

УДК 577.112

ГИБРИДНЫЕ БЕЛКИ С КОРОТКИМИ КОНФОРМАЦИОННЫМИ ЭПИТОПАМИ РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА Spike-БЕЛКА ВИРУСА SARS-CoV-2 СПОСОБСТВУЮТ ВЫРАБОТКЕ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ ПРИ ИММУНИЗАЦИИ

© 2022 А.С. Карягина^{1,2,3*}, А.В. Громов¹, Т.М. Грунина^{1,2}, А.М. Лящук¹, М.С. Попонова¹, Д.А. Клейменов¹, Н.В. Струкова¹, М.С. Генералова¹, А.В. Рязанова¹, З.М. Галушкина¹, О.Ю. Добрынина¹, Т.Н. Большакова¹, М.В. Сергеева⁴, Е.А. Романовская-Романько⁴, И.В. Красильников⁵, М.Е. Субботина^{1,2*}, В.Г. Лунин^{1,2}

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. 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 им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия

⁴ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной Минздрава России, 197376 Санкт-Петербург, Россия

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

Поступила в редакцию 31.01.2022

После доработки 16.02.2022

Принята к публикации 16.02.2022

На основе предложенного ранее подхода синтезом в клетках *Escherichia coli* получены гибридные рекомбинантные белки – потенциальные компоненты эпитопных вакцин, содержащие короткие конформационные эпитопы рецептор-связывающего домена Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (144–153, 337–346, 414–425, 496–507 а.о.), реализующие большое количество белок-белковых взаимодействий в комплексах с нейтрализующими антителами и ACE2 (ангиотензин-превращающий фермент 2). Полученными белками трёхкратно с интервалом в 2 недели иммунизировали мышей и исследовали иммуногенность белковых антигенов и способность сывороток взаимодействовать с инактивированным вирусом SARS-CoV-2 и с рецептор-связывающим доменом (RBD) Spike-белка, полученным в эукариотическом продуценте. Все рекомбинантные белки демонстрировали высокую иммуногенность. Наиболее высокий титр при связывании с RBD Spike-белка продемонстрировала сыворотка, полученная при иммунизации белком на основе эпитопа 414–425. При этом титры сывороток при связывании с инактивированным вирусом и RBD в случае остальных белков оказались существенно ниже титров для полученных ранее четырёх белков на основе петлеобразных эпитопов 452–494 и 470–491, конформация которых дополнительно фиксировалась дисульфидной связью. Для всех белков – полученных ранее и в данной работе – проведено исследование активации клеточного иммунитета, детектируемой по уровню синтеза цитокинов спленоцитами иммунизированных мышей. Максимально выраженный уровень повышения синтеза цитокинов наблюдался в случае ответа на белки, включающие эпитопы с дисульфидными связями (452–494, 470–491), а также эпитопы 414–425 и 496–507. После оптимизации адьюванта для некоторых рекомбинантных белков с короткими конформационными эпитопами RBD Spike-белка были получены сыворотки мышей, демонстрирующие вируснейтрализующий эффект в реакции микронейтрализации с живым вирусом SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 EPI_ISL_415710 GISAID). Полученные результаты могут быть использованы для разработки эпитопных вакцин для профилактики COVID-19 и других вирусных инфекций.

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

DOI: 10.31857/S0320972522030010

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых вариантов вакцин для профилактики COVID-19 и других вирусных

инфекций является чрезвычайно актуальной задачей. Цельновирионные вакцины, субъединичные белковые вакцины, включающие полноразмерные белки, векторные вакцины и РНК-вак-

Принятые сокращения: ДТТ – дитиотреитол; СГТ – средний геометрический титр; ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2; ALD – альдолаза; COVID-19 – коронавирусная инфекция 2019 г. (CoronaVirus Disease 2019); HBD – гепарин-связывающий домен; RBD – рецептор-связывающий домен; RBM – рецептор-связывающий мотив; TLR – Toll-подобные рецепторы; Tti – α -спираль, опосредующая тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2.

* Адресат для корреспонденции.

цины, которые способствуют выработке в организме вирусных белков, индуцируют образование широкого спектра антител, не все из которых являются протективными [1]. В ряде случаев могут образовываться антитела, способствующие при заражении после вакцинирования [2–4]. Эпитопные вакцины, включающие отдельные небольшие белковые эпитопы инфекционного агента, позволяют избежать вышеперечисленных проблем и при этом характеризуются высокой степенью стандартности и слабой реактогенностью. Недостатками эпитопных вакцин может быть их низкая иммуногенность и неспособность вызывать образование вируснейтрализующих антител, а также возможность быстрого ухода новых штаммов вируса от иммунного ответа, вызванного такими вакцинами. Повысить иммуногенность и способствовать выработке вируснейтрализующих антител можно, используя такие подходы, как мультимеризация эпитопов [5] и оптимизация адьюванта [6]. Перспективным подходом при выборе эпитопов – участков поверхности белков, способных эффективно индуцировать образование антител – представляется выбор не линейных, а непрерывных конформационных эпитопов, обеспечивающих большее соответствие участку структуры вирусного белка. Основываясь на данных о контактах, реализуемых в комплексах Spike-белка с нейтрализующими антителами и ACE-2 (ангиотензин-превращающий фермент 2), на предыдущих этапах исследования нами были выбраны две детерминанты в области рецептор-связывающего мотива (RBM) – 452–494 и 470–491 а.о., реализующие большое количество контактов как с антителами, так и с ACE-2 [7]. Обе детерминанты характеризуются петлеобразной конформацией и включают два остатка цистеина, образующих дисульфидную связь в структуре Spike-белка. Для иммунизации были получены два варианта гибридных белков, содержащих антигенные детерминанты, включённые в место поворота в мотиве «спираль-поворот-спираль» Rop-подобного белка из *Methylococcus capsulatus* с целью сближения N- и C-концов и сохранения петлеобразной конформации эпитопов. Rop-подобный белок в данном случае выполняет функцию так называемого эпитопного каркаса. Показано, что при синтезе такого рода белков в *Escherichia coli* и последующей очистке дисульфидная связь образуется [7]. Гибридные белки содержат также либо альдозу из *Thermotoga maritima*, либо α -спиральный участок, соответствующий 958–991 а.о. Spike-белка SARS-CoV-2, обеспечивающие тримеризацию, а также гепарин-связывающий участок, использующийся

для очистки. Для всех четырёх вариантов гибридных белков показана высокая иммуногенность и способность антител, образующихся в ответ на иммунизацию этими белками, в высоком титре взаимодействовать как с рецептор-связывающим доменом (RBD) Spike-белка, так и с инактивированным SARS-CoV-2.

Целью данной работы было получение по ранее разработанной схеме ещё нескольких вариантов гибридных белков, несущих конформационные эпитопы Spike-белка коронавируса SARS-CoV-2, исследование иммуногенности полученных белков и способности индуцированных ими антител связываться с RBD Spike-белка и инактивированным SARS-CoV-2, характеристика цитокинового ответа спленоцитов после иммунизации белками, несущими весь спектр исследуемых эпитопов, исследование вируснейтрализации наиболее перспективными гибридными белками на модели микронеutralизации клинического изолята коронавируса SARS-CoV-2.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм и векторы. В работе использовали бактериальный штамм *Escherichia coli* BL21 (DE3) (*E. coli* B F⁻ *dcm ompT hsdS*(r_mm_b) *gal* λ (DE3), «Agilent Technologies», США), модифицированный плазмидный вектор pQE6 («Qiagen», США), содержащий вместо промотора T5 промотор T7, и плазмиду pRep4 из *E. coli* M15 [pRep4] («Qiagen»).

Получение генно-инженерных конструкций, кодирующих белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD детально описано в работе Karyagina et al. [7]. Последовательности этих белков содержат участки D2 (470–490 а.о.) и D3 (453–494 а.о.) Spike-белка вируса SARS-CoV-2 (UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2), вставленные между аминокислотными последовательностями двух α -спиралей Rop-подобного белка из *M. capsulatus* (первая спираль Rop: 2–34 а.о., вторая спираль Rop: 34–65 а.о., PDB: 2JS5_A, RefSeq WP_010959602). Далее присоединена последовательность α -спирали, опосредующей тримеризацию Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri) (958–991 а.о., UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2), или последовательность альдозы из *T. maritima* (2–201 а.о., PDB: 1WA3). На C-конце белков находится короткий участок гепарин-связывающего гемагглютинаина HBHA из *Mycobacterium tuberculosis*, соответствующий гепарин-связывающему домену (HBD) (160–174 а.о., UniProtKB/

Swiss-Prot: A1KFU9.1). В составе конструкций также имеются дополнительные остатки, представляющие собой линкерные последовательности, и остатки, соответствующие нуклеотидным последовательностям с введёнными рестрикционными сайтами.

