуры полученных белков не проводили, но, предположительно, в растворе они должны самопроизвольно формировать гомотримеры – каждый с тремя идентичными петлеобразными структурными эпитопа-

```

          S455-469          S475-499 E484K          N501Y
433 VIAWNSNNLDSKVGGNYNLYRLFRKSNLKPFERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVV 511
          * * * * *          * * *          * * * * *
          # #####          #####          ##### # #####
          D2 TEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFP
          D3 YRLFRKSNLKPSERDISTEIYQAGSTPCNGVEGFNCYFPLQS

```

Рис. 1. Участок последовательности RBM Spike-белка вируса SARS-CoV-2 и последовательности детерминант D2 и D3. Полужирным шрифтом обозначены а.о., входящие в линейные эпитопы S455–469 и S475–499 (из статьи Lu et al. [7]). Курсивом выделены вариабельные а.о. E484 и N501. Звездочками отмечены а.о., взаимодействующие с ACE2, решетками – а.о., взаимодействующие хотя бы с одним из 13 нейтрализующих антител с известной трехмерной структурой (в соответствии с рис. 2 из работы Lee et al. [11]). Критерий взаимодействия – расстояние между остатками не более 4,5 Å

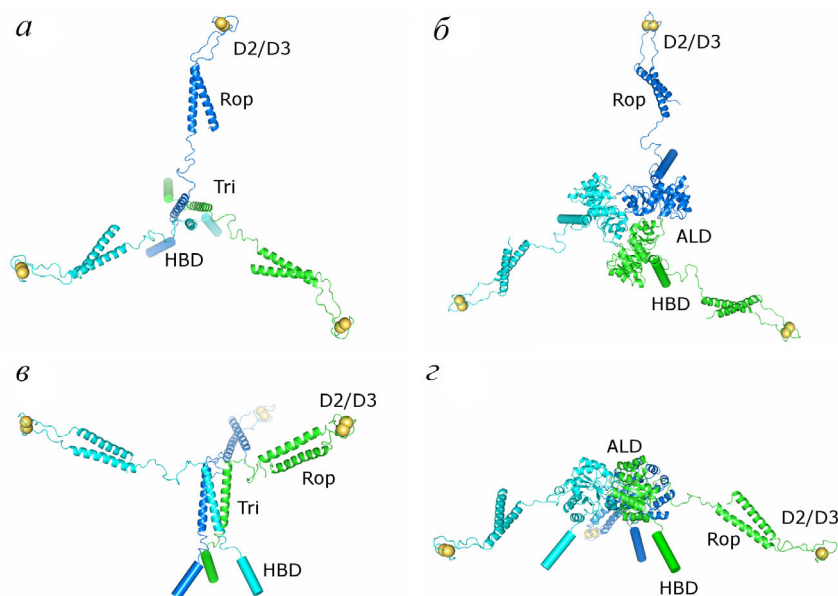


Рис. 2. Трехмерная структура белков Rop-D2/D3-Rop-Tri-HBD (а, б) и Rop-D2/D3-Rop-ALD-HBD (в, г). Модели трехмерной структуры рекомбинантных белков построены в программе PyMOL (<https://pymol.org/2/>) и представлены в проекции сверху (а, в) и сбоку (б, г). Для построения моделей использованы структуры Rop-подобного белка из *M. capsulatus* (PDB-код: 2JS5_A, 2–66 а.о.), RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (PDB-код: 6VW1, изображена петля D2 (470–490 а.о.); петля D3 (453–494 а.о.), имеющая удлиненную петлеобразную конформацию, не показана), α -спирали тримеризатора из Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri) (PDB-код: 1ZVB, 2–34 а.о.) и альдолазы *T. maritima* (PDB-код: 1WA3, 2–201 а.о.). Белки изображены в виде ленточных моделей; образующие дисульфидные связи цистеины – в виде сфер; последовательность а.о. гепарин-связывающего домена (HBD) белка гепарин-связывающего гемагглютинаина из *M. tuberculosis* (160–174 а.о., идентификатор UniProtKB/Swiss-Prot: A1KFU9) – в виде цилиндров (не в масштабе). Разные мономеры изображены разными цветами

ми в *N*-концевой части. Схема строения тримеров полученных гибридных белков показана на рис. 2.

Молекулярная масса мономерных белков – от 18,7 до 38,7 кДа – считается уже достаточной для эффективной выработки антител. Возрастные молекулярной массы при тримеризации должно способствовать дальнейшему усилению иммунного ответа на гибридные антигены.

