

РЕЦЕПТОРСВЯЗЫВАЮЩИЙ ДОМЕН S-БЕЛКА SARS-CoV-2, СЛИТЫЙ С НЕГЛИКОЗИЛИРОВАННЫМ КРИСТАЛЛИЗУЮЩИМ ФРАГМЕНТОМ IgG1 ЧЕЛОВЕКА: ПОЛУЧЕНИЕ И ОЦЕНКА ИММУНОГЕННОСТИ

© 2022 г. А. Ю. Рязанова¹ *, Ю. А. Ходак¹, Н. А. Орлова¹, М. В. Синегубова¹,
Л. К. Даянова^{1,2}, С. В. Ковнир¹, С. В. Коробова³, В. А. Лёдов³, А. Л. Ковальчук³,
Б. И. Алхазова³, М. Э. Головина³, И. И. Воробьев^{1,2}, П. Г. Апарин³

¹Федеральное государственное учреждение “Федеральный исследовательский центр “Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук”, Москва, 119071 Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки “Институт биоорганической химии им. академиком М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова” Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение “Государственный научный центр “Институт иммунологии” Федерального медико-биологического агентства”, Москва, 115522 Россия

*e-mail: venel.ale@gmail.com

Поступила в редакцию 24.06.2022 г.

После доработки 20.09.2022 г.

Принята к публикации 01.10.2022 г.

Рассмотрены варианты генетических конструкций, кодирующих слитый белок рецепторсвязывающего домена (RBD) белка шипа (S-белка) SARS-CoV-2 и кристаллизующегося фрагмента (Fc) иммуноглобулина человека (белок RBD-Fc). Наибольший уровень секреции целевого белка клетками яичника китайского хомячка (CHO) регистрировали при использовании сигнального пептида S-белка и полноразмерного RBD, содержащего два сайта N-гликозилирования. Используя двухстадийную геномную амплификацию, мы получили поликлональную линию-продуцент RBD-Fc. Очищенный белок RBD-Fc использовали для трехкратной иммунизации мышей. Методом иммуноферментного анализа в сыворотках крови иммунизированных мышей определены титры анти-RBD-антител, которые достигали высоких значений (вплоть до 1 : 195000 в зависимости от адьюванта). Таким образом, подтверждена возможность использования очищенного рекомбинантного белка RBD-Fc в качестве потенциального иммуногена для разработки вакцин против SARS-CoV-2.

Ключевые слова: рецепторсвязывающий домен, белок шипа, SARS-CoV-2, экспрессия, клетки CHO, иммуногенность, мыши

DOI: 10.56304/S0234275822060102

Рецепторсвязывающий домен (RBD) белка шипа (S-белка) коронавируса-2 тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV-2) — это ключевой компонент вириона, ответственный за связывание вирусных частиц с рецептором — ангиотензинконвертирующим ферментом-2 (ACE2) — на поверхности хозяйской клетки. В результате этого взаимодействия вирус проникает в клетку и продолжает свой инфекционный цикл. В боль-

шинстве случаев вируснейтрализующие антитела, блокирующие инфекционную способность вирусных частиц, взаимодействуют именно с RBD S-белка [1]. Классические субъединичные вакцины, содержащие RBD, могут быть использованы для регулярной повторной иммунизации против вызываемого SARS-CoV-2 заболевания — COVID-19. Ожидается, что такого рода вакцины будут наиболее безопасными, так как полностью исключают интеграцию генетического материала вируса в геном реципиента и его контакт с иммуногенными вспомогательными компонентами векторных вакцин [2, 3].

RBD S-белка слабо гликозилирован (не менее трех олигосахаридных цепей) и экспонирован на

Список сокращений: а.о. — аминокислотные остатки; ОРС — открытая рамка считывания; ЭР — эндонуклеаза рестрикции; ACE2 — ангиотензинконвертирующий фермент-2; CHO (Chinese hamster ovary) — яичник китайского хомячка; LPS (lipopolysaccharide) — липополисахарид; MTX (methotrexate) — метотрексат; RBD (receptor-binding domain) — рецепторсвязывающий домен.

поверхности вириона, поэтому у инфицированных SARS-CoV-2 к нему вырабатываются антитела [4]. Однако введение рекомбинантного RBD вызывало сравнительно слабый иммунный ответ у мышей [3]. В ряде работ показано, что иммуногенность RBD можно существенно усилить, если использовать рекомбинантный белок RBD-Fc, в котором RBD слит с кристаллизующимся фрагментом (Fc) человеческого иммуноглобулина подкласса G1 (IgG1) [3, 5–7]. Слитие с Fc широко используют в биотехнологии, так как это позволяет многократно увеличить время жизни целевого белка в системной циркуляции. Кроме того, наличие Fc иногда повышает растворимость и стабильность целевого белка, а также позволяет легко выделять белок методом аффинной хроматографии на стандартном промышленном сорбенте [8].