Получение генно-инженерных конструкций Rop-D4-Rop-Tri-HBD, Rop-D4-Rop-ALD-HBD, Rop-D6-Rop-Tri-HBD, Rop-D6-Rop-ALD-HBD, Rop-D8-Rop-Tri-HBD, Rop-D8-Rop-ALD-HBD, Rop-D13-Rop-Tri-HBD, Rop-D13-Rop-ALD-HBD, Rop-RBM-Rop-Tri-HBD проводили по схемам, аналогичным описанным в работе Karyagina et al. [7]. Получали синтетические последовательности, кодирующие участки Spike-белка коронавируса SARS-CoV-2: D4 (496–507 а.о.), D6 (144–153 а.о.), D8 (337–346 а.о.), D13 (414–425 а.о.), RBM (433–511 а.о.), оптимизированные с помощью программы JCat (<http://www.jcat.de/>) по кодонному составу и скорректированные для улучшения вторичной структуры транскрибируемой РНК с помощью веб-сервера DINAMelt (<http://mfold.rna.albany.edu/?q=DINAMelt/Two-state-folding>) с целью повышения экспрессии в *E. coli*. Синтетические последовательности клонировали в плазмиды pL1003, кодирующую белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD и pL989, кодирующую белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD, получение которых описано ранее [7], замещая детерминанту D2. Синтетические последовательности получали в компании «Евроген» (Россия).

Выращивание штаммов-продуцентов и разрушение клеток *E. coli* проводили по протоколам, описанным в работе Karyagina et al. [7]. При этом белки Rop-D4-Rop-Tri-HBD, Rop-D8-Rop-Tri-HBD, Rop-D13-Rop-Tri-HBD и Rop-RBM-Rop-Tri-HBD синтезировались в нерастворимой форме в виде телец включений, а белки Rop-D13-Rop-ALD-HBD, Rop-D4-Rop-ALD-HBD и Rop-D8-Rop-ALD-HBD – в растворимой форме. Синтеза белка Rop-D6-Rop-ALD-HBD не наблюдалось.

Очистку белков проводили в соответствии с ранее опубликованными протоколами хроматографической очистки – для нерастворимых и для растворимых белков [7]. Хроматографию белков, синтезированных в тельцах включений, растворённых в 8 М мочевины и 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), проводили на колонке с WorkBeads 40S («Bio-Works», Швеция), уравновешенной раствором 8 М мочевины и 10 мМ Tris-HCl (pH 8,0), с элюцией линейным градиентом NaCl с концентрацией 0–1 М в том же буферном растворе и последующим диализом против раствора 4 М мочевины в 25 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0) в течение 24 ч при 4 °С и

центрифугированием в течение 30 мин при 9000 g. Затем проводили аффинную хроматографию на Heparin Sepharose CL-6B («GE Healthcare», США), уравновешенной раствором 4 М мочевины в 20 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0), с элюцией линейным градиентом NaCl с концентрацией 0–1 М в растворе 4 М мочевины в 25 мМ Tris-HCl-буфере (pH 8,0) и последующим диализом против буфера 25 мМ Tris-HCl (pH 6,8), постепенно снижая концентрацию мочевины в диализном буфере до нуля (ступенями по 0,5 М) в течение 24 ч при 4 °С.

Хроматографию растворимых белков проводили на сорбенте WorkBeads 40S, уравновешенном 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), с элюцией раствором NaCl (линейным градиентом концентрации 0–1 М) в том же буферном растворе, диализовали против 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0) в течение 24 ч и центрифугировали в течение 30 мин при 9000 g. Затем проводили аффинную хроматографию на гепарин-сефарозе, уравновешенной 20 мМ Tris-HCl-буфером (pH 8,0), с элюцией градиентом концентрации NaCl 0–1 М в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Полученные фракции белков диализовали против 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 50 мМ NaCl в течение 24 ч при температуре 4 °С с трёхкратной сменой буфера.

Концентрацию и общее количество белков определяли по поглощению раствора при 280 нм с использованием бицинониновой кислоты. Полученные препараты белков лиофильно высушивали и использовали для дальнейших исследований.

Молекулярную массу и теоретические значения некоторых параметров рекомбинантных белков рассчитывали с использованием интернет-ресурса <https://web.expasy.org/protparam/>.

Иммуногенные композиции и эксперименты по иммунизации. На основе полученных рекомбинантных белков, содержащих конформационные эпитопы Spike-белка SARS-CoV-2 (включая четыре белка, полученных ранее), были подготовлены иммуногенные композиции, содержащие в одной дозе (объёмом 150 мкл) 1 нмоль рекомбинантного белка и соответствующий адъювант. В первом эксперименте по иммунизации мышей использовали семь рекомбинантных белков (белки в строках 5–11 в табл. 1), в иммуногенные композиции вводили адъювант 1: диэтиламиноэтиловый (ДЭАЭ)-декстран 500 – 1 мг, монтанид ISA 201 («Seppic SA», Франция) – 75 мкл (50%), ретинола пальмитат (100 000 МЕ/мл) (АО «Ретиноиды», Россия) – 1,5 мкл (1%). Сыворотки, полученные после этой иммунизации, использовали для оценки иммуногенности рекомбинантных белков, способности взаимодействовать с RBD и инактиви-

рованным вирусом SARS-CoV-2, постановки первой реакции микронеutralизации, спленомиты – для исследования клеточного иммунитета. Во втором эксперименте по иммунизации использовали те же рекомбинантные белки, ранее полученные рекомбинантные белки [7] (строки 1–4 в табл. 1), а также белки Rop-RBM-Rop-Tri-HBD и RBD («Mount Sinai», США), в иммуногенные композиции вводили адьювант 2: ДЭАЭ-декстран 500 – 1 мг, липополисахарид (LPS) из *E. coli* O55:B5 («Sigma», США) – 0,1 мкг, олигодезоксинуклеотиды CpG (ODN 1826) (ЗАО «Евроген», Россия) – 30 мкг. Полученные сыворотки использовали для постановки второй реакции микронеutralизации.

Детальный протокол иммунизации лабораторных животных описан ранее [7]. Для иммунизации использовали самок мышей сингенной инбредной линии BALB/c в возрасте 5–6 недель весом 18–20 г (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России). Мышам опытных групп ($n = 7$) трёхкратно вводили по 150 мкл иммуногенных композиций, содержащих рекомбинантные белки, с интервалом в 2 недели. Животным контрольной группы ($n = 7$) вводили физиологический раствор (150 мкл). Через 2 недели после последней инъекции лабораторных живот-

ных опытных и контрольной групп вводили в наркоз ингаляцией изофлурана («Piramal Enterprises», Индия) и проводили сбор крови из сердечной полости (в случае первого эксперимента по иммунизации также проводили извлечение селезёнки, см. подраздел про оценку активности клеточного иммунитета). Вакуумные пробирки с кровью выдерживали при комнатной температуре 20 мин и центрифугировали 30 мин при 1500 g без охлаждения. Надосадочную жидкость (сыворотку крови) переносили в стерильные пробирки объёмом 1,5 мл и замораживали при -80°C .

