УДК 57.083.3:[577.112.6:578.834.1] +615.371
УДК [573.6.086.83:577.21]:615.317
№ держреєстрації – 0120U104095

НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
Інститут біохімії ім. О. В. ПАЛЛАДІНА
01054, Київ, вул. Леонтовича 9
тел (044) 234 59 74, факс (044) 279 63 65, e-mail: secretar@biochem.kiev.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ

Директор Інституту біохімії
ім. О. В. ПАЛЛАДІНА НАН України
академік НАН України
_____ С. В. КОМІСАРЕНКО
15 лютого 2021 р.

ЗВІТ

про науково-дослідну роботу
за договором від 23 жовтня 2020 р. № 28/01.2020
за договором від 30 квітня 2021 року № 121/01/0322

ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ ПРОТЕЇНІВ КОРОНАВІРУСУ SARS-COV-2 ЯК ОСНОВА ДЛЯ РОЗРОБЛЕННЯ ВАКЦИНИ ПРОТИ COVID19

грантова підтримка Національного фонду досліджень України
у межах конкурсу «Наука для безпеки людини та суспільства»

(заключний)

Науковий керівник НДР,
головний науковий співробітник,
д.біол.н., професор _____ Д. В. КОЛИБО

2021

Результати роботи розглянуто Вченою радою ІБХ ім. О. В. ПАЛЛАДІНА НАН України, протокол від 15 грудня 2021 року № 12

СПИСОК АВТОРІВ

Науковий керівник НДР, головний науковий співробітник, д.біол.н., проф.	13.12.2021 р.	Д. В. КОЛИБО (реферат, розділи 3-10, додатки)
Відповідальний виконавець, головний науковий співробітник, д.біол.н., проф., академік НАН України	13.12.2021 р.	С. В. КОМІСАРЕНКО (вступ, розділ 1, висновки)
Виконавці:		
Старший науковий співробітник, к.біол.н.	13.12.2021 р.	О. Г. КОРЧИНСЬКИЙ (розділи 4-5)
Старший науковий співробітник, к.біол.н.	13.12.2021 р.	С. І. РОМАНЮК (розділи 2, 5-10)
Науковий співробітник, к.біол.н.	13.12.2021 р.	О. Б. ГОРБАТЮК (розділ 5)
Науковий співробітник, к.біол.н.	13.12.2021 р.	М. М. ГУЗИК (розділи 7, 10)
Науковий співробітник, к.біол.н.	13.12.2021 р.	А. А. СІРОМОЛОТ (розділи 6-9)
Науковий співробітник, к.біол.н.	13.12.2021 р.	О. І. КРИНІНА (розділи 2-5, 8)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 200 с., містить 10 розділів, 80 рис., 8 табл., 2 додатка, 104 джерела.

Об’єкт дослідження – рекомбінантні протеїни коронавірусу SARS-CoV-2 та їх злиті кон’югати з іншими протеїнами.

Предмет дослідження – імуногенні властивості рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 та їх злитих кон’югатів із іншими протеїнами.

Мета роботи – дослідити імуногенні властивості рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та їх злитих кон’югатів, розробити склад вакцини проти COVID19 і провести випробування її дослідного зразка.

Методи дослідження – використано методи молекулярної біології, метало-афінної хроматографії, електрофорезу, імуноензимного аналізу, хемілюмінесцентного вестерн-блотингу, MALDI-TOF мас-спектрометрії, цитофлуориметрії, культивування клітин прокаріотів і еукаріотів, а також методи роботи з лабораторними тваринами та статистичної обробки результатів.

Результати та їх новизна:

– вперше: одержано злитий кон’югат RBD–CRM197; розроблено методику оцінювання захисних властивостей антитіл проти коронавірусу SARS-CoV-2 з використанням злитого протеїну RBD–eGFP;

– удосконалено: поглиблено уявлення про особливості клітинної та гуморальної імунної відповіді на рекомбінантні протеїни коронавірусу SARS-CoV-2 N і RBD; оптимізовано склад дослідного зразка рекомбінантної вакцини проти COVID19;

– дістало подальшого розвитку: клонування і виділення рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 (N, RBD) та злитого кон’югату RBD–eGFP; вивчення антигенних властивостей рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 і захисних властивостей антитіл проти них.

Опис кінцевого продукту – дослідний зразок вакцини проти COVID19, створений на основі рекомбінантного злитого кон’югату RBD-домену протеїну S SARS-CoV-2 із дифтерійним токсоїдом CRM197 і гідроксиду алюмінію. Попередні випробування на тваринах підтвердили, що дослідний зразок вакцини проти COVID19 характеризується достатньою імуногенністю, гарною місцевою переносимістю і низькою токсичністю в дозах, що застосовуються для імунізації.

Результати виконання проєкту можуть стати відправним пунктом для проведення клінічних випробувань і впровадження у виробництво рекомбінантної вакцини проти COVID19.

Ключові слова: АНТИТІЛА, ВАКЦИНА, ЗЛИТІ КОН’ЮГАТИ, ІМУНОГЕННІ ВЛАСТИВОСТІ, КОРОНАВІРУС SARS-COV-2, РЕКОМБІНАНТНІ ПРОТЕЇНИ, COVID19.

ABSTRACT

Report SRW: 200 p., there are: 10 chapters, 80 draw., 8 tables, 2 app., 104 sour.

Research object – immunogenic properties of the recombinant SARS-CoV-2 proteins and their fusion conjugates with other proteins.

Purpose of work – to investigate immunogenicity of the recombinant SARS-CoV-2 proteins and their fusion conjugates, to develop the composition of the COVID19 vaccine and to test vaccine prototype.

Research methods – methods of molecular biology, immobilized metal affinity chromatography, electrophoresis, enzyme-linked immunosorbent assay, chemiluminescent Western blotting, MALDI-TOF mass spectrometry, cytofluorimetry, prokaryotic and eukaryotic cell culture, working with laboratory animals and statistical analysis of results.

Results and novelty:

– first: RBD–CRM197 fusion conjugate was obtained; method for evaluating the protective properties of antibodies against SARS-CoV-2 using the RBD–eGFP fusion protein was developed;

– improved: understanding the features of cellular and humoral immune response to recombinant SARS-CoV-2 N and RBD proteins; the composition of the recombinant COVID19 vaccine prototype was optimized;

– got further development: cloning and isolation of recombinant SARS-CoV-2 proteins (N, RBD) and RBD–eGFP fusion protein; study of antigenic properties of the recombinant SARS-CoV-2 proteins and protective properties of antibodies specific for these proteins.

Description of the final product – prototype of the COVID19 vaccine based on the recombinant RBD of S protein SARS-CoV-2 fused to diphtheria toxoid CRM197 and aluminum hydroxide. Preliminary animal tests confirmed the sufficient immunogenicity, good local tolerability and low toxicity in doses used for immunization.

The results of the project can be a starting point for clinical trials and the introduction of Ukrainian recombinant COVID19 vaccine into production.

Keywords: ANTIBODIES, VACCINE, FUSION PROTEINS, IMMUNOGENIC PROPERTIES, SARS-COV-2, RECOMBINANT PROTEINS, COVID19.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ І УМОВНИХ ПОЗНАК..... 13

ВСТУП..... 15

1 ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ТА ІМУННОГО РОЗПІЗНАВАННЯ КОРОНАВІРУСУ SARS-CoV-2 І СТРАТЕГІЇ РОЗРОБКИ ВАКЦИН ПРОТИ COVID19..... 21

1.1 Походження і будова коронавірусу SARS-CoV-2..... 23

1.2 Формування імунітету проти SARS-CoV-2..... 30

1.3 Основні стратегії розроблення вакцин проти COVID19 33

2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ..... 39

3 СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ КОНСТРУКЦІЙ НА ОСНОВІ ПЛАЗМІДНИХ ВЕКТОРІВ ДЛЯ ПРОКАРІОТИЧНОЇ ЕКСПРЕСІЇ, ЩО МІСТЯТЬ ГЕНИ ПРОТЕЇНІВ КОРОНАВІРУСУ SARS-COV-2 ТА ЇХ ЗЛИТИХ КОН'ЮГАТІВ З НОСІЄМ CRM197..... 61

3.1 Модифікація плазмідного вектору *pET24a* 61

3.2 Створення генетичних конструкцій *pET24a-entero-S-protein(mut)* і *pET24a-entero-RBD-CRM197* із застосуванням ДНК-мутагенезу шляхом ПЛР-індукованого подовження ділянки перекривання 62

3.3 Створення генетичних конструкцій на основі вектору *pET24a-entero*, що містили гени протеїнів вірусу SARS-CoV-2: N, S, Smut, RBD та кон'югату RBD з CRM197..... 65

4 СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ КОНСТРУКЦІЙ НА ОСНОВІ ПЛАЗМІДНИХ ВЕКТОРІВ ДЛЯ ЕУКАРІОТИЧНОЇ ЕКСПРЕСІЇ, ЩО МІСТЯТЬ ГЕНИ ПРОТЕЇНІВ КОРОНАВІРУСУ SARS-COV-2, ЇХ ЗЛИТИХ КОН'ЮГАТІВ З НОСІЄМ CRM197 АБО ЗЕЛЕНИМ ФЛУОРЕСЦЕНТНИМ ПРОТЕЇНОМ..... 70

4.1 Створення генетичних конструкцій на основі вектору *pcDNA3*,

що містив гени протеїнів вірусу SARS-CoV-2: S, Smut, RBD, а також злитого кон'югату рецептор-зв'язуючого домену RBD протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 з дифтерійним токсоїдом CRM197……...……... 70

4.2 Створення генетичної конструкції на основі вектору *pEGFP-N1*, що містив нуклеотидну послідовність кон'югату RBD протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 із зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP)…….…….... 75

4.3 Створення генетичних конструкцій на основі човникового вектору *pShuttle-CMV*, що містив гени коронавірусу SARS-CoV-2: протеїну S і його рецептор-зв'язуючого домену RBD….. 77

ВИСНОВКИ ЕТАПУ І (РОЗДІЛИ 3-4)…….. 83

5 ОДЕРЖАННЯ І ОЧИЩЕННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ SARS-COV-2 ТА ЇХ ЗЛИТИХ КОН'ЮГАТІВ ……. 84

5.1 Структурно-функціональна характеристика протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2, рекомбінантні аналоги яких було одержано…… 84

5.1.1 Рецептор-зв'язуючий домен (RBD) S-протеїну коронавірусу SARS-CoV-2……. 84

5.1.2 Нуклеокапсидний N-протеїн коронавірусу SARS-CoV-2… 87

5.1.3 Злитий кон'югат RBD-домену з дифтерійним токсоїдом CRM197……..... 89

5.1.4 Злитий кон'югат RBD-домену з підсиленим зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP)……..... 90

5.2 Методологія виділення і очищення рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та їх злитих кон'югатів…….. 91

5.3 Одержання рекомбінантного протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2……..... 93

5.4 Одержання рекомбінантного протеїну S коронавірусу SARS-

CoV-2……..... 95
5.5 Оптимізація генетичних конструкцій, що кодують RBD-домен протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2, для експресії в клітинах еукаріотів……... 98
5.6 Оптимізація генетичних конструкцій, що кодують RBD-домен протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2, для експресії в клітинах прокаріотів……. 100
5.7 Одержання рекомбінантного RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2……... 104
5.8 Одержання рекомбінантного злитого кон'югату RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 із дифтерійним токсоїдом CRM197 (RBD–CRM197)…… 106
5.9 Одержання рекомбінантного злитого кон'югату RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 із зеленим флуоресцентним протеїном (RBD–eGFP)…….. 109
5.10 Підтвердження відповідності структури одержаних рекомбінантних протеїнів за допомогою вестерн-блот аналізу та імуноензимного аналізу …… 111
5.11 Підтвердження відповідності амінокислотної послідовності одержаних рекомбінантних протеїнів за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії …… 116
6 ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОГЕННОСТІ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ SARS-COV-2 ТА ЗЛИТОГО КОН'ЮГАТУ RBD–CRM197……. 120
6.1 Визначення рівнів антитіл IgM проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 і носія CRM197 у сироватках крові мишей після першої імунізації ……. 120
6.2 Визначення рівнів антитіл IgG проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 і носія CRM197 у сироватках крові мишей після

першої імунізації ……..... 121
6.3 Визначення рівнів антитіл IgG проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 і носія CRM197 в сироватках крові мишей після триразової імунізації……. 123
6.4 Визначення рівнів антитіл IgG проти рекомбінантного протеїну RBD SARS-CoV-2 у сироватках крові щурів, імунізованих рекомбінантними протеїнами RBD або RBD–CRM197 (з попередньою імунізацією CRM197)…… 123
7 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ КЛІТИННОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ НА РЕКОМБІНАНТНІ ПРОТЕЇНИ КОРОНАВІРУСУ SARS-COV-2 …… 127
7.1 Визначення рівнів цитокінів у клітинах селезінки імунізованих мишей за допомогою RT-PCR……..…….. 127
7.2 Визначення рівнів хемокінів у сироватках крові імунізованих мишей за допомогою RT-PCR…….. 129
7.2.1 Дослідження рівнів хемокінів CCL2 і CCL7 (MCP-1 і MCP-3)…….. 131
7.2.2 Дослідження рівнів хемокінів CCL3 і CCL4 (MIP-1α і MIP-1β)……. 133
7.2.3 Дослідження рівнів хемокінів CCL5 (RANTES) і GM-CSF (CSF2)……... 133
7.3 Аналіз одержаних даних у контексті ролі цитокінів і хемокінів у розвитку клітинної та гуморальної імунної відповіді…… 135
ВИСНОВКИ ЕТАПУ II (РОЗДІЛИ 5-7)…… 139
8 ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАХИСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АНТИТІЛ ПРОТИ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ SARS-COV-2…… 140
8.1 Розроблення методики дослідження захисних властивостей антитіл проти рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2……...…… 140

