

УДК 571.27:616-097

АНТИТЕЛА К N-КОНЦЕВОМУ ДОМЕНУ АНГИОТЕНЗИН-КОНВЕРТИРУЮЩЕГО ФЕРМЕНТА (ACE2) БЛОКИРУЮТ ЕГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С S БЕЛКОМ ВИРУСА SARS-CoV-2

© 2022 г. В. Г. Круть¹, И. В. Астраханцева¹, С. А. Чувпило¹, Г. А. Ефимов², С. Г. Амбарян¹, М. С. Друцкая^{1,3}, академик РАН С. А. Недоспасов^{1,3,*}

Поступило 10.10.2021 г.

После доработки 15.10.2021 г.

Принято к публикации 15.10.2021 г.

SARS-CoV-2 – новый коронавирус, который является причиной пандемии COVID-19. Для проникновения в клетку вирус использует взаимодействие поверхностного S белка с ангиотензин-конвертирующим ферментом 2 (ACE2) как основным рецептором на мембране клетки. Большинство защитных антител, в том числе индуцированных вакцинацией, специфичны к S белку, что препятствует его взаимодействию с ACE2 рецептором. Нами изучена альтернативная возможность блокировки взаимодействия S белка с ACE2 с помощью новых антипептидных антител, связывающих N-конец молекулы ACE2. Полученные антитела позволяют детектировать ACE2 человека *in vitro* и *ex vivo*.

Ключевые слова: COVID-19, пепломеры, пептиды, рецептор

DOI: 10.31857/S2686738922010012

Вирус SARS-CoV-2, массовая инфекция которой вызвала разрушительную пандемию – заболевание COVID-19, затронувшее и Россию [1], в качестве своего основного рецептора на клетках человека использует заякоренную на мембране протеазу – ангиотензин-конвертирующий фермент (ACE2). Пепломеры вириона, образованные мультимерами S белка, входят в контакт с ACE2 своими рецептор-связывающими доменами (RBD). Считается, что нейтрализующие антитела у переболевших и вакцинированных связываются именно с этими доменами на пепломерах вируса и предотвращают его взаимодействие с рецептором ACE2, а также вход вируса в клетку. В настоящей работе мы исследовали альтернативный способ разрушить взаимодействие вируса и рецептора с помощью антител к N-концевому домену ACE2 человека, вовлеченного в контакт с RBD.

На основании данных рентгеноструктурного анализа комплекса RBD-ACE2 [2, 3] был выбран 32-членный пептид (P1), включающий аминокислоты 19-50 последовательности ACE2 и имеющий выраженную конформацию альфа-спирали, который в составе ACE2 осуществляет несколько контактов с белками шипа коронавируса SARS-CoV-2. Этот пептид был химически синтезирован стандартным твердофазным методом и очищен высокоэффективной жидкостной хроматографией, а его последовательность была подтверждена масс-спектрометрией (данные не показаны). Параллельно был приготовлен вариант того же пептида, содержащий на N-конце флуоресцентную метку (5,6-карбоксифлуоресцеин (FAM)). Далее, немеченым 32-членным пептидом, не конъюгированным с белком-носителем, в полном адьюванте Фрейнда были иммунизированы 2 кролика, которые получили две инъекции пептида с интервалом в 21 день. Хотя полученные антитела являются поликлональными, мы предполагаем, что они распознают очень небольшое число близко расположенных линейных эпитопов на молекуле ACE2 человека, что делает их свойства, по сути, близкими к моноспецифическим антителам.

Через 40 дней после начала иммунизации антитела из сыворотки крови кроликов, в дальнейшем называемые aP1Ab, были очищены хроматографическим методом с помощью конъюги-

¹ Научно-технологический университет Сириус, Федеральная территория Сириус/Сочи, Россия

² Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

*e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com

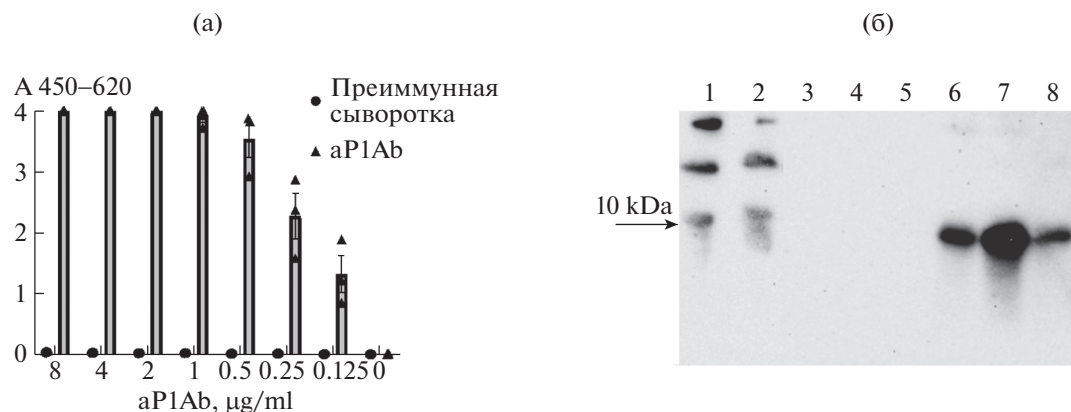


Рис. 1. Взаимодействие антител aP1Ab с фрагментами N-концевого участка белка ACE2. (а) Взаимодействие очищенных антител с пептидом P1, сорбированным на микропланшете (1 мкг/мл), в сравнении с преиммунной сывороткой кролика. Реакция была проявлена после добавления анти-кроличьих антител, меченных HRP, и ТМБ (тетраметилбензидин) субстрата при длинах волн 450–620 нм ($A_{450-620}$ — оптическая плотность образца). Эксперимент проводили в трех повторах, на рисунке представлены медиана \pm SEM. (б) Взаимодействие aP1Ab (1 мкг/мл) с фракциями очищенного белка P2 при анализе Вестерн-блот. 1 — бактериальный лизат, 2 — белки, не связавшиеся с колонкой, 3–5 — фракции после промывки колонки, 6–8 — элюат.

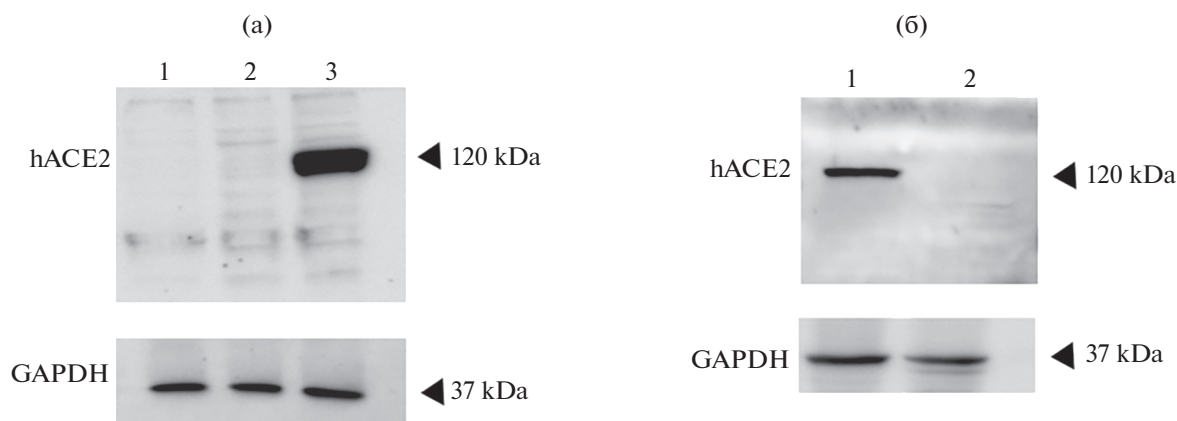


Рис. 2. Анализ экспрессии hACE2 в трансфицированных клетках линии HEK293T и в тканях трансгенных мышей методом Вестерн-блоттинга. (а) 1 — HEK293T (без трансфекции), 2 — HEK293T, трансфицированные p-Cre-hACE2-Kat (2.5 мкг), 3 — HEK293T, трансфицированные p-Cre-hACE2-Kat (2.5 мкг) + плазмидой, кодирующей Cre-рекомбиназу (0.75 мкг). (б) Белковый экстракт, выделенный из гомогената ткани кишечника: 1 — трансгенной мыши K18-hACE2 и 2 — мыши дикого типа C57Bl/6.