В составе RBD S-белка SARS-CoV-2 присутствуют два N-связанных олигосахарида и, по крайней мере, один O-связанный олигосахарид, расположенные вблизи N-конца этого домена [9]. Сохранение нативного профиля гликозилирования RBD при гетерологичной экспрессии необходимо для использования этого белка в качестве вакцинного иммуногена. По-видимому, негликозилированный вариант RBD, получаемый в бактериальной системе, не способен к корректному сворачиванию и индукции высоких титров нейтрализующих антител, а гипергликозилированный RBD, получаемый в дрожжевых клетках, содержит высокоиммуногенные олигосахаридные цепи, которые искажают профиль иммунного ответа. Кроме того, дегликозилированные вирионы SARS-CoV-2 теряют способность инфицировать клетки [10].

В задачи представленной работы входило получение линии клеток яичника китайского хомячка (СНО), эффективно продуцирующей гликозилированный слитный белок RBD-Fc, и его характеристика с точки зрения молекулярной структуры и иммуногенности.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Молекулярное клонирование

Открытая рамка считывания (ОРС), кодирующая целевой полипептид RBD-Fc, содержала следующие блоки: сигнальный пептид S-белка SARS-CoV-2 (аминокислотные остатки (а.о.) 1–14), RBD (319–541 а.о. в полноразмерном S-белке beta-варианта SARS-CoV-2 (B.1.351) и Fc человеческого IgG1 (с аминокислотными заменами С220S, С226S, С229S, N297H). Нуклеотидную последовательность, в которой данная ОРС предварялась консенсусной последовательностью Козак и была фланкирована сайтами узнавания эндонуклеаз

рестрикции (ЭР), синтезировали в ООО “Клонинг Фасилити” (Россия), клонировали в Т-вектор pAL2-T (ЗАО “Евроген”, Россия), секвенировали и переносили в плазмиду p1.1-Tr2-eGFP (GenBank: MW187857) на место ОРС, кодирующей белок eGFP, по сайтам ЭР *AbsI* и *AsuNI*. Полученную плазмиду p1.1-Tr2-V-RBDv2-Fc (рис. S1, Дополнительный материал) повторно секвенировали с использованием праймеров к вектору, описанному в работе [11]. Фрагменты, кодирующие различные варианты N-концевой части RBD с сигнальным пептидом, клонировали в Т-вектор pAL2-T (ЗАО “Евроген”), секвенировали, а затем переносили в плазмиду p1.1-Tr2-V-RBDv2-Fc по сайтам *AbsI* и *AgeI*. От примеси акцепторной плазмиды избавлялись, обрабатывая лигазную смесь ЭР *EcoRV*. Полученные плазмиды секвенировали с тех же праймеров и использовали для трансфекции клеток СНО.

В работе использовали олигонуклеотиды, реагенты для ПЦР, наборы Plasmid Miniprep Purification и PCR Clean-Up System производства ЗАО “Евроген”, а также ЭР производства ООО “СибЭнзим” (Россия).

Получение поликлональных линий-продуцентов

Для разработки линий использовали культуральную среду ProCHO5 (Lonza, Швейцария) с добавлением 8 мМ глутамин в виде смеси добавок глутамин и аланилглутамин (“ПанЭко”, Россия). Проводили трансфекцию четырех типов конструкций, кодирующих различные варианты транслируемого полипептида (табл. 1) методом электропорации на аппарате Neon (Invitrogen, США) в режиме 1700 В, 10 мс, в соотношении 50 мкг ДНК/10⁷ клеток. Первичную селекцию стабильно трансфицированных клеток проводили при концентрации метотрексата (MTX) 200 нМ, а последующую амплификацию целевых генов – в присутствии 2 мкМ MTX до восстановления жизнеспособности клеток >85%, после чего амплификацию повторяли в присутствии 8 мкМ MTX. Стабильную линию клеток получали при культивировании в присутствии MTX с пассированием каждые 3–5 сут – до восстановления жизнеспособности клеток >90%.

Культивирование клеточной линии-продуцента целевого белка

Клетки СНО культивировали в 250-миллилитровых колбах Эрленмейера с 60 мл среды ProCHO5, содержащей дополнительно 4 мМ глутамин и 4 мМ аланилглутамин, при 37°C и 5% CO₂ и перемешивании со скоростью 110 об/мин при амплитуде ка-

Таблица 1. Характеристика поликлональных продуцентов при различных вариантах транслируемого полипептида RBD-Fc**Table 1.** Characteristics of polyclonal producing lines with different variants of the translated RBD-Fc polypeptide

| Плаزمида | Транслируемый полипептид ^а | Границы RBD, а.о. | Продуктивность, пг/клетка |
|---------------------|---------------------------------------|-------------------|---------------------------|
| p1.1-Tr2-V-RBDv2-Fc | V-RBDv2-Fc | 319–541 | 0.654 ± 0.015 |
| p1.1-Tr2-V-RBDv3-Fc | V-RBDv3-Fc | 331–541 | 0.046 ± 0.001 |
| p1.1-Tr2-T-RBDv2-Fc | T-RBDv2-Fc | 319–541 | 0.407 ± 0.009 |
| p1.1-Tr2-T-RBDv3-Fc | T-RBDv3-Fc | 331–541 | 0.507 ± 0.124 |

^а V – сигнальный пептид S-белка SARS-CoV-2; T – сигнальный пептид тканевого активатора плазминогена.

