

УДК 577.22

ДИМЕРНЫЙ ACE2-FC ЭКВИВАЛЕНТЕН МОНОМЕРНОМУ ACE2 В СУРРОГАТНОМ ТЕСТЕ ВИРУС-НЕЙТРАЛИЗУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ АНТИТЕЛ

© 2023 Д.Э. Колесов, Е.А. Гаямова, Н.А. Орлова, И.И. Воробьев*

ФИЦ Биотехнологии РАН, 119071 Москва, Россия; электронная почта: ritchman@gmail.com

Поступила в редакцию 13.05.2023

После доработки 14.06.2023

Принята к публикации 16.06.2023

Ангиотензин-превращающий фермент 2 (ACE2) является основным клеточным рецептором для опасных сарбековирозов SARS-CoV и SARS-CoV-2. Его рекомбинантный внеклеточный домен используется для мониторинга уровня протективного гуморального иммунного ответа на вирусную инфекцию или вакцину методом суррогатного вирус-нейтрализующего теста (сВНТ). Растворимый ACE2 также рассматривается как вариант антивирусной терапии, потенциально нечувствительной к изменениям шиповидного белка SARS-CoV-2. Для широкого тестирования методом сВНТ необходимо использовать препараты ACE2 или его конъюгатов с постоянными свойствами. Ранее нами была получена клеточная линия – продуцент растворимого мономерного ACE2, и было показано, что такой вариант ACE2 может быть использован в сВНТ, предпочтительно в форме конъюгата с пероксидазой хрена (HRP). Для получения стабильной и универсально применимой формы растворимого ACE2 была получена клеточная линия – продуцент слитного белка ACE2-Fc с высокой продуктивностью, более 150 мг/л целевого белка при культивировании в перемешиваемой колбе. Аффинно очищенный ACE2-Fc представляет собой смесь димерной и тетрамерной форм, но позволяет получать линейные кривые ингибирования антителами комплексообразования с рецептор-связывающим доменом шиповидного белка SARS-CoV-2. Система тестирования сВНТ на основе ACE2-Fc-HRP может быть использована для практического измерения уровней вирус-нейтрализующих антител в отношении различных циркулирующих вариантов вируса SARS-CoV-2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ангиотензин-превращающий фермент 2, SARS-CoV-2, сВНТ, вирус-нейтрализация, протективный иммунитет.

DOI: 10.31857/S0320972523090075, EDN: WTUYAA

ВВЕДЕНИЕ

Ангиотензин-превращающий фермент 2 человека (АПФ2, ACE2, EC 3.4.17.23) – это трансмембранный белок с коротким внутриклеточным доменом, обладающий свойствами цинк-зависимой металлопротеазы и экспрессирующийся на поверхности клеток многих тканей, в том числе и эпителия дыхательных путей. Мембранно-связанная форма ACE2 под действием протеазы ADAM17 (дезинтегрин и металлопротеиназный домен 17) превращается в растворимый ACE2 [1], который активно

расщепляет сосудосуживающий пептид ангиотензин II до сосудорасширяющего пептида ангиотензин 1–7 и быстро покидает кровоток с периодом полувыведения около 3 ч [1]. Мембранно-связанный ACE2 является основным клеточным рецептором для опасных сарбековирозов SARS-CoV (коронавирус, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром) и SARS-CoV-2, а также для альфакоронавируса HCoV-NL63, вызывающего сезонные инфекции дыхательных путей [2].

Достигнутый коллективный защитный иммунитет к пандемическому вирусу SARS-CoV-2

Принятые сокращения: ВНА – вирус-нейтрализующие антитела; ВНТ – вирус-нейтрализующий тест; мкАт – моноклональное антитело; сВНТ – суррогатный вирус-нейтрализующий тест; ACE2 – ангиотензин-превращающий фермент 2; CHO – линия клеток яичника китайского хомячка; Fc – кристаллизуемый фрагмент иммуноглобулина; HRP – пероксидаза хрена; IC₅₀ – концентрация, вызывающая ингибирование на 50%; MALS – многоугольная детекция рассеяния света; MTX – метотрексат; PBS – фосфатно-буферизованный раствор; RBD – рецептор-связывающий домен; SARS-CoV-2 – коронавирус 2, вызывающий тяжёлый острый респираторный синдром.

* Адресат для корреспонденции.

основан на возникновении у вакцинированных или переболевших вирус-нейтрализующих антител (ВНА), которые в основном состоят из антител к рецептор-связывающему домену (RBD) шиповидного (S) белка вируса, препятствующих его связыванию с ACE2. Уровень ВНА ограниченно коррелирует с уровнем сывороточного иммуноглобулина G (IgG) к RBD или S-белку; из общего титра IgG, определяемого по ИФА (иммуноферментному анализу), нельзя предсказать уровень ВНА [3].

Поскольку уровень антител к S-белку и уровень ВНА после вакцинации или инфекции постепенно снижаются, в будущем возможно повторное распространение новых вариантов SARS-CoV-2, что может иметь эпидемиологические последствия. Регулярное измерение уровней ВНА при помощи вирус-нейтрализующих тестов (ВНТ) позволит своевременно выявлять потерю ВНА в общей популяции либо выборках вакцинированных или переболевших лиц, при этом тестирование может проводиться против текущих циркулирующих вариантов вируса, всё более отличающихся от исходного варианта 2019 г.

Золотым стандартом ВНТ считается тест на нейтрализацию бляшкообразования (PRNT): культуру лабораторно адаптированного изучаемого вируса добавляют к чувствительным клеткам и затем подсчитывают число вирус-индуцированных бляшек в монослое. Уровнем ВНА назначают максимальное разведение тестируемой сыворотки крови, для которого снижение числа бляшек составило более 50%. Тест PRNT, таким образом, является полуколичественным. Исследования патогенных для человека вирусов в таком формате крайне сложны и требуют применения мер обеспечения биобезопасности высокого уровня [4]. Живой вирус может быть заменён псевдотипированным с репортёрным геном, такой тест (пВНТ) уже может проводиться в условиях BSL-2 [5], но его трудоёмкость всё ещё очень высока, и он не может проводиться как рутинный в клинических и диагностических лабораториях.

Суррогатный ВНТ (сВНТ) обычно проводится как конкурентный ИФА с детекцией количества комплекса RBD:ACE2, уровнем ВНА считают разведение сыворотки, при котором взаимодействие RBD с ACE2 падает вдвое (ID_{50}). Один из наиболее распространённых наборов для сВНТ, сPass [6] производства компании «Genscript» (США), использует мономерный ACE2 в качестве первого слоя и конъюгат RBD с пероксидазой хрена (HRP) в качестве верхнего слоя. Другие варианты сВНТ используют RBD как первый слой и

биотинилированный ACE2 как верхний слой ИФА. Ранее нами было предложено проводить сВНТ при использовании RBD для первого слоя и конъюгата ACE2-HRP для верхнего слоя [7]. Такой вариант сВНТ был пригоден для построения линейной зависимости уровня ингибирования взаимодействия RBD:ACE2 от концентрации исследуемой сыворотки, что существенно уменьшает необходимое число разведений тестируемых образцов для определения уровня ВНА и упрощает расчёт концентрации, вызывающей ингибирование на 50% (IC_{50}).

