УДК 578:612.017.1, 612.017.1:616-097, 677.112.34:579.255
№ держреєстрації 0120U104112
Інв. № _____

Національна Академія Наук України
Інститут біології клітини (ІБК)

79005 м. Львів вул. Драгоманова 14/16; тел..(0322)2612163; факс 72-16-48

ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор Інституту біології
клітини НАН України

_____ Сибірний А.А.
«16» грудня 2021 р.

ЗВІТ

про науково-дослідну роботу
за **проєктом з виконання наукових досліджень і розробок № 2020.01/0080**
РОЗРОБКА ВАКЦИНИ ПРОТИ SARS-COV-2 НА ОСНОВІ ЕКСПРЕСІЇ ФРАГМЕНТІВ БІЛКА S У ДРІЖДЖІВ ТА ВИВЧЕННЯ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ У ЛАБОРАТОРНИХ ТВАРИН
грантова підтримка «Національного фонду досліджень України»
у межах конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»

(остаточний)

Науковий керівник НДР
д.б.н., проф., академік НАН України _____ А.А. Сибірний

2021

Результати роботи розглянуто Вченою Радою ІБК НАН України, протокол від 14 грудня 2021 р. № 13

Керівник НДР,

Директор ІБК НАН України,
д.б.н., професор, академік НАН України — Сибірний А. А.
(вступ; розділ 1; висновки)

Виконавці:

пров. н. с. ІБК НАН України,
д.б.н., професор — Федорович Д. В.
(підрозділи 2.1-2.11)

заступник директора з наукової роботи
ІБК НАН України, д.б.н. — Дмитрук К. В.
(реферат; підрозділи 2.12-2.18)

н. с. ІБК НАН України, к.б.н. — Фаюра Л. Р.
(підрозділи 2.19-2.21)

н. с. ІБК НАН України, к.б.н. — Семків М. В.
(підрозділи 3.1, 3.6, 3.8)

м. н. с. ІБК НАН України — Василишин Р. В.
(підрозділи 3.2-3.4)

інженер ІБК НАН України — Зазуля А. З.
(підрозділи 3.5, 3.7)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 82 с., 20 рис., 55 джерел.

Об'єкт дослідження: кількісний та якісний аналіз експресованих у дріжджах фрагментів білка «шипа» S1 та S2 вірусу SARS-CoV-2, а також вірусоподібних частинок SARS-CoV-2, та оцінка їх здатності викликати імунну відповідь у лабораторних тварин.

Мета дослідження: розробити вакцину, що захищає від інфекції SARS-CoV-2 шляхом експресії фрагментів вірусного білка S1 та S2 у штамів дріжджів (*K. phaffii, O. polymorpha*) з «гуманізованим» типом глікозилювання білка, а також отримати вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 у дріжджах.

Методи дослідження: генно-інженерні, мікробіологічні, біохімічні, біоінформатичного аналізу.

В результаті виконання НДР на основі «гуманізованого» штаму дріжджів *K. phaffii* отримано колекцію трансформантів, що містять в своєму геномі касети експресії фрагментів субодиниць S1 та S2 глікопротеїна «шипа» SARS-CoV-2 під контролем промотора гена *AOX1 K. phaffii*, що індукується метанолом. Серед фрагментів «шипа» представлено наступні варіанти: RBD, NTD-RBD, FP-HR1-HR2 та NTD-RBD-FP-HR1-HR2. Кожен варіант на С-кінці містить домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та 6-His послідовність, що необхідна для металоафінного очищення цільових білків. Кожен з варіантів було додатково представлено у двох версіях, з наявним або відсутнім N-кінцевим сигналом секреції – α-фактором. Також сконструйовано штами з посиленою експресією RBD, на основі «гуманізованого» штаму дріжджів *O. polymorpha* з присутнім α-фактором або без нього. Встановлено, що фрагменти «шипа» з N-кінцевим α-фактором не здатні до секреції в культуральне середовище як на основі дріжджів *K. phaffii* так і *O. polymorpha*. Тому сконструйовано додаткові штами *K. phaffii* та *O. polymorpha*, що експресують RBD без доменів тримеризації та ад'юванту, що ймовірно, можуть мати негативний вплив на здатність білків секретуватись у середовище. Проте, у сконструйованих штамів *K. phaffii* з RBD без додаткових доменів, секреції цільового білка не спостерігали. За допомогою Вестерн-блот аналізу

встановлено, що цільові білки акумулюються в нерозчинній мембранній фракції безклітинних екстрактів. Для виділення відповідних білків було використано низку детергентів, включаючи лаурил саркозінат натрію, додецилсульфат натрію, сечовину, гуанідин гідрохлорид, тощо. Виділення цільових білків з нерозчинної фракції безклітинних екстрактів відбувалось з найбільшою ефективністю із застосуванням гуанідин гідрохлориду. Очистку білків проводили за допомогою металоафінної хроматографії з використанням нікель-сефарози. У значних кількостях вдалося отримати лише фрагмент RBD без доменів тримеризації та ад'юванту, білки більшого розміру отримані в менших концентраціях.

Оскільки процес очищення білків з нерозчинних мембранних фракцій виявився низькоефективним, було також сконструйовано штами *K. phaffii* та *O. polymorpha*, що продукують RBD з фланкуючими лінкерними ділянками, багатими на амінокислоти гліцин та серин. Цей варіант RBD секретується у культуральне середовище і може бути легко очищений без використання детергентів.

Також сконструйовано декілька варіантів рекомбінантних штамів *K. phaffii*, що містять NTD-RBD фрагмент S білка, M- та E-білки SARS-CoV2 і малий S білок (dS, білок риштування) вірусу гепатиту качки для збирання в подальшому вірусоподібних частинок SARS-CoV2. Встановлено, що білки – компоненти вірусоподібних часточок, залишаються в дріжджовій клітині, незалежно від наявності сигналу секреції. Електронна мікроскопія показала наявність в клітинах дріжджів структур розміром близько 20 нм, що можуть бути вірусоподібними часточками. З таких дріжджових клітин було отримано ацетонові порошки та зразки з інактивованими прогріванням клітинам з подальшою ліофілізацією.

Проведено експерименти на мишах, для оцінки переносимості та імуногенності внутрішньочеревного введення очищених білків та інактивованих клітин або ацетонових порошків, що містять компоненти вірусоподібних частинок. Показано, що ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму

№21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 та ліофілізовані клітини дріжджів *K. phaffii* штаму №21 є безпечними для піддослідних тварин, та викликають виражену індукцію імунної відповіді у піддослідних мишей. При аналізі рівнів імуноглобуліну IgG в сироватках крові лабораторних мишей показано, що найвище і найбільш статистично значуще підвищення рівня IgG виникало у випадку введення препаратів білка, очищеного з клітин штаму №5 (FP-HR1-HR2), а також ацетонових порошків з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2. Крім того, високі рівні IgG були відзначені для препаратів білків, отриманих зі клітин штамів, що продукують фрагменти RBD, NTD-RBD, RBD без доменів тримеризації та ад'юванту, з культуральної рідини штамів, що продукують секреторну форму RBD з фланкуючими лінкерними ділянками, багатими на амінокислоти гліцин та серин, а також для препарату з ліофілізованих клітин штаму №21 дріжджів *K. phaffii*, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2.

Також проведено експерименти на клітинній лінії Vero із зараженням її вірусом SARS-CoV2. Препарат білка FP-HR1-HR2, очищеного з клітин рекомбінантного штаму *K. phaffii* №5 та ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2, забезпечували часткове пригнічення цитопатичного ефекту (CPE), спричиненого вірусом SARS-CoV-2.

Ключові слова: SARS-COV-2, ВАКЦИНА, РЕКОМБІНАНТНІ БІЛКИ, ДРІЖДЖІ, «ГУМАНІЗОВАНІ» ШТАМИ ДРІЖДЖІВ, *K. PHAFFII*, *O. POLYMORPHA*, БІЛОК «ШИПА», РЕЦЕПТОР-ЗВ'ЯЗУВАЛЬНИЙ ДОМЕН, ТЕРАПЕВТИЧНІ ПЕПТИДИ.

ABSTRACT

Report: 82 pages, 20 figures, 55 references.

Object of research: quantitative and qualitative analysis of S1 and S2 spike protein fragments of SARS-CoV-2 virus and SARS-CoV-2 virus-like particles expressed in yeast, and evaluation of their ability to elicit an immune response in laboratory animals.

The purpose of the study: to develop a vaccine that protects against SARS-CoV-2 infection by expressing fragments of viral protein S1 and S2 in yeast strains (*K. phaffii*, *O. polymorpha*) with a "humanized" type of glycosylation of the proteins, and to obtain virus-like particles of SARS-CoV-2 in yeast.

Research methods: genetic engineering, microbiological, biochemical, bioinformatics analysis.

Based on the "humanized" strain of yeast *K. phaffii*, a collection of transformants was obtained, containing cassettes for expression of fragments of subunits S1 and S2 of the spike glycoprotein of SARS-CoV-2 under the control of the methanol-inducible promoter of the gene *AOX1 K. phaffii*. Among the fragments of the spike protein are the following variants: RBD, NTD-RBD, FP-HR1-HR2 and NTD-RBD-FP-HR1-HR2. Each variant contains on C-terminus a fibritin protein trimerization domain, an immunological adjuvant (hIgG1-Fc2), a TEV protease site, and a 6-His sequence required for metal-affinity purification of the target proteins. Each of the variants was presented in two versions, with or without the N-terminal secretion signal – α-factor. Recombinant strains with RBD domain expression with or without α-factor were also obtained based on a "humanized" yeast strain of *O. polymorpha*. It was found that fragments of spike protein with N-terminal α-factor are not secreted into the culture medium in the recombinant *K. phaffii* and *O. polymorpha* strains. Therefore, strains of *K. phaffii* and *O. polymorpha* have been constructed that express RBD without additional trimerization and adjuvant domains, which could have a negative effect on the ability of proteins to be secreted from the cells. However, in the newly constructed strains of *K. phaffii* the secretion of the target protein fragments also was not observed. Western blot analysis revealed that the target proteins accumulated in the insoluble

membrane fraction of cell-free extracts. A number of detergents have been used to extract the proteins from this fraction, including sodium lauryl sarcosinate, sodium dodecyl sulfate, urea, guanidine hydrochloride etc. Extraction of target proteins from the insoluble fraction of cell-free extracts was most effective with guanidine hydrochloride. Purification of proteins was performed by metal affinity chromatography using Nickel-Sepharose. Only RBD fragment without trimerization and adjuvant domains was obtained in significant quantities, whereas larger proteins were obtained in lower concentrations.

Because the process of purification of proteins from insoluble membrane fractions was found to be inefficient, recombinant strains of *K. phaffii* and *O. polymorpha* were also constructed that produce RBD with flanking linker regions rich in the amino acids glycine and serine. This variant of RBD is secreted into the culture medium and can be easily purified without the use of detergents.

Several variants of recombinant strains of *K. phaffii* were constructed containing NTD-RBD fragment of S protein, M- and E-proteins of SARS-CoV2 and small S protein (dS, scaffolding protein) of duck hepatitis virus for further assembling of SARS-CoV2 virus-like particles. It was found that proteins - components of virus-like particles, remain in the yeast cell, regardless of the presence of a secretion signal. Electron microscopy showed the presence in yeast cells of structures about 20 nm in size, which may be virus-like particles. Acetone powders and samples of cells inactivated by heating followed by lyophilization were obtained from such strains.

Experiments were performed on mice to assess the tolerability and immunogenicity of intra-abdominal administration of purified proteins and inactivated cells or acetone powders containing components of virus-like particles. Acetone powders from *K. phaffii* yeast cells of strain №21 containing SARS-CoV-2 virus-like particles and lyophilized yeast cells of *K. phaffii* strain №21 have been shown to be safe for experimental animals and to cause a pronounced induction of immune responses in mice. The analysis of IgG immunoglobulin levels in the sera of laboratory mice showed that the highest and most statistically significant increase in IgG levels occurred in the case of administration of protein, purified from cells of strain №5 (FP-

HR1-HR2), and acetone powders from yeast cells of *K phaffii* strain №21 containing SARS-CoV-2 virus-like particles. In addition, high levels of IgG were observed for protein preparations obtained from cells of strains producing fragments of RBD, NTD-RBD, RBD without trimerization domains and adjuvant, from the culture fluid of strains producing secretory form of RBD with flanking linker regions, rich in amino acids glycine and serine, as well as for the preparation of lyophilized cells of strain №21 *K. phaffii,* containing virus-like particles SARS-CoV-2.

Experiments were also performed on the Vero cell line with SARS-CoV2 virus infection. The preparation of FP-HR1-HR2 protein purified from cells of recombinant strain *K. phaffii* №5 and acetone powders from yeast cells *K. phaffii* strain №21 containing SARS-CoV-2 virus-like particles provided partial inhibition of cytopathic effect (CPE), caused by SARS-CoV-2 virus.

Key words: SARS-COV-2, VACCINE, RECOMBINANT PROTEINS, YEAST, "HUMANIZED" YEAST STRAINS, *K. PHAFFII, O. POLYMORPHA*, SPIKE PROTEIN, RECEPTOR-BINDING DOMAIN, THERAPEUTIC PEPTIDES.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ 11
ВСТУП 13
1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД 14
1.1 Загальна характеристика коронавірусу SARS-CoV-2 15
1.2 Розробка вакцини проти SARS-CoV-2 17
1.3 Вірусоподібні частинки як потенційна вакцина 19
1.4 Терапевтичні білки-інгібітори злиття вірусів з клітинами 20
2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ 22
2.1 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) 22
2.2 Рестрикційний аналіз ДНК 22
2.3 Дефосфорилювання 23
2.4 Електрофорез ДНК в агарозному гелі 23
2.5 Елюція фрагментів ДНК з гелю 23
2.6 Очистка ДНК з суміші ферментів 24
2.7 Виділення плазмідної ДНК з клітин *E. coli* 24
2.8 Лігування фрагментів ДНК 25
2.9 Електротрансформація клітин *E. coli* 26
2.10 Електротрансформація дріжджів *O. polymorpha* 26
2.11 Електротрансформація дріжджів *K. phaffii* 27
2.12 Довготривале зберігання бактерійних та дріжджових трансформантів 28
2.13 Вестерн-блот аналіз 28
2.14 Очистка білків за допомогою металоафінної хроматографії 29
2.15 Отримання біомаси клітин дріжджів 29
2.16 Отримання препаратів ліофілізованих клітин дріжджів 30
2.17 Отримання ацетонових порошків клітин дріжджів 30
2.18 Діаліз білків 31
2.19 Отримання нерозчинних фракцій клітин 31

2.20 Утримання лабораторних мишей та спосіб введення їм досліджуваних речовин 31
2.21 Визначення рівня імуноглобуліну IgG в сироватці крові лабораторних мишей 32
3.РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ 34
3.1. Створення векторів для експресії різних фрагментів генів SARS-CoV-2 34
3.2. Введення отриманих нуклеотидних послідовностей в «гуманізовані» штами дріжджів 42
3.3. Біохімічна характеристика рекомбінантних штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha*, що продукують фрагменти S білка 48
3.4 Очищення фрагментів S білка з клітин рекомбінантних штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha* або з культуральної рідини 54
3.5 Біохімічна характеристика рекомбінантних штамів *K. phaffii,* що продукують компоненти вірусоподібних частинок 60
3.6 Дослідження реакції експериментальних тварин на внутрішньочеревне введення інактивованих клітин або ацетонових порошків, що містять компоненти вірусоподібних частинок або RBD 63
3.7 Визначення рівня імуноглобуліну IgG у сироватці крові мишей після внутрішньочеревного введення очищених фрагментів RBD чи інактивованих клітин або ацетонових порошків, що містять компоненти вірусоподібних частинок 68
3.8 Аналіз противірусної активності мишачих імуноглобулінів проти вірусу SARS-CoV-2 70
ВИСНОВКИ 75
ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ 78

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ACE2 – **a**ngiotensin-**c**onverting **e**nzyme 2 – ангіотензинперетворювальний фермент 2 (синонім АПФ2)

AOX1 – **a**lcohol **ox**idase – ген, що кодує алкогольоксидазу

ApE – **A** **p**lasmid **E**ditor – програма для роботи з нуклеотидними послідовностями

COVID-2019 – **co**rona**vi**rus **d**isease 2019 – коронавірусна хвороба 2019

DTT – дитіотреітол

ELISA – Enzyme-**L**inked **I**mmunosorbent **A**ssay – ферментний імуносорбентний аналіз

FCoV – **f**eline **co**rona**v**irus – коронавірус котів

FP – **f**usion **p**eptide – пептид злиття

HCoV-229E – **h**uman **co**rona**v**irus – коронавірус людей

HEPES – 4-(2-**h**ydroxy**e**thyl)-1-**p**iperazine**e**thane**s**ulfonic acid – буфер

HR1, HR2 – **h**eptad **r**epeat 1, 2 – гептані повтори 1, 2

MERS-CoV – **M**iddle **E**ast **r**espiratory **s**yndrome **co**rona**v**irus – коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому

MHV – **M**ouse **H**epatitis **V**irus – вірус мишачого гепатиту

NCBI – **N**ational **C**enter for **B**iotechnology **I**nformation – національний центр біотехнологічної інформації

OD – optical **d**ensity, оптична густина

PEG – **p**oly**e**thylene **g**lycol – поліетиленгліколь

RBD – **r**eceptor **b**inding **d**omain – рецептор-зв'язувальний домен

SARS-CoV-1 – **s**evere **a**cute **r**espiratory **s**yndrome **co**rona**v**irus – коронавірус, що спричиняє важкий гострий респіраторний синдром

SARS-CoV-2 – **s**evere **a**cute **r**espiratory **s**yndrome **co**rona**v**irus 2

SDS – додецилсульфат натрію

$TCID_{50}$ – Median **T**issue **C**ulture **I**nfectious **D**ose – доза вірусу, при якій гине половина клітин в культурі

VLP – **v**irus-**l**ike **p**articles – вірусоподібні частинки

АПФ2 – **а**нгіотензин**п**еретворювальний **ф**ермент 2 (синонім ACE2)

ВІЛ – **в**ірус **і**мунодефіциту **л**юдини

ВПЛ – **в**ірус **п**апіломи **л**юдини

дНТФ – **д**езокси**н**уклеотид**т**ри**ф**осфати

ЕДТА – **е**тилен**д**іамін**т**етра**а**цетат, динатрієва сіль

ПЛР – **п**олімеразна **л**анцюгова **р**еакція

СНІД – **с**индром **н**абутого **і**мунодефіциту **л**юдини

об/хв – **об**ертів за **хв**илину

т.п.н. – **т**исяч **п**ар **н**уклеотидів

2019-nCoV – синонім SARS-CoV-2

ВСТУП

COVID-2019 – це вірусне респіраторне захворювання, що спричинило глобальну пандемію. Збудником інфекції є коронавірус SARS-CoV-2. Розроблено багато видів вакцини проти SARS-CoV-2, зокрема, вакцини з використанням рекомбінантних вірусних білків (найчастіше S-білка). Для виробництва вакцин на основі S-білка, використовуються клітини ссавців або комах, що здорожує цей процес.

Ідея даної роботи полягає у клонуванні послідовностей субодиниць S1 та S2 S-білка SARS-CoV-2 та їх експресії у «гуманізованих» штамах дріжджів *Komagataella phaffii* та *Ogataea polymorpha* для розробки ефективної вакцини. В процесі виконання роботи клоновано та експресовано різні фрагменти S-білка: RBD, NTD-RBD, FP-HR1-HR2 та NTD-RBD-FP-HR1-HR2 з та без α-фактора (сигналу секреції). За рахунок використання «гуманізованих» дріжджів, глікозилювання вірусних білків у клітинах дріжджів відбувається подібно до клітин людини. Також, використання дріжджів суттєво знижуватиме вартість вакцини у порівнянні з її продукцією в культурах клітин комах або ссавців. Встановлено, що експресовані фрагменти S-білка, незалежно від наявності сигналу секреції, локалізувалися в нерозчинній мембранній фракції, тому для їх екстракції використовувалися різноманітні детергенти. Екстраговані білки було очищено за допомогою металоафінної хроматографії. Також, в процесі виконання проєкту отримано і секретовану форму RBD фрагменту S-білка.

Іншим завданням даного проєкту було конструювання рекомбінантих штамів дріжджів, які накопичують вірусоподібні частинки SARS-CoV-2. Було сконструйовано дріжджові штами, що продукують білки SARS-CoV-2 E і M, фрагмент S-білка (NTD-RBD), а також малий білок гепатиту качки dS, який може слугувати каркасом для збирання вірусоподібної частинки. З культури клітин цих рекомбінантних штамів було отримано ацетонові порошки, а також зразки з інактивованими прогріванням та ліофілізованими клітинами. Всі згадані зразки було використано для експериментах на лабораторних мишах та клітинній лінії Vero.