^а V, signal peptide of SARS-CoV-2 S-protein; T, signal peptide of tissue plasminogen activator.

чалки 12 мм. Посевная концентрация составляла 3×10^5 клеток/мл. При снижении содержания глюкозы в среде ниже 10 мМ ее концентрацию однократно увеличивали на 20 мМ добавлением стерильного 40%-ного раствора глюкозы для инъекций. Клетки культивировали в течение 8 сут – до падения жизнеспособности ниже 60%.

Очистка целевого белка

RBD-Fc выделяли из кондиционированной среды методом аффинной хроматографии на колонке, содержащей сорбент MabSelect SuRe (Cytiva, США). Элюцию проводили цитратным буфером (100 мМ цитрата натрия, pH 3.2). Собранный элюат сразу нейтрализовали 1 М карбонатным буфером (pH 9.8) до pH 7.5 и переводили в фосфатно-солевой буфер (PBS: 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ фосфат натрия, pH 7.3–7.5) с использованием центрифужных концентраторов Vivaspin 30000 MWCO (Sartorius, Германия). Концентрацию белка определяли по оптическому поглощению при 280 нм на спектрофотометре BioPhotometer (Erppendorf, Германия). Сконцентрированный препарат RBD-Fc замораживали и хранили при –70°C. Также в работе использовали ранее полученные варианты RBD без Fc: Wuhan-Hu-1 [12] и beta (B.1.351) [13].

Дегликозилирование целевого белка

Для анализа N-гликозилирования полученного белка RBD-Fc использовали пептид-N-гликозидазу F (PNGase F; New England Biolabs, США). После инкубации RBD-Fc с ферментом согласно рекомендациям производителя смесь анализировали методом электрофореза по Лэммли.

Аналитическая гель-фильтрация

Олигомерное состояние полученного препарата RBD-Fc оценивали методом аналитической

гель-фильтрации на колонке Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, США) в PBS со скоростью потока 0.5 мл/мин. В качестве стандартов молекулярной массы использовали набор белков этого же производителя.

Иммунизация мышей

Самок мышей линии (СВА×С57В1/6) F1 весом 16–18 г из питомника “Андреевка” ФГБУН “Научный центр биомедицинских технологий” ФМБА России содержали на стандартном рационе в условиях вивария ФГБУ “НИИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина” Минздрава России. Животных иммунизировали подкожно 3 раза с интервалом 3 недели, по 15 мкг RBD-Fc/мышь. Иммуноген вводили совместно с различными адъювантами: полным адъювантом Фрейнда; очищенным липополисахаридом (LPS) *Shigella flexneri* 2a, не проявляющим свойств эндотоксина [14]; смесью гидроксида алюминия и LPS *S. flexneri* 2a (LPS + Al(OH)₃). В группе сравнения иммуноген вводили без адъюванта в физиологическом растворе. В каждой группе было по 10 мышей. Кровь отбирали из ретроорбитального синуса на 7 сутки после третьей инъекции и получали сыворотки.

Иммуноферментный анализ

Для оценки содержания целевого белка, RBD-Fc, в культуральной жидкости использовали иммуноферментный анализ в сэндвич-варианте. 96-луночные планшеты сенсibilizовали мышьяными моноклональными антителами к γ-цепи IgG человека (XG36; ООО “Хема”, Россия), наносили культуральную жидкость и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Для детекции белка RBD-Fc использовали конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) моноклональные антитела мыши к IgG человека (T271X; ООО “Хема”) в разведении 1 : 20000. В качестве субстрата HRP использовали готовый раствор 3,3',5,5'-тетраметилбензидина