Мономерный ACE2, изготавливаемый для использования в качестве диагностического реагента, обычно содержит на C-конце белка гексагистидиновый кластер; такой реагент не может участвовать в образовании мультимерных комплексов, но может быть менее стабилен при хранении, чем димерный ACE2-Fc (слитный белок внеклеточного домена ACE2 и кристаллизуемого фрагмента IgG).

Для сВНТ, построенного на ингибировании образования комплексов ACE2:RBD на поверхности микрочастиц и детекции трёхслойных комплексов проточной цитометрией, было показано, что димерный ACE2-Fc практически непригоден для получения кривых ингибирования комплексообразования ACE2 и RBD вирус-нейтрализующими моноклональными антителами (мкАт) или антителами из сывороток крови. Мы предположили, что в случае обычного формата сВНТ в форме конкурентного ИФА конъюгат димерного ACE2-Fc с HRP будет эквивалентен конъюгату мономерного ACE2. Димерный ACE2-Fc, как и другие слитные с Fc рекомбинантные белки, потенциально может быть получен в больших количествах в стабильно трансфицированных клетках CHO (линия клеток яичника китайского хомячка) и использован для изготовления реактива для сВНТ с постоянными свойствами.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Молекулярное клонирование. Ген, кодирующий слитный полипептид ACE2-Fc, содержащий внеклеточный домен ACE2 (аминокислотные остатки 319–541) с природным сигнальным пептидом (а.о. 1–14) и кристаллизуемый фрагмент (Fc) человеческого IgG1, собирали на основе плазмиды pTF-ACE2s [7], которая кодирует растворимый ACE2 и депонирована нами в репозиторий Addgene (plasmid #162786, рис. 1).

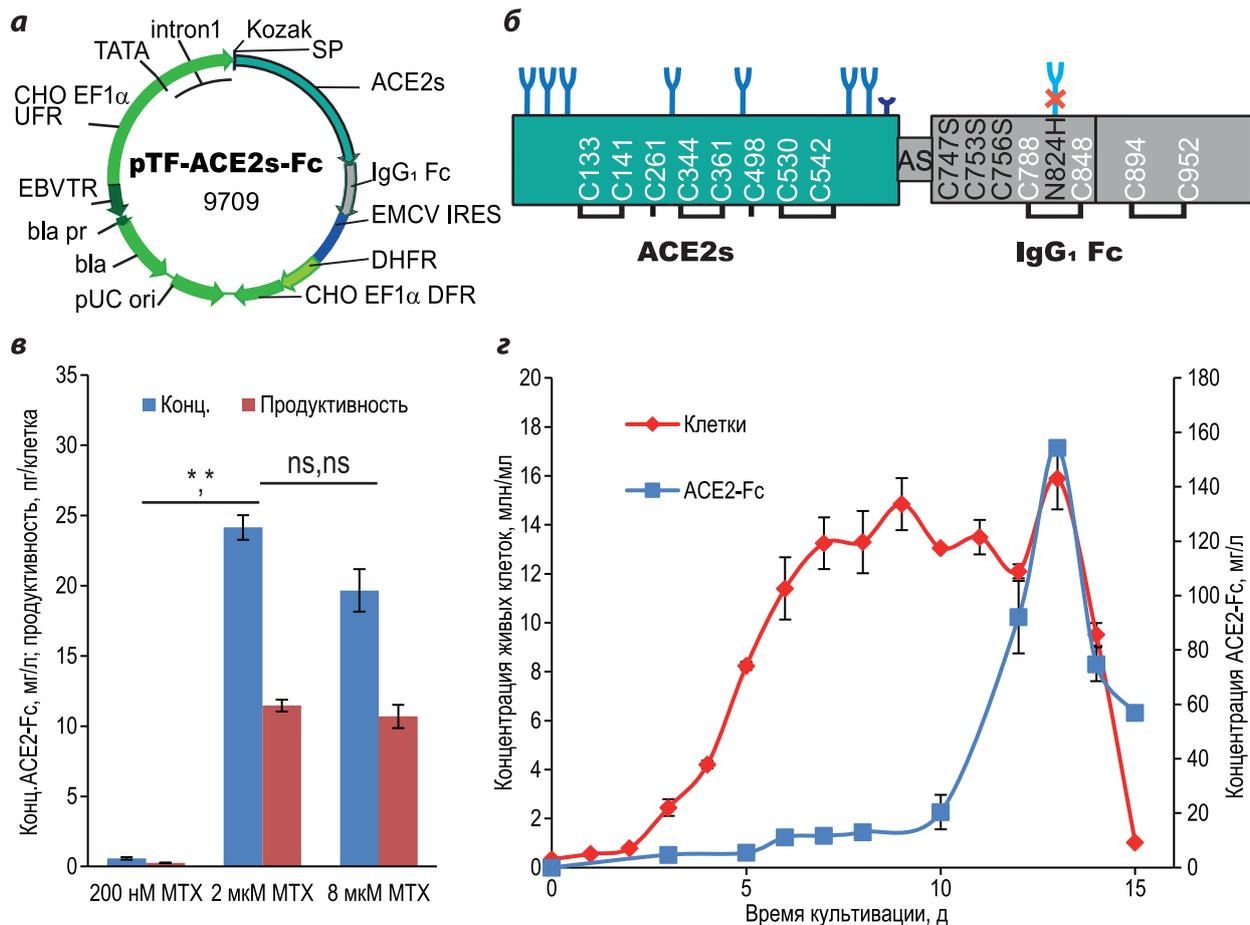


Рис. 1. Схема экспрессионной конструкции pTF-ACE2s-Fc (а), схема экспрессируемого слитного белка (б), динамика удельной продуктивности клеток после проведения селекции и при амплификации трансгена под действием метотрексата (MTX) (в), кривая накопления ACE2-Fc при длительном культивировании (г). Обозначения: pUC ori – область начала репликации плазмиды pUC; bla – открытая рамка считывания бета-лактамазы; bla pr – промотор гена bla; EBVTR – фрагмент конкатемера терминальных повторов вируса Эпштейна–Барр человека; CHO EF1 α UFR – область, фланкирующая ген фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка «выше по течению»; TATA – TATA-бокс; intron 1 – интрон 1 гена фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка; Kozak – синтетическая консенсусная последовательность Козак; SP – область, кодирующая сигнальный пептид гена ACE2; ACE2s – открытая рамка считывания внеклеточного домена ACE2; EMCV IRES – внутренний сайт связывания рибосом вируса энцефаломиокардита лошадей; DHFR – открытая рамка считывания дигидрофолатредуктазы мыши; CHO EF1 α DFR – область, фланкирующая ген фактора элонгации трансляции 1 альфа китайского хомячка «ниже по течению», включающая терминатор, сигнал полиаденилирования и 3'-нетранслируемую область этого гена. Стрелками указаны направления транскрипции генов. На панели (б) существующие остатки Cys обозначены белым шрифтом, замены – черным шрифтом. Синие фрагменты – известные сайты N-гликозилирования, темно-синий фрагмент – сайт O-гликозилирования. AS – линкерный дипептид, связывающий ACE2 и Fc-фрагмент. Планки погрешностей здесь и далее соответствуют стандартному отклонению, статистические различия по критерию Стьюдента, $n = 2$, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ns: $p > 0,05$