Имуноферментный анализ. В качестве антигенов на планшеты сорбировали белки, использованные для иммунизации, вирус SARS-CoV-2, инактивированный формалином, и RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2. Получение инактивированного SARS-CoV-2 и RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2, а также детальный протокол ИФА описаны ранее [7]. Кратко, в 96-луночных планшетах Maxisorp («Thermo Scientific», Дания) в течение ночи при 4°C проводили сорбцию антигенов, после отмывки планшеты инкубировали в течение 2 ч с блокирующим буфером (PBS, содержащий 5% сухого молока; «ТФ Дитол», Россия), повторно отмывали и вносили се-

Таблица 1. Характеристика полученных рекомбинантных белков

№	Белок	Молекулярная масса, Да	Локализация белка после разрушения биомассы	Теоретическая изоэлектрическая точка (pI)	Поглощение водного раствора белка (1 мг/мл) при 280 нм для полностью окисленной формы	Поглощение водного раствора белка (1 мг/мл) при 280 нм для восстановленной формы
1	Rop-D2-Rop-Tri-HBD	18 714	тельца включения	8,83	0,325	0,318
2	Rop-D3-Rop-Tri-HBD	21 359	тельца включения	9,39	0,355	0,349
3	Rop-D2-Rop-ALD-HBD	36 102	растворимая фракция	8,58	0,486	0,483
4	Rop-D3-Rop-ALD-HBD	38 747	растворимая фракция	9,10	0,491	0,488
5	Rop-D4-Rop-Tri-HBD	17 491	тельца включения	9,45	0,256	-
6	Rop-D8-Rop-Tri-HBD	17 627	тельца включения	9,49	0,169	-
7	Rop-D4-Rop-ALD-HBD	34 878	растворимая фракция	9,06	0,457	-
8	Rop-D8-Rop-ALD-HBD	35 014	растворимая фракция	9,07	0,412	-
9	Rop-D6-Rop-Tri-HBD	34 966	тельца включения	9,05	0,456	-
10	Rop-D13-Rop-ALD-HBD	35 215	растворимая фракция	9,13	0,495	-
11	Rop-D13-Rop-Tri-HBD	17 827	тельца включения	9,29	0,334	-
12	Rop-RBM-Rop-Tri-HBD	245 628	тельца включения	8,43	0,836	0,831

Примечание. Для белков, не образующих дисульфидную связь, поглощение водного раствора белка при 280 нм для восстановленной формы не исследовали. Данные для белков в строках 1–4 получены ранее [7] и приведены для удобства сравнения.

рии десятикратных разведений сывороток мышей. В качестве вторичных антител использовали меченые пероксидазой хрена Goat anti mouse IgG (H+L) HRP («Invitrogen», США) в разведении 1 : 1200 (вносили по 100 мкл в лунку). В качестве цветного субстрата использовали раствор TMB («Биосервис», Россия), реакцию останавливали добавлением 1 N H₂SO₄. Поглощение при длине волны 450 нм измеряли на мультипланшетном ридере с LVF монохроматорами CLARIOstar («BMG Labtech», США).

Оценку активации клеточного иммунитета проводили по уровню синтеза цитокинов спленocyтaми иммунизированных мышей методом мультиплексного иммунологического анализа. При этом использовали панель MILLIPLEX MAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel («Merck-Millipore», США), основанную на измерении уровня 32 регуляторных, про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста (G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, RANTES, TNF- α , VEGF, эотаксин/CCL11). Все анализы проводили в соответствии с протоколом производителя, используя рекомендуемые разведения образцов и концентрации стандартной кривой. Измерения проводили на приборе MAGPIX с программным обеспечением xPONENT версии 4.2 («Luminex Corp.», США).

Спленocyтaы (макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты) выделяли из селезёнки мышей через 2 недели после первого эксперимента по иммунизации. Эвтаназированных мышей обмывали 96%-ным спиртом, после чего в асептических условиях проводили вскрытие брюшной полости, извлекали селезёнку и помещали их в стерильную холодную среду DMEM («ПанЭко», Россия). Для выделения культуры спленocyтaов использовали набор для разрушения тканей Tissue Grinder Homogenizer Kit («Sigma», США). Стерилизацию инструментов проводили путём промывания в 96%-ном спирте и прожигания в пламени спиртовки. Стерильно собирали инструмент для разрушения тканей, использовали сетки 100 mesh и 200 mesh («Sigma»). Селезёнку нарезали на фрагменты и протирали через сито в 9-см чашки Петри с ледяной средой DMEM, после чего суспензию переносили в стерильные центрифужные пробирки объёмом 15 мл. Суспензию центрифугировали при 200 g 15 мин, после чего супернатант удаляли. Клеточный осадок ресуспендировали в буфере для лизиса эритроцитов (150 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 1 mM EDTA,

pH 7,0–7,6) и инкубировали 40 с в темноте во льду, после чего разбавляли ледяной средой DMEM и центрифугировали при 200 g 15 мин. Супернатант полностью удаляли, а белый клеточный осадок ресуспендировали в полной ростовой культуральной среде RPMI-1640, включающей 10% FBS («HyClone»), 2 mM L-глутамина («ПанЭко»), антибиотик-антимикотик («Sigma»), 0,05 mM 2-меркаптоэтанола («Sigma»), среду RPMI-1640 без глутаминa («ПанЭко»). Затем проводили подсчёт клеток в суспензии с помощью камеры Горяева. Клеточную суспензию разводили до концентрации 5 × 10⁶–10⁷ кл./мл и вносили по 100 мкл в каждую лунку планшета. Клетки инкубировали в течение 1–1,5 ч в CO₂-инкубаторе, после чего вносили разведения антигенов и контролей. Планшет инкубировали в течение 18–24 ч в CO₂-инкубаторе, после чего переносили культуральную среду в микропробирки, замораживали при –80 °C и хранили до проведения анализа.

Анализ спленocyтaов, полученных после первого эксперимента по иммунизации (белки 5–11 в табл. 1 с адьювантом 1), проводили одновременно с анализом спленocyтaов, выделенных ранее после иммунизации белками 1–4 из табл. 1 с адьювантом 1 [7] (планшеты хранили при –80 °C до проведения анализа).

Реакция микронеutralизации. Для обнаружения нейтрализующих антител использовали реакцию микронеutralизации на основе TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose) [8]. Сыворотки мышей, полученные после трёхкратной иммунизации с двухнедельными интервалами, прогревали 60 мин при 56 °C, чтобы избежать связанного с компонентом снижения вирусной активности. Затем готовили серию двукратных разведений сыворотки на среде MEM с добавлением 2% HI-FBS в объёме 60 мкл, начиная с 1 : 10 (в пересчёте на цельную сыворотку). Каждое разведение сыворотки смешивали в равном объёме (60 мкл) с живым вирусом SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 EPI_ISL_415710 GISAID), содержащим 25 TCID₅₀/50 мкл, и инкубировали 1 ч при 37 °C. Затем 100 мкл разведений переносили в 96-луночные планшеты с монослоем клеток Vero (ATCC CCL-81). Планшеты инкубировали при 37 °C в атмосфере 5% CO₂ в течение 4 сут., после чего проверяли на наличие ЦПД (цитопатическое действие). Нейтрализацию регистрировали, если 100% клеток в лунке сохранялись без видимых бляшек или цитопатического эффекта. Нейтрализующий титр сыворотки выражали как значение, обратное самому высокому разведению сыворотки, в котором была показана нейтрализующая активность [9].

Эксперименты с использованием реакции микронейтрализации проводили дважды. В первой реакции микронейтрализации анализировали сыворотки, полученные в данной работе и ранее [7], после иммунизации белками Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD, Rop-D3-Rop-ALD-HBD, Rop-D4-Rop-Tri-HBD, Rop-D4-Rop-ALD-HBD и Rop-D13-Rop-Tri-HBD с адьювантом 1, во второй реакции – сыворотки, полученные после иммунизации теми же белками, а также белками Rop-RBM-Rop-Tri-HBD и RBD («Mount Sinai») с адьювантом 2. Все эксперименты проводили в лаборатории BSL3.

Статистический анализ. Статистический анализ проводили с использованием программ пакета Statistica 12.0 («Statsoft», США). Нормальность распределения проверяли с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Данные представляли как среднее \pm стандартное отклонение (SD) или как среднее геометрическое \pm стандартное геометрическое отклонение логарифма по основанию 2 титра сывороток антител. Статистическую значимость различий оценивали с помощью двухстороннего дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с апостериорным анализом по Тьюки. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дизайн рекомбинантных белков. На основе анализа структур Spike-белка коронавируса SARS-CoV-2 в комплексе с ACE-2 и нейтрализующими антителами в дополнение к ранее выбранным двум эпитопам Spike-белка вируса SARS-CoV-2 – D2 (470–490 а.о.) и D3 (453–494 а.о.) [7] – было выбрано ещё четыре поверхностных эпитопа: D4 (496–507 а.о.), D6 (144–153 а.о.), D8 (337–346 а.о.), D13 (414–425 а.о.) (рис. 1). Все детерминанты, за исключением D8, имеющей α -спиральную конформацию, имеют петлеобразную конформацию со сближенными N- и C-концами. Рекомбинантные белки, несущие эпитопы D4, D6, D8 и D13, организованы аналогично ранее полученным белкам с эпитопами D2 и D3 [7]. Для дополнительной фиксации N- и C-концов эпитопов и обеспечения их конформационной стабильности аминокислотная последовательность всех эпитопов фланкирована взаимодействующими между собой α -спиральными Rop-подобного белка из *M. capsulatus*. При этом петлеобразные детерминанты вставлены в поворот между спиральными непосредственно, а в случае эпитопа D8 – между эпитопом и α -спиральными Rop-

подобного белка введены гибкие глицин-содержащие спейсеры. В качестве доменов, обеспечивающих мультимеризацию (в данном случае – тримеризацию) эпитопов, выбраны либо α -спираль, участвующая в тримеризации Spike-белка SARS-CoV-2 (Tri), либо альдолаза из *T. maritima* (ALD). Кроме того, в состав гибридных белков включен фрагмент гемагглютини-на НВНА из *M. tuberculosis*, соответствующий гепарин-связывающему домену (HBD).