Для подтверждения существования дисульфидной связи в белках, содержащих петлеобразные фрагменты Spike-белка с Cys480 и Cys488 и полученных синтезом в *E. coli*, был спланирован белок, содержащий полноразмерный RBM, фланкированный последовательностями из Rop-подобного белка. Рецептор-связывающий мотив в нативном Spike-белке образует петлеобразную структуру, включающую на вершине шпильки петлеобразные эпитопы D2 и D3. Цистеины в позициях 480 и 488 входят в состав всех трех фрагментов – RBM, D2 и D3.

Получение и очистка рекомбинантных белков. Клонирование генов рекомбинантных белков проводили согласно разделу «Материалы и методы». Все генно-инженерные конструкции обеспечивали высокий уровень экспрессии генов. Белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-

Rop-Tri-HBD и Rop-RBM-Rop нарабатывались в виде телец включений, а белки Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD синтезировались в растворимой форме. Соответственно, схемы выделения этих белков различались: белки с тримеризатором из SARS-CoV-2 и Rop-RBM-Rop выделяли в денатурирующих условиях в присутствии мочевины, а белки с альдолазой – в неденатурирующих условиях (рис. 3). В качестве первой стадии очистки для всех белков использовали сорбент WorkBeads 40S. На второй стадии для четырех белков, используемых впоследствии для иммунизации и содержащих гепарин-связывающий домен, проводили хроматографию на гепарин-сефарозе.

Вторую стадию очистки белка Rop-RBM-Rop проводили с помощью WorkBeads 40 DEAE, при этом большая часть примесных белков прочно связывалась с сорбентом, а основное количество целевого белка не связывалось с сорбентом и после протекания через колонку выходило в высокоочищенном и достаточно концентрированном виде (рис. 3, е, дорожка 2). Выход белков составлял 4,8–8,0 мг на 1 г сырой биомассы, а степень очистки – 97–98%.

Характеристики белков, включающие экспериментальные данные и теоретические значе-

ния некоторых параметров, полученные с использованием интернет-ресурса <https://web.expasy.org/protparam/>, представлены в табл. 1.

Идентификация белка Rop-RBM-Rop и подтверждение наличия дисульфидной связи в Rop-RBM-Rop и других рекомбинантных белках. Для

идентификации исследуемого белка интересующие полосы из ПЛАГ подвергали трипсинолизу, добавляя и не добавляя перед реакцией протеолиза белка в геле восстановитель ДТТ и иодацетамид (ИАА). В присутствии и в отсутствие ДТТ и ИАА S–S-связи в белке должны, соответ-