Последовательность, кодирующую фрагмент Fc IgG1 человека с аминокислотными заменами C220S, C226S, C229S, N297H (нумерация по Каббату), получали методом ПЦР с использованием смеси полимераз Encyclo («Евроген», Россия), плазмиды p1.1-Tr2-V-RBDv2-Fc [8] в качестве матрицы, праймеров AD-FcNheF (5'-AGCTAGCGAGCCCAAGAGCAGCGAT-3') и AD-FcNheR (5'-CGCTAGCTACTTACCAGGACTAAGAG-3'), содержащих добавленные последовательности для узнавания эндонуклеазой NheI. Продукт ПЦР

размером 712 п.н. выделяли из 1%-ного агарозного геля набором PCR Clean-Up System («Евроген»), клонировали в вектор pAL2-T («Евроген») с образованием плазмиды pAL2-Fc, верифицировали нуклеотидную последовательность методом секвенирования, вырезали фрагмент NheI-NheI размером 704 п.н. и лигировали с плазмидой pTF-ACE2s, рестрицированной той же эндонуклеазой. Поскольку открытая рамка считывания (ORF) фрагмента Fc включала стоп-кодон, C-концевые тэги вектора pTF не транслировались.

Ориентацию вставки определяли методом ПЦР с колоний с использованием праймера к pTF-sACE2s SQ-ACE1512-F [7] и AD-FcNheR. Полученные плазмиды pTF-sACE2-Fc секвенировали с тех же праймеров и использовали для трансфекции клеток CHO. Для выделения плазмид использовали наборы Plasmid Miniprep и Plasmid Midiprep 2.0 («Евроген»).

Получение поликлональных линий-продуктов. Клетки линии CHO 4BGD [9] вели в культуральной среде ProCHO5 («Lonza», Швейцария) с добавлением 8 мМ глутамина в виде смеси добавок глутамина и аланилглутамин («ПанЭко», Россия). Проводили трансфекцию методом электропорации на аппарате Neon («Invitrogen», США) в режиме 1700 В, 10 мс, в соотношении 60 мкг ДНК/10 млн клеток. Получали стабильную линию в присутствии селекционного агента MTX в концентрации 200 нМ с пассированием каждые 3–7 дней до восстановления жизнеспособности клеток более 90%, после этого увеличивали концентрацию MTX до 2 мкМ и вели пассирование до восстановления жизнеспособности выше 85%, затем повторяли амплификацию при концентрации MTX 8 мкМ. Измерение концентрации ACE2-Fc в культуральной среде проводили при помощи ИФА с антителом и конъюгатом антитела к Fc-фрагменту IgG1 человека («ХЕМА», Россия). В качестве калибратора концентрации использовали мкАт IgG1 человека, затем – очищенный ACE2-Fc. Все количественные данные в статье приведены для калибратора ACE2-Fc.

Культивация линии для препаративной наработки белка проводилась в 30 мл среды ActiPro Medium («Cytiva», США) с добавлением 6 мМ аланилглутамин, помещённых в перемешиваемые колбы Эрленмейера на 125 мл, при 37 °С, 5% CO₂, 155 об./мин и при амплитуде качалки 12 мм. Поддерживали концентрацию глюкозы в среде в районе 22 мМ, при падении pH ниже 7,00 добавляли 5 М NaOH.

Очистка белка. ACE2-Fc выделяли из 30–60 мл кондиционированной среды методом аффинной хроматографии на 1-мл колонке, содержащей сорбент MabSelect SuRe («Cytiva»), подвижная фаза – 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5, 150 мМ NaCl, скорость нанесения 0,5 мл/мин, объём промывки 20 мл после стабилизации базовой линии. Элюцию проводили раствором 50 мМ цитрата натрия, pH 3,2. Собраный элюат целевого белка немедленно нейтрализовали раствором Tris-основания до pH 7,0. Нейтрализованный элюат разбавляли 5 объёмами деионизованной воды и наносили на 1-мл анионообменную колонку HiTrap

Capto Q («Cytiva») на скорости 1 мл/мин. Колонку промывали раствором 20 мМ фосфата натрия, pH 7,4; целевой белок элюировали градиентом концентрации NaCl от 0 до 0,5 М в 10 объёмах колонки. Концентрацию очищенного ACE2-Fc определяли при помощи УФ-спектрофотометрии, используя раствор фильтрата, возникающего при ультрафильтрации очищенного белка, в качестве раствора сравнения. Коэффициент поглощения при $\lambda = 280$ нм для ACE2-Fc был определён по аминокислотной последовательности слитного белка и составил 1,78 ОЕ·мл/мг. Раствор элюированного ACE2-Fc концентрировали до 1–2 мг/мл с помощью центрифужных концентраторов Vivaspin 30 000 MWCO («Sartorius», Германия) и хранили при –70 °С. Конъюгирование ACE2-Fc с HRP проводили периодатным методом.

Аналитическая гель-фильтрация ACE2-Fc. Олигомерное состояние полученного препарата ACE2-Fc оценивали методом аналитической гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300 GL («GE Healthcare», США), подвижная фаза – фосфатно-буферизованный раствор (PBS), скорость потока 0,5 мл/мин. В качестве стандартов молекулярной массы использовали набор белков производства «GE Healthcare».

ДСН-ПААГ-Электрофорез. Разделение вели при концентрации акриламида в разделяющем геле 12,5%, окрашивание проводили при помощи коллоидного раствора Кумасси синего. Восстановленный образец получали при добавлении дитиотреитола до 20 мМ и прогревании 5 мин при 95 °С непосредственно перед электрофорезом.

Определение олигомерного состояния ACE2-Fc при помощи детекции многоугольного рассеяния (MALS). Разделение форм ACE2-Fc вели на колонке Superdex 200 Increase 5/150 GL («Cytiva»), подвижная фаза – 20 мМ фосфата натрия, pH 7,4, 100 мМ NaCl. Детекцию вели при помощи УФ-детектора на 280 нм и MALS-детектора miniDAWN («Wyatt Technology», США). Расчёт молекулярной массы вели при помощи штатного программного обеспечения детектора.

Измерение кинетических и равновесных констант взаимодействия проводили методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) на биосенсоре iMSPR-Pro («Icluebio», Республика Корея). Поверхность сенсорного чипа NTA («Icluebio») насыщали раствором NiCl₂ (0,5 мМ, 150 мкл, 30 мкл/мин), проводили иммобилизацию RBD Wuhan (дикий тип) или RBD beta (B.1.351) (25 мкг/мл, 150 мкл, 10 мкл/мин в обоих случаях), оба варианта RBD содержали

на C-конце 10xHis-кластер и были получены, как описано ранее [7, 8]. Далее в проточную ячейку биосенсора вводили ACE2-Fc в концентрации от 50 до 300 нМ (150 мкл, 30 мкл/мин) в растворе 25 мМ фосфата натрия, pH 7,4, 150 мМ NaCl. После каждого введения ACE2-Fc проводили регенерацию поверхности имидазолом (0,4 М, 150 мкл, 30 мкл/мин). Измерения проводили относительно контрольной ячейки, в которой на поверхности чипа не иммобилизовали RBD, а остальные реагенты вносили так же, как в опытную ячейку. Сигнал биосенсора измеряли в относительных единицах измерения – RU. Аппроксимацию кинетических зависимостей проводили с помощью программы TraceDrawer 1.9.1 («Ridgeview Instruments», Швеция).