8.2 Цитофлуориметричне визначення захисних властивостей антитіл проти рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 із використанням злитого кон'югату RBD–eGFP…….. 143
9 ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ SARS-COV-2……..... 148
9.1 Дослідження взаємодії рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 з сироватками крові людей, що перехворіли на COVID19…… 149
9.2 Дослідження взаємодії рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 з сироватками крові вагітних жінок, що не хворіли на COVID19, зібраними до та під час пандемії COVID19..... 152
9.3 Дослідження взаємодії рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 з сироватками крові вакцинованих людей…….. 153
10 РОЗРОБКА ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТУ ПРОТИ COVID19 І ПРОВЕДЕННЯ ДОКЛІНІЧНИХ ВИПРОБУВАНЬ ЙОГО ДОСЛІДНОГО ЗРАЗКА…….. 156
10.1 Розроблення оптимального складу вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2. 156
10.1.1 Вибір антигену для вакцини проти COVID19…… 156
10.1.2 Вибір ад'юванту для вакцини проти COVID19…….. 158
10.1.3 Вибір консерванту для вакцини проти COVID19……... 159
10.1.4 Вибір стабілізатору для вакцини проти COVID19…….. 159
10.1.5 Вибір детергенту для вакцини проти COVID19…….. 160
10.1.6 Вибір розчинника для вакцини проти COVID19……. 160
10.2 Результати доклінічних випробувань на тваринах дослідного зразка вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантного злитого кон'югату RBD–CRM197…….. 161
10.2.1 Дослідження імуногенності дослідного зразка вакцини проти COVID19…… 162
10.2.2 Дослідження місцевої переносимості дослідного зразка

вакцини проти COVID19…….. 164
10.2.3 Дослідження гострої та хронічної токсичності дослідного зразка вакцини проти COVID19…… 166
ВИСНОВКИ ЕТАПУ ІІІ (РОЗДІЛИ 8-10)…… 173
ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ..... 174
ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ..... 176
ПУБЛІКАЦІЇ ЗА ПРОЄКТОМ ЗА ЗВІТНИЙ ПЕРІОД (2020 - 2021 рр.).. 187
ДОДАТОК А. Нуклеотидні послідовності вставок протеїнів вірусу SARS-CoV-2 та їх кон'югатів (з протеїном-носієм CRM197 та флуоресцентним протеїном eGFP) у складі одержаних генетичних конструкцій……... 189
ДОДАТОК Б. Нуклеотидні і амінокислотні послідовності одержаних рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та їх кон'югатів (за результатами секвенування)……..... 197

ПЕРЕЛІК СКОРОЧЕНЬ І УМОВНИХ ПОЗНАК

ACE2 (angiotensin-converting enzyme 2) – ангіотензин-перетворювальний ензим 2;

ADE – антитілозалежне посилення інфекції;

Adv – аденовірус;

CHCA – α-ціано-4-гідроксицинамінова кислота;

COVID19 (Coronavirus disease 2019) – коронавірусне захворювання 2019 року;

CRM197 – нетоксичний мутант дифтерійного токсину 197;

DMSO – диметилсульфоксид;

E.coli (Escherichia coli) – кишкова паличка;

EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота;

eGFP (enhanced Green Fluorescent Protein) – підсилений зелений флуоресцентний протеїн;

IF (interferon) – інтерферон;

Ig – імуноглобуліни;

IL (interleukin) – інтерлейкін;

IPTG – ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид;

MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight) – різновид мас-спектрометрії із використанням матрично-активованої лазерної десорбції / іонізації з час-прольотним аналізатором;

MERS (Middle East Respiratory Syndrome) – близькосхідний респіраторний синдром;

NRP1 (Neuropilin 1) – нейропілін 1;

OD (optical density) – оптична густина;

PBS (phosphate buffered saline) – натрій-фосфатний буфер;

PBS-T – натрій-фосфатний буфер із додаванням твіну або твін-фосфатний буфер;

PCR (ПЛР) – полімеразна ланцюгова реакція;

RBD (Receptor Binding Domain) – рецептор-зв’язуючий домен;

RT-PCR (reverse transcription PCR) – реверс-транскриптазна полімеразна ланцюгова реакція;

SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome) – тяжкий гострий респіраторний синдром;

SbB – субодиниця В дифтерійного токсину;

ТАЕ – тріс-ацетатний буферний розчин із додаванням EDTA;

ТМВ – 3,3’,5,5’-тетраметилбензидин;

БСА – сироватковий альбумін бика;

ДНК – дезоксинуклеїнова кислота;

ДСН – додецилсульфат натрію;

ДТ – дифтерійний токсин;

кДНК – кодуюча дезоксинуклеїнова кислота;

мРНК – матрична рибонуклеїнова кислота;

ПААГ – поліакриламідний гель;

РНК – рибонуклеїнова кислота;

Тх – Т-хелпери.

ВСТУП

У 2020 р. Україна зіткнулася з найбільшим викликом своїй системі біобезпеки та охорони здоров'я – пандемією смертельно небезпечного коронавірусу SARS-CoV-2, що викликає гостре респіраторне захворювання COVID19 [1]. Станом на грудень 2021 р. кількість жертв SARS-CoV-2 у світі становила понад 5,2 мільйона, з яких 95 тисяч є українцями [2]. Світове наукове товариство спрямувало усі свої сили на дослідження патогенного агенту SARS-CoV-2 з метою пошуку підходів до подолання пандемії. Однак досі не знайдено жодного ефективного специфічного противірусного препарату, який би сприяв зменшенню летальності. Тому значні надії покладаються, передусім, на вакцини проти COVID19.

На сьогоднішній день 315 іноземних компаній займаються розробкою вакцин проти COVID19, серед яких 121 компанія знаходиться на стадії клінічних випробувань, причому, 36% із них випробовують вакцини на основі рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 [3]. Декілька виробників вакцин успішно завершили клінічні випробування та вже вивели на ринок свої продукти – вакцини проти COVID19 на основі мРНК, аденовірусних векторів або інактивованих вірусних часток SARS-CoV-2. Першою на європейський ринок вийшла вакцина проти COVID19 виробництва Pfizer-BioNTech (США / Німеччина), що 2 грудня 2020 р. отримала дозвіл на використання у Великобританії [4]. Слідом за нею протягом 2021 року з'явилися ще 3 вакцини проти COVID19 від компаній Moderna (США), Oxford-AstraZeneca (Великобританія / Швеція) і Johnson & Johnson (США / Бельгія). Ці вакцини створені на основі аденовірусів або мРНК. У деяких країнах затверджені до використання китайські вакцини (від компаній CanSino, Sinopharm, Sinovac, Sinopharm-Wuhan) і російські вакцини (виробництва Gamaleya, Vector Institute) [5]. Першою вакциною проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів, яка за попередніми результатами випробувань продемонструвала ефективність 89% і буде

виведена на ринок у цьому році, є вакцина компанії Novavax (США), до складу якої входять наночастки з рекомбінантного протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 і ад'ювант сапонін [6].

Протеїн «шипа» S і особливо його RBD-домен вважаються головними мішенями для розробки вакцин проти COVID19, оскільки антитіла проти цих протеїнів здатні блокувати взаємодію RBD-домену з клітинним рецептором – ангіотензин-перетворювальним ензимом 2 (ACE2) [7], перешкоджаючи проникненню вірусу в клітину. Крім того, перспективною мішенню для створення вакцини проти COVID19 може бути нуклеокапсидний протеїн N – основний структурний компонент віріону SARS-CoV-2. Цей протеїн виконує функцію захисту вірусної РНК та здатний індукувати інтенсивну імунну відповідь [8].

Рекомбінантні протеїни та пептиди не завжди здатні викликати сильну імунну відповідь, тому вакцини на їх основі зазвичай містять додаткові імуностимулюючі молекули і потребують багаторазової імунізації. Ми пропонуємо для підсилення імуногенності рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 використовувати високоімуногенні носії – похідні дифтерійного токсину, зокрема дифтерійний токсоїд CRM197. Цей протеїн є нетоксичною формою дифтерійного токсину, яка відрізняється лише однією амінокислотою (G52E) [9] і широко використовується як носій у вакцинах проти менінгіту, пневмонії, гемофільної інфекції [10], в яких низькоімуногенні бактеріальні олігосахариди кон'юговані із молекулою носія. Крім того, CRM197 може використовуватись для підсилення імунної відповіді на пептидні антигени, приєднані до його молекули за допомогою хімічних методів [11].

Для розроблення вакцин проти COVID19 використовують різні наукові підходи, але невідомо, який підхід виявиться найефективнішим. Фармацевтичні корпорації, що першими досягли успіху в розробленні вакцин проти COVID19, захопили величезний ринок збуту і можуть диктувати власну цінову політику. Розпочаті кампанії вакцинації, в першу чергу,

охоплюють населення країн корпорацій-розробників. І хоча існують гуманітарні програми по забезпеченню країн, що розвиваються, в тому числі й України, вакцинами проти COVID19, невідомо, наскільки регулярними будуть поставки цих вакцин у майбутньому. Враховуючи те, що імунітет проти коронавірусів не є довготривалим, і попит на вакцину проти COVID19, ймовірно, не зникне з часом, важливим завданням є розроблення ефективного вітчизняного вакцинного препарату для боротьби з SARS-CoV-2.

Цей проєкт спрямований на розробку підходів до створення в Україні вакцини проти COVID19 і присвячений дослідженню імуногенних властивостей рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 та їх злитих кон'югатів з високоімуногенними носіями за умов використання ад'ювантів для імунізації.

Згідно з технічним завданням і календарним планом робота виконувалась у 3 етапи.

Метою досліджень першого етапу роботи було створити генетичні конструкції, що містять гени протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 та їх злитих кон'югатів з носіями.

Для цього було виконано наступне завдання:

1. Створити генетичні конструкції на основі плазміди pcDNA3 (для еукаріотичної експресії протеїнів) та плазмід pET24 або pET28 (для прокаріотичної експресії), що містять гени протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2: протеїну нуклеокапсиду (N), протеїну «шипа» (S) або його рецептор-зв'язувального домену (RBD), їх злитих кон'югатів з носіями: дифтерійним токсоїдом CRM197 або субодиницею B дифтерійного токсину (SbB), а також із зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP). Провести секвенування отриманих конструкцій.

Виконанню цього завдання присвячено Розділ 3 «Створення генетичних конструкцій на основі плазмідних векторів для прокаріотичної експресії, що

містять гени протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 та їх злитих кон’югатів з носієм CRM197» та Розділ 4 «Створення генетичних конструкцій на основі плазмідних векторів для еукаріотичної експресії, що містять гени протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2, їх злитих кон’югатів з носієм CRM197 або зеленим флуоресцентним протеїном», а також Додаток А «Нуклеотидні послідовності вставок протеїнів вірусу SARS-CoV-2 та їх кон’югатів (з протеїном-носієм CRM197 та флуоресцентним протеїном eGFP) у складі одержаних генетичних конструкцій».

Метою досліджень другого етапу роботи було дослідити імуногенність рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та їх злитих кон’югатів з носіями, а також вивчити особливості клітинної відповіді на введені антигени, зокрема для передбачення умов виникнення цитокінового «шторму».

Для цього було виконано наступні завдання:

1. Одержати рекомбінантні протеїни SARS-CoV-2 та їх злиті кон'югати в еукаріотичних експресійних системах – клітинах CHO або HEK293 та прокаріотичній експресійній системі – в клітинах *E.coli* Rosetta (DE3). Провести очищення рекомбінантних протеїнів та за необхідності їх рефолдинг.

2. Імунізувати мишей Balb/c рекомбінантними протеїнами коронавірусу SARS-CoV-2 та їх кон'югатами з носіями CRM197 або SbB, використовуючи ад’юванти: гідроксид алюмінію або полілактид-D,L-ко-гліколід. Провести імуноензимний аналіз рівнів антитіл проти коронавірусу SARS-CoV-2 в сироватках крові мишей.

3. Дослідити цитокіновий профіль сироваток крові під час імунізації з метою вивчення особливостей клітинної відповіді на введені

антигени, зокрема для передбачення умов виникнення цитокінового "шторму".

Виконанню завдання 1 присвячено Розділ 5 «Одержання і очищення рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та їх злитих кон'югатів» і додаток Б «Нуклеотидні і амінокислотні послідовності одержаних рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та їх кон’югатів (за результатами секвенування)»; виконанню завдання 2 присвячено Розділ 6 «Дослідження імуногенності рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та злитого кон’югату RBD–CRM197»; а виконанню завдання 3 присвячено Розділ 7 «Дослідження особливостей клітинної імунної відповіді на рекомбінантні протеїни коронавірусу SARS-CoV-2».

Метою досліджень третього етапу роботи було перевірити відповідність антигенних властивостей рекомбінантних і природних протеїнів SARS-CoV-2; дослідити захисні властивості антитіл проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2, а також розробити склад ефективного вакцинного препарату проти COVID19 і провести доклінічні випробування його дослідного зразка.

Для цього було виконано наступні завдання:

1. За допомогою цитофлуориметрії дослідити здатність антитіл проти рекомбінантного протеїну S (RBD) коронавірусу SARS-CoV-2 блокувати взаємодію флуоресцентного похідного RBD-eGFP з рецепторами на клітинах людини, що дозволить оцінити здатність антитіл потенційно захищати клітини від зараження вірусом.

2. Провести аналіз антигенних властивостей рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 з використанням одержаних сироваток крові мишей і, за умов доступності, комерційних сироваток крові людей, що перехворіли на COVID19.