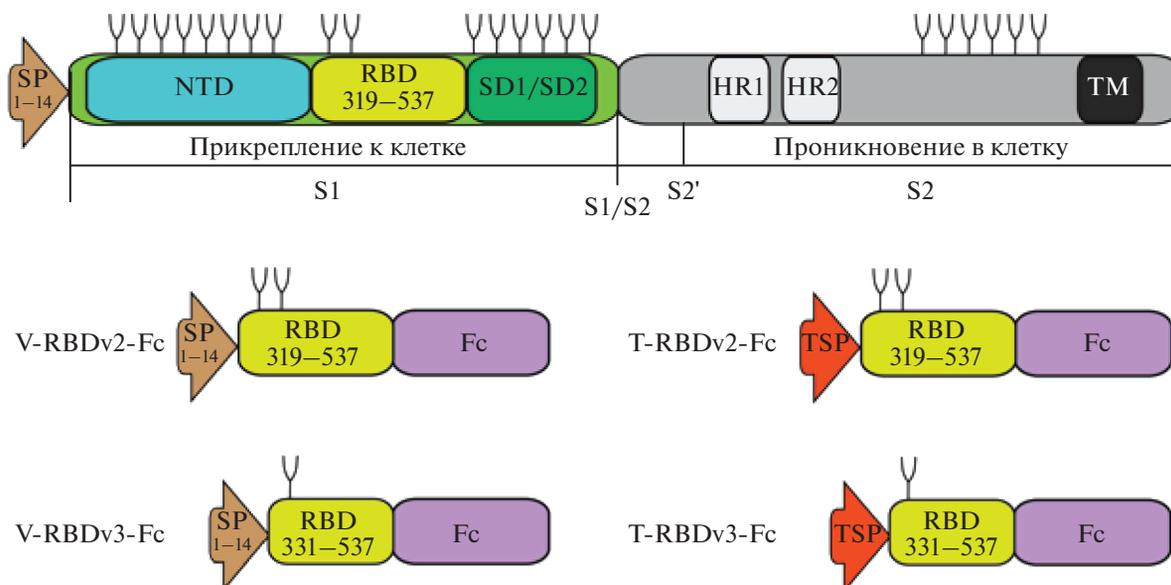


Рис. 1. Схема доменной организации S-белка SARS-CoV-2 и его рекомбинантных фрагментов – вакцинных кандидатов. Обозначения: SP – сигнальный пептид; S1 и S2 – субъединицы S-белка; S2' – сайт протеолитического расщепления, который становится доступным после расщепления на стыке доменов S1/S2; NTD – N-концевой домен; SD1/SD2 – субдомены 1 и 2 субъединицы S1; TM – трансмембранный участок; HR1 и HR2 – гептадные повторы субъединицы S2; Fc – негликозилированный кристаллизующийся фрагмент тяжелой цепи IgG человека; TSP – сигнальный пептид тканевого активатора плазминогена человека. Цифрами обозначены позиции аминокислотных остатков в полном размере S-белке варианта Wuhan-Hu-1 SARS-CoV-2.

Fig. 1. Scheme of domain organization of the SARS-CoV-2 spike protein and its recombinant fragments – vaccine candidates. Description: SP – signal peptide; S1 and S2 – the spike protein subunits; S2' – the proteolytic cleavage site which becomes exposed after the cleavage at the S1/S2 junction; NTD – N-terminal domain; RBD – receptor-binding domain; SD1/SD2 – subdomains 1 and 2 of the S1 subunit; TM – transmembrane region; HR1 and HR2 – heptad repeats of the S2 subunit; Fc – non-glycosylated crystallizable fragment of human IgG heavy chain; TSP – signal peptide of human tissue plasminogen activator. The amino acid residues positions in the full-size spike protein of the SARS-CoV-2 Wuhan variant are marked with numbers.

гидрохлорида (ООО “Биотест Системы”, Россия), реакцию останавливали через 15 мин 10%-ным раствором серной кислоты.

Для определения титра анти-RBD-антител в сыворотках крови иммунизированных мышей на 96-луночном планшете иммобилизовали очищенный рекомбинантный белок RBD (не слитый с Fc) SARS-CoV-2 вариантов Wuhan и beta. Исследуемые и контрольные образцы анализировали в двух повторах. Для детекции использовали конъюгированные с HRP поликлональные козьи антитела к IgG мыши (A4416; Sigma, США) в разведении 1 : 10000. Детекцию проводили, как описано выше. Титром считали такое разведение сыворотки, при котором средняя оптическая плотность была выше, чем средняя оптическая плотность для сыворотки интактных животных в разведении 1 : 25.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее мы продемонстрировали возможность получения RBD S-белка SARS-CoV-2 с высоким выходом в клетках CHO [12] с использованием сигнального пептида тканевого активатора плаз-

миногена и экспрессионных конструкций на основе промотора фактора элонгации трансляции-1 α китайского хомячка [11]. В представленной здесь работе нами использован тот же экспрессионный вектор и несколько вариантов гена, кодирующего целевой белок RBD-Fc (рис. 1). Все они включали RBD beta-изолята вируса (B.1.351), который отличается от варианта Wuhan-Hu-1 тремя мутациями в зрелом RBD: K417N, E484K и N501Y – и повышенным средством к ACE2.