Иммуноферментный анализ, сВНТ. Для количественного анализа содержания ACE2-Fc в культуральной жидкости проводили ИФА с иммобилизованными мкАт мыши к тяжёлой цепи IgG человека (XG36, «Хема», Россия). Для всех вариантов ИФА и сВНТ после иммобилизации антигена планшеты трижды промывали PBS с 0,1%-ным Tween 20 (PBST) и блокировали 3%-ным раствором БСА («Диа-М», Россия) в PBS. Для детекции использовали конъюгат антител к тяжёлой цепи IgG человека с HRP (T271X, «Хема») в разведении 1 : 20 000. В качестве калибратора использовали гуманизированное мкАт или очищенный ACE2-Fc с известной концентрацией. Исследуемые и контрольные образцы анализировали в двух повторностях. Детекцию проводили с помощью готового раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида («Биотест-системы», Россия), реакцию останавливали через 10 мин 5%-ным раствором фосфорной кислоты. Детектировали интенсивность окраски при 450 нм.

Для оценки способности ACE2-Fc связывать RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2 проводили ИФА, иммобилизуя в ячейках иммунологического микропланшета полученный ACE2-Fc в количестве 200 нг/лунку в PBS. Для детекции использовали конъюгат RBD-HRP [7].

Для определения уровня ВНА в лунках микропланшета иммобилизовали RBD SARS-CoV-2 дикого типа или варианта бета по 20 нг на лунку в растворе 50 мМ карбоната натрия, pH 9,4. Анализируемые образцы сывороток крови, полученных от доноров-реконвалесцентов в 2020–2021 гг. [7], разводили в 1%-ном БСА в PBS в диапазоне 1 : 20–1 : 160, вносили по 50 мкл в лунки микропланшета и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С, а затем добавляли конъюгат ACE2-Fc-HRP в концентрации 312,5 нг/мл и инкубировали ещё 1 ч

при 37 °С. Лунки пять раз промывали PBST. Вносили раствор субстрата и инкубировали микропланшеты ровно 10 мин при комнатной температуре ($+25 \pm 2$ °С). Реакцию останавливали 100 мкл 5%-ной ортофосфорной кислоты и измеряли оптическую плотность при 450 нм. Расчёт IC_{50} проводили, как указано в работе Колесова и соавт. [7].

Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для получения рекомбинантного ACE2-Fc нами была использована ОРС негликозилированного Fc-фрагмента IgG1 человека с заменой остатков Cys, образующих межцепочечные S-S связи, на остатки Ser. Такой Fc-фрагмент образует нековалентную димерную структуру и пригоден для стандартной аффинной очистки при помощи протеин А-сефарозы (рис. 1, б). Векторную плазмиду pTF-ACE2s-Fc трансфицировали в клетки линии CHO 4BGD, проводили первичную селекцию стабильно трансфицированных клеток, а затем увеличивали их продуктивность при помощи двух шагов геномной амплификации в присутствии 2 и 8 мкМ МТХ. Только первый шаг амплификации привёл к увеличению общей продуктивности клеток от $0,6 \pm 0,1$ до $24 \pm 0,9$ мг/л целевого белка за 3 дня культивирования (рис. 1, в), дальнейшее увеличение концентрации МТХ привело к небольшому падению концентрации целевого белка в среде, что может соответствовать достижению максимально возможной удельной продуктивности клеток для данного белка. Полученная нами пиковая концентрация ACE2-Fc (рис. 1, д) в среде – 154 мг/л – существенно превосходит опубликованные ранее значения, не превышавшие 1 мг/л [10], и соответствует пиковой концентрации для поликлональной линии клеток-продуцентов ACE2, полученной нами ранее при помощи аналогичной векторной плазмиды и двух циклов геномной амплификации.

Выделенный и очищенный ACE2-Fc не содержал ковалентных мультимеров по данным ДСН-ПААГ и практически не содержал примесных белков (рис. 2, а). По данным гель-фильтрации ACE2-Fc представляет собой смесь димерной и тетрамерной форм, при этом обе формы элюируют быстрее ожидаемого времени (рис. 2, б). Кажущаяся молекулярная масса основной димерной формы ACE2-Fc, определённая при помощи MALS-детектора, также составила 313 кДа (рис. 2, в, теоретически