3. Розробити оптимальний склад вакцинного препарату проти COVID19, який володіє достатніми імуногенними і протективними властивостями, та провести доклінічні випробування його дослідного зразка.

Виконанню завдання 1 присвячено Розділ 8 «Дослідження захисних властивостей антитіл проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2»; виконанню завдання 2 присвячено Розділ 9 «Дослідження антигенних властивостей рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2»; а виконанню завдання 3 присвячено Розділ 10 «Розробка оптимального складу вакцинного препарату проти COVID19 і проведення доклінічних випробувань його дослідного зразка».

В результаті виконання проєкту розроблено оптимальний склад вакцинного препарату проти COVID19, який володіє достатніми імуногенними і протективними властивостями; проведено доклінічні випробування його дослідного зразка; створено продуценти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та їх кон’югатів із носіями, які дадуть змогу безпечно, дешево і в необмеженій кількості одержувати антигенні субстанції для виробництва вакцини проти COVID19.

1 ОСОБЛИВОСТІ БУДОВИ ТА ІМУННОГО РОЗПІЗНАВАННЯ КОРОНАВІРУСУ SARS-CoV-2 І СТРАТЕГІЇ РОЗРОБКИ ВАКЦИН ПРОТИ COVID19

16 листопада 2002 р. в сільській місцевості Фошань (Foshan) провінції Гуандун (Guangdong) на півдні Китаю вперше зареєстрували невідому форму атипової пневмонії, яка вже через 5 місяців поширилася на 37 країн, охопила всі континенти та ледь не стала першою пандемією XXI ст. 15 березня 2003 р. у зверненні Всесвітньої організації охорони здоров'я це захворювання офіційно було названо тяжким гострим респіраторним синдромом — SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome). Спочатку SARS називали атиповою пневмонією (синоніми — китайська пневмонія, гонконгська пневмонія) через подібність за клінічною симптоматикою до вже відомих атипових пневмоній. Термін «атипова пневмонія» було введено ще в 1938 р. американським вірусологом і лікарем Хобартом Рейманом (Hobart Reimann) для випадків запалень легень, викликаних нехарактерними збудниками: мікоплазмами, хламідіями та легіонелами [12].

Збудником захворювання у 2002 р. виявився вірус SARS-CoV з родини коронавірусів, яким люди могли заразитися від цивет, що стали переносником вірусу від кажанів до людей. Усього протягом 2002–2004 рр. було зареєстровано 8422 випадки захворювання, з яких 916 — з летальним результатом (10,9%) [13]. Епідемію SARS було зупинено, незважаючи на відсутність ефективних етіотропних методів діагностики, лікування та профілактики цього захворювання, завдяки консолідації зусиль багатьох країн у проведенні безпрецедентних за своєю суворістю протиепідемічних заходів, а також тому, що в геномі вірусу сталася «головна» мутація, коли з його РНК випав фрагмент у 29 нуклеотидів.

У 2012 р. в Саудівській Аравії виникло нове захворювання, яке дуже нагадувало SARS, — близькосхідний респіраторний синдром MERS (Middle East Respiratory Syndrome), відомий також як верблюжий грип. Його

збудником був коронавірус MERS-CoV, яким люди заразилися від верблюдів, що також стали переносником вірусу від кажанів до людей. Повторні спалахи MERS було зареєстровано у Південній Кореї в 2015 р. і в Саудівській Аравії в 2018 р. Епідемія MERS охопила 26 країн (передусім Середнього Сходу) і спричинила 2519 випадків захворювання, з яких 866 були летальними (34,4%) [14].

Епідемії SARS і MERS вражали своїми летальними наслідками (на щастя, вони не досягли України), однак наступна епідемія, яка виникла (як офіційно вважають) в китайському місті Ухань у листопаді 2019 р., значно перевершила за своїми масштабами всі попередні та змінила життя людей у всьому світі. Нове респіраторне захворювання здобуло назву коронавірусна хвороба 2019 року — COVID19 (Coronavirus disease 2019). Його збудником є коронавірус SARS-CoV-2 (рисунок 1).

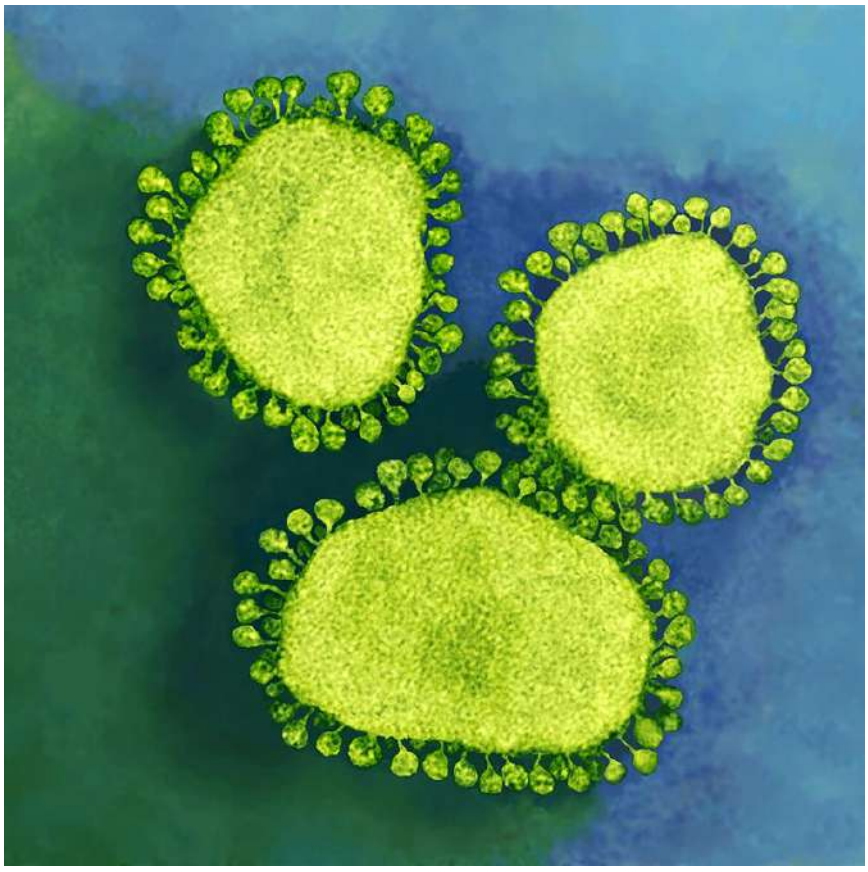

Рисунок 1 – Зображення коронавірусів SARS-CoV-2, одержане за допомогою електронної мікроскопії [15]

За рік від моменту появи перших випадків інфікування SARS-CoV-2 вірус поширився у 191 країні, інфікувавши до 70 млн. людей і спричинивши понад 1,5 млн. смертей, а за два роки він вже інфікував 261 млн. людей і спричинив 5,2 млн. смертей [2].

1.1 Походження і будова коронавірусу SARS-CoV-2

Коронавіруси вперше було виділено від курей у 1937 р. [16], а коронавірус людини вперше одержали з культури війчастого епітелію трахеї людського зародка у 1965 р. [17]. До 2003 р. було відомо 10 видів коронавірусів, серед яких були віруси людини, великої рогатої худоби, свиней, гризунів, кішок, собак та птахів. З моменту ідентифікації у 2002–2003 рр. збудника нового респіраторного захворювання – SARS наукові лабораторії в усьому світі розпочали активне і всебічне вивчення коронавірусів. З огляду на те, що SARS виник у Китаї і що саме тут розташоване найбільше природне джерело його існування у кажанів, у китайському місті Ухань було вирішено створити найбільший у світі центр з вивчення коронавірусів, у якому успішно співпрацюють учені з багатьох країн. Тому за останні роки число відомих видів коронавірусів збільшилося в кілька разів: було відкрито нові коронавіруси людини, коней, китів, птахів та кажанів [18].

Коронавіруси характеризуються широким тропізмом і можуть вражати крім дихальних шляхів печінку, нирки, кишечник, нервову систему, серце та очі. Типова коронавірусна інфекція клінічно проявляється грипоподібним синдромом та/або кишковими розладами. До появи SARS-асоційованого коронавірусу вважалося, що коронавіруси викликають у тварин досить серйозні захворювання, а у людини — лише легкі хвороби верхніх дихальних шляхів [19].

За ступенем подібності геномів та антигенними властивостями коронавіруси поділяють на 3 групи: α-, β- та γ-коронавіруси. Коронавіруси першої групи (збудники перитоніту собак, кішок, інфекційного

гастроентериту свиней, коронавірус людини 229E і NL63 та ін.), а також другої групи (збудники гепатиту кішок, собак, мишей, енцефаломієліту свиней, коронавіруси людини OC43 і HKU1 та ін.) спричинюють захворювання у ссавців, зокрема легкі респіраторні захворювання у людини. Коронавіруси третьої групи викликають захворювання у птахів (віруси інфекційного бронхіту курей, качок). Після тривалих досліджень і дискусій коронавірус SARS-CoV віднесли до підгрупи 2b другої групи коронавірусів [18]. До цієї ж підгрупи належать віруси MERS-CoV і SARS-CoV-2 [20].

Отже, вірус SARS-CoV-2 став сьомим відомим коронавірусом людини, чотири з яких періодично викликають гострі респіраторні захворювання, а три — виявилися летальними для людей (SARS-CoV, MERS-CoV і SARS-CoV-2).

За офіційними даними КНР, захворювання на COVID19 було виявлене 17 листопада 2019 р. у 55-річної особи з міста Ухань (провінція Хубей) [21]. Перші випадки захворювання пов'язували з ринком морепродуктів в Ухані, однак за даними дослідження, опублікованого в журналі Lancet [22], деякі люди з числа перших інфікованих SARS-CoV-2 не мали безпосереднього контакту з цим ринком. Є свідчення того, що людина могла інфікуватися цим вірусом значно раніше (ще в середині вересня 2019 р.), причому ця подія відбулася не в Ухані [23].

Геном SARS-CoV-2 на 88% ідентичний геному SARS-подібних коронавірусів кажанів, однак вірус генетично відрізняється від SARS-CoV і MERS-CoV (подібність становить близько 79 і 50% відповідно) [24]. Припускали, що SARS-CoV-2 походить від коронавірусу кажанів і через якийсь проміжний вид тварин передався людині, потрапивши на ринок морепродуктів в Ухані, з яким пов'язували перші масові випадки захворювання на COVID19 [25]. Подальші дослідження виявили подібність SARS-CoV-2 на 90% до вірусу панголіна (*Manis javanica*), особливо значну в ділянці протеїну S, що відповідає за проникнення в клітину. Однак було доведено, що панголіни не є тваринами, від яких коронавірус перейшов до

людини [26]. Фактично SARS-CoV-2 є химерою, що поєднує в собі окремі риси коронавірусів кажанів і панголінів, а його походження досі залишається нез'ясованим. Дослідження тривають, але поки що не виявлено ані «нульового» пацієнта серед людей, ані проміжної істоти між кажанами і людиною. У березні-квітні 2020 р. фахівці детально розглядали можливість штучного походження SARS-CoV-2 і дійшли висновку, що ймовірність цього є надзвичайно малою [27].

Розглянемо будову вірусу SARS-CoV-2 (рисунок 2).

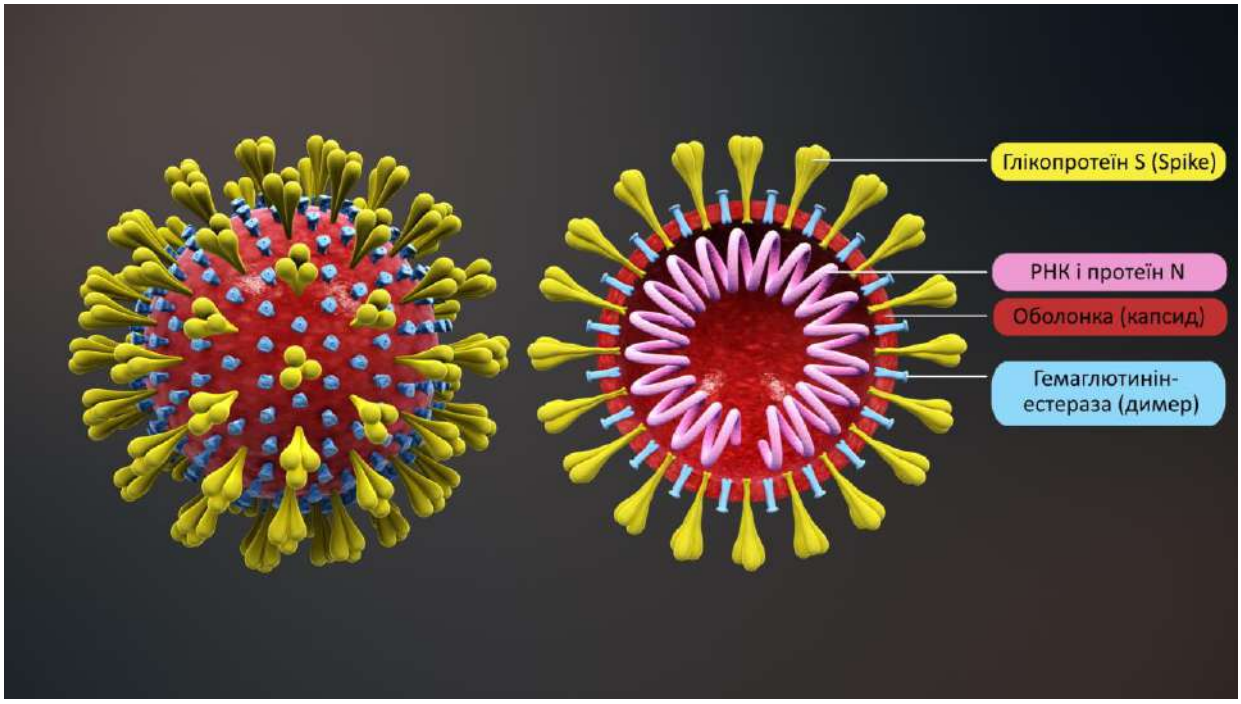

Рисунок 2 – Схема будови коронавірусу SARS-CoV-2 [28]

Він має тонкий, з нерівномірною структурою нуклеокапсид середнього розміру (60 нм) і сферичної форми. Як і в інших коронавірусів, оболонку SARS-CoV-2 складають 4 протеїни: глікопротеїн «шипа» S, нуклеокапсидний протеїн N, мембранний протеїн M і протеїн суперкапсиду (оболонки) E. Крім того, геном вірусу кодують також 16 неструктурних (NSPs) та 9 додаткових протеїнів. Кожен з неструктурних протеїнів (nsp1–16) відіграє специфічну роль у реплікації SARS-CoV-2 і у формуванні реплікативно-транскрипційного комплексу (RTC), що забезпечує синтез субгеномних РНК (sgRNAs) [29, 30]. Нещодавно з'ясувалося, що окрім відомих 29 протеїнів

вірус SARS-CoV-2 експресує ще 23 раніше невідомі протеїни, зокрема, як абсолютно нові протеїни, так і скорочені або розширені версії відомих протеїнів. Функцією деяких відкритих протеїнів є контролювання синтезу відомих вірусних молекул, але роль більшості з них залишається невідомою [31].