ванной с А-белком агарозы и испытаны в ИФА тесте с пептидным антигеном, использованным для иммунизации (рис. 1а). Кроме того, они были подвергнуты Вестерн-анализу с небольшим рекомбинантным белком P2, соответствующим N-концу ACE2 (аминокислоты 19–101) (рис. 1б). 6His-меченный белок P2 был клонирован в вектор pET-22(+), экспрессирован в *E. Coli* BL21 и очищен по стандартной методике с использованием металло-аффинной хроматографии (рис. 1б).

На этом этапе мы оценили антитела aP1Ab по способности детектировать ACE2 человека в клетках HEK293T, индуцибельно продуцирующих ACE2 в Cre-зависимой системе (рис. 2а), а также в тканях трансгенных мышей, экспресси-

рующих ACE2 человека под контролем эпителиального промотора K18 (рис. 2б) [4–7].

Отметим, что эпитопы для антител aP1Ab находятся далеко от положения активного центра ACE2 [8], и не должны интерферировать с ферментативной активностью этой протеазы, регулирующие многие аспекты физиологии сердечно-сосудистой системы.

Убедившись в чистоте и специфичности антител aP1Ab, мы приступили к проверке нашей гипотезы о возможности альтернативной блокировки взаимодействия S белка SARS-CoV-2 и ACE2. Рекомбинантный полноразмерный 6His-меченный S белок был экспрессирован в эукариотической системе Expi293F (Thermo) и очищен с

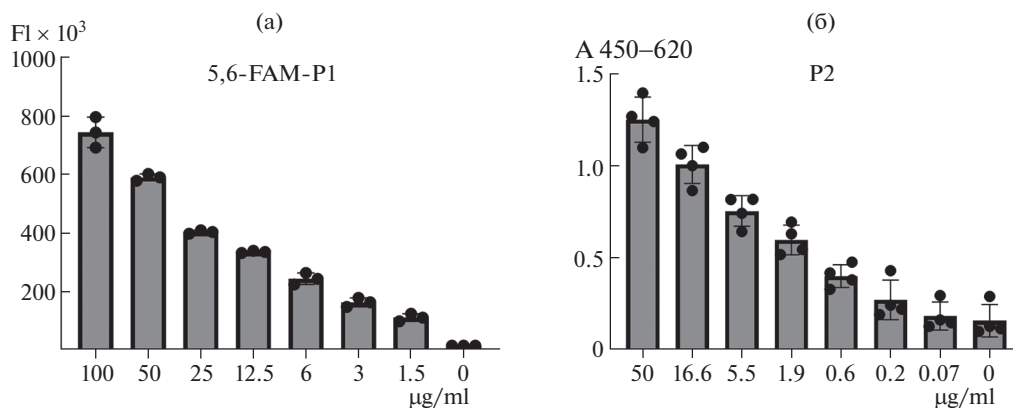


Рис. 3. Взаимодействие фрагментов ACE2 с S белком вируса SARS-CoV-2. (а) Интенсивность флуоресценции (FI: возбуждение – 483 нм, эмиссия – 530 нм) измеряли после инкубации пептида 5,6-FAM-P1 в течение 1 ч при комнатной температуре на микропланшете с сорбированным S белком (1 мкг/мл). (б) Оптическую плотность (A 450–620) оценивали после инкубации белка P2 в различных концентрациях на микропланшете с сорбированным S белком. aP1Ab были использованы в качестве первичных антител (1 мкг/мл). Реакцию проявляли после добавления анти-кроличьих антител, меченных HRP, и ТМБ в качестве субстрата. Все эксперименты проводили в трех повторах, на рисунке представлены медиана \pm SEM.