1. АНАЛІТИЧНИЙ ОГЛЯД

COVID-2019 – це респіраторне вірусне захворювання, яке спричинило світову пандемію, з 203 мільйонами підтверджених випадків захворювання та більше 4 мільйонів летальних випадків. Ідентифіковано збудника інфекції, який викликає COVID-2019 [1]. Ним виявився коронавірус, подібний на раніше описаний коронавірус SARS-CoV, тому його було названо SARS-CoV-2 [2]. Геномом віруса є велика одноланцюгова молекула РНК, що кодує декілька відкритих рамок зчитування. Основні відкриті рамки зчитування кодують структурні білки віруса, а саме білок шипа (S), мембрани (M), оболонки (E) та нуклеокапсиду (N). Одним з найважливіших є білок шипа (S-білок), злитий глікопротеїн класу I, який опосередковує приєднання вірусу до рецепторів клітинної поверхні з його подальшим поглинанням в ендосоми. S-білок є гомотримером, а кожен мономер складається з 2 субодиниць, S1 і S2. Субодиниця S1 містить рецептор-зв’язувальний домен (RBD), який зв'язується з ангіотензинперетворювальним ферментом 2 АПФ2 (рецептор ACE2) людини і таким чином проникає в клітину людини [3]. Геном SARS-CoV-2 розшифрований і є загальнодоступним [4]. Пандемія COVID-19 інтенсивний пошук засобів захисту від інфекції. Запобігти поширенню інфекції можна шляхом карантину або вакцинації. Розробка ефективної вакцини є важливим кроком на шляху подолання пандемії COVID-19. Для коронавірусів SARS-CoV-1 і MERS-CoV проводилися роботи по розробці вакцин, які базувалися на використанні білка «шипа» S. Цей білок через рецептор-зв’язувальний домен взаємодіє з рецептором клітин; таким чином антитіла, що зв’язуються з S-білком, можуть перешкоджати приєднанню вірусу до рецептора та його проникненню в клітину [5, 6]. Подібний антиген – субодиницю S1 S-білка з відповідними RBD-послідовностями – можна використовувати і для вакцини проти SARS-CoV-2 [7]. Вакцини на основі S-білка, на даний час розробляються кількома компаніями, такими як Novavax, Sanofi Pasteur, Clover тощо [8], але для цього використовуються в основному клітини ссавців або комах, що значно здорожує

процес виробництва. Окрім RBD, інші фрагменти S-білка, зокрема пептид злиття (FP) та ділянки гептадних повторів (HR) можуть бути хорошими мішенями для отримання нейтралізуючих антитіл. Показано, що множинні пептиди на основі ділянок гептадних повторів (HR1 та HR2) пригнічують проникнення в клітину SARS-CoV-1 [9]. Також в якості вакцини можна використовувати вірусоподібні частинки, які ніхто не пропонував для SARS-CoV-1 та MERS-CoV раніше, оскільки отримання таких вірусоподібних частинок вимагає тривалого часу. Всі ці питання будуть більш детально розглянуті у наступних розділах аналітичного огляду.

1.1 Загальна характеристика коронавірусу SARS-CoV-2

У грудні 2019 року в китайській провінції Хубей почався спалах пневмонії невідомого походження. Після численних досліджень, як причину захворювання ідентифіковано SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) – новий коронавірус, що спричиняє важкий гострий респіраторний синдром. Китайські вчені хворобу охрестили "коронавірус-19" (COVID-19) [10, 11]. Захворювання на COVID-19 протікає з різною важкістю: від безсимптомного або легкого протікання до важких симптомів та смерті. Загалом, симптоми включають кашель, лихоманку та задишку. Іншими зареєстрованими проявами хвороби є слабкість, біль у м’язах, біль у горлі, втрата відчуття смаку та/або запаху [12].

SARS-CoV-2 належить до групи коронавірусів. Коронавірус людини вперше був виділений із носових виділень хлопчика із застудою в 1965 р. Тайреллом та Байно [13]. Через те, що вигляд вірусу під електронним мікроскопом нагадував сонячну корону, його було названо коронавірусом. Такий вигляд зумовлюється наявністю на поверхні вірусу білка «шипа» – глікопротеїна S. S-глікопротеїн і трансмембранний глікопротеїн М є двома основними білками оболонки вірусу. Глікопротеїн S зв’язується з рецептором і відповідає за злиття вірусу з клітиною. М-глікопротеїн відіграє роль у збиранні віріону та формуванні оболонки [14, 15].

Роль генного матеріалу вірусу відіграє позитивна одноланцюгова РНК розміром приблизно 26–32 т.п.н. – одна з найбільших геномних РНК, відомих серед вірусів. Геном коронавірусів зазвичай містить 7–10 різних відкритих рамок зчитування. Він метильований на 5’-кінці і має полі-А хвіст на 3’-кінці. Геномна РНК з’єднується з капсидом за допомогою основного фосфопротеїна N [16, 17]. Родина коронавірусів має чотири підродини, а саме альфа, бета, гамма та дельта-коронавіруси. Альфа- та бета-коронавіруси були ідентифіковані у різних видів ссавців, а гама- та дельта-коронавіруси – у свиней та птахів.

Бета-коронавіруси ще називають коронавірусами кажанів. Біоінформатичний аналіз показує, що послідовність РНК SARS-CoV-2 більш ніж на 90% подібна до коронавірусу кажанів RaTG13. Повідомлялося, що бета-коронавіруси викликають у людей важкі захворювання, тоді як альфа-коронавіруси викликають безсимптомні або слабосимптомні захворювання [18, 19]. SARS-CoV-2 тісно пов’язаний з B-лінією групи бета-коронавірусів, деякі представники якої спричиняють важкі захворювання та летальні випадки [3]. Щоб визначити амінокислотну послідовність та структуру білків SARS-CoV-2 та передбачити їх взаємодію з клітинами господаря, повний геном вірусу секвенували, а сіквенс депонували в NCBI (Gen-Bank: MN908947.3). Дослідження показали, що S-глікопротеїн є основним фактором адгезії коронавірусів, що взаємодіє з білками-мішенями на клітинах господаря, такими як ACE2, Езрін, CD26, циклофіліни та іншими факторами адгезії [20].

Спалах COVID-19 може бути порівнянний із спалахами двох інших коронавірусних захворювань людини SARS-CoV (2002–2003) у Китаї та MERS-CoV (2012) в Саудівській Аравії через їх зоонозну передачу та деякі подібності в клінічних проявах [21]. Проте філогенетичний аналіз рецептор-зв'язуючого домену ліній бетакоронавірусу вказує на те, що SARS-CoV-2 тісніше споріднений до двох коронавірусів кажанів (bSL-CoVZC45 та SL-CoVZXC21, схожість 88–89%), тоді як його подібність із SARS-CoV та MERS-CoV становить відповідно 79 та 50 % [22]. RBD, розташований у С-кінцевому домені S-білка, здебільшого приєднується до ангіотензинперетворювального ферменту 2

(ACE2), що знаходиться в мембрані клітин господаря. ACE2 в основному наявний в епітеліальних клітинах легень та шлунково-кишкового тракту. Отже, серйозна інфекція може траплятися в тканинах з високим рівнем експресії АПФ2, включаючи легені, кишечник, нирки та судини [1]. Використовуючи програму Swiss-Model 33, було визначено тривимірну структуру SARS-CoV-2-RBD (Ідентифікатор банку даних білків: 2DD8), що, як і RBD інших бета-коронавірусів, складається з ядра та зовнішнього субдомену. Цікаво, що подібність між зовнішнім субдоменом RBD у SARS-CoV-2 із такою у SARS-CoV свідчить про те, що SARS-CoV-2 також використовує зв'язування ACE2 для проникнення в клітину господаря [1]. Проте, в рамках модельних досліджень було виявлено, які амінокислотні залишки в RBD відповідають за зв'язування SARS-CoV-2 з рецептором ACE2 (а саме Asn439, Asn501, Gln493, Gly485 та Phe486), і вони відрізняються від амінокислотних залишків, що відповідають за цю функцію в SARS-CoV-RBD [23, 24].

1.2 Розробка вакцини проти SARS-CoV-2

Розробка безпечних та ефективних вакцин, здатних запобігти зараженню та поширенню SARS-CoV-2, є одним з пріоритетних завдань для науковців всього світу на даний момент. Поточна пандемія COVID-19 є яскравим прикладом того, як нові технології можуть забезпечувати швидку та ефективну розробку вакцин. Відразу після того, як SARS-CoV-2 був ідентифікований як збудник інфекції, та було розшифровано його геном, розпочато пошук вакцин та терапевтичних засобів. Академічні дослідницькі групи, невеликі біотехнологічні компанії та великі фармацевтичні компанії почали обмінюватися даними та співпрацювати. Станом на грудень 2021 року 137 вакцин проходять клінічні дослідження, а 194 – пре-клінічні дослідження (COVID-19 vaccine tracker and landscape (who.int)). Серед них можна виділити такі основні види вакцин: вбитий інактивований вірус, вірусні вектори, вірусоподібні частинки, ДНК, РНК та субодиничні вакцини (на основі рекомбінантних білків) (Таблиця 1, [8]). Деякі

вакцини-кандидати мають альтернативні шляхи введення, такі як оральний або інтраназальний.

Таблиця 1.

Основні види вакцин, що розробляються проти SARS-CoV-2, та частка кожного з цих видів серед вакцин-кандидатів, що проходять клінічні дослідження на 14 грудня 2021 року (COVID-19 vaccine tracker and landscape (who.int)).

Платформа		Вакцини-кандидати (к-сть і %)	
PS	Protein subunit Білкові субодиниці	47	35%
VVnr	Viral Vector (non-replicating) Вірусні вектори (що не реплікують)	20	15%
DNA	DNA ДНК	15	11%
IV	Inactivated Virus Інактивований вірус	18	13%
RNA	RNA РНК	23	17%
VVr	Viral Vector (replicating) Вірусні вектори (що реплікують)	2	1%
VLP	Virus Like Particle Вірусоподібні частинки	6	4%
VVr + APC	VVr + Antigen Presenting Cell Вірусні вектори (що реплікують)+ антигенпрезентуючі клітини	2	1%
LAV	Live Attenuated Virus Живий послаблений вірус	2	1%
VVnr + APC	VVnr + Antigen Presenting Cell Вірусні вектори (що не реплікують)+ антигенпрезентуючі клітини	1	1%
BacAg-SpV	Bacterial antigen-spore expression vector Бактерійний вектор з презентацією антигену на поверхні спори	1	1%

Однак основною проблемою на сьогодні є продукція надзвичайно великої кількості доз вакцини, для того, щоб вакцинувати все населення планети. На практиці це означає необхідність використання багатьох різних вакцин і пошуків можливостей збільшення обсягів продукції вакцин. Однією з можливостей поліпшення вакцин на основі субчастинок є використання ад'юванту. Додавання ад'ювантів, таких як Matrix M, AS03, MF59 або CPG, дозволяє посилити імунну

відповідь при меншій дозі антигену, в результаті забезпечується можливість продукції більшої кількості доз вакцин [8].

1.3 Вірусоподібні частинки як потенційна вакцина

Традиційні вакцини – на основі ослаблених або інактивованих вірусів – мають високу імуногенність завдяки декільком ключовим параметрам, а саме 1) здатність до реплікації ослаблених вірусів; 2) повторювана геометрія їх поверхні; 3) природа частинок; і 4) здатність стимулювати вроджені та адаптивні імунні реакції. Ці параметри служать як парадигми успішної розробки вакцин на основі вірусоподібних частинок (virus-like particles, VLP) [25]. VLP є набагато ефективнішими антигенами в порівнянні з розчинними вірусними білками, адже VLP – це поліпротеїнові надмолекулярні структури, що мають багато характеристик вірусів, тому можуть бути використані при розробці ефективних вакцин [26]. VLP – це структури, що збираються самостійно і містять вірусні білки, але не містять вірусної РНК або ДНК, тому вони не здатні розмножуватися і не спричиняють розвиток інфекції. Більшість VLP мають оболонку, побудовану з декількох однакових молекул білка, що утворюють ікосаедричні або гвинтові (паличкоподібні) структури [27]. VLP можуть продукуватися в більш ніж 170 різних системах експресії, включаючи бактерії, клітини комах, дріжджів або ссавців [26]. Майже 30% VLP виробляється в бактерійних системах (головним чином в *Escherichia coli*), при цьому гени структурних білків вірусів кодон-оптимізовані для бактерій і клоновані в комерційні плазміди під сильні промотери. Це забезпечує високий рівень продукції відповідних рекомбінантних білків [28]. Недоліки бактерійної системи експресії полягають у тому, що прокаріоти не можуть здійснювати посттрансляційну модифікацію (глікозилювання) білків вірусів, яка відбувається в заражених еукаріотичних клітинах, а також рекомбінантний білок може бути забруднений ендотоксинами [29]. Однак у багатьох випадках глікозилювання білків не є необхідним для продукції захисних антитіл. Також, були розроблені бактерійні штами, здатні забезпечити глікозилювання конкретних ділянок рекомбінантного білка [30].

Однак досвід роботи з VLP-глікозилюванням у бактеріях обмежений. Забруднення ендотоксинами, як правило, не є суттєвою проблемою, тому що VLP можуть бути легко очищеними від таких забруднень.

Дріжджові системи експресії також широко використовуються для ефективного виробництва VLP, як, наприклад, у випадку комерційних вакцин проти ВПЛ та вірусу гепатиту В (ВГВ) [31, 32]. VLP з різними поверхневими антигенами на основі малого S білка (dS) вірусу гепатиту качки були отримані в системі експресії на основі метилотрофних дріжджів *O. polymorpha* [33]. А нещодавно були отримані VLP SARS-CoV-2 за рахунок експресії S-, M- та E-білків у клітинах дріжджів *S. cerevisiae* [34].

Клітинні культури з комах та ссавців використовуються для виробництва VLP з 1980-х років, а нещодавно рослинні клітини також були додані до когорти можливих систем експресії [26]. Загалом, VLP часто можна швидко та ефективно виробляти у великій кількості за оптимізованих умов культивування. Після успішної експресії складових білків, VLP самостійно збираються в остаточну форму, яка зазвичай імітує симетрію батьківського вірусу [35].

Продукція VLP може супроводжуватися певними обмеженнями – експресія VLP в еукаріотичних системах часто менш ефективна, ніж якщо використовуються прокаріотичні системи; нестабільність у довготривалій перспективі часто перешкоджає практичному успіху вакцини на основі VLP.

1.4 Терапевтичні білки-інгібітори злиття вірусів з клітинами

Процес проникнення складних РНК-вірусів в клітини господаря включає злиття між плазматичною мембраною клітини і вірусною мембраною, що містить поверхневий глікопротеїн і трансмембранний білок злиття. На основі структурних та функціональних особливостей, білки злиття можуть бути згруповані у два класи, клас I та клас II [36]. Віруси з білком злиття I класу, такі як вірус грипу, вірус імунодефіциту людини типу 1 (ВІЛ-1), вірус Еболи, вірус кору та вірус мишачого гепатиту (MHV), мають подібний і добре вивчений механізм злиття з клітинами, в якому взаємодія між двома

висококонсервативними гептадними повторами (HR1 та HR2 на N та C-кінцях, відповідно) білка злиття веде до утворення консервативної 6-спіральної структури і подальшого злиття вірусної і плазматичної мембран [36]. Було показано, що пептиди-похідні HR2 здатні інгібувати утворення 6-спіральної структури, імовірно за рахунок приєднання до HR1 під час формування проміжного продукту. Зокрема, таку інгібуючу дію мають пептиди DP107 та T20 для ВІЛ-1, GP160 для вірусу Еболи та HR2 для MHV [37-39]. Пептид Т-20 став компонентом антивірусного препарату енфувіртид для лікування СНІДу. S-білок коронавірусу SARS-CoV-1 містить дві субодиниці: S1 і S2, і є білком злиття класу I [40]. Після зв'язування субодиниці S1 з рецептором ACE2, SARS-CoV-1 потрапляє в клітини через ендосомний шлях з подальшим злиттям з ендосомною мембраною або прямого злиття з клітинною мембраною при наявності протеази. Було отримано ряд пептидів, що інгібують злиття SARS-CoV-1 з мембранами клітин [41-43]. Подібні пептиди-інгібітори були створені і для пригнічення інфекції вірусом MERS-CoV [44-46], коронавірусу людини HCoV-229E [47], коронавірусу, що викликає інфекційний перитоніт у котів (FCoV) [48] та ін. Існування таких терапевтичних пептидів для інших коронавірусів дає змогу з високою імовірністю припускати, що пептиди-похідні гептадних повторів HR2 або (з меншою імовірністю) HR1 S-білка SARS-CoV-2 також матимуть інгібуючий вплив на злиття цього вірусу з мембраною клітин-мішеней.

2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР)

Для забезпечення протікання паралельних реакцій готували реакційну суміш, до складу якої входили вода, буфер для ДНК-полімерази з $MgCl_2$, дезоксинуклеотидтрифосфати (дНТФ), праймери та фермент ДНК-полімераза. Суміш розділяли на кілька окремих проб, після чого додавали ДНК-матрицю.

Склад реакційної суміші

реагент	кінцева концентрація
стерильна деіонізована вода	-
10х PCR буфер	1х
2 мМ суміш дНТФ	0,2 мМ
праймер 1	0,1-1 мкл
праймер 2	0,1-1 мкл
полімераза	1,25 u/ 50мкл
матриця ДНК	10 пг- 1 мкг

Реакції проводилися на ампліфікаторі Gene Amp© PCR System 9700. Параметри реакції: початкова денатурація ДНК проводилася при 94°С протягом 5 хв, потім 30 циклів з денатурацією при 94°С протягом 30 с, анілінгом праймерів протягом 30 с та полімеризації при 72°С. В кінці проби інкубувалися при 72°С протягом 10 хв, а потім охолоджувалися до 4°С. Температура, при якій проводився анілінг праймерів, визначалася з врахуванням довжини і нуклеотидного складу праймерів, тривалість полімеризації визначалася в залежності від довжини фрагменту, який потрібно було ампліфікувати.

2.2 Рестрикційний аналіз ДНК [49]

Метод базується на здатності ендонуклеаз рестрикції II класу гідролізувати ДНК у певних сайтах (послідовностях нуклеотидів). У роботі використовували ферменти та відповідні інкубаційні буфери виробництва фірми “Thermo Scientific” (Литва).

У реакційну суміш вносили 0,5-2 мкг аналізованої ДНК, розчиненої в ТЕ-буфері чи бідистильованій воді. До розчину ДНК додавали 2 мкл (1/10 об'єму) відповідного буферу і 1 U ферменту на 1мкг плазмідної ДНК, об'єм реакційної суміші доводили водою до 20 мкл. Суміш інкубували при 37°С протягом 1-2 год.

2.3 Дефосфорилювання

До розчину ДНК 10-40 мкл (1-20 пкмоль кінців) додавали 5 мкл 10-кратного буферу для реакції дефосфорилювання, 1 мкл лужної фосфатази, об'єм реакційної суміші доводили до 50 мкл водою. Суміш інкубували протягом 30 хв при 37°С. Після цього ДНК очищували за допомогою фенолу або колонок.

2.4 Електрофорез ДНК в агарозному гелі [49]

Реактиви: агароза; ТАЕ буфер: 0,04 М *трис*-ацетат, 0,002 М ЕДТА; буфер для нанесення проб: 0,25 % бромфеноловий синій, 40 % сахароза, бромистий етидій 0,5 мкг/мл.

Агарозу вносили в ТАЕ буфер, нагрівали до повного розчинення та кип'ятили протягом 3 хв. Коли розчин охолоджувався до 50°С, додавали бромистий етидій. Охолоджений розчин заливали у кювету з гребінцем для формування лунок. Між дном кювети і гребінцем залишали шар агарози товщиною 0,5-1 мм. Після полімеризації гелю гребінець видаляли, а кювету з гелем поміщали в електрофоретичну камеру з електрофорезним ТАЕ буфером. У лунки вносили виділену ДНК, змішану з буфером для нанесення проб так, щоб об'єм буферу становив 1/6 об'єму кінцевої суміші. Електрофорез проводили за напруги 2-4 В/см^2 протягом 30-40 хв. Зони ДНК реєстрували, освітлюючи гель ультрафіолетовими променями. Одержану електрофореграму фотографували. Як ДНК стандарт у всіх випадках використовували ДНК-маркер фірми "Thermo Scientific" SM 0311.

2.5 Елюція фрагментів ДНК з гелю

Мікропробірку типу еппендорф об'ємом 1,5 мл зважували і записували його вагу. Використовуючи чистий скальпель, вирізали якомога менший фрагмент гелю, що містить потрібний зразок ДНК і поміщали в еппендорф, зважували і розраховували вагу агарозного зрізу. Додавали 10 мкл зв'язуючого

буферу (тип 2) на кожні 10 мг агарозного фрагменту, інкубували на водяній бані при 55ºС, перемішуючи, поки агароза повністю не розплавиться. Отриману суміш об'ємом 600 мкл, яка містила ДНК, переносили у колонку (GFX MicroSpin column), центрифугували при 14000 об./хв протягом 1 хв на центрифузі марки Eppendorf 5417C. Повторювали, доки вся проба не була оброблена таким чином. Потім додавали 500 мкл буферу для промивання (тип 1), центрифугували за таких самих умовах. Додавали 10-20 мкл буферу для елюції (тип 4), інкубували при кімнатній температурі 3-5 хв, центрифугували при 14000 об./хв протягом 2 хв.

2.6 Очистка ДНК з суміші ферментів

До кожних 100 мкл проби (суміш ДНК з ферментами) додавали 500 мкл зв'язуючого буферу, перемішували, переносили у колонку, центрифугували при 14000 об./хв протягом 1 хв на центрифузі марки Eppendorf 5417C. Після цього додавали 500 мкл буферу для промивання, центрифугували за таких самих умов. Додавали 10-20 мкл буферу для елюції, інкубували при кімнатній температурі протягом 3-5 хв, центрифугували при 14000 об./хв протягом 2 хв.

2.7 Виділення плазмідної ДНК з клітин *E. coli* [49]

Реактиви:

Розчин I: 50 мМ глюкоза, 25 мМ *трис*-HCl (pH 8,0), 10 мМ ЕДТА (pH8,0).

Розчин II: 0,2 М NaOH, 1 % SDS, 10мМ *трис*-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЕДТА (pH8,0).

5М Калію ацетат,

3М Натрію ацетат,

7,5М Амонію ацетат,

фенол (pH 8,0),

ізопропанол,

96 % розчин етилового спирту,

70 % розчин етилового спирту.