Молекулярные массы мономерных белков находятся в пределах 17–19 кДа для белков на основе тримеризатора из коронавируса и 35–39 кДа – для белков на основе альдолазы, что с учётом тримеризации должно быть достаточно для эффективной выработки антител.

В качестве одного из контрольных белков для исследования вируснейтрализующей активности сывороток на основе тех же белковых компонентов был сконструирован гибридный белок Rop-RBM-Rop-Tri-HBD, в котором в поворот между двумя спиральными Rop-подобного белка был вставлен фрагмент Spike-белка SARS-CoV-2 с 433 по 511 а.о., включающий последовательности детерминант D2, D3 и D4.

Получение и очистка рекомбинантных белков. Клонирование генов рекомбинантных белков проводили на основе ранее полученных конструкций [7], как описано в разделе «Материалы и методы». Все генно-инженерные конструкции обеспечивали высокий уровень экспрессии генов, за исключением гена белка Rop-D6-Rop-ALD-HBD, который по этой причине не использовали в работе. Белки на основе тримеризационного домена из коронавируса нарабатывались в виде телец включений, а белки на основе альдолазы синтезировались в растворимой форме. Соответственно, схемы выделения этих белков различались: белки с тримеризатором из SARS-CoV-2 выделяли в денатурирующих условиях в присутствии мочевины, а белки с альдолазой – в неденатурирующих условиях. При этом на первой стадии очистки для всех белков использовали хроматографию на сорбенте WorkBeads 40S, на второй – на гепарин-сефарозе, что обеспечивалось присутствием гепарин-связывающего домена в белках.

Молекулярные массы, вычисленные на основании аминокислотных последовательностей, и теоретические значения некоторых параметров рекомбинантных белков представлены в табл. 1 (в табл. 1 включены также данные для ранее полученных белков с эпитопами D2 и D3 [7] для удобства сравнения).

Электрофоретическое разделение очищенных белков показано на рис. 2. Различная

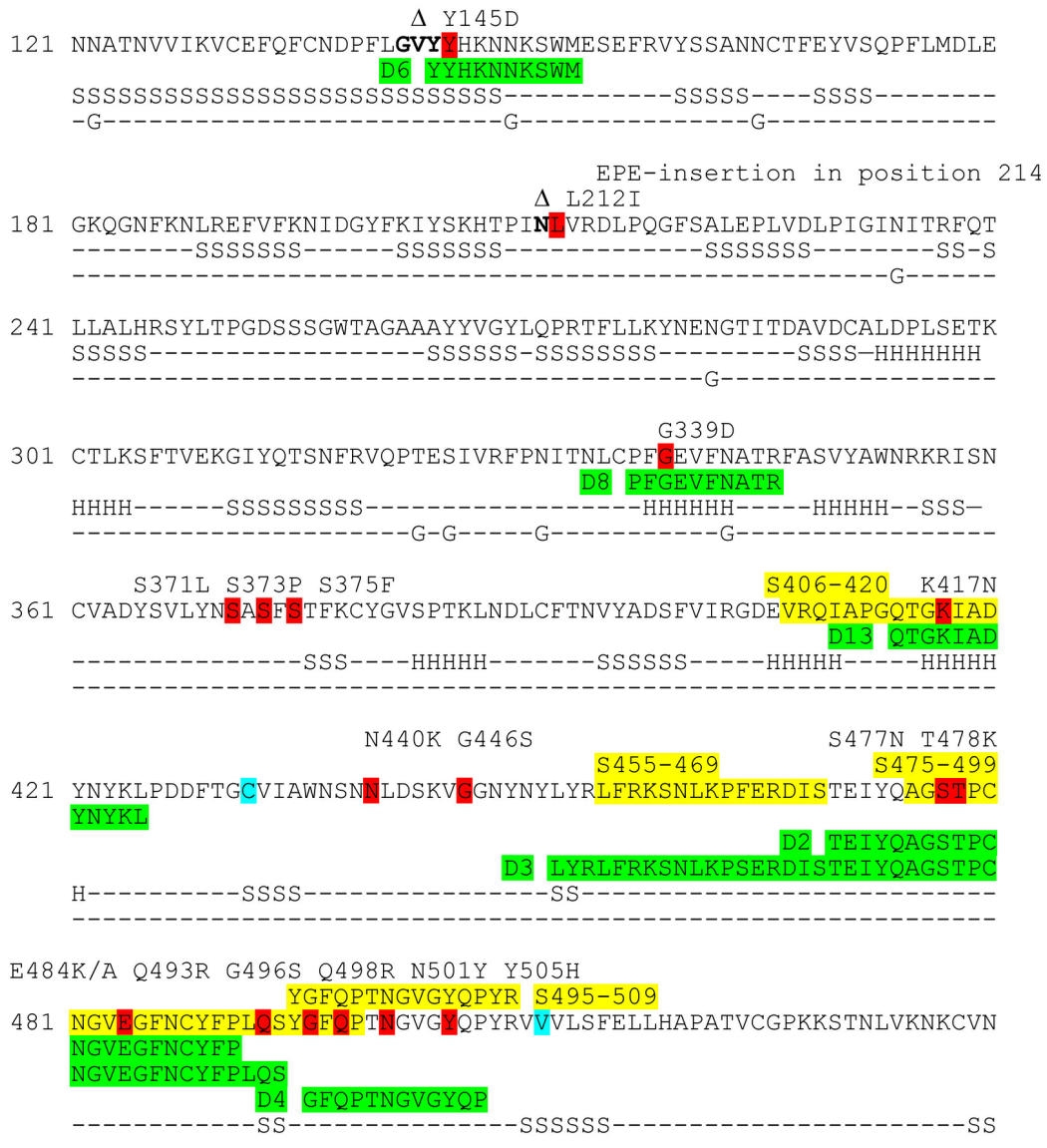


Рис. 1. Участок последовательности Spike-белка вируса SARS-CoV-2 и последовательности эпитопов, используемые в работе (выделены зелёным цветом). Жёлтым цветом выделены а.о., входящие в линейные эпитопы S406–420, S455–469, S475–499 и S495–509 (из статьи Lu et al. [5]), последовательности которых перекрываются с последовательностями исследуемых конформационных эпитопов. Красным цветом выделены вариабельные а.о. в различных вариантах SARS-CoV-2. Полуужирным шрифтом и значком Δ выделены а.о., делетированные в Spike-белке варианта SARS-CoV-2 Омикрон (B.1.1.529). Бирюзовым цветом выделены начальный и концевой а.о. фрагмента, входящего в состав конструкции Ror-RBM-Ror-Tri-HBD. Элементы вторичной структуры (α-спиральные участки (H), β-тяжи (S)) и сайты гликозилирования (G) отмечены в строках ниже аминокислотной последовательности напротив соответствующих остатков в соответствии с данными из комплекса Spike-белка SARS-CoV-2 с нейтрализующим антителом (цепь A, PDB: 7C2L)

электрофоретическая подвижность белков с эпитопами D2 и D3, содержащими в аминокислотных последовательностях по два цистеина, в присутствии и при отсутствии восстанавливающего агента дитиотреитола (ДТТ), свидетельствует о том, что очищенные белки формируют дисульфидную связь. Наличие дисульфидной связи в белке, содержащем последовательность с детерминантами D2/D3, показано ранее масс-

спектрометрическим анализом триптических пептидов [7].