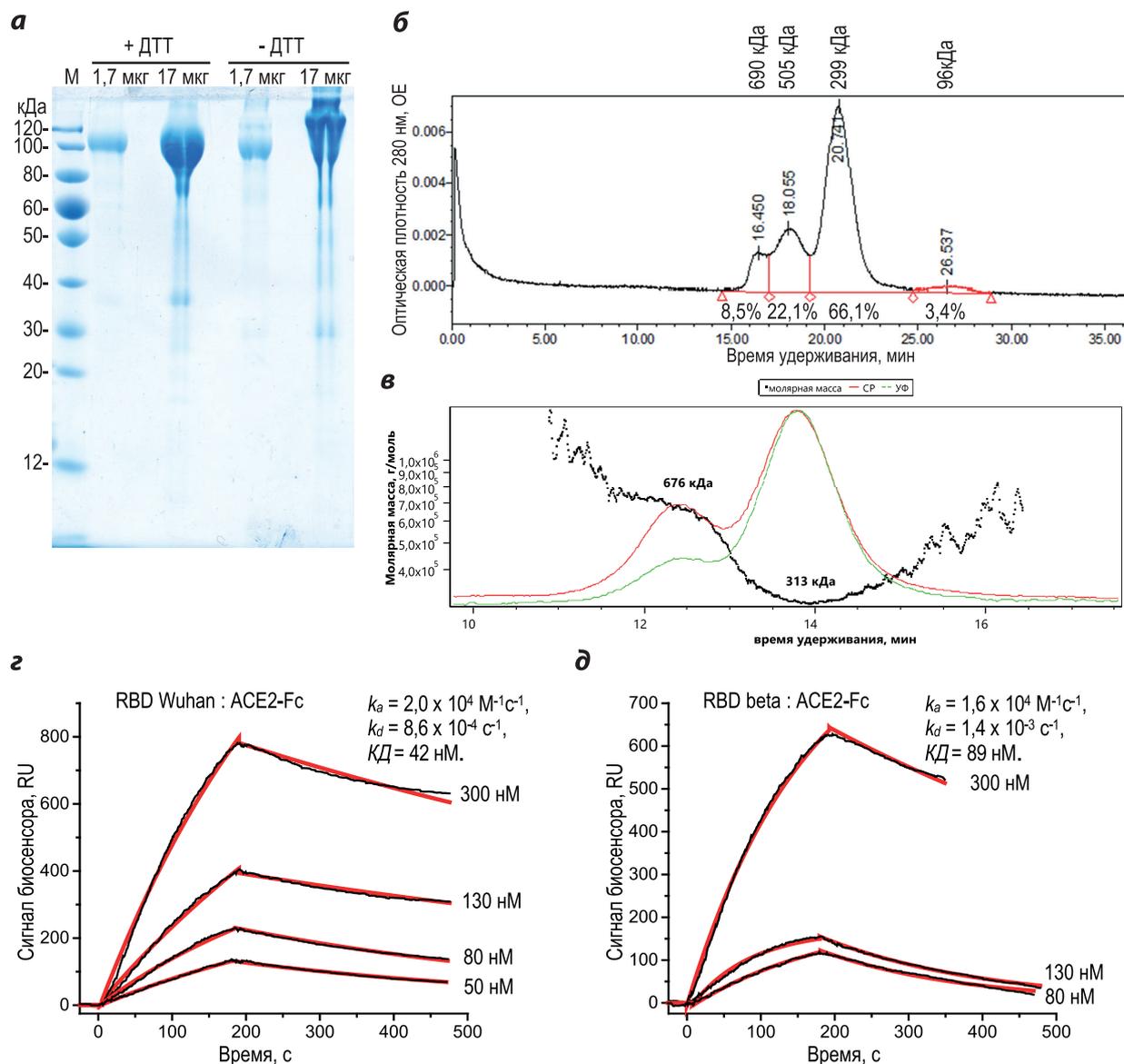


Рис. 2. Характеризация полученного белка ACE2-Fc методами ДСН-ПААГ (а), гель-фильтрации с УФ-детекцией (б) и с детекцией MALS (в), определение константы диссоциации ACE2-Fc и RBD вариантов SARS-CoV-2 методом ППР (г, д). Обозначения: М – маркер молекулярных масс, +ДТТ – внесение дитиотреитола до 10 мМ в образец для электрофореза; –ДТТ – без добавления дитиотреитола; 1,7 мкг, 17 мкг – количество целевого белка, внесённого в лунки геля, СР – светорассеяние, УФ – оптическая плотность на 280 нм, k_a – константа скорости ассоциации, k_d – константа скорости диссоциации

рассчитанная молекулярная масса мономера ACE2-Fc – 110 кДа), что может быть объяснено сильным N-гликозилированием белка и увеличением размера его глобулы.

Константа диссоциации (КД) ACE2-Fc и RBD Wuhan, определённая методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР), составила 42 нМ (рис. 2, г); для данного варианта RBD и мономерного ACE2 КД составляла 33 нМ при измерении кинетики образования и распада комплекса иммобилизованного мономерного ACE2 и RBD, находящегося в растворе [7]. Константа диссоциации ACE2-Fc и RBD вируса SARS-CoV-2 бета составила

89 нМ, что также соответствует литературным данным.

Реагент для проведения сВНТ был получен путём стандартной конъюгации ACE2-Fc с HRP периодатным методом. Полученный реагент ACE2-Fc-HRP так же, как и мономерный ACE2-HRP, давал в ИФА линейную зависимость оптической плотности раствора субстрата реакции от концентрации ACE2-Fc-HRP (рис. 3, а), вследствие этого расчёт степени ингибирования может выполняться без построения полной S-образной кривой ингибирования. Ингибирование образования комплекса RBD : ACE2-Fc-HRP нейтрализующими