ТЕ-буфер: 10 мМ *трис*-HCl (pH 8,0), 1 мМ ЕДТА (pH8,0)

Бактерійні трансформанти нарощували в 100 мл селективного середовища протягом ночі. Біомасу осаджували центрифугуванням при 4000 об./хв протягом

15 хв на центрифузі марки Eppendorf 5804R. Клітини промивали розчином I без лізоциму і центрифугували при 4000 об./хв протягом 12 хв. Супернатант зливали, а осад ресуспендували та додавали 4 мл розчину II, перемішували, щоб суспензія стала в'язкою та витримували 5 хв при 0° С. Потім додавали 3 мл 5 М калію ацетату, перемішували і залишали на холоді. Через 15 хв суміш центрифугували при 9000 об./хв протягом 15 хв, супернатант переносили в чисту пробірку та додавали 1/10 об'єму натрію ацетату та 0,6 об'єму ізопропанолу. ДНК осаджували центрифугуванням при 9000 об./хв протягом 15 хв. Осад розчиняли в 300 мкл ТЕ-буферу. Потім додавали 2 об'єми амонію ацетату та інкубували протягом 15 хв при кімнатній температурі. Центрифугували при 5000 об./хв протягом 15 хв на центрифузі марки Eppendorf 5417C. Надосадову рідину відбирали у чистий еппендорф і додавали 1/10 об'єму натрію ацетату та 0,6 об'єму ізопропанолу та інкубували при кімнатній температурі 10 хв. Після центрифугування при 12000 об./хв 10 хв, супернатант зливали, а осад підсушували і розчиняли в 200 мкл ТЕ-буферу. Для остаточної депротеїнізації до розчину додавали 200 мкл фенолу, насиченого буфером, центрифугували при 12000 об./хв і відбирали верхню (водну) фазу. Додавали 1/10 об'єму натрію ацетату, 2 об'єми етанолу. Потім центрифугували 10 хв при 12000 об./хв. Осад (плазмідна ДНК) промивали 70 % етанолом, підсушували і розчиняли в стерильному ТЕ-буфері.

2.8 Лігування фрагментів ДНК

Готували 10 мкл суміші фрагменту та розщепленого вектора (400-800 нг) у бідистильованій воді; реакційна суміш містила рівну чи вищу (до 3 раз) концентрацію фрагменту по відношенню до концентрації вектора.

Додавали наступні компоненти до суміші:

10-кратний буфер для лігування – 0,5 мкл,

Т4 ДНК-лігаза – 2-4 одиниці,

бідистильована H_2O – до 5 мкл,

інкубували суміш при 16°С протягом 3 год, інактивували лігазу нагріванням до 65°С протягом 15 хв (за умови, що в реакційній суміші не було поліетиленгліколю).

2.9 Електротрансформація клітин *E. coli*

Свіжу колонію бактерійних клітин інокулювали в 2 мл рідкого середовища LB та вирощували в умовах аерації при 37°С протягом ночі. 1 мл „нічної" культури переносили в 100 мл рідкого середовища LB та підрощували до OD_{600} = 0,5-1,0 (кювета 1 см), що відповідає 10^{10} кл/мл. Клітини осаджували 15 хв при 4000 об./хв, 4°С на центрифузі марки Eppendorf 5417C і промивали в 400 мл стерильної холодної бідистильованої води. Клітини ресуспендували в 200-300 мкл холодного стерильного 10 % гліцеролу і переносили в стерильні епендорфи по 40 мкл для довготривалого зберігання при –70°С.

До 40 мкл суспензії клітин додавали 1-4 нг плазмідної ДНК і вносили суміш на дно охолодженої 2-мм кювети; здійснювали електротрансформацію (12,25 кВ/см, 50 мкФ, 129 Ом) тривалістю 5-6 мс. До кожного зразка додавали по 1 мл рідкого середовища LB, трансформовані клітини інкубували протягом 50 хв при 37°С. Отриману суспензію висівали на чашки зі селективним середовищем, яке містило антибіотик, та інкубували від 12 до 16 годин при 37°С.

2.10 Електротрансформація дріжджів *O. polymorpha* [50]

Це високоефективний метод трансформації, що базується на застосуванні електричного струму до висококонцентрованої суспензії попередньо оброблених дитіотреітолом клітин.

Реактиви: розчин 25 мМ DTT у 50мМ фосфатному буфері pH 7,5

STM буфер: 270 мМ сахароза, 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 1 мМ $MgCl_2$

Хід роботи:

Нічну культуру *O. polymorpha*, вирощену у неселективному середовищі YPD при 37°С розводили у 100 раз і переносили у свіже, попередньо прогріте середовище YPD (200 мл) та вирощували до оптичної густини E_{663}=1,2-1,5 (~9×10^7 клітин/мл); клітини осаджували центрифугуванням при 3000 об/хв впродовж 10

хв, ресуспендували у 0,2 об'єму (40 мл) фосфатного буферу з дитіотреітолом (DTT) та інкубували 15 хв при 37°С;

Далі клітини двічі промивали у охолодженому до 0°С STM буфері - спочатку у 1 об'ємі (200 мл), а потім у 0,5 об'єму (100 мл) буферу; клітини ресуспендували у 0,005 об'єму (1 мл) STM (0°С), щоб досягнути густини 2×10^{10} клітин/мл; для довготривалого зберігання компетентних клітин, аліквоти з 60 мкл клітинної суспензії заморожували у рідкому азоті і зберігали при -70°С;

До 60 мкл суспензії клітин додавали ДНК і цю суміш переносили на дно попередньо охолодженої електропораційної кювети та піддавали дії електричного імпульсу (7,5 кВ/см, 50 мкФ, 129 Ом) тривалістю ~5 мс та відразу додавали до суміші клітини/ДНК 1 мл середовища YPD кімнатної температури; інкубували впродовж 1 години при 37°С без перемішування.

Клітини осаджували центрифугуванням (5 хв, 3000 об/хв), промивали у 1 мл стерильної дистильованої води і ресуспендували у необхідному об'ємі стерильного дистиляту. Отриману суспензію розсівали на чашки з селективним середовищем та інкубували при 37°С 3-4 доби, після чого підраховували кількість трансформантів.

2.11 Електротрансформація дріжджів *K. phaffii*

Попередньо підрощені клітини в YPD переносили у 100 мл свіжого середовища YPD і підрощували поки OD_{600} не було рівним 1,2 – 1,3. Після досягнення клітинною суспензією потрібної оптичної густини до суспензії додавали 2,5 мл HEPES і 2,5 мл 1М DTT і інкубували 15 хв при 28°С. Після цього осаджували клітини при 3500g 10 хв та промивали в холодній воді. Далі клітини промивали в 1/2 та 1/25 об'єму сорбітолу. Клітини ресуспендували в 100 – 200 мкл 1 М сорбітолу та переносили по 50 мкл у еппендорфи. Після цього клітини змішували з 5 мкл ДНК та переносили цю суміш на дно попередньо охолодженої електропораційної кювети та піддавали дії електрофоретичного імпульсу (R = 129 Ом, C = 50 мкФ, U = 1,45 кВ/см.) тривалістю 5 мс та відразу додавали до суміші клітини/ДНК 1 мл 1М сорбітолу, перемішували, переносили в еппендорф та інкубували протягом 2 годин при 28°С. Дріжджові клітини

осаджували центрифугуванням (5 хв 3500 g), отриману суспензію висівали на чашки з селективним середовищем YPD з додаванням гігроміцину (0,2 г/л) або норзеотрецину (0,2 г/л) та інкубували при 30 °С.

2.12 Довготривале зберігання бактерійних та дріжджових трансформантів

Для довготривалого зберігання бактерійні трансформанти вирощують в пробірках (3 мл) селективного середовища при 37°С протягом ночі. Клітини осаджують центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10-15 хв. 0,35 мл клітин вносять у мікропробірку з 0,1 мл 70 % стерильного холодного гліцерину, заморожують та зберігають при -70°С.

Дріжджові трансформанти вирощують в пробірках (3 мл) YPD середовища при 37°С протягом ночі. Клітини осаджують центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10-15 хв. 0,25 мл клітин вносять у мікропробірку з 0,25 мл 70 % стерильного холодного гліцерину, заморожують та зберігають при -70°С.

2.13 Вестерн-блот аналіз

Для приготування зразків з клітин дріжджів до 500 мкл суспензії клітин з визначеною оптичною густиною додавали 165 мкл 50% трихлороцтової кислоти, інкубували при -70 °С протягом як мінімум години та осаджували центрифугуванням при -4 °С та 14000 об./хв протягом 15 хв. Осад промивали 500 мкл холодного 80% ацетону, центрифугували при тих же параметрах, відбирали краплю та висушували, потім розчиняли в 50 мкл 2х SDS-page з β-меркаптоетанолом і проварювали при +75 °С протягом 10 хв. Для приготування зразків з культуральної рідини її концентрували шляхом центрифугування через концентруючі колонки (centrifugal concentrator Vivaspin 20), а потім до 50 мкл концентрованої культуральної рідини додавали 50 мкл 2х SDS-page з β-меркаптоетанолом і проварювали при +75 °С протягом 10 хв. 15 мкл отриманих зразків вносили в лунки гелю. Гель для білкового електорофорезу мав наступний склад: розділяючий гель – 6 мл води, 3,75 мл 1,5 М Tris-HCL, pH 8,8, 4,95 мл 30% актиламідної суміші, 150 мкл 10% SDS, 150 мкл 10% APS, 7,5 мкл TEMED; концентруючий гель – 2,8 мл води, 0,5 мл 1,5 М Tris-HCL, pH 8,8, 0,66 мл 30%

актиламідної суміші, 40 мкл 10% SDS, 40 мкл 10% APS, 4 мкл TEMED. Електрофорез проводився при таких параметрах: в концентруючому гелі – 20 мА, 500 В, в розділяючому гелі – 30 мА, 500 В. Після електрофорезу білки переносилися на PVDF мембрану за допомогою блотінгу при 40 В, 225 мА протягом 1 год 45 хв. В подальшому мембрана оброблялася блокуючим буфером, розчином первинних антитіл та розчином вторинних антитіл. Для детекції сигналу використовувався розчин, що містив в 10 мл загального об'єму 1 мл 1 М Tris-HCl pH 8.0, 100 мкл люмінолу, 25 мкл кумарової кислоти, 5 мкл концентрованого H_2O_2 та воду.

2.14 Очистка білків за допомогою металоафінної хроматографії

Очистка фрагментів S-білка здійснювалася за допомогою металоафінної хроматографії з використанням Ni-NTA агарози (Ni-сефарози) (Qiagen). 500 мкл Ni-сефарози відмивали від етанолу (промивали 3 рази дистильованою водою і 2 рази Wash-буфером) і додавали до екстракту, отриманого після обробки мембранної фракції клітин дріжджів детергентом (6 М гуанідин гідрохлоридом). Фрагменти S-білка зв'язуються з іонами Ni^{2+} за рахунок наявності гістидинової мітки (6-His-tag). Екстракт у суміші з Ni-сефарозою наносили на поліпропіленову колонку (Qiagen), при цьому екстракт разом з незв'язаними з Ni^{2+} білками проходив через колонку, а Ni-сефароза з іммобілізованим на ній цільовим білком залишалася на мембрані. В подальшому Ni-сефарозу промивали 4 рази Wash-буфером (по 1 мл), а потім зв'язаний білок елюювали за допомогою Elution-буферу (буфер додавали 4 рази по 0.5 мл).

Склад буферів:

Wash-буфер: 6 М гуанідин гідрохлорид, 0.5 М натрій хлорид, 20 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7.5), 10 мМ імідазол;

Elution-буфер: 6 М гуанідин гідрохлорид, 0.5 М натрій хлорид, 20 мМ калій-фосфатний буфер (pH 7.5), 500 мМ імідазол.

2.15 Отримання біомаси клітин дріжджів

Для отримання біомаси дріжджів клітини нарощували у буферизованому середовищі з додаванням гліцеролу (200 мл) (1% дріжджового екстракту, 2%

пептону, 0,67 % YNB, 400 мкг/л біотину, 100 мМ калій-фосфатний буфер, pH 6.0, та 1% гліцерол) при 28°С при аерації 200 об/хв протягом 1 доби. Отриману культуру використовували для інокуляції в 100 мл буферизованого середовища з додаванням метанолу (1% дріжджового екстракту, 2% пептону, 0,67 % YNB, 400 мкг/л біотину, 100 мМ калій-фосфатний буфер, pH 6.0, та 0,5% метанол) для індукції синтезу цільових білків. Початкова оптична густина суспензії становила 1,5 при довжині хвилі 600 нм. Культивування відбувалось при 28°С при аерації 200 об/хв протягом 72 – 96 годин. Через кожні 24 години у колби додатково вносили метанол до кінцевої концентрації 0,5 %. Осаджували клітини, далі двічі промивали стерильною дистильованою водою та один раз стерильним 20 мМ натрій-фосфатним буфером pH 7,5 за допомогою центрифугування при 4000 об/хв 5хв.

2.16 Отримання препаратів ліофілізованих клітин дріжджів

Для отримання ліофілізованих порошків зруйнованих клітин дріжджів отриману як описано в підпункті біомасу клітин ресуспендували у мінімальному об’ємі 20 мМ фосфатного буферу pH 7,5, переносили по 1 мл суспензії у стерильні епендорфи (2 мл) і додавали стерильні скляні кульки (2/3 об’єму). Клітини руйнували на дезінтеграторі Vortex упродовж 15 хв при 4°С. Гомогенат переносили по 1 мл у стерильні скляні флакони для ліофілізації та закривали стерильною тканиною і прогрівали 10 хв за температури 60°С. Зразки заморожували та ліофілізували за допомогою приладу Alpha 1-2 ldplus A 16/50548, Martin Christ Gefriertrocknungsanlagen GmbH (Germany). Проби зберігали при -20°С.

2.17 Отримання ацетонових порошків клітин дріжджів

Для отримання ацетонових порошків отриману як описано в підпункті біомасу клітин ресуспендували у мінімальному об’ємі 20 мМ фосфатного буферу pH 7,5 і переносили по 300 мкл у 1,5 мл епендорфи. Клітини двічі промивали у ацетоні (2 об’єми) та осаджували при 4000 об/хв 5 хв (4°С). У еппендорфи вносили диетиловий етер (2 об’єми), ресуспендували та закривали стерильною тканиною. Для випаровування етеру проби поміщали у витяжну шафу з

увімкненою ультрафіолетовою лампою впродовж 36 годин. Проби зберігали при -20°С.

2.18 Діаліз білків

У пластикові пробірки об'ємом на 15 мл додавали 1 мл діалізату. Пробірки щільно закрили целофановими мембранами. Їх занурювали у діалізний буфер – 20 мМ фосфатний буфер pH 7,5. Для повного видалення із зразка гуанідингідрохлориду замінювали буферний розчин 4 рази, а загальний об'єм буферу був у 200 разів більшим, ніж об'єм діалізату. Мембрани для проведення діалізу прокип'ячували у 100 мл води, яка містила 20 мМ тріс-HCI pH 8,0 та 1 мМ ЕДТА. Діаліз проводили на магнітній мішалці при 4 °С протягом 18 годин.

2.19 Отримання нерозчинних фракцій клітин

Клітини дріжджів зберігали при -20^{0}С. Для виділення цільових білків клітини руйнували за допомогою скляних кульок «балотіні». Для цього дріжджову біомасу розморожували і ресуспендували в 20 мМ фосфатному буфері pH 7,5, що містив 1 мМ ДТТ та інгібітори протеїназ (Thermo scientific) із розрахунку 100 мг клітин на 1 мл буферу. Руйнування проводили при 4^{0}С впродовж 15 хв. Повноту руйнування контролювали візуально за збільшенням в'язкості суміші. Після цього отриманий гомогенат центрифугували при 12000 об/хв 20 хв при 4^{0}С. Супернатант відкидали, а осад двічі промивали від скляних кульок 20 мМ фосфатним буфером pH 7,5. Після повторного центрифугування отримані уламки клітин використовували для розчинення, очистки та ренатурації цільових білків.

2.20 Утримання лабораторних мишей та спосіб введення їм досліджуваних речовин.

Лабораторних тварин утримували на стандартному харчовому раціоні для гризунів у приміщенні зі сталою температурою (22-23^{0}С) і вологістю повітря (в діапазоні 40-60%). Чергування періоду сну і активності визначалося за допомогою автоматики. Для здійснення доочеревинних ін'єкцій знерухомлену тварину утримували горизонтально, абдомінальною поверхнею до

експериментатора. Препарати вводили у нижню ділянку живота, попередньо дезинфікуючи 70%-им спиртовим розчином.

Схема експерименту. Для досліду використано 23-ри статевозрілі миші-самки лінії *Balb/c*. Тварин було розділено на 6-ть експериментальних (n=3 для кожної групи) та 1-ну контрольну групи (n=5). Мишам експериментальних груп було одноразово доочеревинно введено сполуки № 3, №4, №5, №6; №7; №8 у дозі 100 мкг. Досліджувані речовини вводили в об'ємі 300 мкл. Контрольній групі тварин вводили еквівалентний обсяг 0,9% розчину хлориду натрію в такому ж режимі (Артеріум, Україна).

Забір та аналіз крові експериментальних тварин. Зразки цільної крові були отримані шляхом пункції ретроорбітального синуса ока мишей з допомогою капілярної мікропіпетки. 100 мкл крові відбирали у мікропробірку за наявності у ній антикоагулянта (10%-ва динатрієва сіль етилендиамінтетраоцтової кислоти (Na_2-ЕДТА)) у співвідношенні 50 мкл Na_2-ЕДТА на кожен 1,0 мл крові. Забір крові у піддослідних тварин здійснювали на 7-му та 14-ту доби після ін'єкції досліджуваних сполук. Вимірювання ключових гематологічних показників мишей здійснювали за допомогою 5-диференційного автоматичного гематологічного аналізатора крові Dymind DF51. Аналіз змін гематологічного профілю тварин проводили у програмі GraphPad Prism 7.

Усі експерименти над особинами проводилися за принципами гуманного поводження з лабораторними тваринами згідно з вимогами Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 18.03.1986 р.) та Законом України «Про захист тварин від жорстокого поводження» від 2006 р., ст.26.

2.21 Визначення рівня імуноглобуліну IgG в сироватці крові лабораторних мишей.

Для визначення рівня імуноглобуліну IgG використовували імуноферментний аналіз ELISA сендвіч типу. Процедуру проводили згідно з інструкціями, що додаються до комерційного набору реагентів (Номер в каталозі Invitrogen: BMS2325). Для формування стандартної кривої для IgG були

використані наступні стандарти: 15000; 7500; 3750; 1875; 938; 469; 234 і 0. Усі реагенти та зразки перед використанням доводили до кімнатної температури (20-25 °С). У кожну лунку планшета для титрування (96-лунковий планшет Nunc), із відповідними моноклональними антитілами, додавали 90 мкл буфера, 10 мкл стандартів та тестових зразків. Планшет інкубували при 37 °С протягом 30 хвилин. Після закінчення цього часу вміст планшета зливали і тричі промивали приготованим буфером. Потім додавали по 100 мкл специфічних поліклональних антитіл, кон'югованих з імуноглобуліновим ферментом. Планшет інкубували при 37°С протягом 30 хвилин і знову тричі вносили буфер для промивання. Потім додавали по 100 мкл розчину ферменту (пероксидази хрону) міченого стрептавідином, і інкубували протягом 15 хвилин при кімнатній температурі. Реакцію зупиняли додаванням 100 мкл блокуючого розчину, який змінив колір продукту (з синього на жовтий). Поглинання вимірювали протягом 5 хвилин після зупинки реакції за допомогою пристрою для зчитування мікропланшетів EnSpire (EnSpire Multimode Plate Reader, PerkinElmer, США).

3. РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1 Створення векторів для експресії різних фрагментів генів SARS-CoV-2

У даному проєкті ми розробляли сучасні дріжджові системи для ефективної продукції різних фрагментів білка «шипа» S1 та S2 (Рис. 1, A). Новизна ідеї полягає у експресії послідовностей субодиниць S1 та S2 S білка SARS-CoV-2 у дріжджів *Komagataella phaffi* та *Ogataea polymorpha* для розробки ефективної вакцини. Глікозилювання вірусних білків буде відбуватися так само, як у клітинах людини, завдяки використанню штамів дріжджів з «гуманізованим» глікозилюванням. Використання дріжджів забезпечує поєднання переваг еукаріотичної модифікації білка зі швидким ростом продуцентів на дешевих середовищах, що на один-два порядки знижує вартість вакцини у порівнянні з її продукцією в культурах клітин ссавців чи комах.