Усередині нуклеокапсиду є позитивний ланцюг поліаденильованої РНК довжиною приблизно 30 тис. нуклеотидів, що містить генетичну інформацію [32]. Зовні нуклеокапсид вкрито оболонкою, що містить ліпіди, та протеїновою мембраною. На поверхні віріону містяться шипоподібні відростки довжиною 20 нм — пепломери, які мають форму булави, що розширюється на дистальному кінці. Така форма на зображеннях електронної мікроскопії нагадує сонячну корону під час затемнення, через що їх і назвали коронавірусами [33].

Протеїн «шипа», або протеїн S, є головним «гравцем» у процесі інфікування вірусом клітин людини. Він відповідає за взаємодію (розпізнавання) з рецептором на поверхні клітини-господаря та за входження вірусу в клітину-мішень. Він є гомотримером, тобто утворюється трьома однаковими субодиницями (1273 амінокислотних залишки кожна), а кожна субодиниця має два домени — S1 (амінокислоти від 1 до 685) і S2 (амінокислоти від 686 до 1273). Зовнішня частина субодиниці (з N-кінця) утворює зовнішній ектодомен (амінокислоти 1–1208), до якого з С-кінця прилягає трансмембранний «якір» та короткий С-кінцевий внутрішній «хвіст». Кожен S1-домен має один рецептор-зв'язувальний домен (RBD — амінокислоти від 319 до 541), який зв’язується з мембранним протеїном клітини — ангіотензин-перетворювальним ензимом 2 (ACE2), що є рецептором для проникнення вірусу всередину клітини [34] (рисунок 3). Тому кожен протеїн S (тример) має три рецептор-зв’язувальні домени. SARS-CoV-2, на відміну від SARS-CoV, здатний до більш щільної взаємодії з протеїном ACE2, що і забезпечує його ефективніше проникнення в клітину-мішень [27, 35].

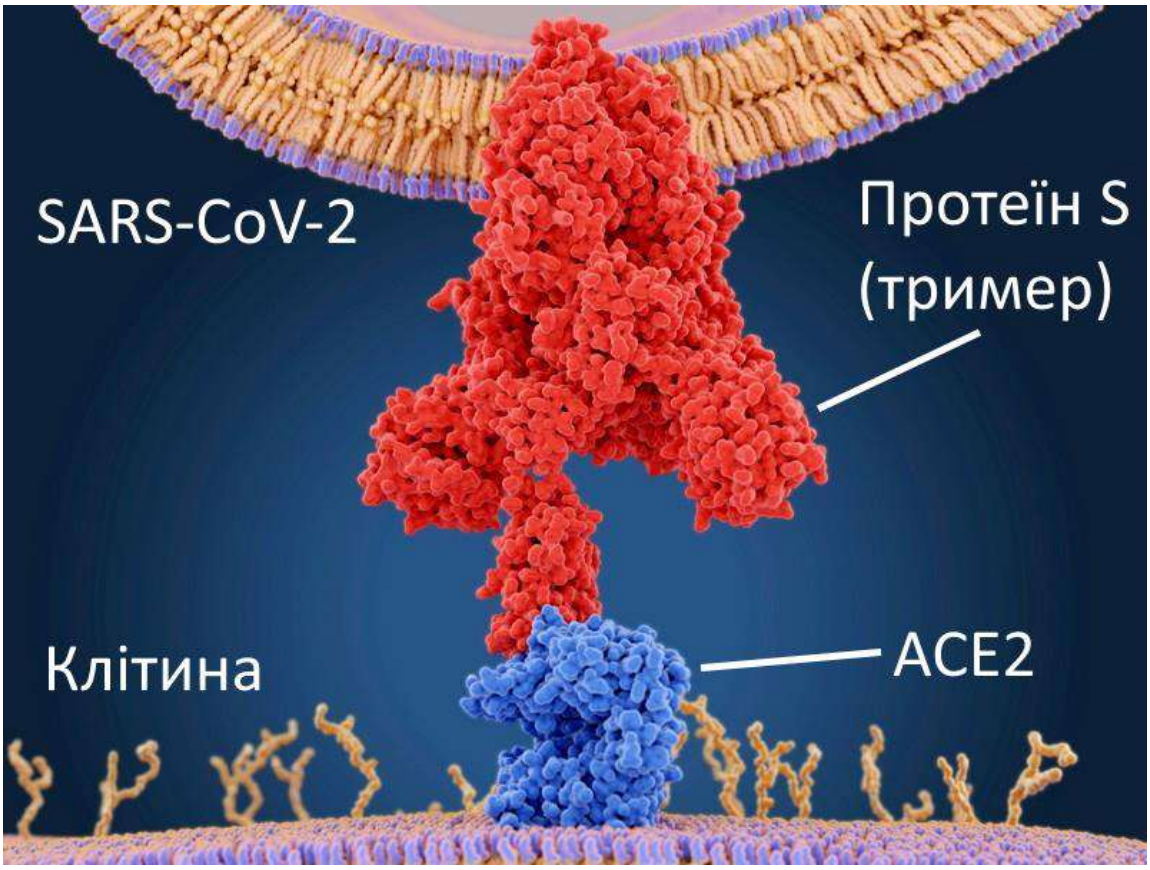

Рисунок 3 – Схема взаємодії шипуватого протеїну S вірусу із ACE2-рецептором на поверхні клітини людини [36]

На верхівці тримера протеїну S є сайти зв’язування гліканів. Встановлено, що кожний протомер тримерного протеїну S має 22 сайти для глікозилювання, а ген SARS-CoV-2 кодує 22 послідовності для N-гліканів на кожен протомер. Ці глікани, що походять з апарату Гольджі клітини хазяїна, беруть участь у фолдингу протеїнів вірусу та в імунній відповіді. Вуглеводні компоненти глікопротеїну S відіграють важливу роль у захисті вірусу від імунної системи господаря, зокрема від антитіл проти епітопів на протеїні S [37].

Механізм проникнення SARS-CoV-2 у клітину, як і патогенез COVID19, поки що вивчено недостатньо, однак відомо, що для інфікування клітини важливими є взаємодії вірусу не лише з рецептором ACE2, а й з іншими клітинними структурами, зокрема з TMPRSS2 — мембрано-зв’язаною сериновою протеазою з маловідомою біологічною функцією. При

інфікуванні протеаза TMPRSS2 або фурин, активує протеїн S SARS-CoV-2 [38, 39] шляхом розриву кількох пептидних зв'язків між S1 та S2 доменами протеїну S. Цей процес — S priming — відкриває шлях до участі S2 домену у злитті вірусу з плазматичною мембраною клітини-мішені. При цьому формується канал, через який протеїни N та вірусна РНК потрапляють у цитоплазму клітини-мішені, де РНК транслюється та сприяє утворенню комплексів для реплікації і транскрипції вірусу, а протеїни N зв'язуються з РНК для збереження її стабільності.

Отже, ефективне потрапляння вірусу в клітину господаря відбувається у три етапи [29, 34] (рисунок 4): перший — вірус зв'язується з рецептором/рецепторами клітини; другий — ліпіди оболонки та мембрани вірусу (напевне, з відповідними протеїнами) зливаються з плазматичною мембраною клітини; третій — геном (РНК) вірусу вивільняється в клітині господаря, де починається реплікація його геномного матеріалу. Протеїн S «шипа» відіграє ключову роль на перших двох етапах, які тривають близько 10 хв, а третій етап, що завершується створенням нових вірусів, — близько 10 год. Синтезовані віруси залишають клітину господаря, яка гине чи від виснаження внутрішніх ресурсів, використаних на синтез вірусів, чи під дією імунної системи, яка руйнує інфіковані клітини, а нові віруси заражають нові клітини або виділяються назовні з повітрям при диханні (якщо це були клітини епітелію легень).

Ймовірно, SARS-CoV-2 використовує для проникнення в клітини кілька різних рецепторів. Є дані про взаємодію протеїну S з CD26 — мембранним ензимом дипептидилпептидазою-4, яка важлива в імунорегуляції [40]. Крім того, доведено можливість проникнення вірусу SARS-CoV-2 в клітину через рецептор CD147 (або базигін) — індуктор матричних металопротеїназ, що належить до суперродини імуноглобулінів і є рецептором для проникнення збудника малярії в еритроцити [41].

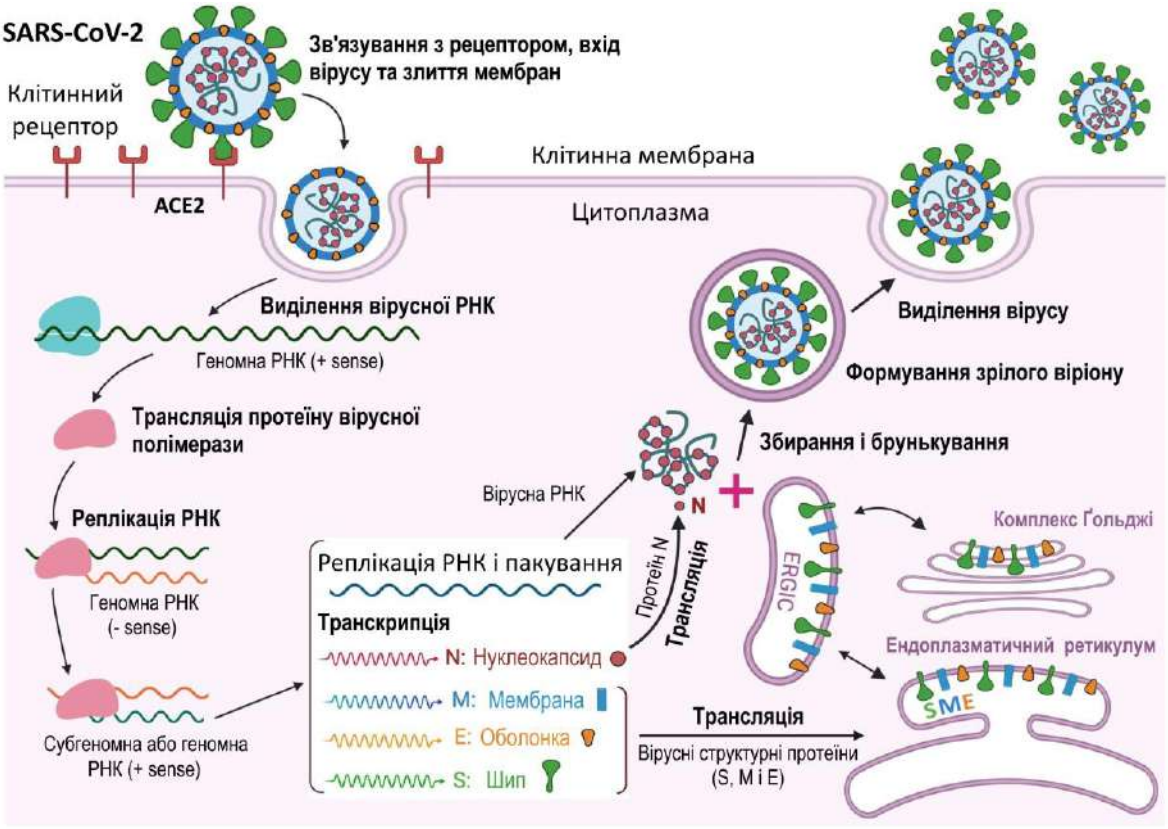

Рисунок 4 – Схема проникнення коронавірусу SARS-CoV-2 в клітину людини, його розмноження та виділення нових вірусів назовні [42]

Опубліковано дані про те, що крім добре відомого на клітинах господаря ACE2-рецептора вірусів SARS-CoV та SARS-CoV-2 (хоча їхній тропізм відрізняється) є ще інший клітинний рецептор [43], який значно підсилює інфекційність SARS-CoV-2 і, можливо, пояснює його тропізм до «не загальноприйнятих» органів та нетиповість перебігу захворювання COVID19. Це — нейропілін-1 (NRP1), який зв’язує субстрати, розщеплені фурином, і взаємодіє з ендотеліальним ростовим фактором (VEGF). Інтраназальне введення мишам NRP1-позитивних частинок, співрозмірних з вірусом, показало їх транспорт до центральної нервової системи, що може пояснювати підсилений тропізм та шляхи поширення вірусу SARS-CoV-2, а також його прямий вплив на мозок.