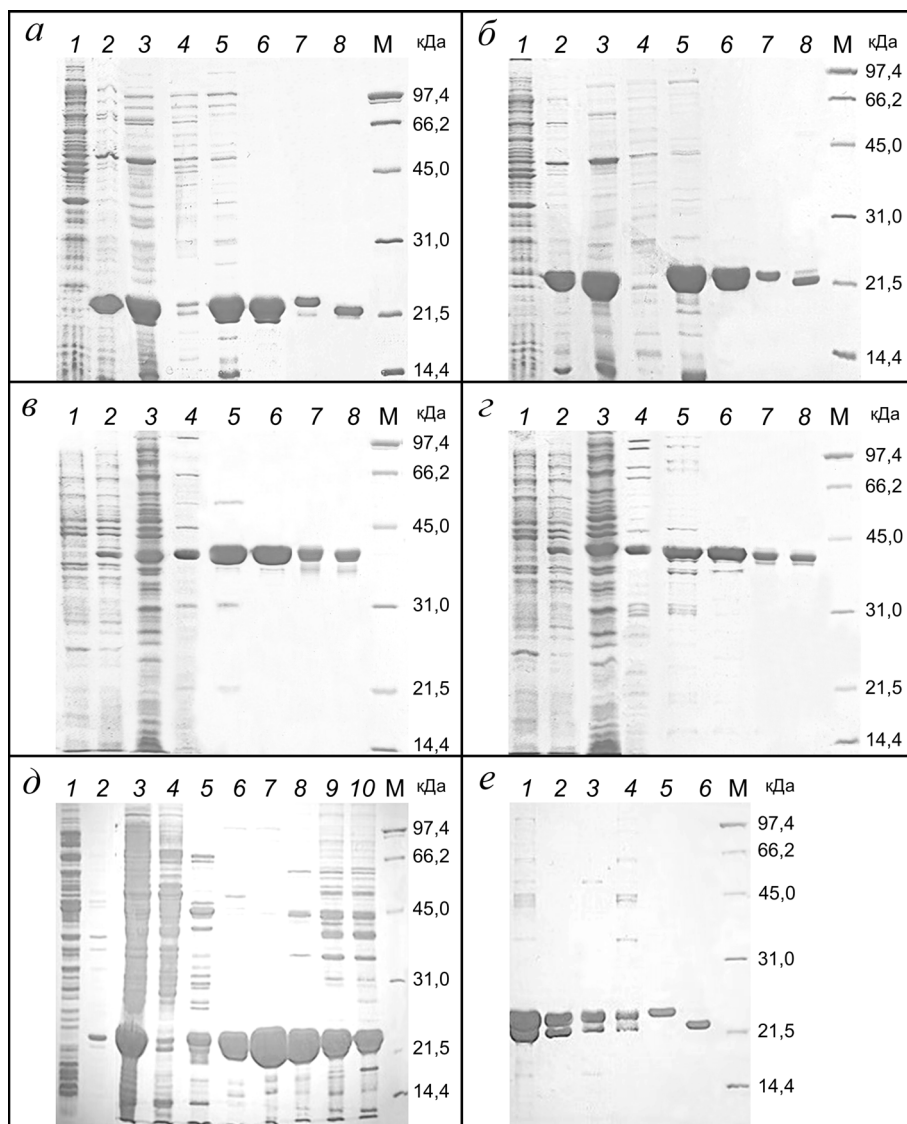


Рис. 3. Электрофореграммы разделения препаратов рекомбинантных белков в 12%-ном ПААГ. *а, б* – Очистка и анализ белков Rop-D2-Rop-Tri-HBD и Rop-D3-Rop-Tri-HBD: 1 – белки клетки до индукции ИПТГ; 2 – белки клетки после индукции ИПТГ; 3 – тельца включения после лизиса биомассы штаммов-продукентов; 4 – супернатант после лизиса биомассы штаммов-продукентов; 5 – объединенные фракции, полученные при элюции с сорбента WorkBeads 40S; 6 – объединенные фракции, полученные при элюции с гепарин-сефарозы; 7 – образцы белков в присутствии восстановителя ДТТ; 8 – образцы белков без ДТТ; *в, г* – очистка и анализ белков Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD: 1 – белки клетки до индукции ИПТГ; 2 – белки клетки после индукции ИПТГ; 3 – супернатант после лизиса биомассы штаммов-продукентов; 4 – прогретый супернатант после лизиса биомассы; 5 – объединенные фракции, полученные при элюции с сорбента WorkBeads 40S; 6 – объединенные фракции, полученные при элюции с гепарин-сефарозы; 7 – образцы белков в присутствии ДТТ; 8 – образцы белков без ДТТ; *д* – 1-й этап очистки и анализа белка Rop-RBM-Rop: 1 – супернатант после лизиса биомассы штамма-продукента; 2 – осадок после лизиса биомассы штамма-продукента; 3 – белки из осадка, растворенные в 8 М мочеvine; 4 – белки из осадка, не связавшиеся с сорбентом WorkBeads 40S; 5–10 – фракции после элюции; *е* – 2-й этап очистки и анализа белка Rop-RBM-Rop: 1 – объединенные фракции после очистки на WorkBeads 40S; 2 – белок, не связавшийся с WorkBeads 40 DEAE; 3, 4 – фракции после элюции; 5 – белок в присутствии ДТТ; 6 – белок без ДТТ; М – маркер молекулярной массы 14,4–97,4 кДа («Bio-Rad», США)

Таблица 1. Характеристики полученных в работе рекомбинантных белков

Параметр	Rop-D2-Rop-Tri-HBD	Rop-D3-Rop-Tri-HBD	Rop-D2-Rop-ALD-HBD	Rop-D3-Rop-ALD-HBD	Rop-RBM-Rop
Молекулярная масса, Да	18 714	21 359	36 102	38 747	20 550
Локализация белка после разрушения биомассы	тельца включения	тельца включения	растворимая фракция	растворимая фракция	тельца включения
Теоретическая изоэлектрическая точка (pI)	8,83	9,39	8,58	9,1	7,73
Поглощение водного раствора белка (1 мг/мл) при 280 нм для полностью окисленной формы белка	0,325	0,355	0,486	0,491	1,071
Поглощение водного раствора белка (1 мг/мл) при 280 нм для восстановленной формы белка	0,318	0,349	0,483	0,488	1,065

ственно, восстанавливаться (разрушаться) или сохраняться. MALDI масс-спектр полученных пептидов представлен на рис. S1, б, в в Приложении.