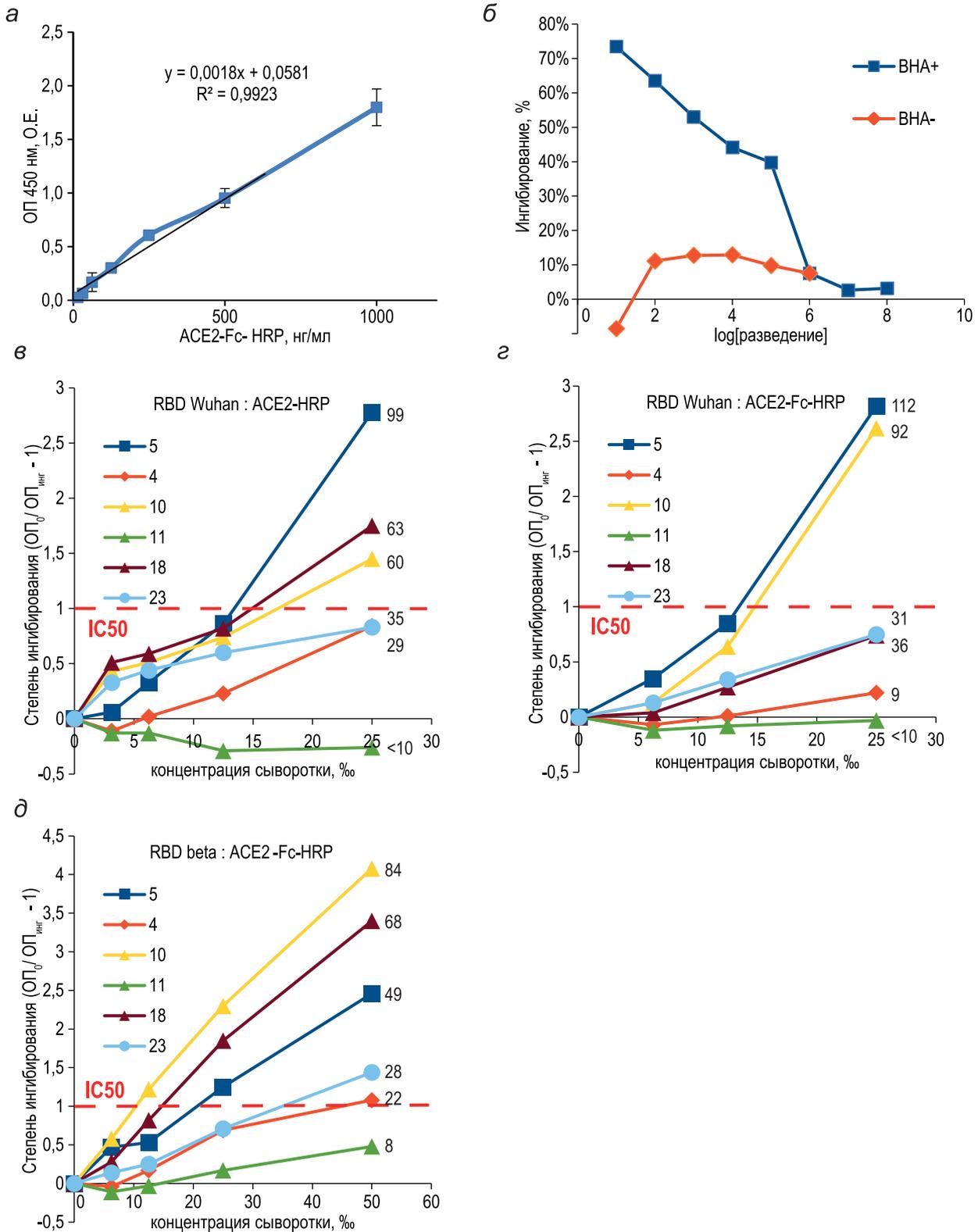


Рис. 3. Сравнительный анализ кривых ингибирования связывания ACE2-Fc-HRP и ACE2-HRP с RBD S-белка SARS-CoV-2 дикого типа. Калибровочная кривая зависимости сигнала в ИФА от концентрации ACE2-Fc-HRP (а), зависимость ингибирования связывания ACE2-Fc-HRP с RBD от разведения сывороток крови реконвалесцентов с высоким (BHA+) и низким (BHA-) содержанием BHA (б), кривые ингибирования для образцов сывороток крови из контрольной панели NIBSC (в-д). В нижнем слое на панелях а-г использован RBD Wuhan, на панели д – RBD beta. Панели а, б, г, д – ACE2-Fc-HRP, панель в – ACE2-HRP. Значения ID₅₀, выраженные как разведения тестируемых образцов, обеспечивающие 50%-ное ингибирование, приведены справа от соответствующих кривых ингибирования для панелей в-д. Обозначения: ОП 450 нм – оптическая плотность образцов, ОП₀ – оптическая плотность образцов контрольных образцов, ОП_{инг} – оптическая плотность образцов с добавлением антител

антителами в высокой концентрации приводило к почти полному прекращению связывания ACE2-Fc и RBD (рис. 3, б), а присутствие антител к RBD, не имеющих вирус-нейтрализующего действия, вызывало видимое ингибирование связывания RBD-Fc-HRP и RBD не более чем на 15%.

Для набора контрольных образцов сывороток крови из калибраторной панели NIBSC, исследованных нами ранее в сВНТ с мономерным ACE2-HRP, было установлено, что определяемые IC_{50} для димерного ACE2-Fc-HRP близки к IC_{50} для мономерного ACE2-HRP (рис. 3, в, г). При замене RBD Wuhan на RBD варианта вируса beta наблюдалось уменьшение IC_{50} для 5 из 6 тестируемых образцов, аналогичные данные были получены ранее для мономерного ACE2-HRP. Таким образом, димерный ACE2-Fc при обычном выполнении сВНТ в формате ИФА эквивалентен мономерному ACE2, может быть получен в больших количествах при помощи стабильно трансфицированных клеток CHO и пригоден для использования в рутинном тестировании динамики титров ВНА в отношении циркулирующих вариантов вируса SARS-CoV-2.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Суррогатные методы определения уровней ВНА, не требующие использования вирусов и культивируемых клеток, могут широко использоваться при наблюдениях за последствиями вакцинации, определении текущего состояния коллективного иммунитета (herd immunity), оценки вирулентности новых вариантов вирусов, а также скрининга библиотек малых молекул – ингибиторов комплексообразования S-белка с рецептором, либо быстрой оценки вирус-нейтрализующей способности мкАт [11]. Один из наиболее распространённых в мире наборов для сВНТ, сPass, показывает корреляцию с данными ВНТ несколько хуже, чем прямой ИФА с S-фрагментом S-белка [12].

В целом, различные варианты реализации сВНТ для SARS-CoV-2, описанные в литературе, дают сходные значения величины корреляции результатов сВНТ и «настоящего» ВНТ. Одновременно с этим при детальном сравнении значений IC_{50} , определённых для одних и тех же образцов сыворотки при помощи разных наборов для сВНТ, выявлялись сильные количественные различия между наборами (см., например, рис. 2 в работе Pieri et al. [13]). В нашем случае при сравнении вычисляемых IC_{50} для одних и тех же образцов сывороток с ВНА при

помощи реагентов ACE2-HRP и ACE2-Fc-HRP не наблюдается существенного изменения IC_{50} . Мы считаем, что причиной больших различий в определяемом уровне IC_{50} между различными коммерческими наборами для сВНТ в одних и тех же образцах являются не различия в состоянии реагента ACE2, а особенности связывания с антителами конъюгатов RBD-HRP и различающиеся протоколы прединкубации исследуемых образцов с RBD-HRP.

При проведении сВНТ с RBD в качестве иммобилизованного на поверхности микропланшетов антигена кооперативное взаимодействие молекул иммуноглобулинов или димерных молекул ACE2-Fc одновременно с двумя молекулами RBD представляется крайне маловероятным. Так, при нанесении 100 нг RBD на одну лунку стандартного 96-луночного микропланшета среднее расстояние между центрами соседних молекул RBD составит около 300 нм, что на два порядка превышает их молекулярный радиус. При использовании ACE2-Fc в качестве иммобилизованного антигена остаётся возможным взаимодействие с ним двух молекул RBD-HRP либо двух иммунокомплексов, содержащих цепочки из молекул иммуноглобулинов и молекул RBD-HRP, и образование таких мультимерных комплексов может давать завышенные величины IC_{50} , поэтому данный формат постановки сВНТ в настоящей работе не исследовался.

Константа диссоциации мономеров ACE2 и RBD S-белка SARS-CoV-2 дикого типа составляет около 30 нМ, а для многих вирус-нейтрализующих мкАт, направленных против SARS-CoV-2 дикого типа, были получены значительно более низкие константы диссоциации. Это ограничило интерес исследователей к созданию и исследованиям препаратов ACE2 в качестве противовирусных средств. Эволюция SARS-CoV-2 достаточно быстро привела к потере эффективности мкАт, получивших временную регистрацию в качестве лекарственных средств. Ферментативно активный растворимый ACE2 ранее проходил клинические испытания при респираторном дистресс-синдроме взрослых и продемонстрировал достаточную безопасность для пациентов, но недостаточную эффективность [14]. При местном применении в качестве аэрозоля этот препарат также был достаточно безопасен для здоровых добровольцев, но его эффективность как противовирусного средства была продемонстрирована только на животной модели [15]. Аффинность ACE2 к S-белку SARS-CoV-2 может быть увеличена до достижения КД около 10 нМ при внесении в ACE2 трёх мутаций:

T27Y, L79T, N330Y [16], такая КД сохраняется и для ACE2-Fc, при этом IC₅₀ в ВНТ составляет также около 10 нМ [17]. Набор мутаций A25V, K31N, E35K, L79F в ACE2 позволил получить КД с RBD SARS-CoV-2 дикого типа менее 1 нМ [18], при ко-культивации вируса SARS-CoV-2 с таким ACE2-Fc не наблюдали эволюции вируса против нейтрализации слитным белком в течение 15 пассажей. Тем не менее такая настройка ACE2 на большую аффинность к известным вариантам вируса SARS-CoV-2 может привести как к ухудшению аффинности против новых вариантов этого вируса, так и к падению аффинности по сравнению с природным ACE2 для новых вирусов, использующих его в качестве рецептора.