Порівняння 106 геномів SARS-CoV-2 та 39 геномів SARS-CoV дало можливість стверджувати, що швидкість мутацій SARS-CoV-2 значно менша,

ніж у SARS-CoV, і що глікопротеїн S «шипа» у SARS-CoV-2 та його рецептор-зв'язувальний домен (RBD) є дуже консервативними [13]. Водночас останнім часом виявляють все більше нових мутацій SARS-CoV-2, які, з одного боку, є більш небезпечними для людини, а з іншого — ставлять під сумнів ефективність створюваних нині вакцин.

1.2 Формування імунітету проти SARS-CoV-2

Ймовірність розвитку захворювання в інфікованої коронавірусом людини залежить від багатьох чинників, пов'язаних як із самим вірусом (шлях інфікування, збереження здатності проникати в клітину, інфекційна доза тощо), так і з організмом людини (генотип, стан імунної системи, наявність інших захворювань, стан внутрішніх органів).

Від того, як імунна система реагує на збудник інфекційного захворювання, значною мірою залежить поширення хвороби. Реакція імунної системи на різні патогени може бути різною: від формування довічного імунітету до практично повної відсутності захисту. Поки що нам доступні лише попередні дані щодо формування імунітету проти коронавірусу SARS-CoV-2, який викликає COVID19. Найкращим підходом у такій ситуації є побудова вченими концептуальної моделі — набору припущень щодо формування імунітету проти SARS-CoV-2 на основі сучасних знань про імунну систему та її реакцію на подібні віруси і в подальшому перевірка правильності кожного компонента моделі, зокрема за допомогою спостережень та експериментів.

Значною мірою наше уявлення про імунітет проти SARS-CoV-2 сформувалося не на основі відомостей про віруси SARS-CoV або MERS-CoV, які інфікували порівняно невелику кількість людей, а на даних про інші коронавіруси людини, які щороку викликають респіраторні захворювання, починаючи від звичайної застуди до пневмонії. У результаті інфікування цими коронавірусами (їх зараз відомо чотири) формується імунітет (не завжди потужний) тривалістю щонайменше один рік. Дослідження осіб, які

перехворіли на SARS або MERS і вижили, показало, що після SARS імунітет зберігався два роки, а після MERS — майже три роки. Водночас нейтралізувальна здатність противірусних антитіл (їх здатність інгібувати реплікацію вірусу) поступово знижувалася протягом усього періоду дослідження [44].

Поки що дослідження тривалості гуморальної імунної відповіді проти SARS-CoV-2, які проводились, дають неоднозначні результати. Так, дослідження, проведене китайськими вченими, показало, що гуморальний імунітет проти SARS-CoV-2 триває досить недовго — 2–3 місяці, причому вже через 8 тижнів рівень противірусних антитіл падає у 13% людей, що мали симптоми COVID19, і у 40% людей, що цих симптомів не мали. Отримані дані ставлять під сумнів ідею «паспортів імунітету», які деякі країни хочуть видавати людям, що перехворіли на COVID19, мають позитивні результати тесту на противірусні антитіла і нібито можуть вільно подорожувати, працювати і не дотримуватися карантинних обмежень [45].

Дослідження, проведене ісландськими вченими за участі біля 30 тис. осіб (у тому числі понад 1200 осіб, які мали позитивний тест на вірус та одужали від COVID19) дало більш оптимістичні результати. Приблизно 90% людей, що одужали, мали антитіла проти SARS-CoV-2: рівень цих антитіл підвищувався протягом двох місяців після встановлення діагнозу, а потім залишався на тому ж рівні протягом усього дослідження, яке тривало 4 місяці. [46].

Ці результати ґрунтуються на визначенні у крові рівнів антитіл класу IgG. Проте поки є мало даних про стан Т-клітинного імунітету проти вірусу, який може відігравати значно більшу захисну роль, зберігатися набагато довше і стан якого може не корелювати з рівнями циркулюючих антитіл. Так, в імунній відповіді на вірус важливі Т-лімфоцити. Додатково до CD4+ Т клітин-хелперів, що відіграють центральну роль в індукції синтезу антитіл, CD8+ Т клітини, що специфічні до будь-якого з протеїнів вірусу, можуть вбити інфіковану вірусом клітину.

Нещодавно в крові у 20-50% людей, які ніколи не зустрічалися з SARS-CoV-2, були виявлені CD4 + Т-клітини пам'яті, реактивні по відношенню до цього вірусу, причому, була доведена їх здатність перехресно реагувати із іншими коронавірусами людини і визначено 142 відповідних епітопи Т-клітин [47]. Очевидно, що частина людей в результаті перенесених коронавірусних застудних захворювань виробила імунітет, здатний, певною мірою, захистити їх від SARS-CoV-2, що частково пояснює неоднорідність перебігу COVID19 у різних людей або в різних географічних регіонах, які відрізняються за поширеністю інфекцій, спричинених коронавірусами людини. Можливо, саме тому населення розвинутих і багатих країн переносить COVID19 важче, ніж населення бідних країн, яке частіше стикається із збудниками інфекційних захворювань, зокрема із коронавірусами людини, через низку економічних і соціально-культурних причин, які призводять до перенаселеності, розповсюдження антисанітарних умов, поганого харчування тощо.

Очевидно, що після інфікування SARS-CoV-2 більшість людей матимуть противірусну імунну відповідь (у когось вона буде сильнішою, в когось слабшою). Можна вважати, що ця імунна реакція забезпечить певний захист людей у середньостроковій перспективі, принаймні на рік, а згодом її ефективність може знизитися. Якщо це дійсно так, то зараження дедалі більшої кількості людей у популяції приведе до формування так званого колективного імунітету. Оскільки все більше людей стануть несприйнятливими до вірусу, інфікована людина матиме все менше шансів увійти в контакт з людиною, сприйнятливою до зараження. Якщо колективний імунітет охопить значну частину популяції (понад 60%), то навіть без епідеміологічних заходів вірус не буде поширюватися так стрімко. Отже, розраховувати на довгостроковий контроль над SARS-CoV-2 можна буде лише тоді, коли більшість людей отримає імунітет завдяки перенесеній інфекції або ефективній вакцинації.

Однак невідомо, чи буде імунітет до SARS-CoV-2 тривалим у більшості населення. Нещодавно було доведено, що людина, яка перехворіла на SARS-CoV-2, може через декілька місяців інфікуватись повторно [48]. Питання про те, чи впливає імунітет на симптоми COVID19 при повторній інфекції, є надзвичайно важливим, особливо в контексті розробки вакцин. Чи можливо, що імунна система не тільки не захистила від вірусу, але й погіршила ситуацію? Так, теоретично така можливість існує. Наприклад, деякі випадки тяжкого перебігу COVID19 погіршуються «підступними» імунними реакціями, які пошкоджують здорові тканини. Люди, які пережили це під час першої інфекції, можуть мати імунні клітини, які готові вдруге відповісти ще більш активно. Інша можливість полягає в існуванні механізму антитіло-залежного посилення реплікації вірусу, при якому антитіла, що утворюються під час першої зустрічі з SARS-CoV-2, допомагають вірусу, а не борються з ним під час повторної інфекції. Потрібно мати набагато більше інформації, щоб зрозуміти, наскільки поширеним явищем є повторне інфікування, які причини до нього призводять, і які фактори впливають на важкість повторного перебігу COVID19. Поки що невідомо, чи може імунітет захистити від інфікування SARS-CoV-2, чи вакцини лише зменшать симптоми під час другого зараження або перетворять вакцинованих осіб на безсимптомних носіїв SARS-CoV-2, які будуть піддавати ризику вразливі групи населення, зокрема людей похилого віку, що погано реагують на вакцини [49].

Отже, існує ймовірність того, що SARS-CoV-2 зможе продовжити циркулювати в популяції людей, незважаючи на колективний імунітет, сформований завдяки природному інфікуванню або вакцинації.

1.3 Основні стратегії розроблення вакцин проти COVID19

Під час минулих епідемій SARS і MERS було розпочато дослідження зі створення вакцини, однак через згасання спалахів фінансування припинили і роботу не було завершено. Результати цих досліджень навряд чи можна було

повністю використати для створення вакцини проти COVID19, оскільки аналіз антигенної структури показав, що найбільш імуногенні епітопи протеїну S «шипа» у SARS-CoV-2 і SARS-CoV відрізняються [50].

Вірус SARS-CoV-2 порівняно з вірусом грипу є відносно стабільним, не схильним до значної кількості мутацій завдяки наявності у нього системи «виправлення помилок» реплікації. Пройшовши шлях від Китаю до США, він набув лише від 4 до 10 мутацій. І це дало дослідникам надію на можливість створення стабільної вакцини, яка залишатиметься ефективною протягом тривалого часу [51]. Однак ця вакцина повинна була пройти детальну перевірку на безпечність, адже амінокислотні послідовності протеїнів вірусу і людського організму іноді містять подібні фрагменти, внаслідок чого побічними ефектами вакцини можуть бути автоімунні захворювання, особливо при застосуванні у людей з генетичною схильністю до автоімунності. Були й інші побоювання: чи буде вакцина захищати від коронавірусу, чи не спричинить вона антитілозалежне посилення реплікації вірусу або посилення гіперімунних реакцій, що призводять до смерті важких хворих на COVID19?

Якою повинна бути «ідеальна» вакцина для профілактики COVID19? У клінічному плані важливими є три основні фактори: 1) обов'язковою є надійна імунна відповідь, яка генерує довготривалі нейтралізувальні антитіла до антигенів SARS-CoV-2 (наприклад, протеїнів S та/або N); 2) вакцина має викликати потужний Т-лімфоцитний імунітет; 3) вакцина не повинна мати будь-яких серйозних побічних ефектів, а також супроводжуватися такими явищами, як антитілозалежна клітинна цитотоксичність, вакцино-асоційоване захворювання дихальних шляхів, цитокіновий «шторм» тощо [52].

Дослідники використовують різні підходи до створення вакцини (рисунок 5). Загалом виділяють 7 основних платформ. Серед них дві — на основі нуклеїнових кислот: ДНК і РНК, які, у свою чергу, можна розподілити відповідно до певних ознак, пов’язаних, скажімо, зі способом доставки.

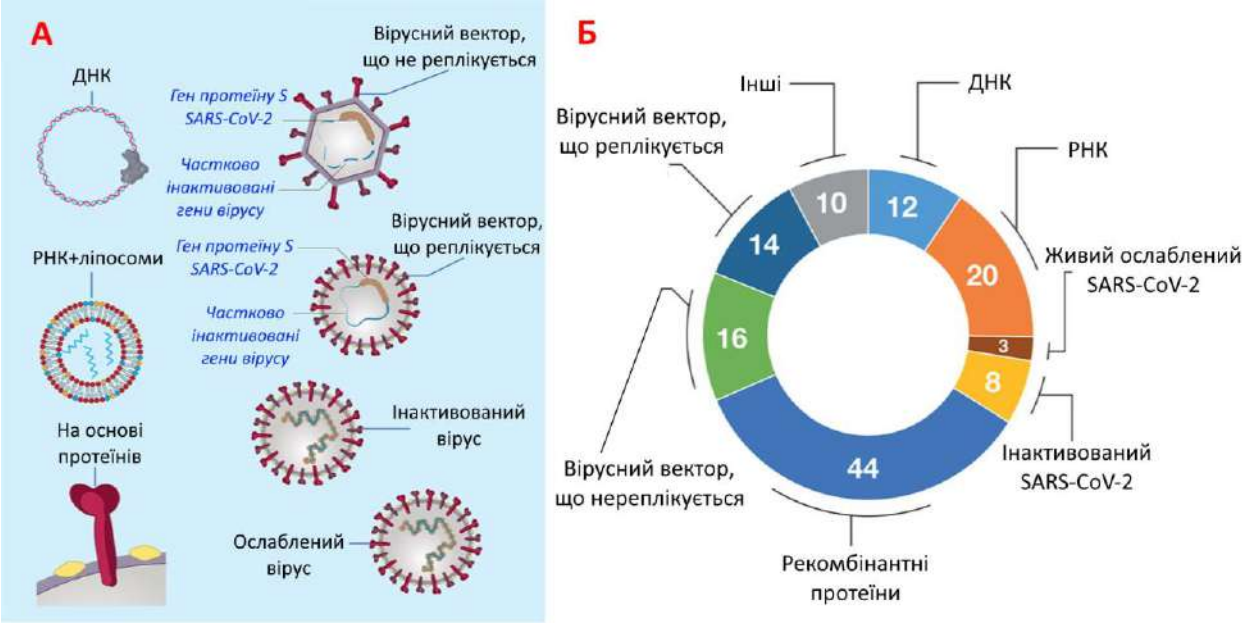

Рисунок 5 – Підходи до розроблення вакцин проти SARS-CoV-2: а — основні підходи; б — розподіл вакцин-кандидатів у групах з різними підходами [52]

Третя категорія — це вакцини на основі протеїнів (їх також називають субодиничні вакцини). Ця група охоплює широкий спектр технологій приготування імуностимулювальних вірусних протеїнових антигенів, і до неї належить найбільша кількість сучасних кандидатів на вакцину проти COVID19. Четверта і п’ята категорії — це вірусні вектори, подібні до тих, що використовують у генній терапії. Вони включають вектори, які не реплікуються, та вектори, які реплікуються. Ще дві категорії — це самі віруси SARS-CoV-2: або інактивовані, або ослаблені живі. Крім того, розробляють вакцини, які не належать до жодної з наведених вище категорій. Це вакцини на основі вірусоподібних частинок або з використанням як вірусних переносників не SARS-CoV-2, а вбитого збудника сказу (CORAVAX) та/чи модифікованого вірусу конячої віспи (TX-1800).