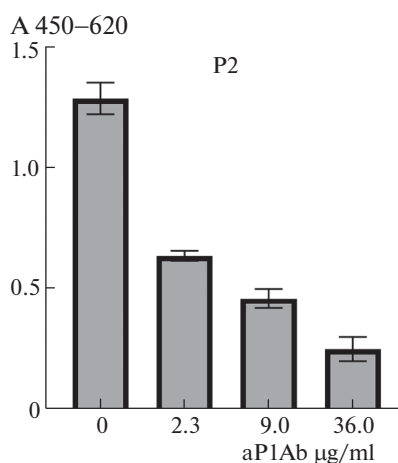


Рис. 4. Дозозависимая блокировка взаимодействия фрагмента ACE2 с S белком вируса SARS-CoV-2. Белок P2 (200 нг/мл) предварительно инкубировали с aP1Ab в различных концентрациях при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем комплекс P2-aP1Ab добавляли в микропланшет с сорбированным полноразмерным S белком (1 мкг/мл). Оптическую плотность (A 450–620) оценивали после инкубации с анти-His-HRP антителами и ТМБ в качестве субстрата. Все эксперименты проводили в трех повторах, на рисунке представлены медиана \pm SEM.

помощью металло-аффинной хроматографии. Сорбированный на подложке S белок специфически связывал как 5,6-FAM-меченный пептид P1 (рис. 3а), так и белок P2 (рис. 3б).

Добавление в систему антител aP1Ab приводило к дозозависимой блокировке взаимодействия S белка SARS-CoV-2 и белка P2 (рис. 4), соответствующего N-концу ACE2, что согласуется с нашей гипотезой.

Каково возможное клиническое значение наших результатов? Во-первых, в большинстве существующих (прошедших испытания и одобренных к применению) профилактических вакцинах

иммуногеном является оригинальный Уханьский вариант S белка вируса SARS-CoV-2. Иммунный (антительный) ответ на RBD S белка вируса, индуцированный вакцинацией, может быть неэффективен в отношении новых вариантов вируса [9], по-прежнему способных эффективно связываться с ACE2. Действительно, структура ACE2, являющегося рецептором всех вариантов вируса SARS-CoV-2, остается неизменной, поэтому антитела к той части молекулы ACE2, которая взаимодействует с RBD S белка вириона, могут блокировать любые варианты вируса (рис. 5). Отметим, что вирус, который вследствие мутаций

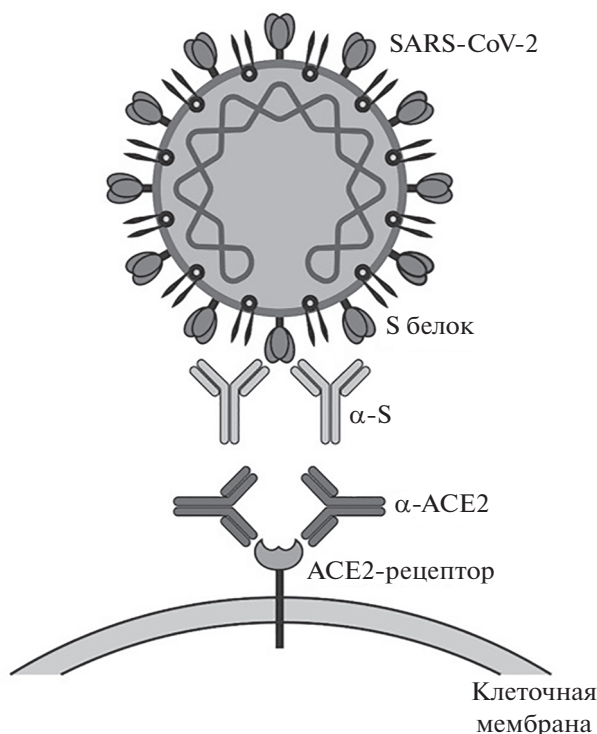


Рис. 5. Два типа антител, разрушающих взаимодействие S белка вируса SARS-CoV-2 и рецептора ACE2. Как антитела против RBD S белка вируса (светлые), так и антитела к взаимодействующему с RBD N-концевому домену ACE2 (темные), могут препятствовать входу вируса в клетку с использованием этого рецептора.

утратил способность связываться с ACE2 человека, теряет возможность входа в клетку с использованием этого рецептора.