Иммуногенные композиции, иммунизация мышей. На основе семи рекомбинантных белков с петлеобразными эпитопами (их характеристика приведена в строках 5–11 табл. 1) и адьюванта 1 были получены композиции для иммунизации мышей инбредной линии BALB/C. Наличие специфических иммуноглобулинов класса G

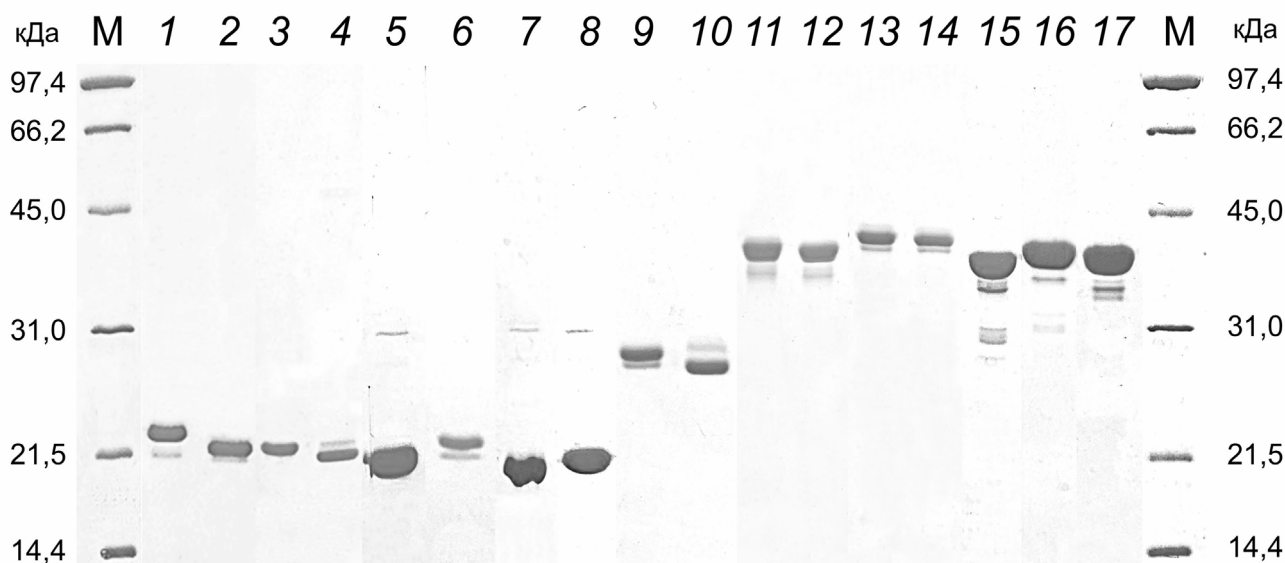


Рис. 2. Электрофореграммы разделения препаратов рекомбинантных белков в 12%-ном ПААГ. М – маркер молекулярной массы 14,4–97,4 кДа («Bio-Rad», США); 1 – белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD в присутствии ДТТ; 2 – белок Rop-D2-Rop-Tri-HBD без ДТТ; 3 – белок Rop-D3-Rop-Tri-HBD в присутствии ДТТ; 4 – белок Rop-D3-Rop-Tri-HBD без ДТТ; 5 – белок Rop-D4-Rop-Tri-HBD; 6 – белок Rop-D8-Rop-Tri-HBD; 7 – белок Rop-D6-Rop-Tri-HBD; 8 – белок Rop-D13-Rop-Tri-HBD; 9 – белок Rop-RBM-Rop-Tri-HBD в присутствии ДТТ; 10 – белок Rop-RBM-Rop-Tri-HBD без ДТТ; 11 – белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD в присутствии ДТТ; 12 – белок Rop-D2-Rop-ALD-HBD без ДТТ; 13 – белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD в присутствии ДТТ; 14 – белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD без ДТТ; 15 – белок Rop-D4-Rop-ALD-HBD; 16 – белок Rop-D8-Rop-ALD-HBD; 17 – белок Rop-D13-Rop-ALD-HBD

(IgG) в образцах сывороток мышей определяли через 2 недели после трёхкратной иммунизации с интервалом в 2 недели. 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 анализа, а также ранее полученные данные для белков, содержащих эпитопы D2 и D3, представлены в табл. 2. Все гибридные белки вызывали у мышей образование антител класса IgG, в высоком титре взаимодействующих с использованным для иммунизации антигеном. Белки, содержащие детерминанты D2 и D3, как было показано ранее [7], с достаточно высоким титром взаимодействовали также и с инактивированным вирусом, и с RBD. Также с RBD взаимодействовал белок Rop-D13-Rop-Tri-HBD. Наиболее иммуногенными являются все белки с альдозазным доменом и белки Rop-D13-Rop-Tri-HBD и Rop-D4-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-Rop-ALD-HBD.

Исследование клеточного иммунитета. Исследование активации клеточного иммунитета про-

водили, измеряя уровень синтеза цитокинов спленоцитами иммунизированных мышей. При этом спленоциты (макрофаги, дендритные клетки, Т- и В-лимфоциты), выделенные из селезёнок мышей через 2 недели после трёхкратной (с двухнедельными перерывами) иммунизации с адьювантом 1, подвергали суточному воздействию теми же антигенами, после чего измеряли степень их ответа на стимуляцию путём определения уровней цитокинов, хемокинов и факторов роста в среде, где проходил этот процесс. Панель, используемая для оценки иммунного ответа, основана на измерении уровня 32 регуляторных, про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов и факторов роста. Результаты эксперимента представлены на рис. 3. Максимально выраженный уровень повышения цитокинов наблюдался в случае ответа на белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD, несколько менее выраженный – в случае белков Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD, Rop-D4-Rop-Tri-HBD, Rop-D4-Rop-ALD-HBD и Rop-D13-Rop-Tri-HBD.

Максимальный ответ на белок Rop-D3-Rop-ALD-HBD (рис. 3) совпадает с максимальным титром антител, специфичных к RBD Spike-белка SARS-CoV-2, характерным для данного белка (табл. 2).

Таким образом, максимально выраженный клеточный ответ вызывали гибридные белки Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD, Rop-D3-Rop-ALD-HBD, Rop-D4-Rop-Tri-HBD, Rop-D4-Rop-ALD-HBD и Rop-D13-Rop-Tri-HBD. Далее интересно было выяснить, обладают ли антитела, образующиеся у мышей после иммунизации этими белками, вируснейтрализующей активностью.

Реакция микронеutralизации. Для обнаружения нейтрализующих антител проводили реакцию микронеutralизации на основе TCID₅₀ с сыворотками иммунизированных мышей.

В первой реакции микронеutralизации анализировали сыворотки мышей, полученные после первого эксперимента по иммунизации (трёхкратная иммунизация с двухнедельными интервалами с адьювантом 1), а также сыворотки, полученные ранее при иммунизации белками с эпитопами D2 и D3 и адьювантом 1 [7]. Ни одна из сывороток в условиях реакции микронеutralизации (см. «Материалы и методы») не оказалась способной нейтрализовать вирус SARS-CoV-2.

Во второй реакции микронеutralизации анализировали сыворотки, полученные после

второго эксперимента по иммунизации (трёхкратная иммунизация через 2 недели, но с использованием адьюванта 2). Помимо отобранных рекомбинантных белков, содержащих исследуемые эпитопы, для иммунизации также использовали ранее выделенные рекомбинантные белки с эпитопами D2 и D3 [7], полученный в данной работе белок Rop-RBM-Rop-Tri-HBD и коммерческий препарат RBD («Mount Sinai»). Данные по реакции микронеutralизации приведены в табл. 2. В результате модификации адьюванта в случае ряда разведений сывороток было показано отсутствие цитопатического действия на клетки живого вируса SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/St Petersburg-3524/2020 EPI_ISL_415710 GISAID), это свидетельствует о том, что в ответ на иммунизацию гибридными белками, содержащими небольшие антигенные детерминанты Spike-белка SARS-CoV-2, образуются специфические антитела, способные нейтрализовать клинический изолят вируса. Максимальные значения среднего геометрического титра (СГТ) продемонстрировали сыворотки, полученные при иммунизации белками Rop-D13-Rop-Tri-HBD (6,7), Rop-D2-Rop-Tri-HBD (7,4), Rop-D4-Rop-Tri-HBD (8,2). Сыворотки, полученные при иммунизации контроль-

Таблица 2. Титры сывороточных антител, определённых методом иммуноферментного анализа к различным антигенам в сыворотках мышей после трёхкратной иммунизации, а также в экспериментах по вируснейтрализации