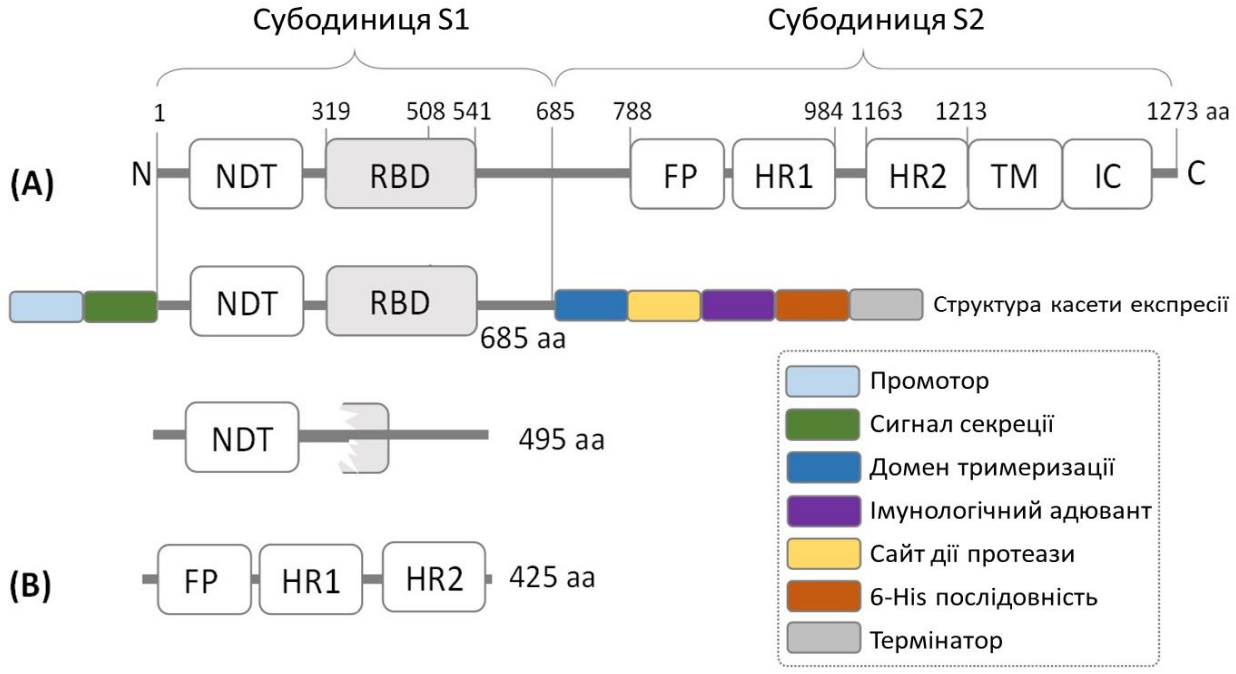


Рис. 1 **(A)** Топологія глікопротеїна «шипа» SARS-CoV-2. NTD; N-кінцевий домен, RBD; рецептор-зв'язувальний домен, FP; пептид злиття, HR1; гептадний повтор 1, HR2; гептадний повтор 2, TM; трансмембранний регіон, IC: внутрішньоклітинний домен. **(B)** Структура запропонованих касет експресії.

Першим етапом виконання проєкту було конструювання векторів для експресії генів, що кодують фрагменти білків SARS-CoV-2, у «гуманізованих» штамах дріжджів *K. phaffii* та *O. polymorpha* (Рис. 1, В). Як вихідна плазміда для конструювання касет експресії використовувалася плазміда pPICZ-B (Nova lifetech Inc). Для експресії генів у *K. phaffii* та *O. polymorpha* було вирішено використовувати метанол-індукований промотор гена алкогольоксидази (*AOX1*). Послідовність промотора гена *AOX1 K. phaffii* входить до складу плазміди pPICZ-B. Дизайн праймерів та зведення нуклеотидних послідовностей плазмід здійснювався за допомогою програми ApE (A plasmid Editor, https://jorgensen.biology.utah.edu/wayned/ape/)

Касети експресії були сконструйовані таким чином, щоб експресовані фрагменти додатково мали домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт протеази TEV та послідовність 6-His, необхідну для ефективного очищення білків. Домен тримеризації складається з 30 амінокислот на С-кінці білка фібритину і завдяки специфічній β-складчастій структурі забезпечує швидке поєднання мономерів фібритину в тример [51]. Ідея додати такий фрагмент до експресованих рекомбінантних пептидів зумовлена тим, що наприклад для вірусу грипу H3N2 модифікація розчинного білка гемаглютиніну (sHA) шляхом додавання на С-кінці гептадного повтору тримеризації з транскрипційного фактору GCN4 стабілізувала нативну тримерну структуру гемаглютиніну і підвищувала його імуногенність [52].

Розроблено два варіанти векторів, для продукції білкових фрагментів із сигналом секреції (α-фактором), або без нього.

Послідовності S-білка SARS-CoV-2 було взято з NCBI (Gen-Bank: MN908947.3) та кодон-оптимізовано для експресії в *K. phaffii* за допомогою програми «Codon Wizard» (http://schwalbe.org.chemie.uni-frankfurt.de/node/3324). Оптимізовані нуклеотидні послідовності було синтезовано фірмою BioCat GmbH (Heidelberg, Germany). Розроблено праймери для ампліфікації окремих ділянок отриманої в результаті хімічного синтезу молекули ДНК: Ko1097/Ko1098 для ампліфікації RBD разом з N-кінцевим доменом (амінокислотні послідовності 1-

684, див. рис. 1), Ko1102/Ko1103 для ампліфікації пептиду FP-HR1-HR2 (амінокислотні послідовності 788-1213), Ko1097/Ko1007 для ампліфікації 5’ кінця вкороченого RBD, Ko1106/Ko1098 для ампліфікації 3’ кінця вкороченого RBD, Ko1097/ Ko1098 для поєднання 5’ та 3’ кінців вкороченого RBD, Ko1132/Ko1133 для ампліфікації RBD без N-кінцевого домену. Всі ці послідовності було клоновано у касети експресії з чи без α-фактору. Всі послідовності праймерів, що використовувалися в роботі, перелічені в таблиці 2.

Таблиця 2.

Перелік олігонуклеотидних послідовностей (праймерів), використаних у роботі

Назва праймера	Послідовність нуклеотидів	Призначення праймера
Ko1097	CCGGAATTCTTTTTGTTTTTTTGGTTTTGTTGC	Ампліфікація RBD разом з N-кінцевим доменом або повнорозмірного гена, що кодує S-білок
Ko1098	TGCTCTAGAGCGGCCGCCGGTACCTCTAGCTCTTCTTGGAGAGTTAG	Ампліфікація RBD разом з N-кінцевим доменом
Ko1099	CGGGGTACCAGTGTAATGCAACTTAAC	Ампліфікація повнорозмірного гена, що кодує S-білок
Ko1100	CCGGAATTCCATCGTTTCGAATAATTAGTTGTTTTTTGATC	Ампліфікація касети експресії без послідовностей, що кодують S-білок і α-фактор
Ko1101	CGGGGTACCGGTTACATTCCAGAAGCTC	Ампліфікація касети експресії без послідовностей, що кодують S-білок і α-фактор

Ko1102	CCGGAATTCTTTACAAGACTCCAC CAATTAAGGATTTTG	Ампліфікація послідовностей, що кодують пептид FP-HR1-HR2
Ko1103	TGCTCTAGAGCGGCCGCCGGTACC AGGCCACTTAATGTATTGTTCGTA C	Ампліфікація послідовностей, що кодують пептид FP-HR1-HR2
Ko1104	CTTTCATAATTGCGACTGGTTC	Перевірка дріжджових трансформантів
Ko1105	GCAAAACAGAGGATCTAAAAACC	Перевірка дріжджових трансформантів
Ko1106	GGTATTTACCAAACTTCTAACTTT AGAAGAGTTGTTGTTTTGTCTTTT GAATTG	Ампліфікація 3’ кінця вкороченого RBD
Ko1107	CAATTCAAAAGACAAAACAACAA CTCTTCTAAAGTTAGAAGTTTGGT AAATACC	Ампліфікація 5’ кінця вкороченого RBD
Ko1108	TTGGACCACAAACAGTAGCTG	Перевірка дріжджових трансформантів
Ko1109	TTGGCGCGCC**ATG**AGATTTCCTTC AATTTTTACTGC	Ампліфікація касет експресії для заміни промотора
Ko1110	GGAAGATCTGATCTCATGACCAA AATC	Ампліфікація касет експресії для заміни промотора
Ko1111	GAGCACAAATCAAATCTCTAGC	Перевірка дріжджових трансформантів

Ko1112	GGAAGATCTCAAAGTCCAGTGTC AGATGAATG	Ампліфікація промотора *AOX1 O. polymorpha*
Ko1113	TTGGCGCGCCTTTGTTTTTGTACTT TAGATTGATGTCAC	Ампліфікація промотора *AOX1 O. polymorpha*
Ko1114	AGTTTTTGCCCTACTTGATCAC	Перевірка дріжджових трансформантів
Ko1115	CCGGAATTCTTTGTTTTTTTGGTTT TGTTGC	Клонування фрагментів послідовностей S-білка в касету експресії без α-фактора
Ko1116	CCGGAATTCTACAAGACTCCACCA ATTAAGGATTTTG	Клонування фрагментів послідовностей S-білка в касету експресії без α-фактора
Ko1117	CCGGAATTCCATTTTGTTTTTGTAC TTTAGATTGATGTCAC	Ампліфікація промотора *AOX1 O. polymorpha*
Ko1118	CCGGAATTCTACTCTTTTGTTTCTG AAGAAACTGG	Ампліфікація гена, що кодує E-білок
Ko1119	ACGCGTCGACACCTTGAAAGTAC AAGTTTTC	Ампліфікація генів, що кодують M-, E-, dS-білки
Ko1120	TCTAGAAACCAACAAATCTGGAA C	Перевірка дріжджових трансформантів
Ko1121	CCGGAATTCGCTGATTCTAACGGT ACTATTACTG	Ампліфікація гена, що кодує M-білок
Ko1122	ACAATGGTCTAGTCAAAATAGTA C	Перевірка дріжджових трансформантів
Ko1123	CCGGAATTCTCTGGTACTTTTGGT GGTATTTTGG	Ампліфікація гена, що кодує dS-білок

Ko1124	ATGGACAAGAACCAACGTAATG	Перевірка дріжджових трансформантів
Ko1132	CCGGAATTCTTGTTCAACCAACTG AATCTATTGTTAG	Ампліфікація RBD без N-кінцевого домену
Ko1133	TGCTCTAGAGCGGCCGCCGGTACC AAAGTTAACACACTTGTTCTTAAC CAAG	Ампліфікація RBD без N-кінцевого домену
Ko1160	CCGGAATTCTTGGTGGTTCTTCTG GTGGTTCTAACATTACTAACTTGT GTCCATTTGG	Ампліфікація RBD з фланкуючими ділянками, багатими на гліцин та серин
Ko1161	GCTCTAGAGCGGCCGCCGGTACC AGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA GAAGAAGAACCACCAGAACCACC CTTCTTTGGACCACAAACAGTAG	Ампліфікація RBD з фланкуючими ділянками, багатими на гліцин та серин

В подальшому було вирішено також вищепити з касет експресії послідовності, що кодують домен тримеризації та імунологічний ад'ювант, що ймовірно, можуть мати негативний вплив на здатність білків секретуватись у середовище. Для цього послідовності плазмід pRBDsmall та pRBDsmall-(α) (для експресії послідовностей RBD без N-кінцевого домену; з чи без α-фактору, відповідно) було ампліфіковано за допомогою ПЛР із використанням праймерів Ko1101/Ko1133, отримані фрагменти оброблено ендонуклеазами рестрикції XbaI або NotI, щоб позбутися домену тримеризації та імунологічного ад'юванту, або лише домену тримеризації. Вкорочені фрагменти ДНК були закільцьовані за допомогою ДНК-лігази та затрансформовані в *E. coli*.

Також було сконструйовано касети для експресії RBD з фланкуючими ділянками, багатими на амінокислоти гліцин та серин (див. нижче). Для цього фрагмент RBD було ампліфіковано за допомогою праймерів Ko1160 та Ko1161, що містять послідовності фланкуючих ділянок та клоновано в плазміди pRBDsmall та pRBDsmall-(α), оброблені ендонуклеазами рестрикції EcoRI/KpnI

або EcoRI/NotI або EcoRI/XbaI. Таким чином отримано касети для експресії RBD з фланкуючими ділянками та різним набором додаткових доменів.

Сконструювано плазміди для експресії фрагментів S-білка у «гуманізованому» штамі дріжджів *O. polymorpha* [53]. Оскільки використовуваний штам вже є зеоцин-резистентним, зеоциновий маркер плазміди pRBDsmall було замінено на ген стійкості до норзеотрицину. З отриманої плазміи було ампліфіковано фрагмент RBD з чи без α-фактора за допомогою пари праймерів Ko1132/Ko1110 або SM165/Ko1110, тоді як промотор гена *AOX1* (метанол-індукований промотор гена алкогольоксидази) *O. polymorpha* було ампліфіковано з геномної ДНК штаму NCYC495 за допомогою праймерів Ko1112/Ko1117. Фрагменти було оброблено ендонуклеазами рестрикції BglII/EcoRI і об’єднано за допомогою T4-лігази. В подальшому отримані плазміди було використано і для отримання векторів експресії без доменів тримеризації та імунологічного ад’юванту, подібно до того, як це описано вище для векторів, що використовувалися для *K. phaffii*.

З метою ефективної секреції продукованого фрагмента S-білка, було також сконструйовано касети для експресії фрагмента RBD, яка міститиме фланкуючі ділянки – гнучкі поліпептидні лінкери, що складаються з гліцину та серину та є важливими компонентами сконструйованих багатодоменних білків. Глі-Сер зв'язки дозволяють змінити конформаційну поведінку білків, збільшують жорсткість лінкера у внутрішньо неупорядкованих білках, і забезпечують стабільність конформації під час секреції [54].

Для роботи був використаний попередньо сконструйований вектор pRBDsmall з норзеотриціновим маркером і промотором *AOX1 O. polymorpha*. За допомогою пар ендонуклеаз рестрикції EcoRI/NotI та EcoRI/XbaI з касети було вищеплено ділянки N-кінцевого сигналу секреції, домену тримеризації, імунологічного адюванту (hIgG1-Fc2) та власне RBD (рис. 2).

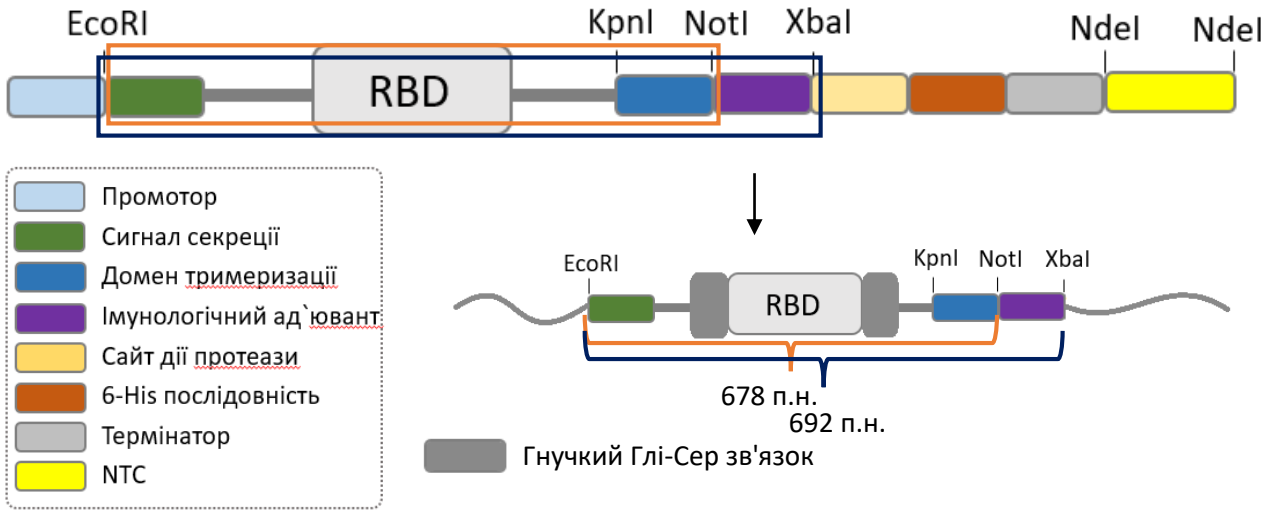


Рис. 2. Схематичне зображення конструювання касет для експресії фрагмента RBD з фланкуючими гліцин-сериновими лінкерами.

На наступному етапі, попередньо сконструйовану плазміду p8, що містила RBD з фланкуючими Глі-Сер ділянками, було оброблено аналогічними парами рестрикційних ферментів EcoRI/NotI та EcoRI/XbaI, що дозволило отримати фрагменти з когезивними кінцями. Відповідні ділянки p8 та фрагменти касети pRBDsmall було з'єднано за допомогою T4 ДНК-лігази.

Ще однією з цілей даного проєкту було отримання вірусоподібних частинок SARS-CoV-2. Для складання VLP повинні містити каркасні білки (основу), які спрямовують та координують самозбірку вірусних білків до структури VLP. Існують дані про отримання VLP SARS-CoV-1 на основі експресії білків E та M разом із S білком у клітинах комах, проте титр VLP був низьким. Нещодавно було встановлено, що малий білок вірусу гепатиту качки (dS) може виконувати роль каркасу для збирання різних VLP в дріжджах *O. polymorpha* [33], проте збирання SARS-CoV-1 не вивчалося. Нами було вирішено спробувати експресувати білки S, E і M SARS-CoV-2, а також dS у *K. phaffii* або *O. polymorpha* для тестування збирання VLP.

Для цього було сконструювано вектори для експресії білків S, E і M SARS-CoV-2 та dS вірусу гепатиту качки. Послідовності S, M та E-білків SARS-CoV-2 було взято з NCBI (Gen-Bank: MN908947.3) та синтезовано відповідні молекули

ДНК, що були кодон-оптимізовані для ефективної експресії білків в *K. phaffii* за допомогою «Codon Wizard». Оптимізовані нуклеотидні послідовності було синтезовано фірмою BioCat GmbH (Heidelberg, Germany). Для ампліфікації гена, що кодує М-білок використовувалася пара праймерів Ko1121/Ko1119 (Див. табл. 2). Для ампліфікації гена, що кодує Е-білок використовувалася пара праймерів Ko1118/Ko1119. Для ампліфікації RBD разом з N-кінцевим доменом використовувалася пара праймерів Ko1097/Ko1098.

Послідовності dS вірусу гепатиту качки було взято з NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/MF510122), кодон-оптимізовано та синтезовано так само як для послідовностей білка вірусу SARS-CoV-2. Для ампліфікації гена, що кодує dS-білок використовувалася пара праймерів Ko1123/ Ko1119.

Всі згадані послідовності клонували в касети експресії, що містили промотор гена *AOX1*, α-фактор (або без нього), сайт впізнавання TEV протеази та 6-His послідовності. В подальшому послідовності для експресії різних генів було покроково клоновано в один вектор, використовуючи метод клонування, де вектор обробляється ендонуклеазою рестрикції BamHI, а вставка – ендонуклеазами BamHI та BglII. Отримано 4 варіанти таких векторів: (1) вектор з послідовностями, що кодують М та Е-білки SARS-CoV-2 і dS білок вірусу гепатиту качки з α-фактором; (2) вектор з послідовностями, що кодують М та Е-білки SARS-CoV-2 і dS білок вірусу гепатиту качки без α-фактору; (3) вектор з послідовностями, що кодують фрагмент S-білка (RBD з N-кінцевим доменом), М та Е-білки SARS-CoV-2 і dS білок вірусу гепатиту качки з α-фактором; (4) вектор з послідовностями, що кодують фрагмент S-білка (RBD з N-кінцевим доменом), М та Е-білки SARS-CoV-2 і dS білок вірусу гепатиту качки без α-фактору.

3.2 Введення отриманих нуклеотидних послідовностей в «гуманізовані» штами дріжджів.

Отримані вектори для експресії нуклеотидних послідовностей, що кодують фрагменти S-білка або генів, що кодують компоненти для збирання

вірусоподібних частинок SARS-CoV-2, було лінеаризовано за допомогою ендонуклеаз рестрикції SacI або BamHI і використано для трансформації «гуманізованого» штаму дріжджів *K. phaffii* SuperMan 5-10 [55].

Дріжджові трансформанти відбирали на середовищі YPD з додаванням 150 мг/л антибіотика зеоцину. Отримані штами було стабілізовано шляхом поперемінного культивування на неселективному та селективному середовищах і наявність касет експресії в геномі цих штамів було підтверджено з допомогою аналітичної ПЛР. В таблиці 3 перераховані всі отримані рекомбінантні штами *K. phaffii*, що використовувалися у подальшій роботі.

Вектори, що були сконструйовані для *O. polymorpha*, після лінеаризації за допомогою ендонуклеази рестрикції SacI було введено в гуманізований штам *O. polymorpha* [53] методом електропорації. Дріжджові трансформанти відбирали на середовищі YPD з додаванням антибіотика норзеотрицину (100 мг/л). Для отримання стабільних рекомбінантних штамів трансформанти культивували в неселективних умовах з подальшим відбором клонів, які зберігають здатність до росту на середовищі з антибіотиком. Підтвердження інтеграції касети в геном дріжджових реципієнтів проводили методом ПЛР, використовуючи пари праймерів Ko1114/Ko1151. Рекомбінантні штами *O. polymorpha*, що використовувалися у подальшій роботі, перелічені в таблиці 3.

Таблиця 3.