После обработки препарата белка ДТТ и ИАА в масс-спектре (рис. S1, в в Приложении) присутствует ряд пиков, соответствующих триптическим и химотриптическим цистеинсодержащим пептидам белка Rop-RBM-Rop, при этом цистеины в данных пептидах присутствуют только в виде карбамидометилцистеинов. Так, пик с m/z 2145,0365 соответствует пептиду DISTEIQAGSTPCNGVEGF (77–96 а.о.), пик с m/z 2582,0867 – DISTEIQAGSTPCNGVEGFNCY (77–99 а.о., данный пептид содержит в своем составе два остатка цистеина), пик с m/z 1191,5626 – NCYFPLQSY (97–105 а.о.), пик с m/z 1323,5494 – QAGSTPCNGVEGF (84–96 а.о.). Последовательности пептидов (84–96) и (96–105) дополнительно подтверждены с помощью фрагментации соударением (CID) (данные не приведены). В целом покрытие последовательности пептидами (рис. S1, а в Приложении) составило 100%, что является хорошим результатом и полностью подтверждает структуру исследуемого белка.

При сравнении масс-спектров гидролизатов образцов Rop-RBM-Rop (рис. S1, б, в в Приложении) показано, что в образце, проанализированном в неденатурирующих условиях, не детектируются пики, соответствующие пептидам, содержащим остатки цистеина в виде S-карбамидометилцистеинов, S-пропионамидоцистеинов или пептидам со свободными немодифицированными остатками цистеина, а присутствуют пики, подтверждающие наличие дисульфидной

связи в исследуемом белке. Детальный анализ пиков, соответствующих цистеинсодержащим пептидам, идентифицированным в составе белка Rop-RBM-Rop-DTT-IAA, между цистеинами которых образуется дисульфидная связь, представлен в табл. S1 в Приложении.

Видно, что пикам с m/z 2631,1467; 3791,486; 2561,1583 и 1645,6688 соответствуют две возможные структуры пептидов, однако они имеют одинаковую брутто-формулу и различаются лишь положением, в котором произошло расщепление полипептидной цепи трипсином (выделены курсивом в табл. S1 в Приложении). Кроме того, структура ионов с m/z 2561,044; 2865,261 и 3791,486 дополнительно подтверждена с помощью тандемной масс-спектрометрии. В масс-спектрах фрагментации, индуцированной соударением (CID) (рис. S2 в Приложении), присутствуют пики, соответствующие а-, у- и b-сериям фрагментов соответствующих родительских ионов, структуры которых были предположены на основании анализа масс-спектра триптического гидролизата (рис. S1, в; табл. S1 в Приложении) – этот факт дополнительно подтверждает правильность определения структуры этих ионов.

Таким образом, методом масс-спектрометрии было показано наличие S–S-связи между цистеинами 90 и 98 (480 и 488) в препарате белка Rop-RBM-Rop, полученном синтезом в клетках *E. coli* в виде телец включения с последующей хроматографической очисткой в денатурирующих условиях и рефолдингом посредством диализа.

Для остальных белков масс-спектрометрический анализ не проводили. Образование дисульфидной связи в выделенных белках выявля-

ли по наличию разницы в подвижности полос, соответствующих восстановленной (прогретой при 95 °С в присутствии восстанавливающего агента ДТТ) и невосстановленной формам белка. У белка Rop-RBM-Rop, для которого наличие дисульфидной связи показано с помощью масс-спектрометрии, восстановленная форма имеет меньшую подвижность в геле (рис. 3, е). Аналогичное поведение характерно для всех четырех белков с детерминантами D2 и D3 (рис. 3, а–д). Это подтверждает наличие дисульфидной связи в выделенных белках.

Образование антител после иммунизации. Иммуногенные композиции на основе четырех белков были использованы для иммунизации мышей инбредной линии BALB/с. Через 2 недели после трехкратной иммунизации с интервалом в 2 недели определяли наличие специфических иммуноглобулинов класса G (IgG) в образцах сыворотки мышей. В качестве антигенов использовали те же белки, которые применяли для иммунизации, вирус SARS-CoV-2, инактивированный формалином, и RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2. Результаты иммунизации представлены в табл. 2.

Как видно из приведенных в табл. 2 данных, все четыре белка вызвали у мышей образование антител класса IgG, в достаточно высоком титре взаимодействующих как с собственно антигеном, использованным для иммунизации, так и с инактивированным вирусом и RBD. Наиболее иммуногенными являются белки Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD. Наименее иммуногенным является белок Rop-D3-Rop-Tri-HBD. Наиболее выраженный ответ к RBD наблюдался в случае белка Rop-D3-Rop-ALD-HBD. Наиболее выраженный ответ к инактивированному вирусу SARS-CoV-2 наблюдался в группе животных, иммунизированных белком Rop-D2-ALD-HBD. Описанные сравнения имеют характер наблюдаемых тенденций, поскольку использованный в эксперименте размер выборки (7 животных в группе) является недостаточ-