В то время как гликозилирование RBD необходимо для использования его в качестве иммуногена, в том числе для вакцинных препаратов, гликозилирование Fc, наоборот, нежелательно. В связи с этим во всех вариантах слитные белки RBD-Fc содержали Fc IgG1 человека, в котором мутация N297H предотвращает его N-гликозилирование. Кроме того, мутации C220S, C226S и C229S предотвращают образование дисульфидных связей между двумя Fc [15, 16]. Хотя прототипы анти-SARS-CoV-2-вакцин на основе слитных белков с ковалентно димеризующимся Fc дикого типа [5] дают высокий титр нейтрализующих антител, слитные белки со слабо димеризующимся

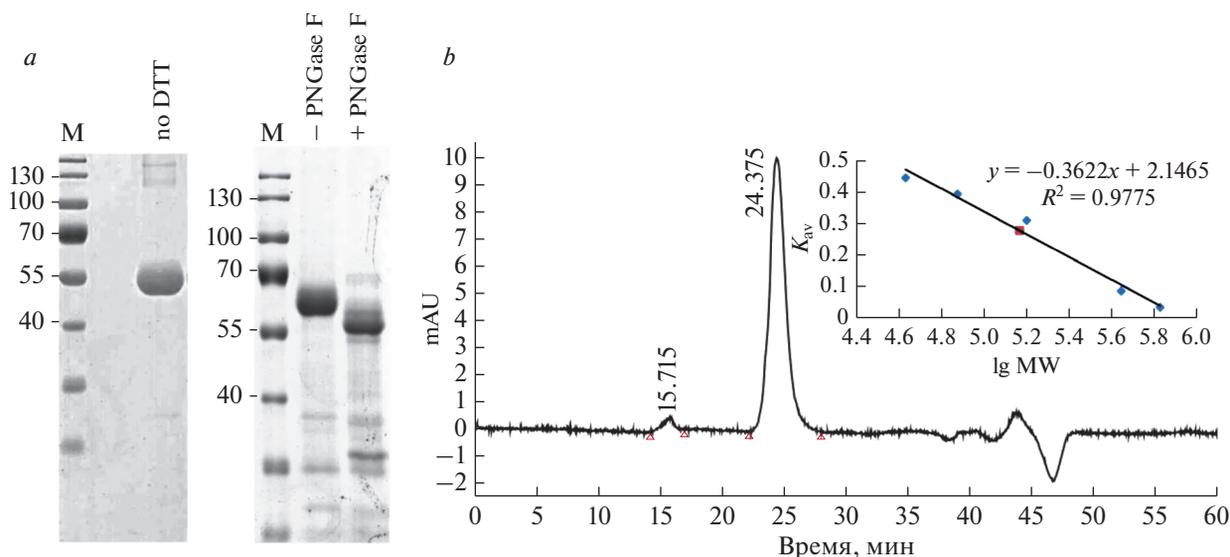


Рис. 2. Анализ очищенного препарата RBD-Fc методом гель-электрофореза по Лэммли (*a*) и методом гель-фильтрации (*b*). Обозначения: М – маркеры молекулярной массы белков; no DTT – препарат RBD-Fc в невосстанавливающих условиях; –PNGase F и +PNGase F – препарат RBD-Fc в восстанавливающих условиях соответственно до и после обработки пептид-*N*-гликозидазой F.

Fig. 2. Analysis of the purified RBD-Fc by Laemmli gel-electrophoresis (*a*) and by gel-filtration (*b*). M – markers of protein molecular mass; no DTT – RBD-Fc under non-reducing conditions; –PNGase F and +PNGase F – RBD-Fc under reducing conditions, before and after the treatment with peptide *N*-glycosidase F, respectively.

Fc более пригодны для производства в промышленных масштабах и не требуют дополнительной очистки от примеси некорректно сформированного ковалентного димера.

Мы протестировали два варианта RBD: полно-размерный (с двумя сайтами *N*-гликозилирования) и укороченный с *N*-конца (с одним сайтом). Также использовали два варианта *N*-концевого сигнального пептида, который отщепляется при секреции рекомбинантного белка в культуральную среду и поэтому отсутствует в целевом продукте. В первом случае это нативный пептид S-белка SARS-CoV-2, во втором – сигнальный пептид тканевого активатора плазминогена человека: MDAMKRGLCCVLLLCGAVFVSA (рис. 1). Сконструированными плазмидами p1.1-Tr2-V-RBDv2-Fc (8114 п.н.), p1.1-Tr2-T-RBDv2-Fc (8138 п.н.), p1.1-Tr2-V-RBDv3-Fc (8078 п.н.) и p1.1-Tr2-T-RBDv3-Fc (8102 п.н.) трансфицировали клетки CHO и получали стабильные линии-продуценты, характеристики которых приведены в табл. 1.

В дальнейшей работе использовали тот вариант полипептида, который обеспечивал наибольшую продуктивность, то есть полноразмерный RBD, несущий нативный сигнальный пептид S-белка SARS-CoV-2 (V-RBDv2). Проводили двухстадийную амплификацию трансгенов в геноме клеток-продуцентов в присутствии возрастающих концентраций MTX и полученную поли-

клональную популяцию использовали для наработки целевого белка без клонирования клеток. Выделение RBD-Fc из кондиционированной среды проводили методом аффинной хроматографии. Конечный выход очищенного RBD-Fc составил 60 мкг с 1 мл культуральной среды.