Рекомбінантні штами дріжджів, що були отримані в процесі виконання проєкту на основі «гуманізованих» штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha* і використовувалися для подальшої біохімічної характеристики

№ штаму	**Вихідний штам, на основі якого сконструйований рекомбінантний**	**Які білки/білкові домени кодуються касетами експресії, введеними в геном штаму**	**Очікувані розміри рекомбі-нантного білка/білків**

1	*K. phaffii* SuperMan 5-10	α-фактор, RBD, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	65.81 кДа
2	*K. phaffii* SuperMan 5-10	RBD, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	56.27 кДа
3	*K. phaffii* SuperMan 5-10	NTD, RBD, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	108.17 кДа
4	*K. phaffii* SuperMan 5-10	α-фактор, FP, HR1, HR2, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	87.74 кДа
5	*K. phaffii* SuperMan 5-10	FP, HR1, HR2, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний адювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	78.47 кДа
6	*K. phaffii* SuperMan 5-10	α-фактор, NTD, RBD, FP, HR1, HR2, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	175.36 кДа

7	*K. phaffii* SuperMan 5-10	NTD, RBD, FP, HR1, HR2, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	166.09 кДа
8	*K. phaffii* SuperMan 5-10	dS – маленький S білок вірусу гепатиту качки з сигналом секреції α-фактора, сайтом дії TEV протеази та послідовністю 6xHis; M, E – білки вірусу SARS-CoV-2 з сигналами секреції α-фактора, сайтами дії TEV протеази та послідовностями 6xHis	30.15 кДа 37.1 кДа 20.31 кДа
9	*K. phaffii* SuperMan 5-10	dS – маленький S білок вірусу гепатиту качки з сайтом дії TEV протеази та послідовністю 6xHis; M, E – білки вірусу SARS-CoV-2 з сайтами дії TEV протеази та послідовностями 6xHis	20.61 кДа 27.56 кДа 10.77 кДа
10	*K. phaffii* SuperMan 5-10	α-фактор, NTD, RBD, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	117.44 кДа
11	*O. polymorpha* humanized	α-фактор, RBD, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	65.81 кДа

12	*O. polymorpha* humanized	α-фактор, RBD, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	65.81 кДа
13	*O. polymorpha* humanized	α-фактор, RBD, Глі-Сер фланкуючі ділянки, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	52.48 кДа
17	*O. polymorpha* humanized	α-фактор, RBD, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	62.75 кДа
18	*K. phaffii* SuperMan 5-10	RBD, сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	27.64 кДа
19	*O. polymorpha* humanized	α-фактор, RBD, сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	37.18 кДа
21	*K. phaffii* SuperMan 5-10	dS – маленький S білок вірусу гепатиту качки з сайтом дії TEV протеази та послідовністю 6xHis; M, E – білки вірусу SARS-CoV-2 з сайтами дії TEV протеази та послідовностями 6xHis та фрагмент S білка, що містить NTD, RBD, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний адювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	20.61 кДа 27.56 кДа 10.77 кДа 108.17 кДа

22	*K. phaffii* SuperMan 5-10	α-фактор, RBD, Глі-Сер фланкуючі ділянки, сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	26.92 кДа
23	*O. polymorpha* humanized	α-фактор, RBD, Глі-Сер фланкуючі ділянки, сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	26.92 кДа
25	*K. phaffii* SuperMan 5-10	dS – маленький S білок вірусу гепатиту качки з сигналом секреції α-фактора, сайтом дії TEV протеази та послідовністю 6xHis; M, E – білки вірусу SARS-CoV-2 з сигналами секреції α-фактора, сайтами дії TEV протеази та послідовностями 6xHis та фрагмент S білка, що містить α-фактор, NTD, RBD, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний адювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	30.15 кДа 37.1 кДа 20.31 кДа 117.44 кДа
39	*K. phaffii* SuperMan 5-10	α-фактор, RBD, Глі-Сер фланкуючі ділянки, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад’ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	52.54 кДа

50	*K. phaffii* SuperMan 5-10	α-фактор, RBD, Глі-Сер фланкуючі ділянки, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis	52.48 кДа

3.3 Біохімічна характеристика рекомбінантних штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha*, що продукують фрагменти S білка

Для індукції продукції цільових білків, отримані рекомбінантні штами культивувалися в середовищі з метанолом. Для рекомбінантних штамів *K. phaffii* використовувалися такі умови культивування: дріжджі інокулювали у колби об'ємом 300 мл, які містили 100 мл середовища BMGY: (1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 100 мМ калій фосфатний буфер pH 6,0, 0,7% YNB, 0,4 мг/л біотин, 1% гліцерин) та вирощували при 30°C за умов перемішування при 200 об/хв. Через 18-24 години, коли OD_{600} досягло 10-15 одиниць, клітини збирали, ресуспендували в 100 мл буферизованого середовища, що включає метанол (BMMY: 1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 100 мМ калій фосфатний буфер pH 6,0, 0,7% YNB, 0,4 мг/л біотин, 0,5 % метанол) до початкового OD_{600} = 1,5, і інкубували при 30°C за умов перемішування при 200 об/хв у колбах об'ємом 300 мл. Кожні 24 години додавали метанол (0,5 мл) до кінцевої концентрації 0,5 %. Індукцію здійснювали протягом 72-96 годин при 30°C. Далі клітини відокремлювали центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 10 хвилин. Надосадову рідину та клітини заморожували при -70° C до використання.

Для рекомбінантних штамів *O. polymorpha* використовувалися такі умови культивування: дріжджі інокулювали у колбах об'ємом 300 мл, які містили 100 мл YPD (1% дріжджового екстракту, 2% пептону та 2% глюкози) та вирощували при 37°C за умов перемішування при 200 об/хв. Через 18-24 годин, коли OD_{600} досягло 10-15 одиниць, клітини збирали, ресуспендували в 100 мл буферизованого середовища, що включає метанол (BMMY: 1% дріжджовий екстракт, 2% пептон, 100 мМ фосфат калію pH 6,0, 0,7% YNB, 0,4 мг/л біотин, 1% метанол) до початкового OD_{600} = 2,0, і інкубували при 37°C за умов

перемішування при 200 об/хв у колбах об'ємом 300 мл. Кожні 24 години додавали метанол (1 мл) до кінцевої концентрації 1%. Індукцію здійснювали протягом 72 годин при 37°С. Далі клітини відокремлювали центрифугуванням при 3000 об/хв протягом 10 хвилин. Надосадову рідину та клітини заморожували при -70° С до використання.

Продукцію фрагментів S-білка було проаналізовано за допомогою Вестерн-блот аналізу. Для аналізу використовували первинні антитіла Anti-6*HIS або Anti-SARS-COV-2-Spike-RBD.

В результаті проведення Вестерн-блот аналізу зразків клітин і культуральної рідини рекомбінантних штамів № 1, 3, 6, 7 та 10, що містять фрагменти S білка різної довжини з доменом тримеризації білка фібритину та імунологічним ад'ювантом, з або без α-фактору, було показано, що цільовий білок залишається всередині клітин дріжджів і не секретується в культуральне середовище (Рис. 3).

Рис. 3 Результати Вестерн-блот аналізу клітин і культурального середовища рекомбінантних штамів *K. phaffii* SuperMan 5-10, що містять різні фрагменти S білка, з використанням антитіл Anti-SARS-COV-2-Spike-RBD **(А)** та Anti-6*HIS **(Б)**. №1, 10, 3, 6, 7 - рекомбінантні штами *K. phaffii*, що містять цільові гени, які кодують варіанти S білка з допоміжними послідовностями (див. Табл. 3); WT – вихідний штам *K. phaffii* SuperMan 5-10. Стрілками позначено фрагменти очікуваної величини.

При використанні антитіл Anti-SARS-COV-2-Spike-RBD на рис. 3 (А) можна побачити смугу розміром 65,8 кДа, що відповідає розміру білка, що експресує штам №1 (секреторний сигнал α-фактора, RBD, домен тримеризації, послідовність ад'юванта, сайт для протеази і 6-His -послідовність). Для штаму №10 можна побачити смугу розміром 117,4 кДа, що відповідає розміру білка, який експресує цей штам (секреторний сигнал α-фактора, NTD, RBD, домен тримеризації, послідовність ад'юванта, сайт для протеази і 6-His-послідовність). Для штаму №3 можна побачити смугу розміром 108,2 кДа, що відповідає розміру білка, який експресує цей штам (NTD, RBD, домен тримеризації, послідовність ад'юванта, сайт для протеази і 6-His-послідовність). Для штаму №7 можна побачити смугу розміром 166,1 кДа, що відповідає розміру білка, який експресує цей штам (NTD, RBD, FP, HR1, HR2, домен тримеризації, послідовність ад'юванта, сайт для протеази, 6-HIS-послідовність).

Було встановлено, що при використанні антитіл Anti-6*HIS для штамів №1, №10 і №3 фрагменти величиною 65,8 кДа, 117,4 кДа і 108,2 кДа, відповідно, також чітко помітні на плівці, що підтверджує наявність цільового білка в клітинах цих рекомбінантних штамів (Рис. 3, Б).

Для штамів №4 і №5 при використанні антитіл Anti-6*HIS встановлено наявність фрагментів 87,7 і 78,5 кДа відповідно, що відповідають величинам цільового білка для цих штамів дріжджів (Рис. 4).

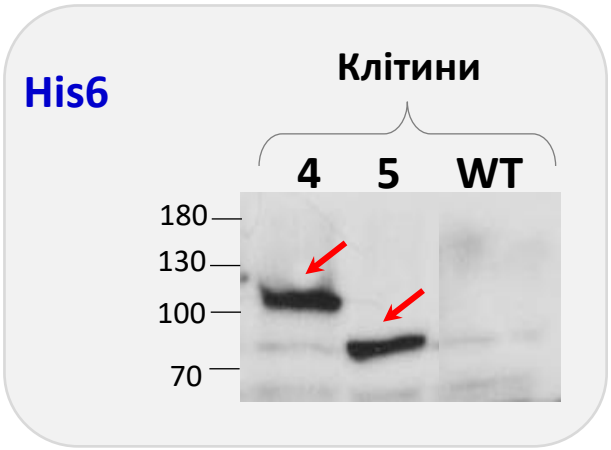


Рис. 4 Результати Вестерн-блот аналізу клітин рекомбінантних штамів *K. phaffii* SuperMan 5-10, що містять різні фрагменти S білка, з використанням антитіл

Anti-6*HIS. №4, 5 - рекомбінантні штами *K. phaffii*, що містять цільові гени, які кодують варіанти S білка з допоміжними послідовностями; WT – вихідний штам *K. phaffii* SuperMan 5-10. Стрілками позначено фрагменти очікуваної величини.

Штами *O. polymorpha*, які експресують фрагмент RBD, також було проаналізовано за допомогою Вестерн-блот аналізу. Для аналізу використовували первинні антитіла Anti-SARS-COV-2-Spike-RBD. В результаті проведення Вестерн-блот аналізу зразків клітин і культуральної рідини рекомбінантних штамів №11 та №12, було показано, що RBD (очікуваної величини 66 кДа) залишається в середині клітин дріжджів і не секретується в культуральне середовище (Рис. 5).

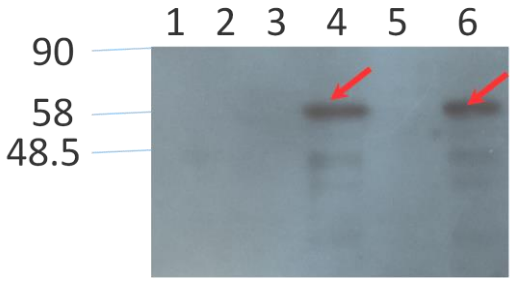


Рис. 5 Результати Вестерн-блот аналізу клітин і культурального середовища рекомбінантних штамів *O. polymorpha*, що містять фрагмент RBD, з використанням антитіл Anti-SARS-COV-2-Spike-RBD. 1 – концентроване середовище вихідного штаму *O. polymorpha* (контроль); 2 – клітини вихідного штаму *O. polymorpha* (контроль); 3, 5 – концентроване середовище штамів №11 та №12 *O. polymorpha*, що експресують α-фактор, RBD, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний адювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6-His; 4, 6 – клітини штамів №11 та №12 *O. polymorpha*, що експресують α-фактор, RBD, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний адювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6-His. Стрілками позначено фрагменти очікуваної величини.

Оскільки фрагменти S білка з секреторним сигналом не секретувалися у культуральне середовище ні у рекомбінантних штамів *O. polymorpha*, ні у рекомбінантних штамів *K. phaffii*, було вирішено отримати також штами, що продукуватимуть фрагмент RBD без додаткових доменів, що можуть перешкоджати секреції білків, а саме без домену тримеризації або без домену тримеризації та імунологічного адюванту. Однак, сконструйовані рекомбінантні штами *K. phaffii* не секретували в культуральне середовище ці білки без додаткових доменів, тоді як у *O. polymorpha* секреція спостерігалася у випадку штаму 19, що продукує RBD з α-фактором, сайтом дії TEV протеази та послідовністю 6xHis (Рис. 6).

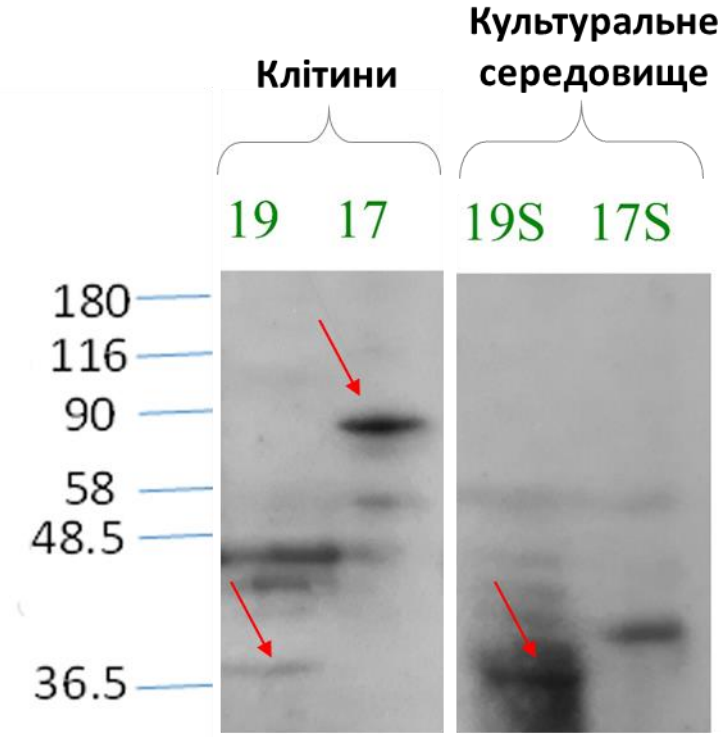


Рис. 6 Результати Вестерн-блот аналізу клітин і культурального середовища рекомбінантних штамів *O. polymorpha*, що містять фрагмент RBD, з використанням антитіл Anti-SARS-COV-2-Spike-RBD. 19 – клітини штаму №19 *O. polymorpha*, що експресує α-фактор, RBD, сайт дії TEV протеази та послідовність 6-His; 17 – клітини штаму №17 *O. polymorpha*, що експресує α-фактор, RBD, імунологічний адювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6-His; 19s – концентрована культуральна рідина штаму №19 *O. polymorpha*, що експресує α-фактор, RBD, сайт дії TEV протеази та

послідовність 6-His; 17s – концентрована культуральна рідина штаму №17 *O. polymorpha*, що експресує α-фактор, RBD, імунологічний адювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6-His; Стрілками позначено фрагменти очікуваної величини.

Для того, щоб все ж таки досягнути секреції RBD фрагмента у *K. phaffii*, було сконструйовано рекомбінантні штами №22, №39 та №50 (Див. табл. 3), що продукували фрагмент RBD з фланкуючими ділянками – гнучкими поліпептидними лінкерами, що складаються з гліцину та серину. Також були сконструйовані і подібні рекомбінантні штами *O. polymorpha* – штами №23 і №13. Серед сконструйованих штамів для продукції RBD з гнучкими лінкерними ділянками, секреція білка в культуральне середовище спостерігалася у випадку штаму №22 і частково штаму №50 (Рис. 7)

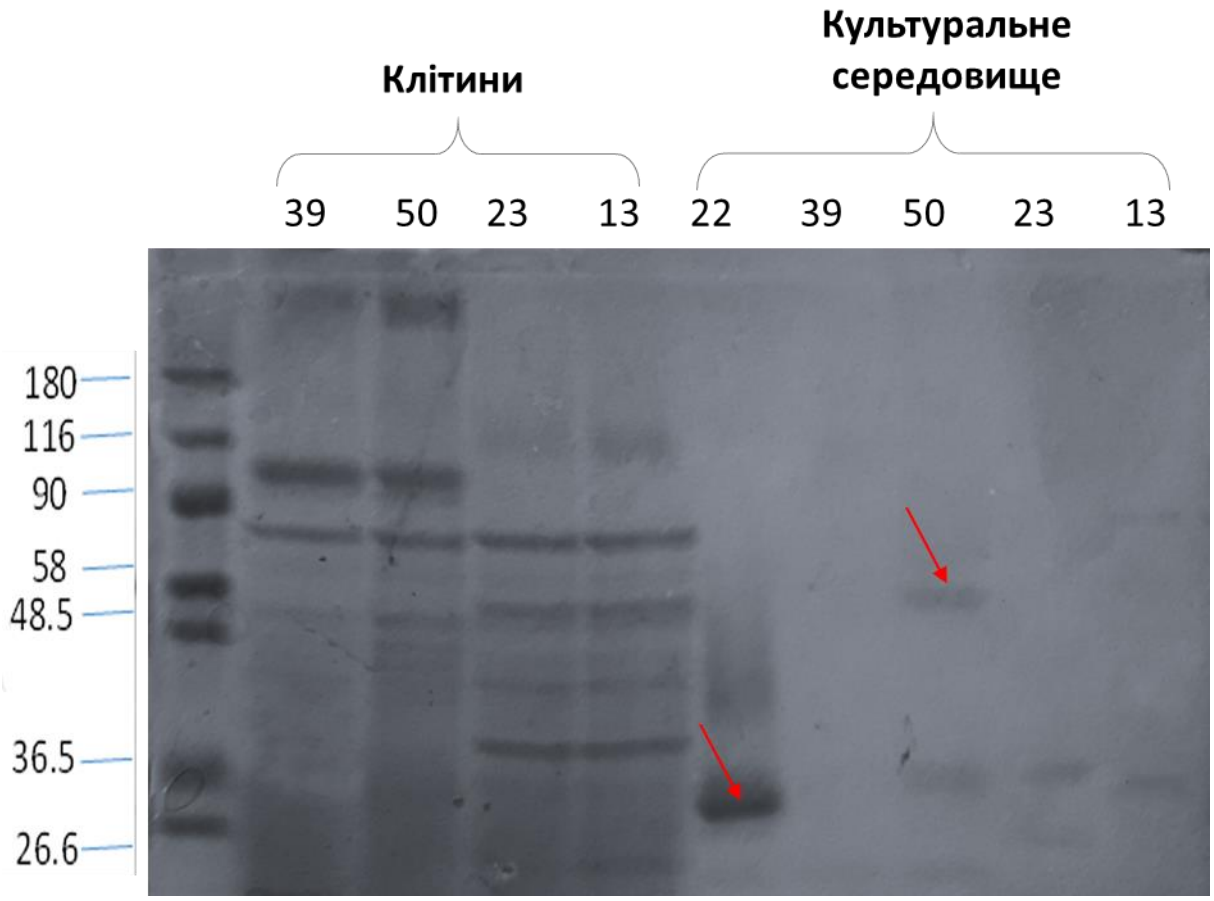


Рис. 7 Результати Вестерн-блот аналізу клітин і сконцентрованого культурального середовища рекомбінантних штамів *K. phaffii* і *O. polymorpha*,

що містять фрагмент RBD з гнучкими лінкерними ділянками, з використанням антитіл Anti-SARS-COV-2-Spike-RBD. 39 – штам *K. phaffii*, що експресує α-фактор, RBD, Глі-Сер фланкуючі ділянки, домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis; 50 – штам *K. phaffii,* що експресує α-фактор, RBD, Глі-Сер фланкуючі ділянки, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis; 22 – штам *K. phaffii,* що експресує α-фактор, RBD, Глі-Сер фланкуючі ділянки, сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis; 23 –штам *O. polymorpha*, що експресує α-фактор, RBD, Глі-Сер фланкуючі ділянки, сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis; 13 –штам *O. polymorpha*, що експресує α-фактор, RBD, Глі-Сер фланкуючі ділянки, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та послідовність 6xHis. Стрілками позначено фрагменти очікуваної величини.

3.4 Очищення фрагментів S білка з клітин рекомбінантних штамів *K. phaffii* та *O. polymorpha* або з культуральної рідини

Оскільки більшість отриманих рекомбінантних штамів *K. phaffii* і *O. polymorpha* не секретували рекомбінантні білки у культуральне середовище, було вирішено провести очистку білків з клітин дріжджів. Для цього, для початку необхідно визначити локалізацію цільових білків в клітинах рекомбінантних штамів дріжджів. Після руйнування клітин дріжджів штамів № 4 і № 25 за допомогою скляних кульок, цільові білки були виявлені у нерозчинній фракції клітинного дебрісу, тоді як у розчинній фракції, відповідних білків не виявлено (Рис. 8). Після екстракції цільових білків з нерозчинної фракції клітинного дебрісу за допомогою 0,3% лаурилсаркозиду, в результаті Вестерн-блот аналізу, було виявлено смуги очікуваної величини, а саме 87,7 кДа (для штаму №4) і 30 кДа, 37 кДа, 20 кДа, 117 кДа (для штаму №25) (Рис. 8).

Після руйнування клітин дріжджів штамів №4 і № 25 за допомогою буферу RIPA (20 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ Na_2EDTA, 1 мМ EGTA, 1% NP-40, 1% дезоксихолат натрію, 2,5 мМ натрію пірофосфат, 1 мМ β-

гліцерофосфат, 1 мМ Na_3VO_4, 1 мкг/мл леупептин) з подальшим центрифугуванням, в розчинній фракції цільових білків не виявлено. Проте білки з очікуваними величинами були виявлені з нерозчинній фракції. Отже, використання буферу RIPA не забезпечує екстрагування цільових білків з нерозчинних мембранних фракції.