ным для вывода о статистической достоверности (двухсторонний дисперсионный анализ с применением критерия Тьюки, $p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Высокие титры антител, взаимодействующих с RBD, полученным в эукариотическом продуценте, а также с инактивированным вирусом SARS-CoV-2 свидетельствуют о том, что полученные в работе рекомбинантные белки, содержащие короткие фрагменты RBM, соответствующие конформационным эпитопам D2 и D3, способны эффективно индуцировать выработку специфических антител. Одним из важных обстоятельств, которое, вероятно, во многом определило эффективную выработку антител, является то, что в пределах выбранных детерминант в Spike-белке отсутствуют сайты гликозилирования, поэтому участки поверхности вируса и RBD в области детерминант D2 и D3 не модифицированы остатками сахаров, как и эпитопы D2 и D3 в полученных в нашей работе белках, синтезированных в бактериальных клетках. В нашем случае присоединение N- и C-концов детерминант D2 и D3 к спиральям Rop-подобного каркасного белка, по-видимому, обеспечивает высокую конформационную схожесть петлеобразных участков D2 и D3 в рекомбинантных белках и в нативном Spike-белке. Об этом также свидетельствует образование характерной дисульфидной связи, непосредственно продемонстрированное для белка Rop-RBM-Rop с помощью масс-спектрометрии и косвенно – для всех четырех белков, использованных для иммунизации (по снижению подвижности восстановленной формы при электрофорезе в ПААГ). В последующем на основе разработанной в нашей работе платформы планируется получение других рекомбинантных белков, включающих перспективные вирусные эпитопы, не обязательно петлеобразные. В том случае, если эти эпитопы будут иметь любую

Таблица 2. Среднее геометрическое титра сывороточных антител к различным антигенам в сыворотках мышей после трехкратной иммунизации ($1/\log_2$ титр)

Группа мышей	Белок	Антиген, использованный при иммунизации	Инактивированный формалином SARS-CoV-2	RBD
1	Rop-D2-Rop-Tri-HBD	$14,21 \pm 1,04$	$8,64 \pm 1,00$	$10,73 \pm 1,12$
2	Rop-D3-Rop-Tri-HBD	$13,48 \pm 1,19$	$9,67 \pm 1,18$	$11,44 \pm 1,19$
3	Rop-D2-Rop-ALD-HBD	$> 15,64$	$9,88 \pm 1,12$	$11,36 \pm 1,17$
4	Rop-D3-Rop-ALD-HBD	$> 15,64$	$9,75 \pm 1,10$	$12,61 \pm 1,08$
5	физиологический раствор	$< 7,0$	$< 7,0$	$< 7,0$

другую устойчивую конформацию, например, α -спиральную, или представлять собой участки β -листа, для их присоединения к каркасному Rop-подобному белку будут использованы гибкие глицин-содержащие линкеры. Конформация эпитопов может быть дополнительно стабилизирована за счет замены а.о., не взаимодействующих с антителами и рецептором, на остатки цистеина, которые будут обеспечивать сближение несущих их белковых цепочек за счет образования дисульфидных связей. Такой подход реализован в работе Zuniga et al. [12] по получению эпитопной вакцины на основе коротких фрагментов белка респираторно-синцитиального вируса (RSV), конъюгированных с синтетическими наночастицами.

Наличие в белках тримеризационных доменов, вероятно, приводит к дополнительному усилению иммунного ответа за счет укрупнения антигена. Максимальный эффект наблюдается в случае белков с альдолазой (рис. 2). Способность альдолазы к самопроизвольной мультимеризации часто используют для получения кандидатных вакцин на основе белковых наночастиц, в частности, вакцин на основе RBD коронавируса [13–15]. Альдолаза, используемая в нашей работе, – достаточно крупный по сравнению с вирусными детерминантами белок, поэтому можно предположить, что среди вырабатываемых антител значительная часть антител будет вырабатываться именно на альдолазу и другие дополнительные домены рекомбинантных белков. Тем не менее в многочисленных работах по созданию вакцин на основе вирусных и других белков, способных к самосборке, образующих огромные белковые комплексы (например, из 24-х или 60-ти субъединиц), образования кросспецифичных или аутореактивных антител на белковые компоненты носителя не отмечается [16]. Тем не менее в настоящей работе мы, помимо альдолазы, использовали также другой тримеризатор – α -спираль из Spike-белка SARS-CoV-2, который существенно меньше по размерам и, следовательно, должен в меньшей степени «перетягивать» на себя «антительный ответ», кроме того, он происходит из того же вируса, что и целевые антигены. Подобный тримеризатор (фолдон – фрагмент белка фибритина из бактериофага T4 длиной 27 а.о.) уже достаточно давно используется для получения кандидатных вакцин на основе вирусных белков, в частности, он содержится в разработанных ранее вакцинах против SARS-CoV и MERS [17, 18]. Данные вакцины и другие белковые вакцины против коронавирусов [13, 15] в качестве антигенного компонента содержат крупные фрагменты или весь Spike-белок коронавирусов, син-