Одну з перших у світі вакцин проти COVID19 створила американська біотехнологічна фірма Moderna за участі NIAID. Її клінічне випробування розпочалося вже через 64 дні після того, як було опубліковано геном вірусу. 18 травня 2020 р. Moderna заявила про перші результати клінічних

випробувань [53]: її mRNA-1273 вакцина проти COVID19 викликала імунну відповідь у людей і захищала мишей від легеневих інфекцій, спричинених коронавірусом SARS-CoV-2.

Майже одночасно з Moderna за розроблення вакцини взялися й інші провідні фармацевтичні фірми та науково-дослідні інститути у Великій Британії, КНР, ФРН, Франції, згодом до них приєдналися установи з Японії, Кореї, Канади, Індії та інших країн. На сьогоднішній день 315 іноземних компаній займаються розробкою вакцин проти COVID19, серед яких 121 компанія знаходиться на стадії клінічних випробувань, причому, 36% із них випробовують вакцини на основі рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 [3]. Декілька виробників вакцин успішно завершили клінічні випробування та вже вивели на ринок свої продукти – вакцини проти COVID19 на основі мРНК, аденовірусних векторів або інактивованих вірусних часток SARS-CoV-2. Першою на європейський ринок вийшла вакцина проти COVID19 виробництва Pfizer-BioNTech (США / Німеччина), що 2 грудня 2020 р. отримала дозвіл на використання у Великобританії [4]. Слідом за нею протягом 2021 року з'явилися ще 3 вакцини проти COVID19 від компаній Moderna (США), Oxford-AstraZeneca (Великобританія / Швеція) і Johnson & Johnson (США / Бельгія). Ці вакцини створені на основі аденовірусів або мРНК. У деяких країнах затверджені до використання китайські вакцини (від компаній CanSino, Sinopharm, Sinovac, Sinopharm-Wuhan) і російські вакцини (виробництва Gamaleya, Vector Institute) [5]. Першою вакциною проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів, яка за попередніми результатами випробувань продемонструвала ефективність 89% і буде виведена на ринок у цьому році, є вакцина компанії Novavax (США), до складу якої входять наночастки з рекомбінантного протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 і ад'ювант сапонін [6].

Зі всіх компаній, що заявили про початок робіт зі створення вакцини проти COVID19, майже третина обрали стратегію розроблення вакцини на основі окремих протеїнів (субодиниць) вірусу, зокрема протеїну S або його

домену RBD, який відповідає за взаємодію з рецептором ACE2 і проникнення вірусу в клітину. Цей напрямок є найбільш популярним, оскільки ефективність подібних вакцин була підтверджена в експериментах на мавпах при створенні вакцини проти подібного коронавірусного захворювання – атипової пневмонії SARS, яка поширювалась світом у 2002 р. Ми обрали аналогічну стратегію для створення вітчизняної вакцини проти COVID19 як найбільш перспективну.

Відомо, що субодиничні вакцини не здатні викликати сильну імунну відповідь, тому вони потребують додаткових імуностимулюючих молекул і багаторазової імунізації. Способи підсилення імуногенності можуть бути різними, і компанії, що зараз розробляють вакцини проти COVID19, не завжди розкривають цю інформацію через комерційну таємницю. Ми запропонували використати для підсилення імуногенності високоімуногенний носій – дифтерійний токсоїд CRM197.

CRM197 широко використовується як носій у вакцинах проти менінгіту, пневмонії, гемофільної інфекції тощо, в яких антигенні пептиди чи олігосахариди пришиваються хімічним шляхом по всій поверхні молекули носія. Ми ж застосували новий підхід: антигени коронавірусу були приєднані до носія з N-кінця шляхом злиття їх генів. Це забезпечило не тільки стабільність з’єднання, але й дозволило використати унікальну функцію дифтерійного токсину – здатність транспортувати протеїни всередину клітини шляхом їх транслокації через мембрану ендосом. Така транспортна функція притаманна всім похідним дифтерійного токсину, зокрема і CRM197, які мають у своєму складі трансмембранний домен токсину, адже саме він забезпечує проникнення в клітину каталітичного домену дифтерійного токсину, що спричиняє загибель клітини шляхом апоптозу через зупинку синтезу протеїнів. Ймовірно, транспортування вірусних протеїнів у цитозоль антиген-презентувальних клітин сприятиме їх ефективній презентації на клітинній поверхні в комплексі з антигенами гістосумісності І класу, що є необхідною умовою для індукції Т-клітин, які

відіграють ключову роль у противірусному захисті. Тому використання як носія CRM197 повинно підсилити імуногенність протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 і дозволити розробити ефективну вакцину проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів.

2 МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Методологія дослідження

Для виконання поставлених завдань під час виконання проєкту заплановано використати 3 групи методів. По-перше, це методи молекулярної біології та генної інженерії для створення генетичних конструкцій, що містять гени протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2: N і S (RBD), їх злитих кон'югатів з носіями CRM197 або SbB, а також із флуоресцентною міткою (eGFP). Конструкції планується створити на основі плазміди pcDNA3 (для експресії в еукаріотичних клітинах CHO або HEK293) та плазмід pET24 або pET28 (для експресії в *E.coli* Rosetta (DE3)). Кожна з цих систем експресії має свої переваги та недоліки: одержання рекомбінантних протеїнів в бактеріальній системі експресії є більш зручним і дешевим, однак такі протеїни, на відміну від еукаріотичних, не підлягають глікозилюванню, що може впливати на їх властивості. Однак, відсутність глікозилювання при одержанні рекомбінантних протеїнів у системі експресії *E.coli* не повинна стати проблемою, адже ділянки молекул протеїнів N і S, що задіяні на ключових етапах життєвого циклу вірусу, зокрема при взаємодії вірусу з клітинним рецептором, не є глікозильованими. Крім того, під час імунної відповіді в результаті процесингу антигенів на поверхні імунних клітин презентуються в комплексі з антигенами гістосумісності, переважно, неглікозильовані пептиди. Наступні етапи роботи планується виконати у 2021 р. На етапі очищення і, за необхідності, рефолдингу буде використано методи металоафінної хроматографії на Ni-NTA агарозі та електрофорезу в поліакриламідному гелі (ПААГ). Для одержання кон'югатів рекомбінантних протеїнів з носіями планується використати саме метод генетичного злиття, а не хімічної кон'югації, оскільки він забезпечує чітке приєднання протеїну-«пасажиру» з N кінця молекули, що важливо для його ефективного транспорту за допомогою похідних дифтерійного токсину всередину антиген-презентуючих клітин.

По-друге, будуть використані імунохімічні методи (імуноензимний аналіз, вестерн-блот) для вивчення імуногенних та антигенних властивостей рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 та їх кон'югатів з носіями, цитокінового профілю імунних сироваток, а також виявлення генно-інженерних протеїнів за мітками – тагами. Мишей Balb/c планується імунізувати за класичною схемою (триразова імунізація через кожні 2 тижні) з використанням ад'ювантів: гідроксиду алюмінію або полілактид-D,L-ко-гліколіду, що посилюють імунну відповідь і можуть використовуватись у складі вакцин для людей. За умов доступності, комерційних сироваток крові людей, що перехворіли на COVID19, буде перевірено відповідність антигенних та імуногенних властивостей протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 та їх рекомбінантних аналогів. При обробці результатів імуноензимного аналізу будуть застосовані статистичні методи. Достовірність відмінностей між середніми значеннями буде визначена за t-критерієм Стьюдента ($p<0,05$) з використанням програмного забезпечення Origin 9.

По-третє, планується використати методи роботи з клітинами і цитофлуориметрію для дослідження здатності антитіл проти рекомбінантного протеїну S (RBD) коронавірусу SARS-CoV-2 блокувати взаємодію флуоресцентного похідного RBD-eGFP з рецепторами ACE2 на клітинах людини і потенційно захищати їх від зараження вірусом.

Доклінічні випробування дослідного зразка вакцини проти COVID19 включатимуть вивчення імуногенності та місцевої переносимості.

2.2 Культури клітин, експресійні штами та вектори

Генетичні конструкції отримували з використанням плазмід *nCov19-N-Protein, pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-8his, pCMV14-3X-Flag-SARS-CoV-2 S, pET-24a(+), pEGFP-N1*.

Бактеріальні штами-продуценти рекомбінантних протеїнів N, S, RBD, RBD–CRM197 та RBD–eGFP були створені на основі *E. coli* штаму Rosetta

(DE3) (Merck, Німеччина), а клонувальні штами створені на основі *E. coli* DH10B (Thermo Fisher Scientific, США).

Еукаріотичні продуценти рекомбінантних протеїнів були створені на основі клітинної лінії HEK293 та CHO із використанням генетичних конструкцій на основі плазміди *pcDNA3* та аденовірусу *pAdv-CMV-Easy1*.

2.3 ПЛР і електрофоретичне розділення ДНК

ПЛР-ампліфікацію проводили на термоциклері 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США). З метою ампліфікації вставки для клонування використовували суміш PrimeSTAR (Takara Bio, Япония), а у тесті колоній STAB-ПЛР полімеразу DreamTaq (Thermo Scientific).

Електрофорез ДНК-послідовностей проводили в 1% або 3% агарозному гелі в буферному розчині TAE (0,4 М тріс ацетат (pH - 8.3), 0,01 М EDTA). Зразки розчиняли у 6X Loading Buffer (Thermo Scientific). Після закінчення розділення гелі забарвлювали в 0,005% розчині бромистого етидію протягом 5 хв та промивали дистильованою водою. Візуалізацію ДНК в гелі здійснювали за допомогою системи транс-ілюмінатор Vilber Lourmat TFX - 20.LM та пристрою для документації гелів "Vilber Lourmat" DP - 001.FDC (Vilber Lourmat, France).

2.4 Виділення плазмідних ДНК методом лужного лізису

Плазміди виділяли з клітин *E.coli* неекспресійного штаму DH10B методом лужного лізису. Всі операції проводили у холоді. Осад бактеріальних клітин суспендували в першому плазмідному розчині (25 мМ Tris-HCl, 10 мМ EDTA, pH 8,0) з розрахунку на 1 мл культури 100 мкл розчину. Далі додавали свіжоприготовлений лізуючий другий плазмідний розчин (0,2 N NaOH, 1% SDS) із розрахунку на 1 мл культури 200 мкл розчину, обережно перемішували та інкубували протягом 2 хв. Після цього додавали третій плазмідний розчин (3 М CH_3COONa, pH 5,5) із розрахунку

на 1 мл культури 150 мкл розчину та обережно перемішували до утворення білого преципітату.

Геномну ДНК та основну масу бактерійних протеїнів осаджували центрифугуванням при 3500 об/хв та 4°С протягом 10 хв. Білкові залишки екстрагували за допомогою хлороформу, який додавали до розчину у співвідношенні 1:1 з подальшим центрифугуванням при 3500 об/хв протягом 10 хв. До верхньої фази, яка містила РНК та плазмідну ДНК додавали ізопропанол у співвідношенні 1:1. Отриману суміш інкубували 5 хв при -80°С. Після цього розчин центрифугували 10 хв при 3500 об/хв. Утворений осад ресуспендували в етанолі та осаджували центрифугуванням протягом 5 хв при 13000 g. Надалі, залишки етилового спирту відбирали та висушували осад у термостаті. Для очищення від РНК осад розчиняли у 100 мкл води без нуклеаз та додавали 10 U РНКази та залишали суміш у термостаті на 30 хв при 37°С. Також, для подальшого використання проводили додаткове очищення та концентрування плазмідної ДНК комерційним набором для очищення ДНК (DNA Extraction Kit, Thermo) згідно рекомендацій виробника.

2.5 Модифікація плазмідного вектору *pET24a*

Комплементарні послідовності, що кодують сайт щеплення ентерокіназою та наведені у таблиці 1, були відпалені та клоновані в плазмідний вектор *pET24a* за сайтами NotI та XhoI. Отримана генетична конструкція *pET24a-entero* використовувалась для трансформації клітин *E. coli* штаму DH10B. Ефективність клонування досліджували за допомогою ПЛР. Для ампліфікації в ПЛР використовували праймери комплементарні ділянці Т7 промотору (pET sense) та вставки (entero antisense) (таблиця 1).

2.6 Створення генетичних конструкцій, що кодують протеїни вірусу SARS-CoV-2, для експресії в прокаріотичній системі

Нуклеотидні послідовності протеїну нуклеокапсиду (N), рецепторного протеїну (S) або його рецептор-зв’язувального домену (RBD)

напрацьовували за допомогою ПЛР з використанням як матриці плазмід *nCov19-N-Protein, pCMV14-3X-Flag-SARS-CoV-2 S, pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-8his* відповідно та специфічних пар праймерів, наведених у таблиці 2. ПЛР продукти та плазміду *pET24a-entero* обробляли ендонуклеазами рестрикції NdeI (для S-протеїну та RBD) або NheI (для N-протеїну) та NotI. Гідролізовану ДНК розділяли в 1%-му агарозному гелі. Необхідні фрагменти виділяли за допомогою набору для виділення ДНК (DNA Extraction Kit). Всі маніпуляції проводили згідно рекомендацій виробника.