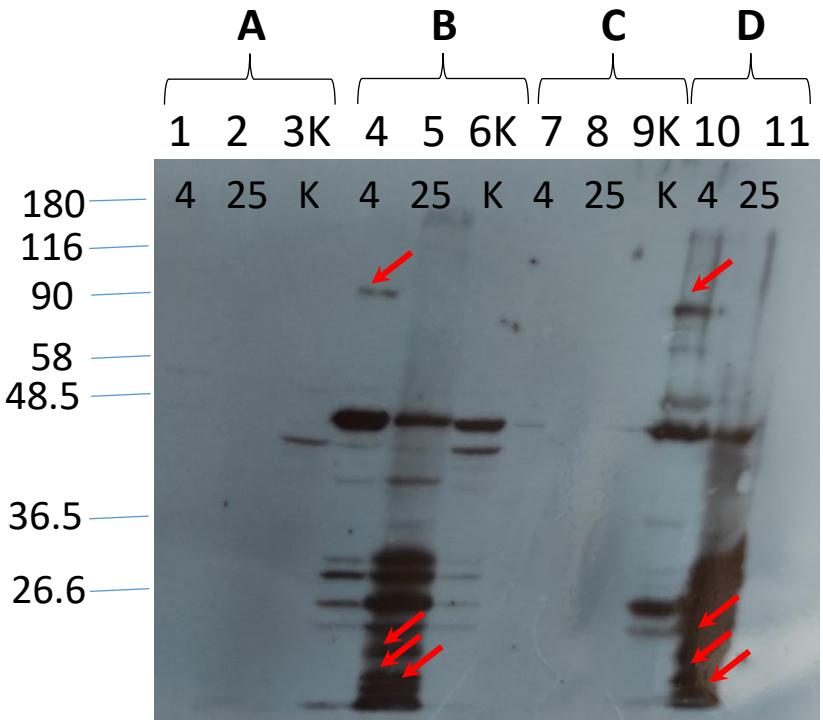


Рис. 8 Результати Вестерн-блот аналізу безклітинних екстрактів рекомбінантних штамів *K. phaffii*, що містять фрагмент S білка та білки-компоненти вірусоподібних частинок, з використанням антитіл Anti-6*HIS. Стрілками позначено фрагменти очікуваної величини. A) Розчинні фракції безклітинних екстрактів, отриманих після руйнування клітин скляними кульками; B) екстракт, отриманий з фракції клітинного дебрісу за допомогою 0,3% лаурилсаркозиду, C) розчинні фракції безклітинних екстрактів, отриманих після руйнування клітин буфером RIPA, D) нерозчинні фракції безклітинних екстрактів, отриманих після руйнування клітин буфером RIPA.

Для штамів №2, №3 було отримано безклітинні екстракти за допомогою скляних кульок. Цільові білки екстрагували з нерозчинного клітинного дебрісу 6 М гуанідингідрохлоридом. Очистку цільових білків проводили з

використанням Ni-сефарози, як описано в підпункті 2.14 розділу Матеріали і методи досліджень. Перед Вестерн-блот аналізом фракції очищеного білка діалізували проти 20 мМ фосфатного буферу pH 7,5. В результаті Вестерн-блот аналізу, було виявлено смуги очікуваної величини, а саме 56 кДа і 108 кДа для штамів №2 і №3, відповідно (Рис. 9). Зниження pH буферу для елюції забезпечувало більш повну елюцію цільових білків (Рис. 9).

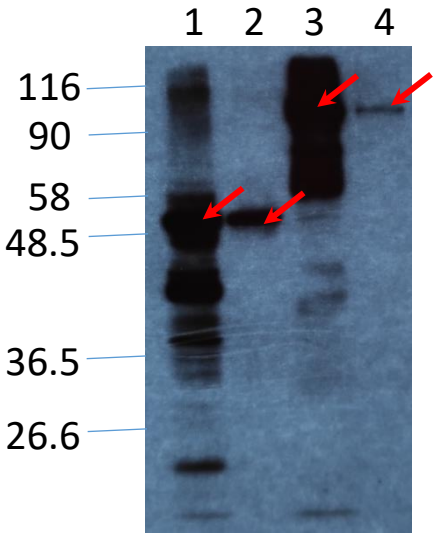


Рис. 9 Результати Вестерн-блот аналізу очищених білків з використанням антитіл Anti-SARS-COV-2-Spike-RBD: доріжки 1, 2 – білок, отриманий зі штаму №2, доріжки 3, 4 – білок, отриманий зі штаму №3. Доріжки 1, 3 – елюцію проводили з використанням 20 мМ калій-фосфатного буфера (pH 7.5), доріжки 2, 4 – елюцію проводили з використанням 100 мМ натрій-ацетатного буфера (pH 5). Стрілками позначено фрагменти очікуваної величини.

Зразки очищених білків з штамів №2 і №3, а також штаму №5 аналізували також із використанням антитіл Anti-6*HIS. Виявлено цільові білки очікуваної величини 78,5 кДа, 56 кДа і 108 кДа очищених з штамів №5, №2 і №3, відповідно (Рис. 10).

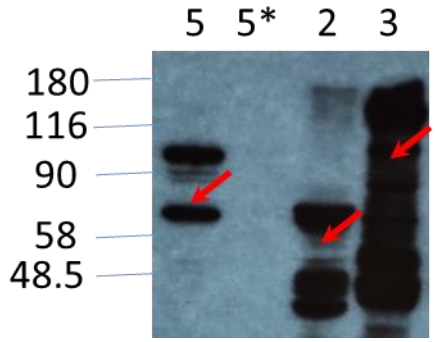


Рис. 10 Результати Вестерн-блот аналізу очищених білків з штамів *K. phaffii* №5, №2 та №3. 5* елюцію проводили з використанням буфера зі зниженим pH. Стрілками позначено фрагменти очікуваної величини.

Було також сконструйовано штам №18 *K. phaffii*, що продукує варіант RBD без домена тримеризації та послідовності ад'юванта. Цей варіант було використано для відпрацювання процесу солюбілізації та очищення білків з нерозчинної фракції безклітинних екстрактів. Найчастіше солюбілізацію білків проводять в умовах денатурації. З цією метою нами було використано кілька типів денатураційних буферів. Спочатку ми використали денатураційний буфер на основі N-лаурилсаркозиду. Солюбілізацію нерозчинних білків клітин проводили при почерговій інкубації клітинного дебрісу в денатураційних буферах, що містили 0,3%; 1% та 2% цього детергента. Окрім того, до складу цього буферу входив 1мМ ДТТ в 20 мМ фосфатному буфері pH 8,0. Об'єм буферу, доданого до нерозчинних фракцій клітин залежав від маси осаду. 10-20 мг осаду суспендували в 1 мл буферу та інкубували при кімнатній температурі 1 год. Відбирали по 100 мкл суспензії та після центрифугування 20 хв при 12000 об/хв готували зразки осадової та надосадової фракцій згідно описаної в підпункті 2.13 методики для проведення Вестерн-блот аналізу. Однак, наведені вище концентрації детергента у солюбілізаційному буфері не приводять до очікуваного розчинення цільових білків. Тому нами було використано інший денатураційний буфер, до складу якого входить гунідингідрохлорид.

На першому етапі ми дослідили вплив концентрації денатуруючого агента – гуанідингідрохлориду у 20 мМ фосфатному буфері pH 7,5 на вихід цільових

білків. Для цього однакові аліквоти суспензії зруйнованих клітин, що містили нерозчинні білки розчиняли у буфері, що містив 4 М; 5 М та 6 М гуанідингідрохлорид. Нерозчинний залишок видаляли центрифугуванням, а супернатант після ренатурації аналізували за допомогою Вестерн-блот аналізу. Ренатурацію денатурованих білків проводили за допомогою діалізу денатураційної суміші, як описано в підпункті 2.18 розділу Матеріали і методи досліджень.

Результати імунологічного аналізу досліджуваних зразків білків, денатурованих за різних умов засвідчили, що зниження концентрації гуанідингідрохлориду із 6 М до 4 М призводить до суттєвого зниження виходу досліджуваних білків. Тоді як при використанні 6 М концентрації гуанідингідрохлориду в денатураційному буфері вихід білків був найвищий.

Відомо, що досліджувані фрагменти S-білків містять у С-кінцевій частині специфічну послідовність, до якої входить дві сірковмісні амінокислоти. Ймовірно, що ці залишки можуть окислюватись впродовж процедури денатурації-ренатурації, що призведе до зниження виходу цих білків. Тому на наступному етапі ми перевіряли вплив ДТТ (0-5мМ), доданого до денатуруючого буферу, який містив 6 М гуанідингідрохлорид. Було виявлено, що збільшення концентрації ДТТ вже до 1 мМ приводить до зростання виходу цільових білків. Подальше підвищення концентрації ДТТ у денатуруючому буфері не впливало на білковий вихід. Тому у всіх подальших експериментах для розчинення потрібних білків використовували денатуруючий буфер наступного складу: 20 мМ фосфатний буфер pH 7,5, 6 М гуанідингідрохлорид, 1 мМ ДТТ. Розчинення білків проводили 1 год при 37°С.

У процесі проведення діалізу денатураційної суміші частина солюбілізованих білків випадала в осад. Для того, щоб дослідити ці білки, осад було зібрано за допомогою центрифугування, денатуровано в описаних вище умовах та випробувано наступний метод ренатурації: відновлення структури білків проводили шляхом швидкого розведення денатураційної суміші у 100 кратному об’ємі 10 мМ фосфатного буферу pH 7,5 з подальшою інкубацією при 15°С

впродовж 90-100 годин. Далі білкові суспензії було сконцентровано та проведено їх імунологічний аналіз. Цільових білків у зразках не було виявлено. Очевидно, що для ренатурації цільових білків достатнім є проведення діалізу денатураційної суміші у вказаних вище умовах.

З отриманої денатураційної суміші було проведено очистку білків за допомогою металоафінної хроматографії, як описано в підпункті 2.14 розділу Матеріали і методи досліджень. Ефективність елюції RBD було підтверджено за допомогою Вестерн-блот аналізу (Рис. 11).

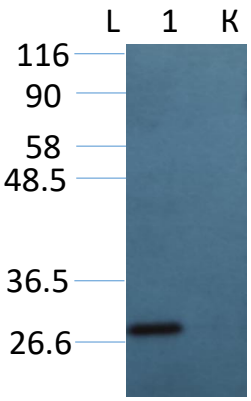


Рис. 11 Результати Вестерн-блот аналізу очищеного білка з штаму *K. phaffii* №18, що містить RBD без додаткових доменів, проте, з наявним сайтом дії TEV протеази та послідовністю 6-His

Було відпрацьовано також процес очистки рекомбінантного білка з культуральної рідини. При цьому використовувалася культуральна рідина, отримана після культивування штаму *K. phaffii* №22, що продукує RBD з α-фактором, Глі-Сер фланкуючими ділянками, сайтом дії TEV протеази та послідовністю 6xHis. Аналізувався вміст цільового білка у різних фракціях: вихідній культуральній рідині; культуральній рідині, сконцентрованій за допомогою колонок; стоковій фракції, що містить білки які не зв'язалися з Ni-сефарозою; 4 фракцій Wash-буферу, що використовувався для промивки колонок з Ni-сефарозою; та 2 фракцій Elution-буферу, що використовувався для змивання білка з 6-His міткою з колонок з Ni-сефарозою. Результати цього аналізу представлені на рис. 12. Як видно з рисунку, частина продукованого білка не зв'язується з Ni-сефарозою та залишається в стоковій фракції, однак вміст білка в фракціях Elution-буферу також є достатньо високим і білок є чистим – не містить сторонніх домішків.

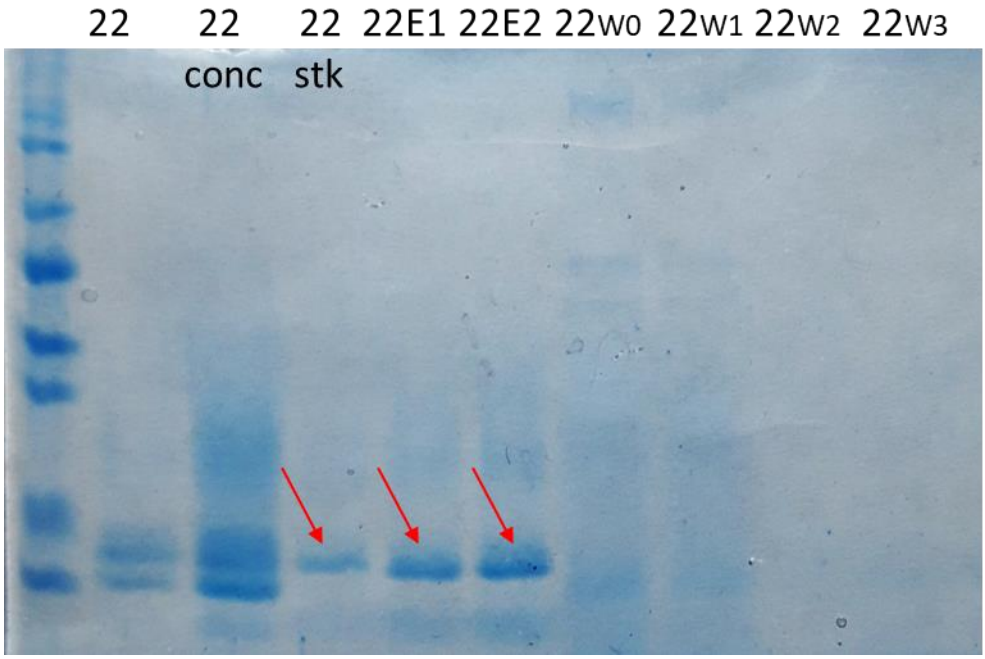


Рис. 12 Результати білкового гельелектрофорезу з використанням різних фракцій, отриманих під час очистки фрагменту RBD з культуральної рідини, одержаної після культивування штаму *K. phaffii* №22. 22 – вихідна культуральна рідина; 22conc – культуральна рідина, сконцентрована за допомогою колонок; 22stk – стокова фракція; $22W_{0\text{-}3}$ – 4 фракції Wash-буферу; $22E_{1,2}$ – 2 фракції Elution-буферу.Стрілками позначено фрагмент очікуваної величини.

3.5 Біохімічна характеристика рекомбінантних штамів *K. phaffii*, що продукують компоненти вірусоподібних частинок.

Було проаналізовано рекомбінантні штами *K. phaffii*, що продукують компоненти вірусоподібних частинок (штами №8 і №9). Показано, що цільові білки також залишаються всередині клітин дріжджів (Рис. 13). Для штаму №8 на Рис. 13 наявні смуги величиною 20 кДа, 30 кДа і 37 кДа, що відповідають теоретичним розмірам білків вірусоподібних частинок (dS – маленький S білок вірусу гепатиту качки з сигналом секреції α-фактора; M, E – білки вірусу SARS-CoV-2 з сигналами секреції α-фактора). Для штаму №9 на Рис. 13 наявні смуги величиною 11 кДа, 21 кДа і 28 кДа, що відповідають теоретичним розмірам білків вірусоподібних частинок (dS – маленький S білок вірусу гепатиту качки; M, E – білки вірусу SARS-CoV2). Важливо відзначити, що для штаму №8 також

характерні смуги, які відповідають білкам dS, M, і E без сигналу секреції. Це свідчить про те, що секреторний сигнал відщеплюється, але цільові білки залишаються всередині клітини.

Рис. 13 Результати Вестерн-блот аналізу клітин рекомбінантних штамів *K. phaffii* SuperMan 5-10, що містять білки-компоненти вірусоподібних частинок, з використанням антитіл Anti-6*HIS. №8, 9 – рекомбінантні штами *K. phaffii*, що містять цільові гени, які кодують білки-компоненти вірусоподібних частинок з допоміжними послідовностями; WT – вихідний штам *K. phaffii* SuperMan 5-10. Стрілками позначено фрагменти очікуваної величини.

При використанні антитіл Anti-6*HIS, у клітинах (зруйнованих за допомогою ТХО) штамів №21 і №25 показано наявність очікуваних фрагментів величиною 21 кДа, 28 кДа, 11 кДа, 108 кДа і 30 кДа, 37 кДа, 20 кДа, 117 кДа відповідно (Рис. 14), що відповідають величинам цільових білків. При проведенні аналізу культуральної рідини очікуваних фрагментів не виявлено. Отримані результати свідчать про те, що білки не секретуються в культуральне середовище, а залишаються в клітинах дріжджів.

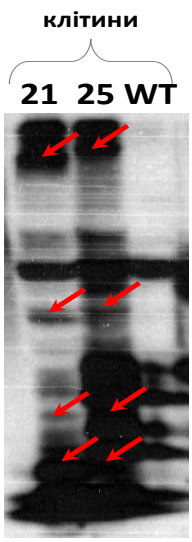


Рис. 14 Результати Вестерн-блот аналізу клітин рекомбінантних штамів *K. phaffii* SuperMan 5-10, що містять білки-компоненти вірусоподібних частинок, з використанням антитіл Anti-6*HIS. №21, 25 – рекомбінантні штами *K. phaffii*, що містять цільові гени, які кодують білки-компоненти вірусоподібних частинок з допоміжними послідовностями; WT – вихідний штам *K. phaffii* SuperMan 5-10. Стрілками позначено фрагменти очікуваної величини.

Трансмісійна електронна мікроскопія клітин штамів №8, 9, 21 та 25 проводилася з використанням електронного мікроскопу Tecnai G2 Spirit Biotwin (FEI, Thermofisher scientific, OR, США). Результати електронної мікроскопії з використанням клітин штамів №8, 9, 21 та 25 до перенесення на середовище з метанолом та після індукції метанолом представлені на рис. 15. Білі ікосаедроподібні структури, особливо яскраво представлені на фото у штаму №9, можуть бути вірусоподібними частинками, але для підтвердження цього потрібні додаткові дослідження.

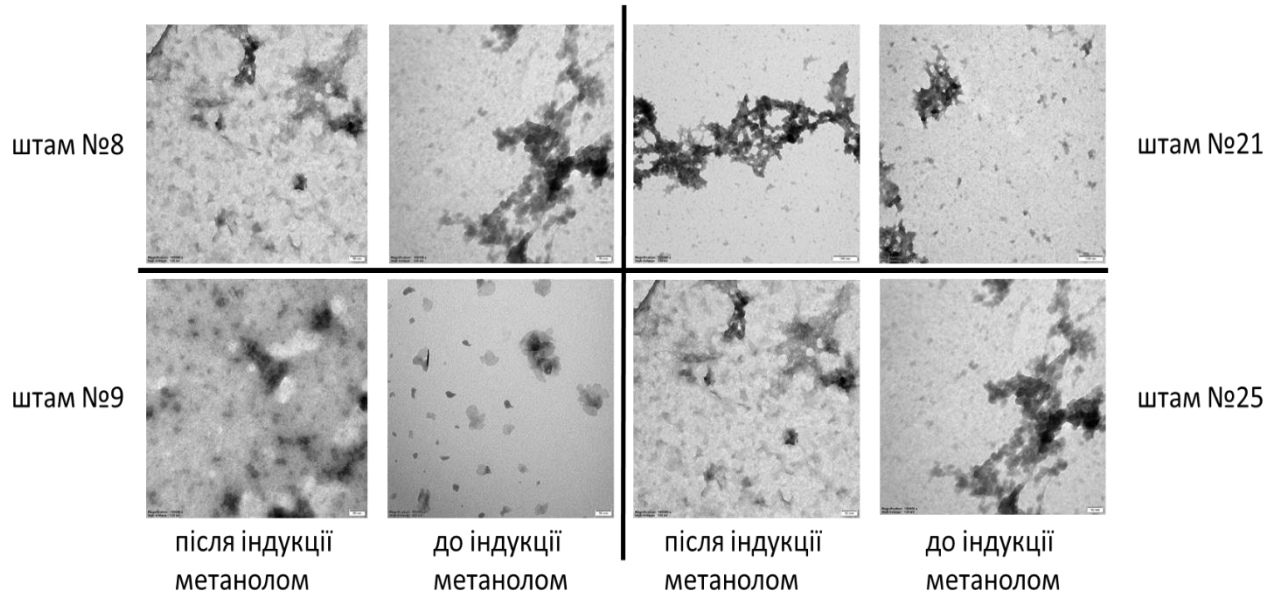


Рис. 15 Результати електронномікроскопічного аналізу клітин рекомбінантних штамів *K. phaffii* SuperMan 5-10, що містять білки-компоненти вірусоподібних

частинок. Штами №8, 9, 21, 25 – рекомбінантні штами *K. phaffii*, що містять цільові гени, які кодують білки-компоненти вірусоподібних частинок з допоміжними послідовностями.

3.6 Дослідження реакції експериментальних тварин на внутрішньочеревне введення інактивованих клітин або ацетонових порошків, що містять компоненти вірусоподібних частинок або RBD

Культури клітин штамів *K. phaffii* №18 та №21 використовувалися для приготування ацетонових порошків та ліофілізованих клітин дріжджів, як описано в підпунктах 2.16 та 2.17 розділу Матеріали і методи досліджень і ці проби вводилися лабораторним мишам, як описано в підпункті 2.20.

Показано, що усі досліджувані зразки ніяк не впливали на кількість еритроцитів у крові мишей лінії Balb/c як на 7-й, так і на 14-й день після введення клітин дріжджів. В той же час зразки №3 (ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2) та №4 (ліофілізовані клітини дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2) призводили до 1.5-кратного зростання загального рівня лейкоцитів крові піддослідних тварин на 7-й день після ін’єкції зразків мишам (Рис. 16). На 14-й день після ін’єкції вакцино-індукований лейкоцитоз знижувався, що вказує на виражену імунну відповідь на ці антигени. Важливо зазначити, що інші зразки дріжджів, які не містили вірусоподібних частинок, взагалі не впливали на загальний рівень лейкоцитів як на 7-й, так і на 14-й день після ін’єкції.

Для більш детального з’ясування механізмів, що лежать в основі лейкоцитозу за дії вірусоподібних частинок, нами було проведено аналіз лейкограми піддослідних тварин. Виявлено, що одноразова ін’єкція сполуки №4 супроводжувалася розвитком нейтрофільозу та лімфопенії, які характеризувалися збільшенням кількості нейтрофілів в 2,1 рази ($P \leq 0,001$) та зменшенням кількості лімфоцитів в 1,5 разів ($P \leq 0,001$) у крові мишей лінії Balb/C порівняно із цими показниками у контрольних тварин на 7-му добу

експерименту. Це разом із трикратним збільшенням нейтрофільно-лімфоцитарного співвідношення вказує на виражений розвиток запального процесу, індукованого введенням тваринам згаданої вище сполуки. Цікаво, що на 14-тий день експерименту такий ефект сполуки №4 не спостерігався (Рис. 17). За дії інших зразків змін у кількості нейтрофілів та лімфоцитів виявлено не було. Отже, отримані результати вказують на здатність ліофілізованих клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2, індукувати запальні процеси у організмі піддослідних тварин, які, однак, є короткотривалими і зникають вже на 14-й день після інокуляції клітин дріжджів мишам. Ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii*, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2, такою властивістю не володіли.