Группа мышей	Белок	Антиген, использованный при иммунизации	Инактивированный формалином SARS-CoV-2	RBD	СГТ в реакции микронеutralизации (разброс значений)
1	физиологический раствор	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	5,0
2	Rop-D2-Rop-Tri-HBD	14,21 ± 1,04	8,64 ± 1,00	10,73 ± 1,12	7,4 (5; 10)
3	Rop-D3-Rop-Tri-HBD	13,48 ± 1,19	9,67 ± 1,18	11,44 ± 1,19	5,0
4	Rop-D4-Rop-Tri-HBD	> 15,64 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	8,2 (5; 20)
5	Rop-D6-Rop-Tri-HBD	10,57 ± 1,40	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	—
6	Rop-D8-Rop-Tri-HBD	8,64 ± 1,32	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	—
7	Rop-D13-Rop-Tri-HBD	> 15,64 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	10,12 ± 1,16	6,7 (5; 10)
8	Rop-D2-Rop-ALD-HBD	> 15,64 ± 1,00	9,88 ± 1,12	11,36 ± 1,17	5,5 (5; 10)
9	Rop-D3-Rop-ALD-HBD	> 15,64 ± 1,00	9,75 ± 1,10	12,61 ± 1,08	5,5 (5; 10)
10	Rop-D4-Rop-ALD-HBD	> 5,64 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	5,5 (5; 10)
11	Rop-D8-Rop-ALD-HBD	> 15,64 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	—
12	Rop-D13-Rop-ALD-HBD	> 15,64 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	< 7,0 ± 1,00	—
13	Rop-RBM-Rop-Tri-HBD	—	—	—	11,0 (5; 20)
14	RBD	—	—	—	44,2 (20; 320)

Примечание. Данные по ИФА представлены в виде среднего геометрического титра для группы (\log_2) ± стандартное геометрическое отклонение, данные по вируснейтрализации — в виде среднего геометрического титра и разброса значений титров сывороток; данные по ИФА для белков Rop-D2-Rop-Tri-HBD, Rop-D3-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-ALD-HBD и Rop-D3-Rop-ALD-HBD получены ранее [7] и приведены для удобства сравнения. Прочерк означает, что данный белок в соответствующем эксперименте не использовали. СГТ — средний геометрический титр.

Цитокин/ хемокин/ фактор роста	Rop-D2-Rop-Tri-HBD	Rop-D3-Rop-Tri-HBD	Rop-D2-Rop-ALD-HBD	Rop-D3-Rop-ALD-HBD	Rop-D4-Rop-Tri-HBD	Rop-D8-Rop-Tri-HBD	Rop-D4-Rop-ALD-HBD	Rop-D8-Rop-ALD-HBD	Rop-D13-Rop-ALD-HBD	Rop-D13-Rop-Tri-HBD
G-CSF	0,9	0,6	0,9	2,1	0,6	0,4	0,3	0,1	0,1	0,3
Эотаксин	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
GM-CSF	2,0	0,6	1,2	12,9	1,1	0,3	0,4	0,3	0,3	2,1
IFN- γ	3,8*	0,1	0,6	26,0*	0,2	0,0	0,1	0,0	0,0	0,2
IL-1 α	1,3	1,0	1,1	2,3	1,0	0,4	0,7	0,5	0,4	1,0
IL-1 β	1,8*	0,8	1,5	3,6	0,9	0,6	0,6	0,4	0,4	1,5
IL-2	3,8*	2,7	3,2*	9,1*	9,9*	0,9	4,2*	0,7	1,9	10,6*
IL-4	5,7*	0,0	4,6*	7,4*	6,6*	0,0	2,9*	0,0	2,3*	6,1*
IL-3	3,2*	0,0	1,4	6,4*	9,1*	0,9	2,8	0,0	2,0	6,3
IL-5	0,0	0,0	8,1*	18,0*	11,4*	0,0	0,0	0,0	0,0	7,6
IL-6	2,1*	1,1	1,5	6,5*	1,6	0,3	0,6	0,3	0,3	1,1
IL-7	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0
IL-9	1,0	1,3	1,3	2,3*	1,3	0,4	1,3	1,6	1,0	1,0
IL-10	2,9*	1,6*	3,2*	7,6*	4,1*	1,0	2,8*	1,3	1,2	0,8
IL-12 (p40)	2,0	0,0	2,0	3,6*	2,0	0,0	2,8	2,0	0,0	2,0
IL-12 (p70)	6,2	6,2	11,7*	26,7*	11,7*	0,0	0,0	6,2*	0,0	0,0
LIF	1,4	1,0	1,2	9,9*	3,1*	0,0	2,8	1,7	0,6	2,1
IL-13	1,4	0,8	1,0	3,4	1,0	0,0	1,0	0,5	0,0	1,0
LIX	0,8	0,0	1,5	12,8*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IL-15	3,2	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
IL-17	2,6*	0,8	1,2	22,7*	2,5	0,6	0,6	0,2	0,2	3,8
IP-10	3,2*	0,3	2,2	7,0	0,8	0,2	0,4	0,1	0,1	0,3
KC	0,4	0,2	0,3	0,6	0,2	0,2	0,1	0,1	0,1	0,1
MCP-1	1,5*	1,5*	3,7*	3,9*	2,4*	1,0	1,7*	1,4	1,0	1,4
MIP-1 α	1,4	0,6	0,7	2,9	0,8	0,4	0,3	0,1	0,1	0,7
MIP-1 β	1,7*	0,9	1,2	2,7*	1,3	0,7	0,7	0,2	0,4	1,3
M-CSF	0,8	0,6	0,8	1,6	0,8	0,6	0,8	0,8	0,6	0,8
MIP-2	2,1*	1,4	2,1	2,3*	0,8	0,6	0,6	0,3	0,3	0,6
MIG	1,3	0,4	1,4	2,0	0,5	0,2	0,4	0,4	0,4	0,7
RANTES	1,8*	1,1	1,2	3,3*	1,0	0,6	0,6	0,4	0,6	0,5
VEGF	2,1*	2,0*	3,3*	3,9*	2,2*	1,2	1,8*	1,6	1,4*	1,4*
TNF- α	8,1*	3,7*	2,7*	2,8*	2,1*	1,3	1,4	0,8	0,7	0,7

Кратность выделена:

0–1	1–2	2–3	3–10	>10
-----	-----	-----	------	-----

Рис. 3. Кратные различия в медианных уровнях цитокинов/хемокинов/факторов роста у мышей, иммунизированных различными антигенами, по сравнению с контрольной группой. * Статистически значимые отличия от контрольной группы ($p < 0,05$) по критерию Тьюки

ным белком Rop-RBM-Rop-Tri-HBD и рекомбинантным RBD («Mount Sinai»), показали СГТ на уровне 11,0 и 44,2 (табл. 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данной работе мы существенно расширили список исследуемых поверхностных эпитопов Spike-белка SARS-CoV-2: к исследованным ранее эпитопам D2 (470–490 а.о.) и D3 (453–494 а.о.) [7] добавилось ещё четыре эпитопа: D4 (496–507 а.о.), D6 (144–153 а.о.), D8 (337–346 а.о.) и D13 (414–425 а.о.) (рис. 1).

Важным обстоятельством при выборе эпитопов было то, что их последовательности должны включать а.о. Spike-белка, взаимодействующие с ACE2 и вируснейтрализующими антителами. В связывании RBD с рецептором ACE2 участвуют а.о. в следующих положениях: 417, 446, 449, 453, 455, 456, 475, 486, 487, 489, 493, 496, 498, 500, 504, 502 и 505 [10]. Большинство этих а.о. входит в состав выбранных эпитопов D2, D3, D4, D8 и D13. Ряд описанных в литературе нейтрализующих антител связывается с эпитопами в RBD, перекрывающимися с эпитопами, анализируемыми в наших работах: P2B-2F6 [11], BD23 [12], COVA2-39 [13], REGN10933 и REGN10987 [14], LY-CoV555 [15].

N-концевой домен S1-субъединицы Spike-белка (NTD) ограничен 20–286 а.о. Выделено несколько нейтрализующих антител, связывающихся с эпитопами в этом участке: 4A8 [16], COV2-2676 и COV2-2489 [17], S2L28, S2M28 и S2X333 [18]. Так что создание конструкций с эпитопами, соответствующими районам NTD (D6), также представляется перспективным.