Ферментативно неактивные варианты ACE2 сохраняют способность связываться с S-белком сарбековирусов. На примере S-белка SARS-CoV было показано, что ACE2-Fc с мутациями H374N и H378N ингибирует псевдотипированный вирус в ВНТ с IC₅₀ около 2 нМ [19]. Нежелательная ферментативная активность ACE2 может быть устранена как точечными мутациями, так и необратимыми ингибиторами [20], что также может быть использовано для получения лекарственных препаратов ACE2-Fc. Более совершенные варианты ACE2-Fc, исследованные к настоящему моменту, содержат как точечные мутации, блокирующие карбоксипептидазную активность ACE2, так и укороченные формы внеклеточной части ACE2, варианты искусственной шарнирной области IgG и несколько вариантов Fc-фрагмента, обеспечивающих разный спектр его эффекторных функций [21].

Описанная в настоящей работе система экспрессии гена ACE2-Fc обладает достаточной удельной продуктивностью для получения прототипа лекарственного средства, которое может потребоваться при возникновении новых вариантов SARS-CoV-2 с высокой патогенностью или новых видов коронавирусов, использующих рецептор ACE2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Димерный слитный белок ACE2-Fc может быть получен в больших количествах в клетках CHO при помощи векторной плазмиды на основе нетранслируемых областей гена *EEF1A1* китайского хомячка и выделен в чистом виде как смесь димерной и тетрамерной форм. Димерный ACE2-Fc может быть конъюгирован с HRP при помощи стандартного протокола и полностью эквивалентен мономерному ACE2 в качестве реагента для сВНТ. Получение ферментативно неактивных вариантов ACE2-Fc как прототипов противовирусных лекарственных средств может быть предметом дальнейших исследований.

Вклад авторов. И.И. Воробьев – концепция и руководство работой; Е.А. Гаямова, Д.Э. Колесов, Н.А. Орлова – проведение экспериментов; все авторы – обсуждение результатов исследования; И.И. Воробьев и Н.А. Орлова – написание текста; Н.А. Орлова – редактирование текста статьи.

Финансирование. Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00091).

Благодарности. Авторы выражают благодарность Н.Н. Случанко (Институт биохимии им. Баха, ФИЦ Биотехнологии РАН) за проведение определения молекулярной массы ACE2-Fc при помощи MALS-детекции, Сафенковой И.В. (ibid.) за проведение определения константы диссоциации ACE2-Fc и RBD методом ППР, Кострикиной Е.С. (ООО «Хема-Медика») за получение конъюгата ACE2-Fc-HRP.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lambert, D. W., Yarski, M., Warner, F. J., Thornhill, P., Parkin, E. T., Smith, A. I., Hooper, N. M., and Turner, A. J. (2005) Tumor necrosis factor-alpha convertase (ADAM17) mediates regulated ectodomain shedding of the severe-acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) receptor, angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2), *J. Biol. Chem.*, **280**, 30113-30119, doi: 10.1074/jbc.M505111200.
2. Smith, M. K., Tusell, S., Travanty, E. A., Berkhout, B., van der Hoek, L., and Holmes, K. V. (2006) Human angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) is a receptor for human respiratory coronavirus NL63, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **581**, 285-288, doi: 10.1007/978-0-387-33012-9_48.
3. Bohn, M. K., Lippi, G., Horvath, A., Sethi, S., Koch, D., Ferrari, M., Wang, C. B., Mancini, N., Steele, S.,

- and Adeli, K. (2020) Molecular, serological, and biochemical diagnosis and monitoring of COVID-19: IFCC taskforce evaluation of the latest evidence, *Clin. Chem. Lab. Med.*, **58**, 1037-1052, doi: 10.1515/ccm-2020-0722.
4. Bewley, K. R., Coombes, N. S., Gagnon, L., McInroy, L., Baker, N., Shaik, I., St-Jean, J. R., St-Amant, N., Buttigieg, K. R., Humphries, H. E., Godwin, K. J., Brunt, E., Allen, L., Leung, S., Brown, P. J., Penn, E. J., Thomas, K., Kulnis, G., Hallis, B., Carroll, M., et al. (2021) Quantification of SARS-CoV-2 neutralizing antibody by wild-type plaque reduction neutralization, microneutralization and pseudotyped virus neutralization assays, *Nat. Protoc.*, **16**, 3114-3140, doi: 10.1038/s41596-021-00536-y.
 5. Vandergaast, R., Carey, T., Reiter, S., Lathrum, C., Lech, P., Gnanadurai, C., Haselton, M., Buehler, J., Narjari, R., Schnebeck, L., Roesler, A., Sevola, K., Suksanpaisan, L., Bexon, A., Naik, S., Brunton, B., Weaver, S. C., Rafael, G., Tran, S., Baum, A., et al. (2021) IMMUNO-COV v2.0: Development and validation of a high-throughput clinical assay for measuring SARS-CoV-2-neutralizing antibody titers, *mSphere*, **6**, e0017021, doi: 10.1128/mSphere.00170-21.
 6. Tan, C. W., Chia, W. N., Qin, X., Liu, P., Chen, M. I., Tiu, C., Hu, Z., Chen, V. C., Young, B. E., Sia, W. R., Tan, Y. J., Foo, R., Yi, Y., Lye, D. C., Anderson, D. E., and Wang, L. F. (2020) A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike protein-protein interaction, *Nat. Biotechnol.*, **38**, 1073-1078, doi: 10.1038/s41587-020-0631-z.
 7. Kolesov, D. E., Sinegubova, M. V., Dayanova, L. K., Dolzhikova, I. V., Vorobiev, I. I., and Orlova, N. A. (2022) Fast and accurate surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blocking of the interaction of ACE2 and SARS-CoV-2 spike protein RBD, *Diagnostics (Basel)*, **12**, 393, doi: 10.3390/diagnostics12020393.
 8. Рязанова А. Ю., Ходак Ю. А., Орлова Н. А., Синегубова М. В., Даянова Л. К., Ковнир С. В., Коробова С. В., Лёдов В. А., Ковальчук А. Л., Алхазова Б. И., Головина М. Э., Воробьев И. И., Апарин П. Г. (2022) Рецепторсвязывающий домен S-белка SARS-CoV-2, слитый с негликозилированным кристаллизующимся фрагментом IgG1 человека: получение и оценка иммуногенности, *Биотехнология*, **38**, 12-19, doi: 10.56304/S0234275822060102.
 9. Orlova, N. A., Dayanova, L. K., Gayamova, E. A., Sinegubova, M. V., Kovnir, S. V., and Vorobiev, I. I. (2022) Targeted knockout of the *dhfr*, *glul*, *bak1*, and *bax* genes by the multiplex genome editing in CHO cells, *Dokl Biochem Biophys*, **502**, 40-44, doi: 10.1134/S1607672922010082.
 10. Matthews, A. M., Biel, T. G., Ortega-Rodriguez, U., Falkowski, V. M., Bush, X., Faison, T., Xie, H., Agarabi, C., Rao, V. A., and Ju, T. (2022) SARS-CoV-2 spike protein variant binding affinity to an angiotensin-converting enzyme 2 fusion glycoproteins, *PLoS One*, **17**, e0278294, doi: 10.1371/journal.pone.0278294.
 11. Zhang, S., Gao, C., Das, T., Luo, S., Tang, H., Yao, X., Cho, C. Y., Lv, J., Maravillas, K., Jones, V., Chen, X., and Huang, R. (2022) The spike-ACE2 binding assay: An *in vitro* platform for evaluating vaccination efficacy and for screening SARS-CoV-2 inhibitors and neutralizing antibodies, *J. Immunol. Methods*, **503**, 113244, doi: 10.1016/j.jim.2022.113244.
 12. Ru, Z., Xhang, Y., Wu, J., Huang, H., Liang, Y., Yang, X., Wu, J., and Lou, J. (2021) Comparison of the SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test (sVNT) assay and direct binding ELISA (S-IgG) with the cytopathic effect assay (CPE) in analyzing the neutralization antibody of vaccination people, *J. Clin. Immunol. Immunother.*, **7**, 063, doi: 10.24966/CIIT-8844/1000063.
 13. Pieri, M., Infantino, M., Manfredi, M., Nuccetelli, M., Grossi, V., Lari, B., Tomassetti, F., Sarubbi, S., Russo, E., Amedei, A., Benucci, M., Casprini, P., Stacchini, L., Castilletti, C., and Bernardini, S. (2022) Performance evaluation of four surrogate Virus Neutralization Tests (sVNTs) in comparison to the *in vivo* gold standard test, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **27**, 74, doi: 10.31083/j.fbl2702074.
 14. Khan, A., Benthin, C., Zeno, B., Albertson, T. E., Boyd, J., Christie, J. D., Hall, R., Poirier, G., Ronco, J. J., Tidswell, M., Harges, K., Powley, W. M., Wright, T. J., Siederer, S. K., Fairman, D. A., Lipson, D. A., Bayliffe, A. I., and Lazaar, A. L. (2017) A pilot clinical trial of recombinant human angiotensin-converting enzyme 2 in acute respiratory distress syndrome, *Crit. Care*, **21**, 234, doi: 10.1186/s13054-017-1823-x.
 15. Shoemaker, R. H., Panettieri, R. A., Jr., Libutti, S. K., Hochster, H. S., Watts, N. R., Wingfield, P. T., Starkl, P., Pimenov, L., Gawish, R., Hladik, A., Knapp, S., Boring, D., White, J. M., Lawrence, Q., Boone, J., Marshall, J. D., Matthews, R. L., Cholewa, B. D., Richig, J. W., Chen, B. T., et al. (2022) Development of an aerosol intervention for COVID-19 disease: Tolerability of soluble ACE2 (APN01) administered via nebulizer, *PLoS One*, **17**, e0271066, doi: 10.1371/journal.pone.0271066.
 16. Chan, K. K., Dorosky, D., Sharma, P., Abbasi, S. A., Dye, J. M., Kranz, D. M., Herbert, A. S., and Procko, E. (2020) Engineering human ACE2 to optimize binding to the spike protein of SARS coronavirus 2, *Science*, **369**, 1261-1265, doi: 10.1126/science.abc0870.
 17. Wines, B. D., Kurtovic, L., Trist, H. M., Esparon, S., Lopez, E., Chappin, K., Chan, L. J., Mordant, F. L., Lee, W. S., Gherardin, N. A., Patel, S. K., Hartley, G. E., Pymm, P., Cooney, J. P., Beeson, J. G., Godfrey, D. I., Burrell, L. M., van Zelm, M. C., Wheatley, A. K., Chung, A. W., et al. (2022)