Во-вторых, в литературе [10] описаны аутоантитела к ACE2 у людей, но расположение распознаваемых эпитопов на молекуле ACE2 не было определено. На основании наших результатов можно предположить, что некоторые индивидуумы с аутоантителами к собственному ACE2 могут обладать повышенной резистентностью к инфекции широким спектром вариантов SARS-CoV-2 (рис. 5). Эта интересная гипотеза может быть экспериментально проверена в будущем.

ИСТОЧНИКИ ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование поддержано АНО Научно-технологический университет Сириус и грантом РФФИ № 20-04-60338.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарят Р. Абагяна и А. Круглова за советы и обсуждения, Н. Позднякову и В. Гоголеву за помощь с иммунизацией, А.В. Филатова за предоставление реагентов, М. Носенко, М. Жмака, А. Шумеева и Р. Зварцева за содействие. В работе использовалось оборудование ресурсных центров «Клеточная биоло-

гия и иммунология» и «Биотехнологические продукты» АНО Научно-технологического университета Сириус.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bobik T.V., Kostin N.N., Skryabin G.A., et al. COVID-19 in Russia: Clinical and Immunological Features of the First-Wave Patients. // *Acta Naturae*. 2021. V. 13. № 1. P. 102–115.
2. Shang J., Ye G., Shi K., et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. // *Nature*. 2020. V. 581. P. 221–224.
3. Yan R., Zhang Y., Li Y., et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2. // *Science*. 2020. V. 367. P. 1444–1448.
4. Zheng J., Wong L.R., Li K., et al. COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE2 mice. // *Nature*. 2021. V. 589. P. 603–607.
5. Yinda C.K., Port J.R., Bushmaker T., et al. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19. // *PLoS Pathog.* 2021. V. 17. № 1. e1009195.
6. Liu X., Zaid A., Freitas J.R., et al. Infectious Clones Produce SARS-CoV-2 That Causes Severe Pulmonary Disease in Infected K18-Human ACE2 Mice. // *mBio*. 2021. V. 12. № 2. P. 1–10.
7. Oladunni F.S., Park J.G., Pino P.A., et al. Lethality of SARS-CoV-2 infection in K18 human angiotensin-

- converting enzyme 2 transgenic mice. // *Nat Commun.* 2020. V. 11. P. 6122–6139.
8. *Turner A.J., Tipnis S.R., Guy J.L., et al.* ACEH/ACE2 is a novel mammalian metalloprotease and a homologue of angiotensin-converting enzyme insensitive to ACE inhibitors. // *Can J Physiol Pharmacol.* 2002. V. 80. P. 346–353.
9. *Chen R.E., Zhang X., Case J.B., et al.* Resistance of SARS-CoV-2 variants to neutralization by monoclonal and serum-derived polyclonal antibodies. // *Nat Med.* 2021. V. 27. P. 717–726.
10. *Takahashi Y., Haga S., Ishizaka Y., et al.* Autoantibodies to angiotensin-converting enzyme 2 in patients with connective tissue diseases. // *Arthritis Res Ther.* 2010. V. 12. № 3. P. 1–8.

ANTIBODIES TO THE N-TERMINAL DOMAIN OF ANGIOTENSIN-CONVERTING ENZYME (ACE2) THAT BLOCK ITS INTERACTION WITH SARS-CoV-2 S PROTEIN

V. G. Krut^a, I. V. Astrakhantseva^a, S. A. Chuvpilo^a, G. A. Efimov^b, S. G. Ambaryan^a, M. S. Drutskaya^{a,c}, and Academician of the RAS S. A. Nedospasov^{a,c,#}

^a *Sirius University of Science and Technology, Federal Territory Sirius/Sochi, Russian Federation*

^b *National Medical Research Center of Hematology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

^c *V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: sergei.nedospasov@gmail.com*

SARS-CoV-2 is a new coronavirus that is the cause of COVID-19 pandemic. To enter the cell, the virus interacts via its surface S protein with angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2), the main entry receptor on the cell membrane. Most of protective antibodies, including those induced by vaccinations, target the S protein, preventing its interaction with the ACE2 receptor. We have evaluated an alternative strategy for blocking the S-ACE2 interaction using new antipeptide antibodies to the N-terminus of the ACE2 molecule. These antibodies allow detection of human ACE2 in vitro and ex vivo.

Keywords: COVID-19, peplomers, peptides, receptor