Все эпитопы, за исключением D8, представляющего собой α -спираль, в структуре Spike-белка SARS-CoV-2 имеют петлеобразную конформацию со сближенными *N*- и *C*-концами. Конформацию выбранных эпитопов фиксировали с помощью встраивания в место поворота между двумя взаимодействующими друг с другом α -спиралями Rop-подобного белка из *M. capsulatus*. К такой конструкции на *C*-конец присоединяли тримеризующий модуль, представляющий собой либо альдолазу из *T. maritima*, либо тримеризующую α -спираль из Spike-белка SARS-CoV-2. На *C*-конец конструкции с тримеризующим модулем помещали фрагмент гемагглютинаина из *M. tuberculosis* для облегчения очистки гибридных белков с помощью хроматографии на гепарин-сефарозе.

Интересно отметить, что, несмотря на то что абсолютно все полученные гибридные белки вызывали у мышей образование антител клас-

са IgG, в высоком титре взаимодействующих с использованным для иммунизации антигеном, лишь белки, содержащие эпитопы D2 и D3, в достаточно высоком титре взаимодействовали также и с инактивированным вирусом. С RBD Spike-белка SARS-CoV-2, синтезированным в клетках прокариот, помимо белков с D2 и D3, взаимодействовал также белок Rop-D13-Rop-Tri-HBD. Те же белки, а также белки Rop-D4-Rop-ALD-HBD и Rop-D4-Rop-Tri-HBD вызывали максимально выраженное повышение уровня цитокинов в исследовании активации клеточного иммунитета. При рассмотрении профиля повышенных в результате стимуляции спленоцитов антигеном Rop-D3-Rop-ALD-HBD (и в меньшей степени другими белками) уровней цитокинов наблюдается развитие реакций врождённого иммунного ответа с потенциальной дифференцировкой В-клеток. Также можно отметить вовлечение самых ранних признаков развития и других звеньев адаптивного иммунного ответа на антиген, причём отмечается присутствие признаков дифференцировки Т-клеток в Th1 (IFN- γ), а также присутствие компонентов Th2 и Th17 (IL-4, IL-5 и IL-17). Наличие регуляторных цитокинов – стимулирующих (IL-1 и IL-12) и супрессирующих (IL-10) молекул – характеризует полноценность вызванного антигенами иммунного ответа. Тем не менее, несмотря на выраженный иммунный ответ, исследование вируснейтрализующей активности сывороток, полученных при иммунизации мышей с адьювантом 1, в реакции микро-нейтрализации показало отрицательный результат.

Известно, что выбор оптимального адьюванта может иметь решающее значение для формирования иммунного ответа с образованием протективных антител при формулировании вакцины для определённого патогена [19]. Имеются данные о том, что агонисты Toll-подобных рецепторов (TLR) могут функционировать в качестве компонентов адьюванта для повышения эффективности инактивированной ультрафиолетом вакцины против SARS-CoV [20] или вакцинной композиции на основе рекомбинантного белка, содержащего эктодомен Spike-белка SARS-CoV [6]. При этом иммунизация мышей эктодоменом Spike-белка SARS-CoV с наночастицами из золота в качестве адьюванта не приводила к получению протективных антител [6]. Учитывая вышесказанное, мы модифицировали адьювант для иммунизации – ввели в него вместо монтанида ISA 201 и ретинола пальмитата агонисты TLR – LPS из *E. coli* O55:B5 и CpG-олигодезоксинуклеотиды (ODN 1826). ДЭАЭ-декстран 500, являющийся компонентом обоих

адьювантов, в случае второго варианта адьюванта способствует также удержанию в месте введения (депонированию) CpG-олигонуклеотидов. При иммунизации мышей гибридными белками со вторым вариантом адьюванта удалось получить сыворотки, некоторые из которых продемонстрировали значимый уровень нейтрализации клинического изолята вируса SARS-CoV-2 в реакции микронейтрализации (табл. 2). При этом наиболее выраженную нейтрализующую активность продемонстрировали сыворотки, полученные при иммунизации гибридными белками Rop-D13-Rop-Tri-HBD, Rop-D2-Rop-Tri-HBD и Rop-D4-Rop-Tri-HBD. Интересно отметить, что все гибридные белки, вызывающие образование нейтрализующих антител, получены с использованием сравнительно небольшого тримеризационного домена из Spike-белка коронавируса, а не достаточно крупного альдолазного домена, что позволяет отдать предпочтение менее высокомолекулярным белковым носителям, смещающим соотношение в сторону преобладания антигенной части белка. Возможно, положительную роль также играет то, что используемый тримеризационный домен происходит из Spike-белка.

Гибридные белки, приводящие к максимальному выраженному иммунному ответу с образованием нейтрализующих антител, содержат короткие петлеобразные эпитопы D2 и D4, расположенные в пределах RBM, или в области RBD, предшествующей RBM (D13). Эти эпитопы в значительной степени перекрываются с линейными эпитопами S406–420, S475–499 и S495–509 из статьи Lu et al. [5] (рис. 1). По данным, представленным в этой статье, все эти линейные эпитопы являются вируснейтрализующими в отношении варианта G614 вируса SARS-CoV-2 [5]. Это хорошо соответствует нашим результатам по вируснейтрализации клинического изолята вируса hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 EPI_ISL_415710 GISAID, также несущего замену D614G. При этом максимальную способность к образованию нейтрализующих антител, приближающуюся по значению СГТ к белку с целым RBM, продемонстрировал белок, несущий короткий петлеобразный эпитоп D4.

Все выбранные нами эпитопы несут а.о., мутировавшие в Spike-белке варианта SARS-CoV-2 Омикрон (B.1.1.529), вызвавшего максимальную волну заболеваемости COVID-19 по сравнению с предыдущими [21]. При этом наибольшее количество переменных а.о. сосредоточено именно в области эпитопов, демонстрирующих максимальный уровень вируснейтрализации по нашим данным (рис. 1). Это неудиви-

тельно, поскольку все выбранные нами детерминанты расположены на поверхности Spike-белка, а тот участок RBD, в пределах которого расположены вируснейтрализующие эпитопы, непосредственно вовлечён во взаимодействие с ACE2. Высокая «кучность» переменных участков в области нейтрализующих эпитопов позволит на основе уже имеющихся конструкций быстро получать измененные варианты последовательностей и корректировать нейтрализующий ответ, направленный на соответствующий мутантный вариант коронавируса. Возможно, имеет смысл расширить границы эпитопов и использовать для разработки эпитопной вакцины весь участок RBM, несущий максимальное число переменных а.о. Это оправдано, поскольку в области RBM отсутствуют сайты гликозилирования, рекомбинантный белок с RBM эффективно нарабатывается в *E. coli*, демонстрирует высокую степень очистки, подвергается правильному рефолдингу с образованием дисульфидной связи и имеет максимальный уровень СГТ в реакции микронейтрализации из всех гибридных белков, полученных микробиологическим синтезом.

Следует отметить, что, несмотря на положительный результат, показанный в реакции микронейтрализации, демонстрирующий принципиальную возможность образования измеримых количеств нейтрализующих антител при иммунизации рекомбинантными белками с небольшими петлеобразными эпитопами RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2, полученные значения СГТ сывороток невелики по сравнению с полноразмерным RBD, синтезированным в клетках эукариот. Это определяет необходимость дальнейшей работы по созданию эпитопных вакцин для профилактики коронавирусной инфекции, которая возможна по следующим направлениям: 1) поиск новых перспективных вируснейтрализующих эпитопов в составе белков SARS-CoV-2, например, на основе использования экспериментальных данных по характеристике линейных эпитопов, хорошо коррелирующих с данными по конформационным эпитопам; 2) комбинированное использование нескольких гибридных белков для иммунизации с варьированием дозы антигенов; 3) укрупнение петлеобразных эпитопов, одним из которых может быть RBM; 4) оптимизация платформы для мультимеризации эпитопов.

Поскольку одним из наиболее значимых результатов работы является подбор адьюванта, способствующего формированию вируснейтрализующих антител даже при использовании в качестве антигенов рекомбинантных белков с очень короткими участками последовательности

ти Spike-белка вируса SARS-CoV-2, было бы интересно охарактеризовать иммуногенность белков, вызывающих образование нейтрализующих антител, способность получаемых при иммунизации ими сывороток связываться с RBD Spike-белка SARS-CoV-2 и инактивированным вирусом, а также оценить влияние иммунизации этими белками на клеточный иммунитет, чтобы иметь возможность предсказывать нейтрализующую активность белков на основании более простых экспериментов без использования живого вируса. Это также может быть одним из направлений дальнейших исследований.