Важливим недоліком векторних вакцин проти COVID-19 є потенційний ризик тромбозів у пацієнтів. Нами було досліджено вплив ліофілізованих клітин дріжджів *K. phaffii* та ацетонових порошків з них же, на рівень тромбоцитів у піддослідних тварин. Нами не було виявлено статистично достовірних змін у кількості тромбоцитів та рівня гемоглобіну у крові піддослідних тварин за дії цих зразків ні на 7-й, ні на 14-й день після їхньої ін’єкції, що вказує на низький ризик виникнення тромбозів за їхньої дії (Рис. 18). В той же час ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №18, що містять рецептор-зв’язувальний доменом (RBD) S білка SARS-CoV-2, призводили до достовірного ($P \leq 0{,}001$) зниження кількості тромбоцитів у крові піддослідних мишей, що вказує на потенційне утворення тромбів, і підтверджує дані літератури.

Підсумовуючи вищесказане, в ході виконання даних досліджень показано, що ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 та ліофілізовані клітини дріжджів *K. phaffii* штаму №21 є абсолютно безпечними для піддослідних тварин (миші лінії Balb/C). Ці зразки ніяк не впливають на рівень еритроцитів, гемоглобіну та тромбоцитів у крові мишей (Рис. 16, 18), що свідчить про мінімальні ризики індукції тромбозу. В той же час за дії цих вакцин спостерігається короткотривале зростання кількості лейкоцитів у крові, яке, однак, швидко знижується до норми

вже на 14-й день після інокуляції. Це вказує на виражену індукцію імунної відповіді новостворених вакцинами у піддослідних мишей.

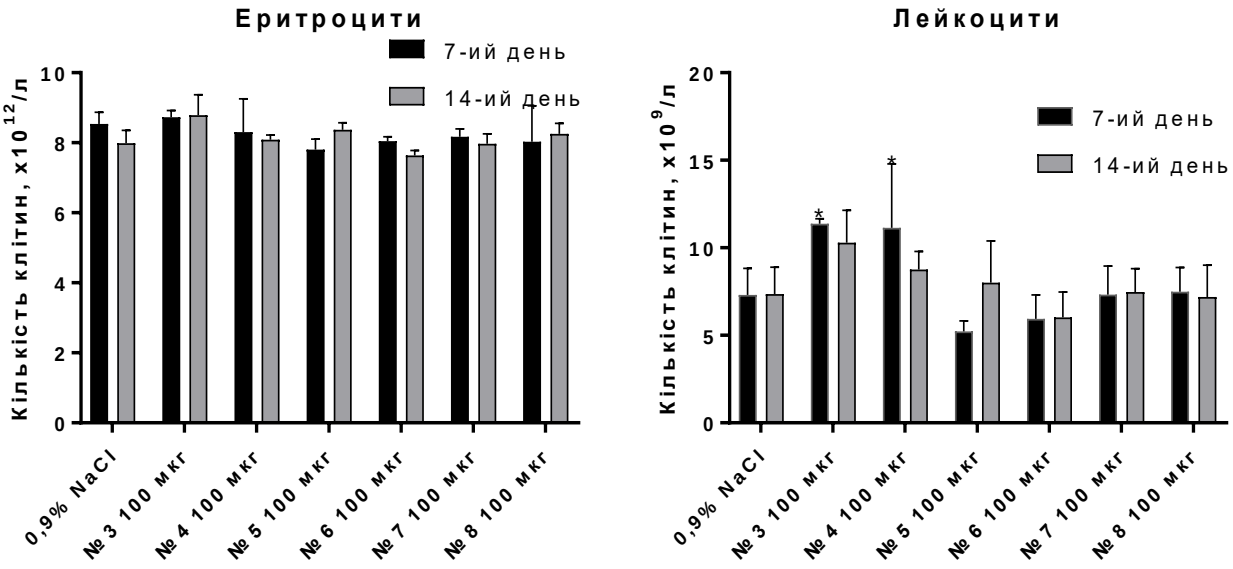


Рис. 16 Динаміка кількості еритроцитів і лейкоцитів у крові мишей лінії Balb/c за однократного введення клітин дріжджів:

№3 – Ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 (100 мкг)

№4 – Ліофілізовані клітини дріжджів *K. phaffii*, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 (100 мкг)

№5 – Ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №18, що містять рецептор-зв'язувальний домен (RBD) S білка SARS-CoV-2 (100 мкг)

№6 – Ліофілізовані клітини дріжджів *K. phaffii*, що містять рецептор-зв'язувальний доменом (RBD) S білка SARS-CoV-2 (100 мкг)

№7 – Ацетонові порошки з клітин батьківського штаму дріжджів *K. phaffii* (*K. phaffii* SuperMan 5-10, контроль) (100 мкг)

№8 – Ліофілізовані клітини батьківського штаму дріжджів *K. phaffii* (контроль) (100 мкг)

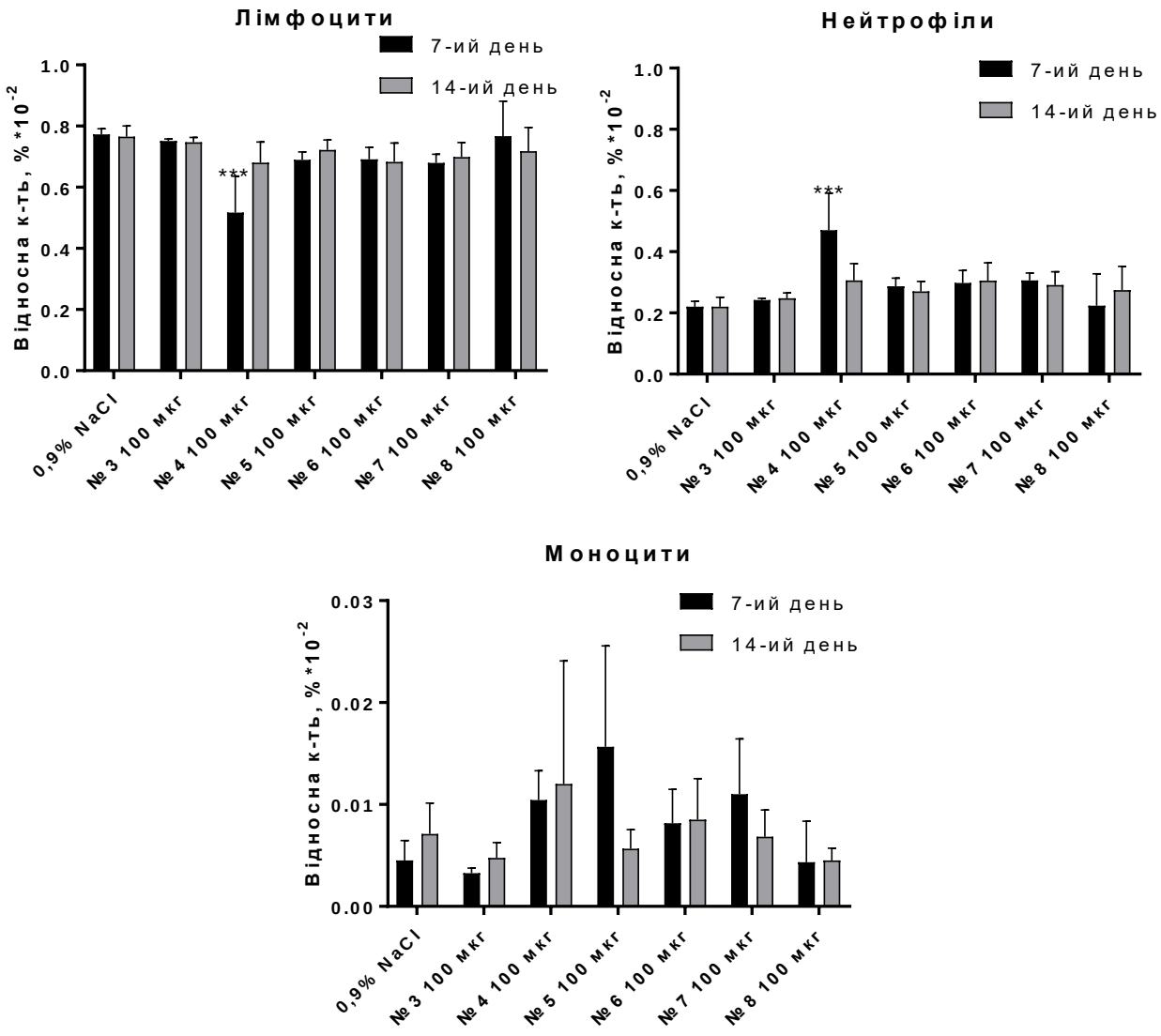


Рис. 17 Зміни лейкограми у крові мишей лінії Balb/c за однократного введення клітин дріжджів:

№3 – Ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 (100 мкг)

№4 – Ліофілізовані клітини дріжджів *K. phaffii*, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 (100 мкг)

№5 – Ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №18, що містять рецептор-зв'язувальний доменом (RBD) S білка SARS-CoV-2 (100 мкг)

№6 – Ліофілізовані клітини дріжджів *K. phaffii*, що містять рецептор-зв'язувальний доменом (RBD) S білка SARS-CoV-2 (100 мкг)

№7 – Ацетонові порошки з клітин батьківського штаму дріжджів *K. phaffii* (*K. phaffii* SuperMan 5-10, контроль) (100 мкг)

№8 – Ліофілізовані клітини батьківського штаму дріжджів *K. phaffii* (контроль) (100 мкг)

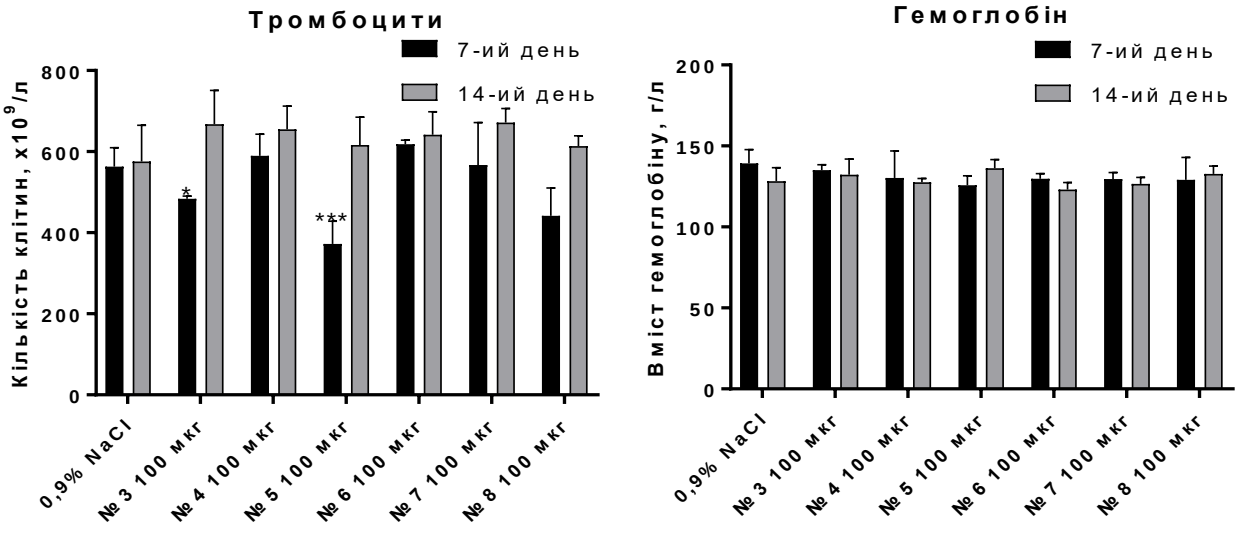


Рис. 18 Динаміка кількості тромбоцитів і рівня гемоглобіну у крові мишей лінії Balb/c за однократного введення клітин дріжджів:

№3 – Ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 (100 мкг)

№4 – Ліофілізовані клітини дріжджів *K. phaffii*, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 (100 мкг)

№5 – Ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №18, що містять рецептор-зв'язувальний доменом (RBD) S білка SARS-CoV-2 (100 мкг)

№6 – Ліофілізовані клітини дріжджів *K. phaffii*, що містять рецептор-зв'язувальний доменом (RBD) S білка SARS-CoV-2 (100 мкг)

№7 – Ацетонові порошки з клітин батьківського штаму дріжджів *K. phaffii* (контроль) (100 мкг)

№8 – Ліофілізовані клітини батьківського штаму дріжджів *K. phaffii* (*K. phaffii* SuperMan 5-10, контроль) (100 мкг)

3.7 Визначення рівня імуноглобуліну IgG у сироватці крові мишей після внутрішньочеревного введення очищених фрагментів RBD чи інактивованих клітин або ацетонових порошків, що містять компоненти вірусоподібних частинок.

Для визначення рівня імуноглобуліну IgG у сироватці крові мишей внутрішньом'язово вводили препарати (табл. 4), використовуючи розведення 50 мкг білка/100 мкл буферного фізіологічного розчину (PBS) або 100 мкг клітин/100 мкл PBS для кожної миші. Бустерна доза була призначена через 4 тижні після першої ін’єкції. Експерименти проводили на мишах-самцях штаму CBA/J, віком приблизно 6 місяців із середньою масою тіла 32-34 грами. Кожна група тварин, яка отримувала даний препарат, складалася з 6 тварин.

Таблиця 4

Проаналізовані препарати*

Код	Назва препарату
1	CTR – контроль
2	білок, очищений з клітин штаму #5 – 100 µg FP-HR1-HR2
3	білок, очищений з клітин штаму #3 – 240 µg NTD+RBD
4	білок, очищений з клітин штаму #2 – RBD (з доменом тримеризації та імунологічним адювантом)
5	#21 PLUS Cell A VLP – ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2
6	#21 Cell A VLP– ліофілізовані клітини штаму №21 дріжджів *K. phaffii*, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2
7	#18 M – білок RBD без додаткових доменів (домена тримеризації та імунологічного адюванта), очищений з клітин штаму #18 *K. phaffii*
8	#19 S – білок RBD без додаткових доменів (домена тримеризації та імунологічного адюванта), очищений з клітин штаму #19 *O. polymorpha*

9	22 D – білок RBD з Глі-Сер лінкерними ділянками, очищений з культуральної рідини, отриманої після культивування штаму #22 *K. phaffii*
10	#3 M – білок NTD+RBD, очищений з клітин штаму #3
11	#2 M– білок NTD+RBD, очищений з клітин штаму #2
12	22 F – білок RBD з Глі-Сер лінкерними ділянками, очищений з культуральної рідини, отриманої після культивування штаму #22 *K. phaffii*
13	22 A – білок RBD з Глі-Сер лінкерними ділянками, очищений з культуральної рідини, отриманої після культивування штаму #22 *K. phaffii*
14	22 E – білок RBD з Глі-Сер лінкерними ділянками, очищений з культуральної рідини, отриманої після культивування штаму #22 *K. phaffii*
15	22 X – білок RBD з Глі-Сер лінкерними ділянками, очищений з культуральної рідини, отриманої після культивування штаму #22 *K. phaffii*
16	#18 348 – білок RBD без додаткових доменів (домена тримеризації та імунологічного адюванта), очищений з клітин штаму #18 *K. phaffii*

* Серед препаратів, перелічених в табл. 4, біологічними повторами є такі проби: (а) 3 і 10; (б) 4 і 11; (в) 7 і 16; (г) 9, 12, 13, 14 і 15. Ці групи препаратів були отримані в різний час з різних культур одного і того ж рекомбінантного штаму.

Кров відбирали з орбітального синуса мишей за допомогою стерильних одноразових капілярів з антикоагулянтом (EDTA) довжиною 2 см і діаметром близько 1 мм в пробірки з гелевим сепаратором і активатором згортання. Для аналізу відбирали 400-500 мкл крові залежно від маси тіла тварини. Протягом усієї процедури тварини анестезували сумішшю кетаміну та ксилазину. Зібрану кров центрифугували 10 хвилин (1800-2200 об/хв) для отримання сироватки. Потім сироватки інактивували при 56 °C протягом 30 хвилин і визначали рівень імуноглобуліну IgG, як описано в підпункті 2.21 розділу Матеріали і методи досліджень. Результати визначення представлені на рис. 19.

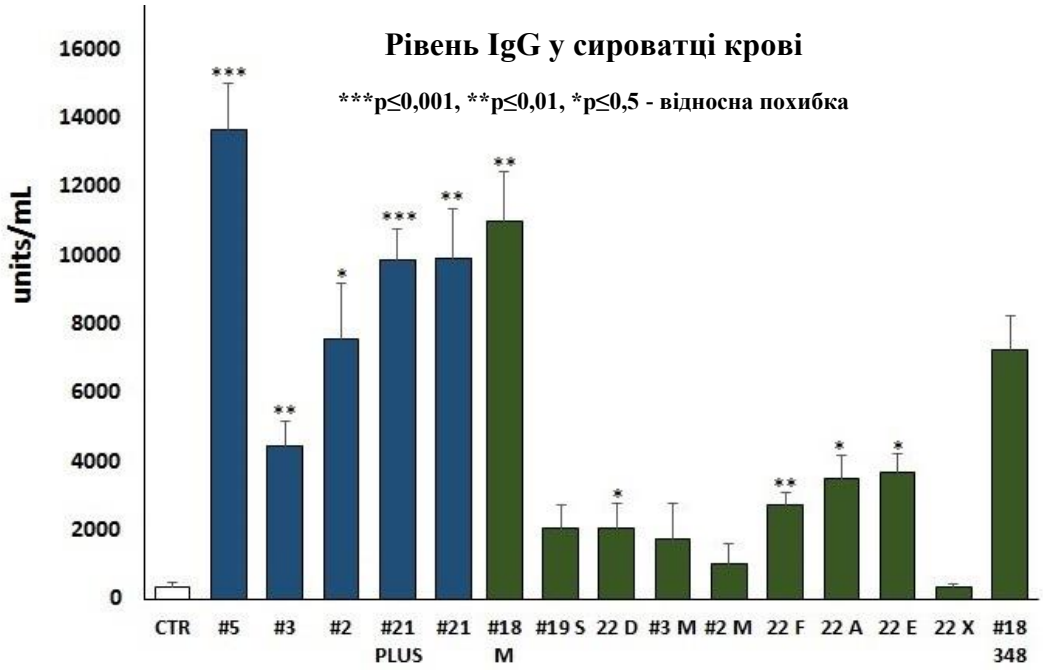


Рис. 19. Рівні імуноглобуліну IgG у сироватці мишей після стимуляції препаратами, перерахованими в Табл. 4.

Порівняння рівнів імуноглобуліну IgG в окремих групах показало найбільші статистично значущі відмінності у випадку препаратів білка, очищеного з клітин штаму №5 (FP-HR1-HR2), а також ацетонових порошків з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2. Крім того, високі рівні IgG були відзначені для препаратів білків, отриманих зі штамів № 3, № 2, №18 (проба 18 M), №22 (проби 22 D, 22 F, 22 A і 22 E), а також для препарату з ліофілізованих клітин штаму №21 дріжджів *K. phaffii*, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 (рис.19).

3.8 Аналіз противірусної активності мишачих імуноглобулінів проти вірусу SARS-CoV-2

Для визначення інгібуючого потенціалу мишачих імуноглобулінів на інфекцію SARS-CoV-2 було використано клітинну лінію Vero (ATCC: CCL-81), вірус SARS-CoV-2 (ізольований вірусологічною лабораторію Ягеллонського університету Кракова (Польща) і позначений як PL_P07 [GISAID CladeG, рід панголінів B.1; номери доступу до бази даних GISAID: hCoV-19 / Польща /

PL_P07 / 2020]), а також препарати ліофілізованих білків, переданих нашою лабораторією для тестування (табл. 5).

Таблиця 5

Проаналізовані препарати

Код	Назва препарату
1	CTR – контроль
2	2# RBD – білок, очищений з клітин штаму #2 – RBD (з доменом тримеризації та імунологічним адювантом)
3	3# 240 μg NTD + RBD – білок, очищений з клітин штаму #3
4	5# 100 μg FP-HR1-HR2 – білок, очищений з клітин штаму #5
5	Cell A #21 VLP – ліофілізовані клітини штаму №21 дріжджів *K. phaffii*, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2
6	Cell A #21• VLP – ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2

Експеримент з визначення інгібуючого потенціалу мишачих імуноглобулінів на інфекцію SARS-CoV-2 проводили одноразово, використовуючи два окремих повтори тестувань із різними розведеннями препарату. Отримані препарати розводили в культуральному середовищі, а потім змішували з вірусом SARS-CoV-2. Позитивним контролем експерименту були клітини, інфіковані вірусом за відсутності досліджуваних сполук, тоді як негативним контролем були неінфіковані (фіктивні) клітини.

Спочатку сироватки інактивували при 56 °C протягом 30 хвилин, а потім готували остаточні розведення препаратів: 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640, 1/1280, 1/2560 і 1/5120. Вірус використовували з кінцевим титром $TCID_{50}$=1600. Попередню інкубацію імуноглобулінів з вірусом проводили протягом однієї години при кімнатній температурі. Через годину суміші наносили на злиті

клітини Vero, засіяні напередодні, і залишали на 96 годин при 37 °C. Через 96 годин оцінювали вигляд клітин для аналізу цитопатичного ефекту.

На основі спостереження за пригніченням цитопатичного ефекту (CPE), спричиненого вірусом SARS-CoV-2, оцінили ефективність використаних сироваток. Результати спостережень представлені в таблиці 6 та на рис. 20 (А, Б).