тезированные в эукариотических системах экспрессии. Все они обладают высокой иммуногенностью и в большей или меньшей степени вызывают выработку вируснейтрализующих антител. Целью настоящей работы было получение на основе синтеза в *E. coli* коротких детерминант Spike-белка SARS-CoV-2 (эпитопов), обладающих нативной конформацией, изучение их иммуногенности и способности образующих в ответ на них антител взаимодействовать с RBD белка и инактивированным вирусом. Успешная реализация данного этапа исследования позволяет перейти к исследованию вируснейтрализующего эффекта получаемых антител, расширению списка изучаемых детерминант и последующим этапам разработки эпитопной вакцины.

Необходимо отметить, что в пределах обеих выбранных детерминант в последовательности RBD Spike-белка находится остаток глутаминовой кислоты E484, который при замене на лизин обеспечивает меньшую эффективность связывания с моноклональными антителами и сыворотками переболевших и вакцинированных [19–21]. Указанная мутация присутствует в новых вариантах вируса SARS-CoV-2, произошедших от линии B.1.1.28, впервые описанных в Бразилии и Японии (P.2 и P.1), а также в штаммах линии B.1.351, также известной как 501Y.V2, впервые выявленных в Южной Африке, а в настоящее время распространенных повсеместно [22]. На основе разработанной в статье платформы технически несложно получить варианты иммуногенных рекомбинантных белков, содержащих замену E484K. Введение в вакцинную композицию обоих вариантов белков должно обеспечить выработку антител, связывающихся как с исходными, так и с мутантными вариантами вируса.

Наиболее близкий к предлагаемому в нашей работе подход реализован в исследовании Lu et al. [7], в рамках которого были предсказаны и синтезированы поверхностные В-клеточные эпитопы Spike-белка, созданы вакцины на основе вирусоподобных частиц (VLPs) кор-белка вируса гепатита В (HBV) с применением системы SpyCatcher/SpyTag [7]. Иммуногенность эпитопов проверяли при использовании сывороток мышей через 10 дней после трехкратной иммунизации с двухнедельным интервалом. Для эпитопа S455–469, входящего в состав последовательности D3, и эпитопа S475–499, входящего в состав D2, и D3 (рис. 1), в экспериментах по твердофазному ИФА (ELISA) с использованием пептидов в качестве антигенов показана высокая иммуногенность (титр антител в сыворотках мышей $> 10^4$).

Lu et al. [7] использовали короткие линейные синтетические пептиды, при этом плот-

ность их посадки на вирусоподобные частицы и размер самих частиц, вероятно, больше по сравнению с тримерными гибридными белками, получаемыми в нашей работе. Тем не менее при использовании нашего подхода титр антител в сыворотках мышей также превышает 10^4 . В нашем исследовании показана также активность сывороток мышей в отношении RbM и инактивированного вируса, что свидетельствует в пользу нативной конформации полученных нами петлеобразных эпитопов. В работе Lu et al. [7] для эпитопов S455–469 и S475–499 была показана также нейтрализующая активность образующих антител в отношении псевдовирюсов вариантов D614 и G614. Это позволяет надеяться на то, что иммунизация белками с эпитопами D2 и D3 также будет приводить к образованию вируснейтрализующих антител в отношении обоих вариантов вирусов.

Таким образом, на основе гибридных белков, включающих Ror-подобный белок из *M. capsulatus* и тримеризационных доменов, альдозазы из *T. maritima* или α -спирали Spike-белка SARS-CoV-2, создана платформа для получения иммуногенных конструкций, содержащих конформационные эпитопы с непрерывной аминокислотной последовательностью, в частности эпитопы белков вируса SARS-CoV-2, которые могут быть использованы для создания новых вариантов эпитопных вакцин для профилактики COVID-19. Перспективы работы связаны с расширением спектра исследуемых детерми-