Полученный препарат RBD-Fc анализировали методом гель-электрофореза по Лэммли (рис. 2*a*). Его подвижность в геле соответствовала молекулярной массе около 50 кДа в невосстанавливающих условиях и около 58 кДа в восстанавливающих, то есть в присутствии дитиотреитола. Это было вполне ожидаемо, так как RBD содержит 4 дисульфидных мостика, которые формируют более компактную пространственную структуру [17]. Электрофоретическая подвижность образца RBD-Fc, обработанного пептид-*N*-гликозидазой F, была больше, чем необработанного белка. Таким образом, получено прямое доказательство наличия *N*-гликанов в молекуле продуцируемого клетками CHO целевого белка. Методом аналитической гель-фильтрации молекулярная масса RBD-Fc была оценена как 147 кДа (рис. 2*b*), что соответствует димерной форме белка. Следовательно, RBD-Fc в физиологических условиях существует в форме нековалентного димера.

Иммуногенность очищенного RBD-Fc определяли по образованию специфических антител у

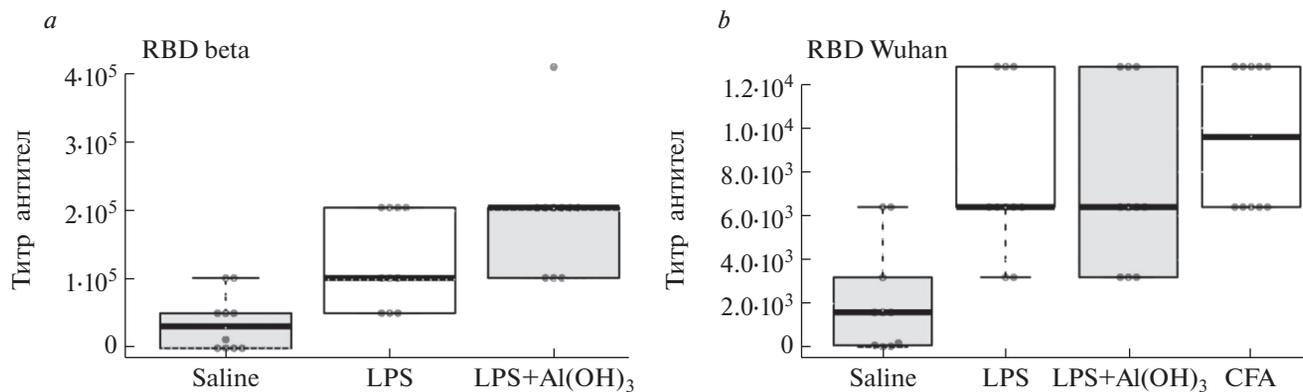


Рис. 3. Иммуноферментный анализ анти-RBD-антител IgG в сыворотках мышей, трижды иммунизированных RBD-Fc. Очищенный белок RBD-Fc вводили подкожно в физиологическом растворе (Saline), с липополисахаридом *Shigella flexneri* 2a (LPS), со смесью гидроксида алюминия и липополисахарида *Shigella flexneri* 2a (LPS+Al(OH)₃) или с полным адъювантом Фрейнда (CFA). Титры антител оценивали по связыванию с рекомбинантным RBD SARS-CoV-2 варианта beta (a) или Wuhan-Hu-1 (b).

Fig. 3. Enzyme-linked immunosorbent assay of anti-RBD IgG in mice sera after the triple immunization with RBD-Fc. The purified RBD-Fc was injected subcutaneously in a physiological saline solution (Saline), with *Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide (LPS), with a mixture of aluminium hydroxide and *Shigella flexneri* 2a lipopolysaccharide (LPS+Al(OH)₃), or with complete Freund's adjuvant (CFA). Antibody titers were evaluated by their binding to the recombinant RBD of the SARS-CoV-2 variant beta (a) or Wuhan-Hu-1 (b).

мышей. Использовали TLR-специфичный адъювант — LPS *S. flexneri* 2a [14] — в присутствии и в отсутствие стандартного носителя Al(OH)₃; в качестве положительного контроля использовали полный адъювант Фрейнда [18–20], в качестве группы сравнения — отсутствие адъюванта. Образование высокого титра анти-RBD-IgG регистрировали во всех группах мышей после третьего введения антигена (рис. 3). Хотя для иммунизации использовали RBD-Fc beta-варианта SARS-CoV-2, наблюдалась перекрестная реактивность: анти-RBD-антитела также взаимодействовали с RBD варианта Wuhan-Hu-1, хотя и с меньшей аффинностью.

Использование в качестве адъювантов LPS *S. flexneri* 2a и LPS *S. flexneri* 2a + Al(OH)₃ достоверно усиливало иммуногенность белка RBD-Fc: титры анти-RBD-антител были выше, чем в группе сравнения, и сходными с группой положительного контроля. Таким образом, при использовании RBD-Fc в качестве иммуногена LPS из *S. flexneri* 2a можно считать достаточно эффективным адъювантом, причем даже в отсутствие корпускулярного носителя Al(OH)₃. Последнее обстоятельство значительно упрощает технологический процесс наработки вакцины. Следует заметить, что высокий титр антител, индуцированный у мышей очищенным рекомбинантным белком RBD-Fc, подтверждает возможность его использования в качестве вакцинного антигена. Дальнейшая работа будет посвящена подбору оптимальной дозы антигена и адъювантной композиции.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа выполнена в рамках госзадания ФИЦ Биотехнологии РАН.