Таблиця 1 – Послідовності праймерів для додавання сайту щеплення ентерокіназою в плазмідний вектор *pET24a*

entero top	ggccgcgatgacgatgataagc
entero bottom	tcgagcttatcatcgtcatcgc
pET sense	taatacgactcactataggg

Таблиця 2 – Послідовності праймерів, що використовувались у ПЛР для підтвердження наявності вставки

RBD sense (NdeI)	gatcatatgaagaccatcatcgcc
RBD asense (NotI)	caagcggccgcacttttgggcccacaaac
S-prot sense (NdeI)	gatcatatgttcgttttccttgttctg
S-Prot asense (NotI)	gtagcggccgctgcaacatgatccgcaaga
N-Prot sense (NheI)	catgctagctctgataatggaccccaaa
N-Prot asense	gtagcggccgcggcctgagttgagtcag
pET antisense	gctagttattgctcagcggt

Об’єднання нуклеотидних послідовностей вставок та експресійного вектору проводили за допомогою Т4 ДНК-лігази. Лігування та рестрикцію виконували згідно з методикою, рекомендованою виробниками. Далі клітини *E.coli* експресійного штаму DH10B трансформували отриманими

генетичними конструкціями методом електропорації з подальшим висіванням на тверде поживне середовище LB з додаванням селективного антибіотика канаміцину у концентрації 0,001%.

Колонії, що виросли на твердому поживному середовищі, аналізували на наявність в них генетичної конструкції методом ПЛР з використанням специфічних до вставки праймерів у напрямку sence та pET antisence, які комплементарні послідовності у складі вектору (таблиця 2).

2.7 Створення генетичних конструкцій, що кодують протеїни вірусу SARS-CoV-2 з модифікаціями їх нуклеотидних послідовностей

Задля створення злитого протеїну або внесення необхідних мутацій у нуклеотидну послідовність S-протеїну коронавірусу SARS-CoV-2 використовували метод ПЛР-індукованого подовження ділянки перекривання (англ. PCR-mediated overlap extension, PCR-OE) [54]. Для цього на першому етапі за допомогою ПЛР напрацьовували фрагменти з бажаними змінами нуклеотидної послідовності, які вносили з використанням специфічних праймерів, наведених у таблиці 3.

Матрицею для синтезу мутованого S-протеїну слугували плазміди *pCMV14-3X-Flag-SARS-CoV-2 S* (Addgene) та плазміда *pET24a-CRM197*, отримана раніше в нашій лабораторії. Матрицями для синтезу частин злитого протеїну – рецептор-зв'язувального домену S-протеїну та нетоксичного рекомбінантного похідного дифтерійного токсину CRM-197 – слугували плазміда *pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-8his* (Addgene) та плазміда *pET24a-CRM197*, отримана раніше в нашій лабораторії. На другому етапі методом ПЛР отримували повні послідовності з використанням ПЛР-продуктів, отриманих після першого етапу, та фланкуючих праймерів.

Фінальні ПЛР-продукти та плазміду *pET24a-entero* послідовно обробляли ендонуклеазами рестрикції NdeI та NotI та об'єднували в єдину генетичну конструкцію лігуванням Т4 ДНК-лігазою за «липкими кінцями».

Ферментативні реакції виконували згідно умов, рекомендованих виробниками.

Таблиця 3 – Послідовності праймерів, що використовувались для направленого мутагенезу та створення злитих протеїнів

RBD sense (NdeI)	gatcatatgaagaccatcatcgcc
RBD asense fusion	aggtcttctgcgaagacccgtgatccctttttgggcc
CRM197 sense fusion	gtcttcgcagaagacctggctgccggcgctgatgatgtt
CRM197 asense fusion	gtggcggccgcagctcttgatttcaaaaaatag
S-prot sense (NdeI)	gatcatatgttcgttttccttgttctg
S-Prot asense (NotI)	gtagcggccgctgcaacatgatccgcaaga
sense S-prot mutation	ccagcaagcccagagtgtggcttctcaaagc
asense S-prot mutation	ctctgggcttgctggggtgagttagtttgtgtctg
pET antisense	gctagttattgctcagcggt
Spike seq 9	catgtcatttccccagtcag

Далі клітини *E.coli* неекспресійного штаму DH10B (DE3) трансформували отриманою лігазною сумішшю методом електропорації з подальшим висіванням на тверде поживне середовище LB з додаванням селективного антибіотика канаміцину у концентрації 0,001%. Колонії, що виросли на твердому поживному середовищі, аналізували на наявність в них генетичних конструкцій *pET24a-entero-Spike(mut)* або *pET24a-entero-RBD-CRM197*. Для цього проводили ПЛР з використанням праймерів, комплементарних до послідовностей RBD або S-протеїну (Spike seq 9) з N-кінця та вектору з С-кінця (таблиця 3).

2.8 Створення генетичних конструкцій, що дозволяють екпресувати протеїни вірусу SARS-CoV-2 в еукаріотичній системі експресії

Нуклеотидні послідовності рецепторного протеїну (S) та його мутованої форми, а також рецептор-зв'язувального домену (RBD) окремо та у формі злитого з CRM197, напрацьовували методом ПЛР з використанням отриманих раніше генетичних конструкцій та праймерів, наведених в таблиці 4.

Отримані ПЛР-продукти послідовно інкубували з ендонуклеазою рестрикції NotI та фрагментом Кленова та ендонуклеазою NheI. Вектори *pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-8his* та *pEGFP-N1* послідовно інкубували з ендонуклеазою рестрикції BamHI та фрагментом Кленова, а також ендонуклеазою NheI, розділяли в 1 % агарозному гелі та очищали за допомогою комерційного набору для екстракції ДНК із гелю. Генетичні конструкції *pcDNA3-Spike-8his, pcDNA3-Spike(mut)-8his, pcDNA3-RBD-CRM197-8his, pEGFP-N1-RBD* створювали шляхом об'єднання лінійного вектору та вставки Т4 ДНК лігазою.

Таблиця 4 – Послідовності праймерів, що використовувались у ПЛР для напрацювання кДНК протеїнів SARS-CoV-2 та їх кон'югатів

sense Spike (RBD) eu	caagctagcgccaccatgaagaccatcatcgcc
CRM197 asense fusion	gtggcggccgcagctcttgatttcaaaaaatag
S-prot sense eu	cttgctagcgccaccatgttcgttttccttgttctg
S-Prot asense (NotI)	gtagcggccgctgcaacatgatccgcaaga
EGFP asense (NotI)	gcggccgctatacttgtacagctcgtcc

Надалі клітини *E.coli* штаму DH10B трансформували отриманими генетичними конструкціями методом електропорації з подальшим висіванням на тверде поживне середовище LB з додаванням селективного

антибіотика ампіциліну у концентрації 0,001%. Колонії аналізували методом ПЛР з використанням специфічних до вбудованих послідовностей праймерів.

2.9 Внесення змін у генетичні конструкції, що кодують протеїни вірусу SARS-CoV-2, для експресії в прокаріотичній системі

Нуклеотидні послідовності фрагменту RBD протеїну S коронавірусу, та його злитих похідних RBD-CRM197 та RBD-eGFP напрацьовували за допомогою ПЛР з використанням в якості матриці плазмід *pET24a-entero-RBD, pET24a-entero-RBD-CRM197* та *pEGFP-N1-RBD* відповідно та специфічних пар праймерів, наведених у таблиці 5.

Таблиця 5 – Послідовності праймерів, що використовувались у ПЛР для напрацювання кДНК протеїнів SARS-CoV-2 та їх кон'югатів

RBD sense wo signal	actaatctttgtccgttcggt
pET antisense	gctagttattgctcagcggt
pET sense	taatacgactcactataggg
EGFP asense (NotI)	gcggccgctatacttgtacagctcgtcc

Плазміду *pET28a* обробляли ендонуклеазою рестрикції NcoI, фрагментом Кленова та рестриктазою XhoI (для RBD та RBD-CRM197) або NotI (RBD-eGFP). Гідролізовану ДНК розділяли в 1% му агарозному гелі. Необхідні фрагменти виділяли за допомогою набору для виділення ДНК (DNA Extraction Kit). Всі маніпуляції проводили згідно рекомендацій виробника.

Об'єднання нуклеотидних послідовностей вставок та експресійного вектору проводили за допомогою Т4 ДНК-лігази. Лігування та рестрикцію виконували згідно параметрів, рекомендованих виробниками. Далі клітини *E.coli* експресійного штаму DH10B трансформували отриманими генетичними конструкціями методом електропорації з подальшим

висіванням на тверде поживне середовище LB з додаванням селективного антибіотика канаміцину у концентрації 0,001%.

Колонії, що виросли на твердому поживному середовищі, аналізували на наявність в них генетичної конструкції методом ПЛР з використанням специфічних до вставки праймерів у напрямку sence та pET antisence, який комплементарний послідовності у складі вектору (таблиця 5).

2.10 Культивування прокаріотичних і еукаріотичних продуцентів рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2

Клітини еукаріотів культивували в поживному середовищі RPMI-1640 з L-глутаміном, що містило 5 % фетальної сироватки великого рогатої худоби, стрептоміцин (100 мг/л), пеніцилін (10 000 U) та амфотеріцин В (250 мкг/л) у зволоженій атмосфері з 5 % CO_2 при 37 °С.

Клітини прокаріотів культивували в поживному середовищі LB Broth (Lennox) (10 г/л бакто-триптону, 5 г/л дріжджового екстракту, 5 г/л NaCl) ("Fluka", Швейцарія), що містило 50 мкг/мл канаміцину, до густини, що відповідає А600=0,3-0,5. Після цього додавали індуктор експресії – ізопропіл-β-D-1-тіогалактопіранозид (IPTG) до кінцевої концентрації 1 мМ, і залишали на 3-4 год за 30° С при активній аерації. Після цього клітини осаджували центрифугуванням, видаляли надосадову рідину, а клітинний осад використовували для виділення цільового протеїну.

2.11 Індукція експресії рекомбінантних протеївнів коронавірусу SARS-CoV-2

Після досягнення культурою бактерій-продуцентів густини, що відповідає А600=0,3-0,5, експресію рекомбінантних протеїнів індукували додаванням IPTG до концентрації 1 мМ та інкубували 3-4 год за 30° С при активній аерації.

Також для експресії рекомбінантних протеїнів використовували модифікований протокол аутоіндукції. Клітини *E. coli* Rosetta (DE3),

трансформовані відповідним плазмідним вектором нарощували протягом ночі при 37°С в 2 мл середовища 2xYT, яке містило 50 мкг/мл канаміцину 1% глюкози. Нічну культуру інокулювали в розведенні 1:1000 в 2 мл свіжого 2xYT середовища, яке містило 50 мкг/мл канаміцину, 25 мМ $(NH_4)_2SO_4$, 50 мМ KH_2PO_4, 50 мМ Na_2HPO_4, 1мМ $MgSO_4$, 0,05 % глюкози, 0.2 % α- лактози, 0,5 % гліцерол. Для великомасштабного синтезу використовували 400 мл 2xYT. Індукування експресії проводили протягом 18-24 год при 37°С, після чого бактеріальні клітини осаджували центрифугуванням 3000g протягом 20 хв.

2.12 Визначення локалізації рекомбінантних протеїнів у клітинах бактерій-продуцентів

Визначення локалізації рекомбінантних протеїнів проводили розділенням розчинної і нерозчинної фракцій протеїнів *E. coli* за допомогою електрофорезу в поліакриламідному гелі із додаванням додецилсульфату натрію (ДСН-ПААГ). Для одержання розчинної і нерозчинної фракцій протеїнів цитоплазми *E. coli* осадженні клітини ресуспендували в буфері PBS, який містив 1 мг/мл лізоциму, заморожували/розморожували для руйнування хромосомної ДНК і отриману суспензію піддавали дії ультразвуку. Розділення розчинної і нерозчинної фракцій протеїнів *E. coli* проводили центрифугуванням при 13200 g протягом 5 хв. Локалізацію рекомбінантного протеїну в клітині визначали розділенням в 12 % ДСН-ПААГ.

2.13 Виділення рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 з тілець включення

Рекомбінантні протеїни очищали за протоколом екстракції з бактеріальних тілець включення [55]. Клітини руйнували шляхом ультразвукового лізису за допомогою гомогенізатору Labsonic M (Sartotius, Німеччина). Використовували ультразвук із амплітудою 220 мкм та інтенсивністю 600 Вт/см^2 протягом 3 хв у розчині 10 мл 100 мМ Na_2HPO_4 у 10 мМ трис-HCl, 1% тритону X-100, 0,5 М NaCl, pH 8,0. Зразки зі

зруйнованими клітинами центрифугували при 2000 g протягом 15 хв, надосадову рідину зливали, а осад промивали двічі (шляхом ресуспендування) у 30 мл 100 мМ Na_2HPO_4, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0. Потім осад (що містив промиті бактеріальні тільця включення) розчиняли у 2,5 мл 8 М сечовини у 100 мМ Na_2HPO_4, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0. Залишки клітин, що не розчинилися, видаляли центрифугуванням протягом 20 хв при 8000 g.

2.14 Очищення рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 за допомогою метало-афінної хроматографії

Рекомбінантні протеїни коронавірусу SARS-CoV-2 продукувалися злитими з полігістидиновим тагом (маркерною послідовністю), що дозволило виділяти їх за допомогою методу метало-афінної хроматографії на сорбенті Ni^{2+}-NTA-агарозі (Sigma, США).