- Fc engineered ACE2-Fc is a potent multifunctional agent targeting SARS-CoV2, *Front. Immunol.*, **13**, 889372, doi: 10.3389/fimmu.2022.889372.
18. Higuchi, Y., Suzuki, T., Arimori, T., Ikemura, N., Mihara, E., Kirita, Y., Ohgitani, E., Mazda, O., Motooka, D., Nakamura, S., Sakai, Y., Itoh, Y., Sugihara, F., Matsuura, Y., Matoba, S., Okamoto, T., Takagi, J., and Hoshino, A. (2021) Engineered ACE2 receptor therapy overcomes mutational escape of SARS-CoV-2, *Nat. Commun.*, **12**, 3802, doi: 10.1038/s41467-021-24013-y.
 19. Moore, M. J., Dorfman, T., Li, W., Wong, S. K., Li, Y., Kuhn, J. H., Coderre, J., Vasilieva, N., Han, Z., Greenough, T. C., Farzan, M., and Choe, H. (2004) Retroviruses pseudotyped with the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein efficiently infect cells expressing angiotensin-converting enzyme 2, *J. Virol.*, **78**, 10628-10635, doi: 10.1128/JVI.78.19.10628-10635.2004.
 20. Svilenov, H. L., Delhommel, F., Siebenmorgen, T., Ruhrnossl, F., Popowicz, G. M., Reiter, A., Sattler, M., Brockmeyer, C., and Buchner, J. (2023) Extrinsic stabilization of antiviral ACE2-Fc fusion proteins targeting SARS-CoV-2, *Commun. Biol.*, **6**, 386, doi: 10.1038/s42003-023-04762-w.
 21. Hernández, T., Bermúdez, E., Fundora, T., and Sánchez, B. (2022) COVID-19 therapy based on soluble ACE2: the use of receptor-Fc fusion proteins, *Open Acc. J. Bio Sci.*, **4**, 1970-1975, doi: 10.38125/OAJBS.000472.

DIMERIC ACE2-FC IS EQUIVALENT TO MONOMERIC ACE2 IN THE SURROGATE VIRUS NEUTRALIZATION TEST

D. E. Kolesov, E. A. Gaiamova, N. A. Orlova, and I. I. Vorobiev*

*Federal Research Center "Fundamentals of Biotechnology", Russian Academy of Sciences,
119071 Moscow, Russia; e-mail: ptichman@gmail.com*

Angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) is the main cellular receptor for the dangerous sarbecoviruses SARS-CoV and SARS-CoV-2. Its recombinant extracellular domain is used to monitor the level of the protective humoral immune response to a viral infection or vaccine using a surrogate virus neutralization test (sVNT). Soluble ACE2 is also being considered as an antiviral therapy option potentially insensitive to changes in the SARS-CoV-2 spike protein. For widespread sVHT testing, it is necessary to use ACE2 preparations or ACE2 conjugates with constant properties. Previously, we obtained a cell line that produces soluble monomeric ACE2 and showed that this variant of ACE2 can be used in sBHT, preferably in the form of a conjugate with horseradish peroxidase. To obtain a stable and universally applicable form of soluble ACE2, a cell line was obtained that produced the ACE2-Fc fusion protein with high productivity, more than 150 mg/l of the target protein during cultivation in a stirred flask. Affinity-purified ACE2-Fc is a mixture of dimeric and tetrameric forms, but allows one to obtain linearizable antibody inhibition curves for complexation with the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 spike protein. The ACE2-Fc-HRP based sVHT testing system can be used to practically measure the levels of virus-neutralizing antibodies against various circulating variants of the SARS-CoV-2 virus.

Keywords: angiotensin-converting enzyme 2, SARS-CoV-2, sVHT, virus neutralization, protective immunity