ЭТИЧЕСКИЕ НОРМЫ

Все экспериментальные процедуры с животными проводили в соответствии с Правилами исследовательской работы с лабораторными животными в Институте иммунологии ФМБА России (приказ от 12 ноября 2015 года), сертифицированными Локальным комитетом по этике (Резолюция 4/17 от 13 июля 2017 года).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МАТЕРИАЛ

Дополнительный материал доступен для зарегистрированных пользователей по адресу DOI: 10.56304/S0234275822060102.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yuan M., Liu H., Wu N.C., Wilson I.A. Recognition of the SARS-CoV-2 receptor binding domain by neutralizing antibodies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2021, 538, 192–203. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.10.012>
2. Min L., Sun Q. Antibodies and vaccines target RBD of SARS-CoV-2. *Front. Mol. Biosci.*, 2021, 8, 671633. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.671633>

3. Sun Y.S., Zhou J.J., Zhu H.P., Xu F., Zhao W.B., Lu H.J., Wang Z., Chen S.Q., Yao P.P., Jiang J.M., Zhou Z. Development of a recombinant RBD subunit vaccine for SARS-CoV-2. *Viruses*, 2021, 13(10), 1936. <https://doi.org/10.3390/v13101936>
4. Premkumar L., Segovia-Chumbez B., Jadi R., Martinez D.R., Raut R., Markmann A., Cornaby C., Bartelt L., Weiss S., Park Y., Edwards C.E., Weimer E., Scherer E.M., Rouphael N., Edupuganti S., Weiskopf D., Tse L.V., Hou Y.J., Margolis D., Sette A., Collins M.H., Schmitz J., Baric R.S., de Silva A.M. The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.*, 2020, 5(48), eabc8413. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc8413>
5. Sun S., He L., Zhao Z., Gu H., Fang X., Wang T., Yang X., Chen S., Deng Y., Li J., Zhao J., Li L., Li X., He P., Li G., Li H., Zhao Y., Gao C., Lang X., Wang X., Fei G., Li Y., Geng S., Gao Y., Wei W., Hu Z., Han G., Sun Y. Recombinant vaccine containing an RBD-Fc fusion induced protection against SARS-CoV-2 in nonhuman primates and mice. *Cell. Mol. Immunol.*, 2021, 18(4), 1070–1073. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00658-z>
6. Liu X., Drelich A., Li W., Chen C., Sun Z., Shi M., Adams C., Mellors J.W., Tseng C.T., Dimitrov D.S. Enhanced elicitation of potent neutralizing antibodies by the SARS-CoV-2 spike receptor binding domain Fc fusion protein in mice. *Vaccine*, 2020, 38(46), 7205–7212. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2020.09.058>
7. Chaouat A.E., Achdout H., Kol I., Berhani O., Roi G., Vitner E.B., Melamed S., Politi B., Zahavy E., Brizic I., Lenac Rovis T., Alfi O., Wolf D., Jonjic S., Israely T., Mandelboim O. SARS-CoV-2 receptor binding domain fusion protein efficiently neutralizes virus infection. *PLoS Pathog.*, 2021, 17(12), e1010175. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010175>
8. Czajkowsky D.M., Hu J., Shao Z., Pleass R.J. Fc-fusion proteins: new developments and future perspectives. *EMBO Mol. Med.*, 2012, 4(10), 1015–1028. <https://doi.org/10.1002/emmm.201201379>
9. Shajahan A., Supekar N.T., Gleinich A.S., Azadi P. Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*, 2020, 30(12), 981–988. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa042>
10. Casas-Sanchez A., Romero-Ramirez A., Hargreaves E., Ellis C.C., Grajeda B.I., Estevao I.L., Patterson E.I., Hughes G.L., Almeida I.C., Zech T., Acosta-Serrano A. Inhibition of protein N-glycosylation blocks SARS-CoV-2 infection. *mBio*, 2022, 13(1), e0371821. <https://doi.org/10.1128/mbio.03718-21>
11. Orlova N.A., Kovnir S.V., Hodak J.A., Vorobiev I.I., Gabibov A.G., Skryabin K.G. Improved elongation factor-1 alpha-based vectors for stable high-level expression of heterologous proteins in Chinese hamster ovary cells. *BMC Biotechnol.*, 2014, 14, 56. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-14-56>
12. Sinegubova M.V., Orlova N.A., Kovnir S.V., Dayanova L.K., Vorobiev I.I. High-level expression of the monomeric SARS-CoV-2 S protein RBD 320–537 in stably transfected CHO cells by the EEF1A1-based plasmid vector. *PLoS One*, 2021, 16(2), e0242890. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242890>
13. Kolesov D.E., Sinegubova M.V., Dayanova L.K., Dolzhikova I.V., Vorobiev I.I., Orlova N.A. 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)*, 2022, 12(2), 393. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12020393>
14. Ledov V.A., Golovina M.E., Markina A.A., Knirel Y.A., L'vov V.L., Kovalchuk A.L., Aparin P.G. Highly homogeneous tri-acylated S-LPS acts as a novel clinically applicable vaccine against *Shigella flexneri* 2a infection. *Vaccine*, 2019, 37(8), 1062–1072. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.12.067>
15. Guirakhoo F., Kuo L., Peng J., Huang J.H., Kuo B.S., Lin F., Liu Y.J., Liu Z., Wu G., Ding S., Hou K.L., Cheng J., Yang V., Jiang H., Wang J., Chen T., Xia W.G., Lin E., Hung C.H., Chen H.J., Shih Z., Lin Y.L., Wang S., Ryan V., Schurter B.T., Hu M.M., Heppner G., Malherbe D.C., Bukreyev A., Hellerstein M., Monath T.P., Wang C.Y. A novel SARS-CoV-2 multipeptide vaccine candidate is highly immunogenic and prevents lung infection in an AAV hACE2 mouse model and non-human primates. *bioRxiv*, 2020.11.30.399154. <https://doi.org/10.1101/2020.11.30.399154>
16. Wang C.Y., Hwang K.P., Kuo H.K., Peng W.J., Shen Y.H., Kuo B.S., Huang J.H., Liu H., Ho Y.H., Lin F., Ding S., Liu Z., Wu H.T., Huang C.T., Lee Y.J., Liu M.C., Yang Y.C., Lu P.L., Tsai H.C., Lee C.H., Shi Z.Y., Liu C.E., Liao C.H., Chang F.Y., Chen H.C., Wang F.D., Hou K.L., Cheng J., Wang M.S., Yang Y.T., Chiu H.C., Jiang M.H., Shih H.Y., Shen H.Y., Chang P.Y., Lan Y.R., Chen C.T., Lin Y.L., Liang J.J., Liao C.C., Chou Y.C., Morris M.K., Hanson C.V., Guirakhoo F., Hellerstein M., Yu H.J., King C.C., Kemp T., Heppner D.G., Monath T.P. A multipeptide SARS-CoV-2 vaccine provides long-lasting B cell and T cell immunity against Delta and Omicron variants. *J. Clin. Invest.*, 2022, 132(10), e157707. <https://doi.org/10.1172/JCI157707>
17. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*, 2020, 581(7807), 215–220. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2180-5>
18. Lu Y.C., Yeh W.C., Ohashi P.S. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 2008, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
19. Dubé J.Y., McIntosh F., Zarruk J.G., David S., Nigou J., Behr M.A. Synthetic mycobacterial molecular patterns partially complete Freund's adjuvant. *Sci. Rep.*, 2020, 10(1), 5874. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-62543-5>
20. Facciola A., Visalli G., Laganà A., Di Pietro A. An overview of vaccine adjuvants: current evidence and future perspectives. *Vaccines (Basel)*, 2022, 10(5), 819. <https://doi.org/10.3390/vaccines10050819>