нант и характеристикой их способности вызывать образование нейтрализующих антител. Наработка белков микробиологическим синтезом является недорогой альтернативой получения белков синтезом в клетках эукариот. Выбор эпитопов, значительная часть которых экспонируется на поверхности белка, включающих аминокислотные остатки, вовлеченные во взаимодействие с нейтрализующими антителами и не содержащие сайтов гликозилирования, представляется при этом оптимальной стратегией.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 20-04-60373\20 «Разработка подходов к созданию профилактической вакцины нового типа против COVID-19, основанной на использовании рекомбинантных антигенов SARS-CoV-2 в составе химерных белковых наночастиц»).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/bioximiya/>) и на сайте издательства Springer (www.springer.com/journal/10541), том 86, вып. 10, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burton, D. R. (2002) Antibodies, viruses and vaccines, *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 706-713, doi: 10.1038/nri891.
- Neu, K. E., Henry Dunand, C. J., and Wilson, P. C. (2016) Heads, stalks and everything else: how can antibodies eradicate influenza as a human disease? *Curr. Opin. Immunol.*, **42**, 48-55, doi: 10.1016/j.coi.2016.05.012.
- Sok, D., and Burton, D. R. (2018) Recent progress in broadly neutralizing antibodies to HIV, *Nat. Immunol.*, **19**, 1179-1188, doi: 10.1038/s41590-018-0235-7.
- Dejnirattisai, W., Supasa, P., Wongwiwat, W., Rouvinski, A., Barba-Spaeth, G., et al. (2016) Dengue virus serocross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus, *Nat. Immunol.*, **17**, 1102-1108, doi: 10.1038/ni.3515.
- Yuan, M., Liu, H., Wu, N. C., Lee, C. D., Zhu, X., et al. (2020) Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2, *Science*, **369**, 1119-1123, doi: 10.1126/science.abd2321.
- Xu, K., Acharya, P., Kong, R., Cheng, C., Chuang, G. Y., et al. (2018) Epitope-based vaccine design yields fusion peptide-directed antibodies that neutralize diverse strains of HIV-1, *Nat. Med.*, **24**, 857-867, doi: 10.1038/s41591-018-0042-6.
- Lu, S., Xie, X. X., Zhao, L., Wang, B., Zhu, J., et al. (2021) The immunodominant and neutralization linear epitopes for SARS-CoV-2, *Cell Rep.*, **34**, 108666, doi: 10.1016/j.celrep.2020.108666.
- Juraja, S. M., Mulhern, T. D., Hudson, P. J., Hattarki, M. K., Carmichael, J. A., and Nuttall, S. D. (2006) Engineering of the *Escherichia coli* Im7 immunity protein as a loop display scaffold, *Protein Eng. Des. Sel.*, **19**, 231-244, doi: 10.1093/protein/gzl005.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., and Mann, M. (2006) In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat. Protoc.*, **1**, 2856-2860, doi: 10.1038/nprot.2006.468.
- Grunina, T. M., Demidenko, A. V., Lyaschuk, A. M., Poponova, M. S., Galushkina, Z. M., et al. (2017) Recombinant human erythropoietin with additional processable protein domains: purification of protein synthesized in *Escherichia coli* heterologous expression system, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 1285-1294, doi: 10.1134/S0006297917110062.
- Lee, S.-Y., Kim, C., Ryu, D.-K., Lee, J., Kim, Y.-I., et al. (2020) A novel neutralizing antibody targeting receptor binding domain of SARS-CoV-2, *Res. Square*, preprint, doi: 10.21203/rs.3.rs-59639/v1.
- Zuniga, A., Rassek, O., Vrohlings, M., Marrero-Nodarse, A., Moehle, K., et al. (2021) An epitope-specific chemically defined nanoparticle vaccine for respiratory syncytial virus, *Vaccines*, **6**, 85, doi: 10.1038/s41541-021-00347-y.
- Cohen, A. A., Gnanapragasam, P., Lee, Y. E., Hoffman, P. R., Ou, S., et al. (2021) Mosaic nanoparticles elicit cross-