Таблиця 6

Пригнічення цитопатичного ефекту досліджуваними сироватками

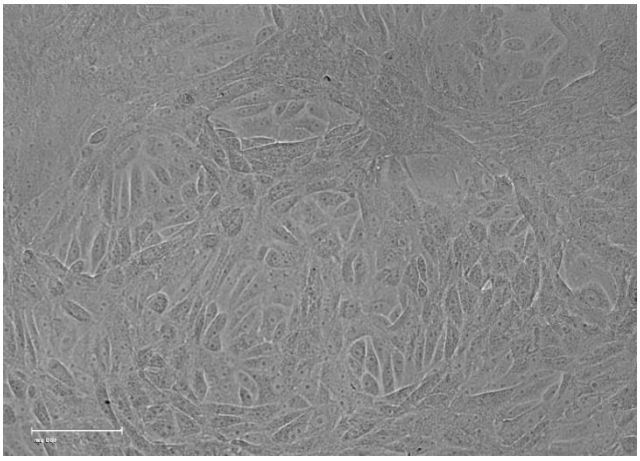
	20x	40x	80x	160x	320x	640x	1280x	2560x	5120x
CTR	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
#2	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
#3	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
#5	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
#21	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
#21●	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

- – немає інфекції
+ – окремі інфіковані клітини
++ – спалахи інфекції
+++ – абсолютна інфекція
++++ – загибель клітин

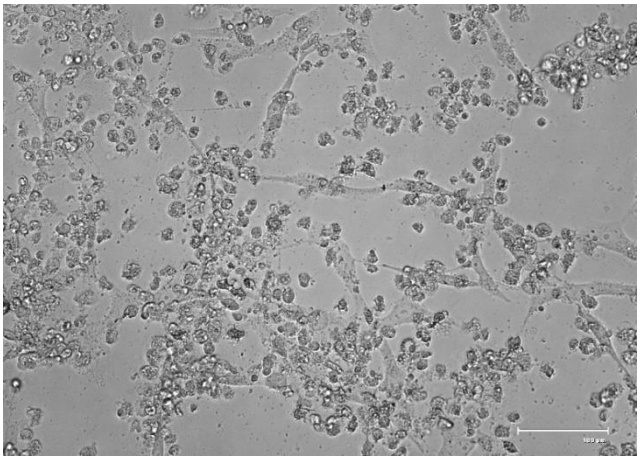
За допомогою електронної мікроскопії, використовуючи обрані розведення досліджуваних сироваток (рис. 20 Б), а також негативний (імітаційний) та позитивного (вірус) контроль (рис. 20 А), зроблено репрезентивні фотографії клітин. Препарат білка FP-HR1-HR2, очищеного з клітин штаму №5 та ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 забезпечували часткове пригнічення цитопатичного ефекту (CPE), спричиненого вірусом SARS-CoV-2 у 80-кратному розведенні (Табл. 6). Це узгоджується з результатами, описаними у попередньому розділі: білок зі штаму №5 та ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21 забезпечували генерацію найвищих рівнів імуноглобуліну IgG в сироватках крові лабораторних мишей. На жаль, за браком

часу в цьому експерименті не було проаналізовано деякі з проб, що аналізувалися на предмет рівня імуноглобуліну IgG у сироватці крові мишей після внутрішньочеревного введення, а саме не було проаналізовано вплив білків RBD без додаткових доменів (домена тримеризації та імунологічного адюванта), очищеного з клітин штаму #18 *K. phaffii* або RBD з Глі-Сер лінкерними ділянками, очищеного з культуральної рідини, отриманої після культивування штаму #22 *K. phaffii*.

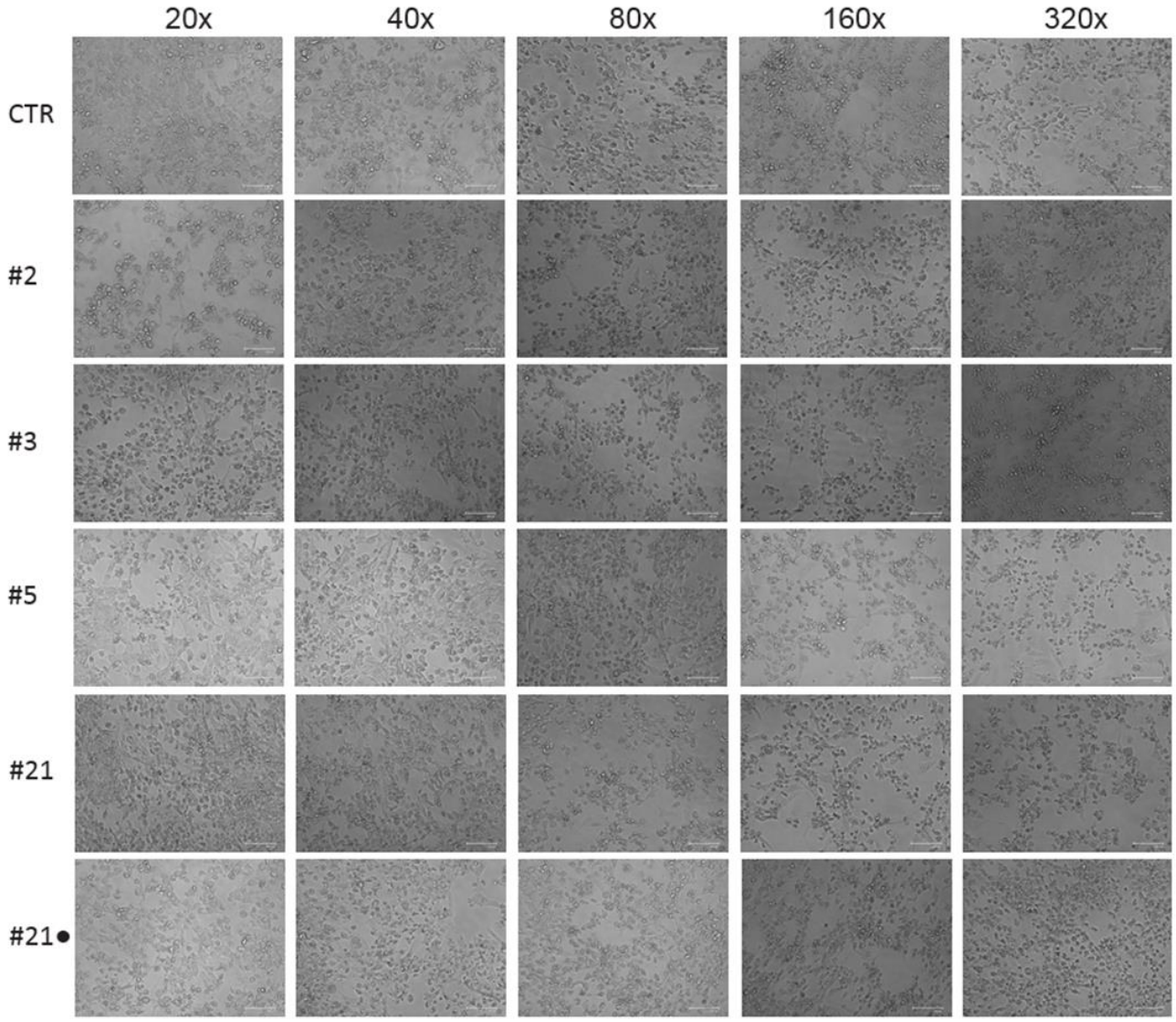
Негативний контроль



Позитивний (вірус) контроль



А)



Б)

Рис. 20. Репрезентивні фотографії клітин негативного та позитивного контролю (А) та поодинокі вогнища інфекції, що спостерігалися при 80-кратному розведенні препаратів білка FP-HR1-HR2, очищеного з клітин штаму #5 та ацетонових порошків з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2.

ВИСНОВКИ

В результаті виконання НДР на основі «гуманізованого» штаму дріжджів *K. phaffii* отримано колекцію трансформантів, що містять в своєму геномі касети експресії фрагментів субодиниць S1 та S2 глікопротеїна «шипа» SARS-CoV-2 під контролем промотора гена *AOX1 K. phaffii*, що індукується метанолом. Серед фрагментів «шипа» представлено наступні варіанти: RBD, NTD-RBD, FP-HR1-HR2 та NTD-RBD-FP-HR1-HR2. Кожен варіант на С-кінці містить домен тримеризації білка фібритину, імунологічний ад'ювант (hIgG1-Fc2), сайт дії TEV протеази та 6-His послідовність, що необхідна для металоафінного очищення цільових білків. Кожен з варіантів було додатково представлено у двох версіях, з наявним або відсутнім N-кінцевим сигналом секреції – α-фактором. Також сконструйовано штами з посиленою експресією RBD, на основі «гуманізованого» штаму дріжджів *O. polymorpha* з присутнім α-фактором або без нього. Встановлено, що фрагменти «шипа» з N-кінцевим α-фактором не здатні до секреції в культуральне середовище як на основі дріжджів *K. phaffii* так і *O. polymorpha*. Тому сконструйовано додаткові штами *K. phaffii* та *O. polymorpha*, що експресують RBD без доменів тримеризації та ад'юванту, що ймовірно, можуть мати негативний вплив на здатність білків секретуватись у середовище. Проте, у сконструйованих штамів *K. phaffii* з RBD без додаткових доменів, секреції цільового білка не спостерігали. За допомогою Вестерн-блот аналізу встановлено, що цільові білки акумулюються в нерозчинній мембранній фракції безклітинних екстрактів. Для виділення відповідних білків було використано низку детергентів, включаючи лаурил саркозінат натрію, додецилсульфат натрію, сечовину, гуанідин гідрохлорид, тощо. Виділення цільових білків з нерозчинної фракції безклітинних екстрактів відбувалось з найбільшою ефективністю із застосуванням гуанідин гідрохлориду. Очистку білків проводили за допомогою металоафінної хроматографії з використанням нікель-сефарози. У значних кількостях вдалося отримати лише фрагмент RBD без

доменів тримеризації та ад'юванту, білки більшого розміру отримані в менших концентраціях.

Оскільки процес очищення білків з нерозчинних мембранних фракцій виявився низькоефективним, було також сконструйовано штами *K. phaffii* та *O. polymorpha*, що продукують RBD з фланкуючими лінкерними ділянками, багатими на амінокислоти гліцин та серин. Цей варіант RBD секретується у культуральне середовище і може бути легко очищений без використання детергентів.

Також сконструйовано декілька варіантів рекомбінантних штамів *K. phaffii*, що містять NTD-RBD фрагмент S білка, M- та E-білки SARS-CoV2 і малий S білок (dS, білок риштування) вірусу гепатиту качки для збирання в подальшому вірусоподібних частинок SARS-CoV2. Встановлено, що білки – компоненти вірусоподібних часточок, залишаються в дріжджовій клітині, незалежно від наявності сигналу секреції. Електронна мікроскопія показала наявність в клітинах дріжджів структур розміром близько 20 нм, що можуть бути вірусоподібними часточками. З таких дріжджових клітин було отримано ацетонові порошки та зразки з інактивованими прогріванням клітинам з подальшою ліофілізацією.

Проведено експерименти на мишах, для оцінки переносимості та імуногенності внутрішньочеревного введення очищених білків та інактивованих клітин або ацетонових порошків, що містять компоненти вірусоподібних частинок. Показано, що ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2 та ліофілізовані клітини дріжджів *K. phaffii* штаму №21 є безпечними для піддослідних тварин, та викликають виражену індукцію імунної відповіді у піддослідних мишей. При аналізі рівнів імуноглобуліну IgG в сироватках крові лабораторних мишей показано, що найвище і найбільш статистично значуще підвищення рівня IgG виникало у випадку введення препаратів білка, очищеного з клітин штаму №5 (FP-HR1-HR2), а також ацетонових порошків з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2. Крім того, високі рівні

IgG були відзначені для препаратів білків, отриманих зі клітин штамів, що продукують фрагменти RBD, NTD-RBD, RBD без доменів тримеризації та ад'юванту, з культуральної рідини штамів, що продукують секреторну форму RBD з фланкуючими лінкерними ділянками, багатими на амінокислоти гліцин та серин, а також для препарату з ліофілізованих клітин штаму №21 дріжджів *K. phaffii*, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2.

Також проведено експерименти на клітинній лінії Vero із зараженням її вірусом SARS-CoV2. Препарат білка FP-HR1-HR2, очищеного з клітин рекомбінантного штаму *K. phaffii* №5 та ацетонові порошки з клітин дріжджів *K. phaffii* штаму №21, що містять вірусоподібні частинки SARS-CoV-2, забезпечували часткове пригнічення цитопатичного ефекту (CPE), спричиненого вірусом SARS-CoV-2.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Wan, Y., et al., *Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus.* J Virol, 2020. **94**(7).
2. Cheng, V.C., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus as an agent of emerging and reemerging infection.* Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 660-94.
3. Letko, M., A. Marzi, and V. Munster, *Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses.* Nat Microbiol, 2020. **5**(4): p. 562-569.
4. Wu, F., et al., *A new coronavirus associated with human respiratory disease in China.* Nature, 2020. **579**(7798): p. 265-269.
5. Lan, J., et al., *Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor.* Nature, 2020. **581**(7807): p. 215-220.
6. Wrapp, D., et al., *Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation.* Science, 2020. **367**(6483): p. 1260-1263.
7. Ahmed, S.F., A.A. Quadeer, and M.R. McKay, *Preliminary Identification of Potential Vaccine Targets for the COVID-19 Coronavirus (SARS-CoV-2) Based on SARS-CoV Immunological Studies.* Viruses, 2020. **12**(3).
8. Almond, J., et al., *Development of vaccines at the time of COVID-19.* Microlife, 2020. **1**(1): p. uqaa003.
9. Bosch, B.J., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. **101**(22): p. 8455-8460.
10. Schett, G., M. Sticherling, and M.F. Neurath, *COVID-19: risk for cytokine targeting in chronic inflammatory diseases?* Nat Rev Immunol, 2020. **20**(5): p. 271-272.

11. Yuen, K.S., et al., *SARS-CoV-2 and COVID-19: The most important research questions.* Cell Biosci, 2020. **10**: p. 40.
12. Lovato, A., C. de Filippis, and G. Marioni, *Upper airway symptoms in coronavirus disease 2019 (COVID-19).* Am J Otolaryngol, 2020. **41**(3): p. 102474.
13. Singhal, T., *A Review of Coronavirus Disease-2019 (COVID-19).* Indian J Pediatr, 2020. **87**(4): p. 281-286.
14. Jacofsky, D., E.M. Jacofsky, and M. Jacofsky, *Understanding Antibody Testing for COVID-19.* J Arthroplasty, 2020. **35**(7S): p. S74-S81.
15. Ujike, M. and F. Taguchi, *Incorporation of spike and membrane glycoproteins into coronavirus virions.* Viruses, 2015. **7**(4): p. 1700-25.
16. Comas-Garcia, M., *Packaging of Genomic RNA in Positive-Sense Single-Stranded RNA Viruses: A Complex Story.* Viruses, 2019. **11**(3).
17. Mousavizadeh, L. and S. Ghasemi, *Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis.* J Microbiol Immunol Infect, 2020.
18. Li, H., et al., *Coronavirus disease 2019 (COVID-19): current status and future perspectives.* Int J Antimicrob Agents, 2020. **55**(5): p. 105951.
19. Velavan, T.P. and C.G. Meyer, *The COVID-19 epidemic.* Trop Med Int Health, 2020. **25**(3): p. 278-280.
20. Song, W., et al., *Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2.* PLoS Pathog, 2018. **14**(8): p. e1007236.
21. Hui, D.S., Z.A. Memish, and A. Zumla, *Severe acute respiratory syndrome vs. the Middle East respiratory syndrome.* Curr Opin Pulm Med, 2014. **20**(3): p. 233-41.
22. Lai, C.C., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges.* Int J Antimicrob Agents, 2020. **55**(3): p. 105924.

23. Lu, R., et al., *Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding.* Lancet, 2020. **395**(10224): p. 565-574.
24. Yan, T., R. Xiao, and G. Lin, *Angiotensin-converting enzyme 2 in severe acute respiratory syndrome coronavirus and SARS-CoV-2: A double-edged sword?* FASEB J, 2020. **34**(5): p. 6017-6026.
25. Jennings, G.T. and M.F. Bachmann, *Designing recombinant vaccines with viral properties: a rational approach to more effective vaccines.* Curr Mol Med, 2007. **7**(2): p. 143-55.
26. Mohsen, M.O., et al., *Major findings and recent advances in virus-like particle (VLP)-based vaccines.* Semin Immunol, 2017. **34**: p. 123-132.
27. Adolph, D.W. and P.J. Butler, *Studies on the assembly of a spherical plant virus. III. Reassembly of infectious virus under mold conditions.* J Mol Biol, 1977. **109**(2): p. 345-57.
28. Brown, S.D., J.D. Fiedler, and M.G. Finn, *Assembly of hybrid bacteriophage Qbeta virus-like particles.* Biochemistry, 2009. **48**(47): p. 11155-7.
29. Zhao, Q., et al., *Disassembly and reassembly improves morphology and thermal stability of human papillomavirus type 16 virus-like particles.* Nanomedicine, 2012. **8**(7): p. 1182-9.
30. Wacker, M., et al., *N-linked glycosylation in Campylobacter jejuni and its functional transfer into E. coli.* Science, 2002. **298**(5599): p. 1790-3.
31. Hofmann, K.J., et al., *Sequence determination of human papillomavirus type 6a and assembly of virus-like particles in Saccharomyces cerevisiae.* Virology, 1995. **209**(2): p. 506-18.
32. Valenzuela, P., et al., *Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast.* Nature, 1982. **298**(5872): p. 347-50.
33. Wetzel, D., et al., *Establishment of a yeast-based VLP platform for antigen presentation.* Microb Cell Fact, 2018. **17**(1): p. 17.
34. Arora, K., et al., *Multi-Antigenic Virus-like Particle of SARS CoV-2 produced in Saccharomyces cerevisiae as a vaccine candidate.* bioRxiv preprint, 2020.

35. Bachmann, M.F. and G.T. Jennings, *Vaccine delivery: a matter of size, geometry, kinetics and molecular patterns.* Nat Rev Immunol, 2010. **10**(11): p. 787-96.

36. Weissenhorn, W., et al., *Structural basis for membrane fusion by enveloped viruses.* Mol Membr Biol, 1999. **16**(1): p. 3-9.

37. Jiang, S., et al., *HIV-1 inhibition by a peptide.* Nature, 1993. **365**(6442): p. 113.

38. Kilby, J.M., et al., *Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry.* Nat Med, 1998. **4**(11): p. 1302-7.

39. Watanabe, S., et al., *Functional importance of the coiled-coil of the Ebola virus glycoprotein.* J Virol, 2000. **74**(21): p. 10194-201.

40. Cinatl, J., Jr., et al., *Development of antiviral therapy for severe acute respiratory syndrome.* Antiviral Res, 2005. **66**(2-3): p. 81-97.

41. Liu, I.J., et al., *Identification of a minimal peptide derived from heptad repeat (HR) 2 of spike protein of SARS-CoV and combination of HR1-derived peptides as fusion inhibitors.* Antiviral Res, 2009. **81**(1): p. 82-7.

42. Bosch, B.J., et al., *Severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV) infection inhibition using spike protein heptad repeat-derived peptides.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(22): p. 8455-60.

43. Zhu, J., et al., *Following the rule: formation of the 6-helix bundle of the fusion core from severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein and identification of potent peptide inhibitors.* Biochem Biophys Res Commun, 2004. **319**(1): p. 283-8.

44. Channappanavar, R., et al., *Protective Effect of Intranasal Regimens Containing Peptidic Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Fusion Inhibitor Against MERS-CoV Infection.* J Infect Dis, 2015. **212**(12): p. 1894-903.

45. Gao, J., et al., *Structure of the fusion core and inhibition of fusion by a heptad repeat peptide derived from the S protein of Middle East respiratory syndrome coronavirus.* J Virol, 2013. **87**(24): p. 13134-40.

46. Xia, S., et al., *Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) entry inhibitors targeting spike protein.* Virus Res, 2014. **194**: p. 200-10.
47. Xia, S., et al., *Peptide-Based Membrane Fusion Inhibitors Targeting HCoV-229E Spike Protein HR1 and HR2 Domains.* Int J Mol Sci, 2018. **19**(2).
48. Liu, I.J., et al., *Peptides corresponding to the predicted heptad repeat 2 domain of the feline coronavirus spike protein are potent inhibitors of viral infection.* PLoS One, 2013. **8**(12): p. e82081.
49. Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 4 ed. 2012, New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 2028.
50. Faber, K.N., et al., *Highly-efficient electrotransformation of the yeast Hansenula polymorpha.* Curr Genet, 1994. **25**(4): p. 305-10.
51. Guthe, S., et al., *Very fast folding and association of a trimerization domain from bacteriophage T4 fibritin.* J Mol Biol, 2004. **337**(4): p. 905-15.
52. Weldon, W.C., et al., *Enhanced immunogenicity of stabilized trimeric soluble influenza hemagglutinin.* PLoS One, 2010. **5**(9).
53. Cheon, S.A., et al., *Remodeling of the glycosylation pathway in the methylotrophic yeast Hansenula polymorpha to produce human hybrid-type N-glycans.* J Microbiol, 2012. **50**(2): p. 341-8.
54. van Rosmalen, M., M. Krom, and M. Merkx, *Tuning the Flexibility of Glycine-Serine Linkers To Allow Rational Design of Multidomain Proteins.* Biochemistry, 2017. **56**(50): p. 6565-6574.
55. Jacobs, P.P., et al., *Engineering complex-type N-glycosylation in Pichia pastoris using GlycoSwitch technology.* Nat Protoc, 2009. **4**(1): p. 58-70.