Таким образом, в результате проведённой работы получены гибридные рекомбинантные белки, включающие небольшие петлеобразные конформационные эпитопы из RBD и N-концевого домена Spike-белка вируса SARS-CoV-2. Показана высокая иммуногенность полученных белков. Для ряда белков, содержащих эпитопы из RBD Spike-белка вируса SARS-CoV-2, продемонстрирована способность сывороток, полученных при иммунизации данными белками, в высоком титре связываться с RBD, синтезированным в клетках эукариот, и с инактивированным вирусом SARS-CoV-2. Исследована активация

клеточного иммунитета при иммунизации рекомбинантными белками по уровню синтеза цитокинов спленоцитами иммунизированных мышей. После модификации адьюванта, заключающейся во введении в него агонистов TLR – LPS и CpG-олигонуклеотидов – для ряда белков показана нейтрализующая активность сывороток в реакции микронеutralизации в отношении живого вируса SARS-CoV-2.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-60373\20). Получение белка Rop-RBM-Rop-Tri-NBD и исследование его способности вызывать образование вируснейтрализующих антител было проведено в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 056-00119-21-00 («Разработка препарата блокатора рецептора ACE2 для профилактики и терапии коронавирусной инфекции»).

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.

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 sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus, *Nat. Immunol.*, **17**, 1102-1108, doi: 10.1038/ni.3515.
- 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.
- Sekimukai, H., Iwata-Yoshikawa, N., Fukushi, S., Tani, H., Kataoka, M., et al. (2020) Gold nanoparticle-adjuvanted S protein induces a strong antigen-specific IgG response against severe acute respiratory syndrome-related coronavirus infection, but fails to induce protective antibodies and limit eosinophilic infiltration in lungs, *Microbiol. Immunol.*, **64**, 33-51, doi: 10.1111/1348-0421.12754.
- Karyagina, A. S., Gromov, A. V., Grunina, A. M., Lyaschuk, A. M., Grishin, A. V., et al. (2021) Development of a platform for producing recombinant protein components of epitope vaccines for the prevention of COVID-19, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1275-1287, doi: 10.1134/S0006297921100096.
- Manenti, A., Maggetti, M., Casa, E., Martinuzzi, D., Torelli, A., et al. (2020) Evaluation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies using a CPE-based colorimetric live virus micro-neutralization assay in human serum samples, *J. Med. Virol.*, **92**, 2096-2104, doi: 10.1002/jmv.25986.
- Barchuk, A., Shirokov, D., Sergeeva, M., Tursun Zade, R., Dudkina, O., et al. (2021) Evaluation of the performance of SARS-CoV-2 antibody assays for a longitudinal population-based study of COVID-19 spread in St. Petersburg, Russia, *J. Med. Virol.*, **93**, 5846-5852, doi: 10.1002/jmv.27126.
- Lan, J., Ge, J., Yu, J., Shan, S., Zhou, H., et al. (2020) Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor, *Nature*, **581**, 215-220, doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
- Ju, B., Zhang, Q., Ge, J., Wang, R., Sun, J., et al. (2020) Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection, *Nature*, **584**, 115-119, doi: 10.1038/s41586-020-2380-z.
- Cao, Y., Su, B., Guo, X., Sun, W., Deng, Y., et al. (2020) Potent neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 identified by high-throughput single-cell sequencing of convalescent patients' B cells, *Cell*, **182**, 73-84.e16, doi: 10.1016/j.cell.2020.05.025.
- Brouwer, P., Caniels, T. G., van der Straten, K., Snitselaar, J. L., Aldon, Y., et al. (2020) Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability, *Science*, **369**, 643-650, doi: 10.1126/science.abc5902.
- Hansen, J., Baum, A., Pascal, K. E., Russo, V., Giordano, S., et al. (2020) Studies in humanized mice and

- convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail, *Science*, **369**, 1010-1014, doi: 10.1126/science.abd0827.
15. Jones, B. E., Brown-Augsburger, P. L., Corbett, K. S., Westendorf, K., Davies, J., et al. (2021) The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates, *Sci. Transl. Med.*, **13**, eabf1906, doi: 10.1126/scitranslmed.abf1906.
 16. Chi, X., Yan, R., Zhang, J., Zhang, G., Zhang, Y., et al. (2020) A neutralizing human antibody binds to the N-terminal domain of the Spike protein of SARS-CoV-2, *Science*, **369**, 650-655, doi: 10.1126/science.abc6952.
 17. Suryadevara, N., Shrihari, S., Gilchuk, P., VanBlargan, L. A., Binshtein, E., et al. (2021) Neutralizing and protective human monoclonal antibodies recognizing the N-terminal domain of the SARS-CoV-2 spike protein, *Cell*, **184**, 2316-2331.e15, doi: 10.1016/j.cell.2021.03.029.
 18. McCallum, M., De Marco, A., Lempp, F. A., Tortorici, M. A., Pinto, D., et al. (2021) N-terminal domain antigenic mapping reveals a site of vulnerability for SARS-CoV-2, *Cell*, **184**, 2332-2347.e16, doi: 10.1016/j.cell.2021.03.028.
 19. Sarkar, I., Garg, R., and van Drunen Littel-van den Hurk, S. (2019) Selection of adjuvants for vaccines targeting specific pathogens, *Expert Rev. Vaccines*, **18**, 505-521, doi: 10.1080/14760584.2019.1604231.
 20. Iwata-Yoshikawa, N., Uda, A., Suzuki, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Sato, Y., et al. (2014) Effects of Toll-like receptor stimulation on eosinophilic infiltration in lungs of BALB/c mice immunized with UV-inactivated severe acute respiratory syndrome-related coronavirus vaccine, *J. Virol.*, **88**, 8597-8614, doi: 10.1128/JVI.00983-14.
 21. He, X., Hong, W., Pan, X., Lu, G., and Wei, X. (2021) SARS-CoV-2 Omicron variant: Characteristics and prevention, *MedComm*, **2**, 838-845, doi: 10.1002/mco2.110.

HYBRID PROTEINS WITH SHORT CONFORMATIONAL EPITOPES OF THE RECEPTOR-BINDING DOMAIN OF THE SARS-CoV-2 SPIKE PROTEIN PROMOTE THE PRODUCTION OF VIRUS-NEUTRALIZING ANTIBODIES DURING IMMUNIZATION

A. S. Karyagina^{1,2,3*}, A. V. Gromov¹, T. M. Grunina^{1,2}, A. M. Lyaschuk¹, M. S. Poponova¹, D. A. Kleymenov¹, N. V. Strukova¹, M. S. Generalova¹, A. V. Ryazanova¹, Z. M. Galushkina¹, O. Yu. Dobrynina¹, T. N. Bolshakova¹, M. V. Sergeeva⁴, E. A. Romanovskaya-Romanko⁴, I. V. Krasilnikov⁵, M. E. Subbotina^{1,2*}, 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; e-mail: 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

Based on the previously proposed approach, hybrid recombinant proteins, potential components of epitope vaccines containing short conformational epitopes of the receptor-binding domain of the Spike protein of the SARS-CoV-2 virus, were obtained by synthesis in *Escherichia coli* cells (144-153, 337-346, 414-425, 496-507 a.a.), which implement a large number of protein-protein interactions in complexes with neutralizing antibodies and ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2). The obtained proteins were used for immunization of mice three times with an interval of 2 weeks, and the immunogenicity of protein antigens and the ability of sera to interact with the inactivated SARS-CoV-2 virus and with the RBD of the Spike protein obtained in a eukaryotic producer were studied. All recombinant proteins showed high immunogenicity. The highest titer upon binding to the RBD of the Spike protein was demonstrated by the serum obtained by immunization with a protein based on epitope 414-425. At the same time, the serum titers upon binding to the inactivated virus and RBD in the case of other proteins turned out to be significantly lower than the titers for the previously obtained four proteins based on loop-like epitopes 452-494 and 470-491, the conformation of which was additionally fixed by a disulfide bond. For all proteins obtained earlier and in this work, we studied the activation of cellular immunity, which was detected by the level of cytokine synthesis by splenocytes of immunized mice. The most pronounced level of increased cytokine synthesis was observed in the case of a response to proteins, including epitopes with disulfide bonds (452-494, 470-491), as well as epitopes 414-425 and 496-507. After optimization of the adjuvant for some recombinant proteins with short conformational epitopes of the RBD of the Spike protein, mouse sera were obtained showing a virus-neutralizing effect in the microneutralization reaction with live virus SARS-CoV-2 (hCoV-19/Russia/StPetersburg-3524/2020 EPI_ISL_415710 GISAID). The results obtained can be used to develop epitope vaccines for the prevention of COVID-19 and other viral infections.

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