- reactive immune responses to zoonotic coronaviruses in mice, *Science*, **371**, 735-741, doi: 10.1126/science.abf6840.
14. Kang, Y. F., Sun, C., Zhuang, Z., Yuan, R. Y., Zheng, Q., et al. (2021) Rapid Development of SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain self-assembled nanoparticle vaccine candidates, *ACS Nano*, **15**, 2738-2752, doi: 10.1021/acsnano.0c08379.
 15. Tan, T. K., Rijal, P., Rahikainen, R., Keeble, A. H., Schimanski, L., et al. (2021) A COVID-19 vaccine candidate using SpyCatcher multimerization of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain induces potent neutralising antibody responses, *Nat. Commun.*, **12**, 542, doi: 10.1038/s41467-020-20654-7.
 16. Nguyen, Q. D., Kikuchi, K., Maity, B., and Ueno, T. (2021) The versatile manipulations of self-assembled proteins in vaccine design, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 1934, doi: 10.3390/ijms22041934.
 17. Li, J., Ulitzky, L., Silberstein, E., Taylor, D. R., and Viscidi, R. (2013) Immunogenicity and protection efficacy of monomeric and trimeric recombinant SARS coronavirus spike protein subunit vaccine candidates, *Viral Immunol.*, **26**, 126-132, doi: 10.1089/vim.2012.0076.
 18. Tai, W., Zhao, G., Sun, S., Guo, Y., Wang, Y., et al. (2016) A recombinant receptor-binding domain of MERS-CoV in trimeric form protects human dipeptidyl peptidase 4 (hDPP4) transgenic mice from MERS-CoV infection, *Virology*, **499**, 375-382, doi: 10.1016/j.virol.2016.10.005.
 19. Baum, A., Fulton, B. O., Wloga, E., Copin, R., Pascal, K. E., et al. (2020) Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies, *Science*, **369**, 1014-1018, doi: 10.1126/science.abd0831.
 20. Greaney, A. J., Starr, T. N., Gilchuk, P., Zost, S. J., Binshtein, E., et al. (2021) Complete mapping of mutations to the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain that escape antibody recognition, *Cell Host Microbe*, **29**, 44-57.e9, doi: 10.1016/j.chom.2020.11.007.
 21. Greaney, A. J., Loes, A. N., Crawford, K. H. D., Starr, T. N., et al. (2021) Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies, *Cell Host Microbe*, **29**, 463-476.e6, doi: 10.1016/j.chom.2021.02.003.
 22. Tegally, H., Wilkinson, E., Lessells, R. J., Giandhari, J., Pillay, S., et al. (2021) Sixteen novel lineages of SARS-CoV-2 in South Africa, *Nat. Med.*, **27**, 440-446, doi: 10.1038/s41591-021-01255-3.

DEVELOPMENT OF A PLATFORM FOR PRODUCING RECOMBINANT PROTEIN COMPONENTS OF EPITOPE VACCINES FOR THE PREVENTION OF COVID-19

A. S. Karyagina^{1,2,3*}, A. V. Gromov¹, T. M. Grunina^{1,2}, A. M. Lyaschuk¹, A. V. Grishin¹, N. V. Strukova¹, M. S. Generalova¹, Z. M. Galushkina¹, L. A. Soboleva¹, O. Yu. Dobrinina¹, T. N. Bolshakova¹, M. E. Subbotina^{1,2*}, E. A. Romanovskaya-Romanko⁴, I. V. Krasilnikov⁵, N. B. Polyakov^{1,6}, A. I. Solovyev¹, D. A. Grumov¹, V. G. Zhukhovitsky¹, E. I. Ryabova¹, V. V. Prokofiev¹, and V. G. Lunin^{1,2}

¹ Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 123098 Moscow, Russia; e-mail: akaryagina@gmail.com, subbotinam@gmail.com

² All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, 127550 Moscow, Russia

³ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

⁴ Institute of Influenza, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, 197376 St. Petersburg, Russia

⁵ Saint Petersburg Institute of Vaccines and Sera, FMBA, 198320 St. Petersburg, Russia

⁶ Vernadsky Institute of Geochemistry and Analytical Chemistry, Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

A new platform for creating anti-coronavirus epitope vaccines has been developed. From the receptor-binding motif of a Spike protein from SARS-CoV-2 virus, two loop-like epitopes with lengths of 22 and 42 amino acid residues were selected, which implement a large number of protein-protein interactions in complexes with ACE2 and neutralizing antibodies. Two types of hybrid proteins, including one of the two selected epitopes, were constructed. To fix the conformation of the selected epitopes, an approach using protein scaffolds was used. The homologue of Rop protein from *Escherichia coli* ColE1 plasmid, incorporating helix-turn-helix motif, was used as an epitope scaffold for the convergence of C- and N-termini of loop-like epitopes. Loop epitopes were inserted into the turn region. The conformation was additionally fixed by a disulfide bond formed between the cysteine residues present within the epitopes. For the purpose of multimerization, either aldolase from *Thermotoga maritima*, which forms a trimer in solution, or the alpha-helical trimerizer of a Spike protein from SARS-CoV-2, was attached to the epitopes incorporated into the Rop-like protein. To enable purification on heparin-containing sorbents, a short fragment from the heparin-binding hemagglutinin of *Mycobacterium tuberculosis* was inserted at the C-terminus of the hybrid proteins. All the obtained proteins demonstrated a high level of immunogenicity after triplicate parenteral administration to mice. Sera from mice immunized with both aldolase-based hybrid proteins and the Spike protein SARS-CoV-2 trimerizer-based protein with a longer epitope interacted in high titer with both the inactivated SARS-CoV-2 virus and the Spike protein receptor-binding domain.

Keywords: SARS-CoV-2, Spike protein, RBD, RBM, epitope vaccine, epitope, epitope scaffold, aldolase, hybrid protein