Receptor-Binding Domain of SARS-CoV-2 Spike Protein Fused to a Non-Glycosylated Crystallizable Fragment of Human IgG1: Obtaining and Assessment of Immunogenicity

A. Yu. Ryazanova^{a, #}, Yu. A. Khodak^a, N. A. Orlova^a, M. V. Sinegubova^a, L. K. Dayanova^{a, b},
S. V. Kovnir^a, S. V. Korobova^c, V. A. Ledov^c, A. L. Kovalchuk^c, B. I. Alkhazova^c,
M. E. Golovina^c, I. I. Vorobiev^{a, b}, and P. G. Aparin^c

^a*Fundamentals of Biotechnology Federal Research Centre, Russian Academy of Sciences
(Research Center of Biotechnology RAS), Moscow, 119071 Russia*

^b*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

^c*NRC Institute of Immunology FMBA of Russia, Moscow, 115522 Russia*

[#]*e-mail: venel.ale@gmail.com*

Abstract—Variants of genetic constructs are discussed which encode the receptor-binding domain (RBD) of SARS-CoV-2 spike protein fused with a crystallizable fragment (Fc) of human immunoglobulin (RBD-Fc protein). The highest secretion level of the target protein by Chinese hamster ovary (CHO) cells was registered in the variant containing the S protein signal peptide and the full-length RBD with two N-glycosylation sites. We used two-stage genomic amplification to obtain an RBD-Fc-producing polyclonal cell line. The purified RBD-Fc protein was used for triple immunization of mice. High titers of anti-RBD-antibodies in blood sera of immunized mice (up to 1 : 195000 depending on the adjuvant) were shown by enzyme-linked immunosorbent assay. Thus, the possibility of using purified recombinant RBD-Fc as a potential immunogen for the development of an anti-SARS-CoV-2 vaccine has been confirmed.

Keywords: receptor-binding domain, spike protein, SARS-CoV-2, expression, CHO cells, immunogenicity, mice