Всі маніпуляції, пов’язані з отриманням протеїнів із бактерій та їхньою очисткою, проводили у нативному буфері для Ni^{2+}-NTA агарози: 100 мМ Na_2HPO_4, 10 мМ Tris•Cl, 500 мМ NaCl, pH 8,0. Надосадову рідину після етапу виділення рекомбінантних протеїнів із зруйнованих клітин наносили на колонку із Ni^{2+}-NTA агарозою, врівноважену буфером для відмивання з 8 М сечовиною. Колонку промивали 15-ма об'ємами буфера для відмивання, що містив 8 М сечовину. Після цього колонку послідовно промивали чотирма об'ємами буфера з 6 М сечовиною, 4 М сечовиною, 2 М сечовиною і врешті 10-ма об’ємами буфера для відмивання без сечовини. Для того, щоб позбутися протеїнів, молекули яких не мають тагу, але містять чисельні гістидинові амінокислотні залишки, колонку промивали буфером для відмивання з концентрацією імідазолу 10 мМ. Цільові протеїни елюювали буфером для відмивання, що містив імідазол у кінцевій концентрації 410 мМ, після чого проводили діаліз у буфері PBS (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144% Na_2HPO_4, 0,024% KH_2PO_4, pH 7,4).

Для отримання препаративних кількостей рекомбінантних протеїнів використовували колонку 26/20 XK (GE Helthcare, США), в яку упаковували 20

мл Ni-NTA Superflow агарози (Qiagen, Нідерланди). Відповідні фракції елюції збирали та аналізували в 12 % ДСН-ПААГ. Чистоту протеїнів та вихід ренатурації визначали методом денситометрування електрофореграм.

2.15 Ренатурація рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2

Ренатурацію протеїну N проводили методом діалізу із використанням 1xPBS як ренатуруючого буферу. Ренатурацію інших рекомбінантних протеїнів проводили за допомогою методу поступового розведення [56]. Для забезпечення формування дисульфідних зв'язків у ренатуруючий буфер додавали глутатіон відновлений та глутатіон окиснений. Застосування 0,1 М L-аргініну та 0,2 % Твин 20 дозволило попередити агрегацію протеїнів та отримати необхідну їх кількість для проведення імунізації.

2.16 SDS-електрофорез у поліакриламідному гелі

Електрофоретичне розділення одержаних рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 проводили в поліакриламідному гелі з додецилсульфатом натрію за модифікованою методикою Schagger H. [57] з додаванням 0,1 М трицину до катодного буферного розчину. Протеїнові препарати в буфері для зразків (6 М сечовина, 4% ДСН, 5% β-меркаптоетанол, 20% гліцерин, бромфеноловий синій) були прогріті до 85° С 5 хв перед нанесенням. Розділення протеїнів проводили у поліакриламідному гелі з додаванням 10% додецил-сульфату натрію (SDS), при проведенні електрофорезу використовували анодний буфер (0,2 М Tris, pH 8,9) та катодний буфер (0,1 М трицин, 0,1 М Tris, 0,1% ДСН). Для ідентифікації протеїнів гель забарвлювали розчином кумасі блакитного G-250. Аналіз електрофореграм проводили за допомогою програмного забезпечення TotalLab TL120 (TotalLab Ltd, Великобританія). Використовували протеїнові маркери молекулярної маси Roti-Mark Tricolor (Carl Roth, Німеччина) і PageRuler (Thermo Fisher Scientific, США).

2.17 Вестерн-блот та хемілюмінесцентний аналіз

Вологе перенесення протеїнів із поліакриламідного гелю на нітроцелюлозну мембрану здійснювали у блоттері Bio-Rad. Нітроцелюлозна мембрана попередньо була витримана у буферному розчині для перенесення (25 мМ Tris, 0,1% додецилсульфату натрію, 20% метилового спирту, 192 мМ гліцину) протягом кількох хвилин. Після перенесення мембрану витримували у 5% розчині знежиреного молока у PBS протягом 2 год за температури 25°C. На наступному етапі нітроцелюлозну мембрану витримували у розчині 0,1% твінфосфатного буферу PBS-T (PBS з 0,04% Tween-20) з додаванням 1% знежиреного молока та відповідних антитіл кроля до фрагменту RBD протеїну коронавірусу протягом ночі при 4^0C. Надалі мембрану промивали розчином PBS-T тричі по 10 хв за кімнатної температури при інтенсивному струшуванні. Після цього мембрану інкубували у розчині кон'югованих з пероксидазою хрону вторинних антитіл проти імуноглобулінів G кроля (розведення 1:10000) у PBS-T із додаванням 1% сироваткового альбуміну бика (БСА).

Проявлення нітроцелюлозної мембрани здійснювали протягом кількох хвилин у розчині 100 мМ Tris-HCl, що містив 0,025% люмінолу, 0,003% кумарової кислоти та 0,035% H_2O_2, який вносили безпосередньо перед проявленням. Люмінесценцію фіксували на рентгенівській плівці протягом відповідних проміжків часу в залежності від інтенсивності сигналу. Після цього плівку почергово переносили у готові розчини для проявлення та фіксації. Для проведення повторного хемілюмінесцентного аналізу нітроцелюлозну мембрану двічі промивали розчином 0,2 М гліцину (pH 2.0) протягом 1 хв та залишали ще на 30 хв за 37^0C при інтенсивному струшуванні. Після цього мембрану двічі промивали розчином PBS-T та повторно блокували.

2.18 MALDI-TOF мас-спектрометрія

Протеїн для аналізу отримували шляхом вирізання смуги з форезного гелю (розміром приблизно 1 мм х 4 мм). Цей шматок гелю двічі відмивали від кумасі сумішшю, що містила 200 мМ водний розчин гідрокарбонату амонію та ацетонітрил у співвідношенні 1:1 (за об'ємом). Потім гель зневоднювали (в ацетонітрилі) та остаточно висушували (за допомогою Eppendorf Concentrator plus).

До висушенного гелю, що містив протеїн, додавали 10 мкл розчину ТСРК-модифікованого бичачого трипсину мас-спектрометричної чистоти (Applied Biosystems, США) та проводили трипсиноліз за 37^0С протягом 18 год. Далі додавали 50 мкл 0,1% водного розчину трифтороцтової кислоти (Sigma-Aldrich, США), проводили УЗД-опромінення для екстракції отриманих триптичних пептидів із гелю та концентрування отриманого розчину шляхом випаровування в концентраторі Eppendorf Concentrator plus до об'єму 5-10 мкл.

Отриманий розчин триптичних пептидів досліджували методом MALDI-TOF на спектрометрі Voyager DE PRO Serial No 6393 (Applied Biosystems, США) у режимі позитивних іонів у діапазоні мас МН+ від 500 до 6000 Да. Застосовували рефлекторний режим роботи часопролітного детектора мас-спектрометра з наведеною напругою 20 кВ. Було зроблено внутрішнє калібрування спектрів із використанням піків матриці (МН+ 666.0293) та автолізних пептидів трипсину (МН+ 2163.0566, 2273.1599). Н+-матричну іонізацію триптичних пептидів проводили з використанням α-ціано-4-гідроксицинамінової кислоти (CHCA) (Sigma, США) під дією лазерного опромінення. Концентрація CHCA у матричному реагенті становила 1 мг/мл, реактив розводили в розчині, що містив ацетонітрил (Sigma, США) та 0,1 % трифтороцтову кислоту у співвідношенні 1:1 за об'ємом. Із отриманого розчину триптичних пептидів відбирали на аналіз 0,8 мкл та змішували з 1 мкл розчину CHCA. Зразки наносили на предметну пластину, висушували та аналізували. Отримані мас-спектри обробляли

сервісною програмою Data Explorer 4.1 (Applied Biosystems, США). Вимірювали моноізотопні значення протонованих молекул, для одержання середнього значення використовували дані від 4 до 10 мас-спектрів.

Амінокислотну послідовність триптичних пептидів визначали, використовуючи онлайн-ресурс Peptide Mass Calculator [58].

2.19 Імунізація піддослідних тварин (мишей і щурів)

Лабораторних мишей (самиць лінії Balb/c віком 4 місяці та масою 20-28 г) утримували у віварії Інституту біохімії ім. О.В. Палладіна НАН України за стандартних умов щодо освітлення (12/12), температури (20-23° С) та вологості (30-35%) відповідно до «Стандартних правил по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)».

Для вивчення імуногенних властивостей одержаних рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 мишей імунізували тричі з інтервалом у 2 тижні такими антигенами: протеїном N, RBD-доменом протеїну S, злитим кон'югатом RBD–CRM197, сумішшю протеїну N і злитого кон'югату RBD–CRM197, а також контрольними антигенами CRM197 і гідроксидом алюмінію. Рекомбінантні протеїни вводили інтраперитонеально у дозі 20 мкг/тварину у суміші з ад'ювантом – гідроксидом алюмінію (100 мкл/тварину).

Після кожної імунізації на 10-й день у мишей відбирали зразки крові з хвостової вени та отримували сироватки крові. Для цього відібрану кров без актикоагулянтів інкубували протягом 2 год при 37 ºС, потім протягом ночі при 4 ºС та центрифугували протягом 30 хв при 1300g. Одержані сироватки зберігали в морозильній камері за температури -20°С і через 14 днів після останньої імунізації використовували для дослідження рівнів специфічних антитіл проти рекомбінантних антигенів коронавірусу SARS-CoV-2 за допомогою імуноензимного аналізу.

Лабораторних щурів (самців лінії Wistar віком 6 місяців і масою 220-250 г) утримували за стандартних умов щодо освітлення, температури та вологості в акредитованому віварії ДУ "Інститут фармакології та токсикології НАМН України" відповідно до «Стандартних правил по упорядкуванню, устаткуванню та утриманню експериментальних біологічних клінік (віваріїв)».

Для визначення впливу попередньої імунізації дифтерійним токсоїдом CRM197 на утворення антитіл проти RBD при імунізації злитим кон'югатом RBD–CRM197 щурів (3 групи по 10 особин) імунізували за наступною схемою: 1) щурам I та II групи вводили інтраперитонеально CRM197 (при першій імунізації в дозі 120 мкг/тварину та через 2 тижні при другій імунізації – в дозі 60 мкг/тварину) у суміші (1:1) з ад'ювантом – гідроксидом алюмінію; 2) через 8 місяців щурів імунізували двічі з інтервалом у 2 тижні рекомбінантними протеїнами SARS-CoV-2: щурам I групи вводили RBD (30 мкг/тварину), щурам II та III груп вводили RBD–CRM197 (90 мкг/тварину).

Зразки крові відібрали з венозного синусу ока. Для одержання сироваток кров із додаванням актикоагулянтів на основі силіцію інкубували протягом 2 год при 37 ºС, потім протягом ночі при 4 ºС та центрифугували протягом 30 хв, за 10 ºС при 1300 g. Рівень специфічних антитіл проти рекомбінантних протеїнів RBD, RBD–CRM197 та CRM197 у сироватках імунізованих щурів визначали методом непрямого імуноензимного аналізу через 14 днів після останньої імунізації.

2.20 Непрямий твердофазний імуноензимний аналіз (ELISA)

96-лункові полістиролові планшети використовували для сорбції рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 (протеїну N, RBD-домену протеїну S), злитого кон'югату RBD–CRM197, суміші протеїнів RBD і CRM197 а також контрольного антигену CRM197 у концентрації 3 мкг/мл, які вносили по 100 мкл у буфері PBS (0,8% NaCl, 0,02% KCl, 0,144%

Na_2HPO_4, 0,024% KH_2PO_4, pH 7,4) та інкубували протягом 2 год при 37 °C або протягом ночі при 4 °C. Після внесення рекомбінантних протеїнів вільні для сорбції сайти на планшеті блокували внесенням по 100 мкл 1% розчину знежиреного сухого молока в PBS протягом 1 год при 37 °C. На наступних етапах усі компоненти вносили у буферному розчині PBS-T (PBS з додаванням 0,04% Tween-20), планшети інкубували 1 год при 37 °C і тричі промивали їх лунки. Таким чином спочатку вносили первинні антитіла – розведені у PBS-T шляхом титрування (1:50-1:12800) сироватки крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами SARS-CoV-2, або сироватки крові людей (розведені 1:100 у PBS-T) різних діагностичних категорій (тих, що перехворіли на COVID19, вакцинованих проти COVID19 тощо); а потім після інкубації і промивання вносили вторинні антитіла (кон'югати антитіл кози проти імуноглобулінів миші класів IgM, IgG або проти імуноглобулінів людини з полімерною пероксидазою хрону (у розведенні 1:10 000 в PBS-T). Для виявлення пероксидазної мітки в лунки планшету додавали по 100 мкл розчину хромоген-субстрату, який містив 1 частину розчину 1 мг/мл 3,3',5,5'-тетраметилбензидину (TMB) в диметилсульфоксиді (DMSO), 9 частин 0,05 М цитратно-фосфатного буферного розчину (pH 5,0) та 0,007% H_2O_2. Планшети інкубували протягом 10-30 хв в темряві при 37 °C і для зупинки реакції додавали по 50 мкл в лунку 1N розчин H_2SO_4. Результати аналізу зчитували на мікропланшетному рідері BioTek ELx800 (BioTek Instruments, США) за довжини хвилі 450 нм (референтна довжина хвилі – 630 нм).

2.21 Визначення рівнів цитокінів і хемокінів у мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами коронавірусу SARS-CoV-2

Рівні цитокінів і хемокінів визначали за допомогою методу RT-PCR [59] з використанням праймерів до цитокінів миші: IL12b, IFN-gamma, IL-4 та iNOS, а також праймерів до хемокінів миші: GM-CSF (CSF2), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES) і CCl7 (MCP-3). Для

визначення рівнів цитокінів використовували клітини селезінки, а для визначення рівнів хемокінів – сироватки крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами SARS-CoV-2. ПЛР-ампліфікацію проводили на термоциклері 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, США).

Електрофорез ДНК-послідовностей проводили в 1% або 3% агарозному гелі в буферному розчині ТАЕ (0,4 М тріс ацетат (pH - 8.3), 0,01 М EDTA). Зразки розчиняли у 6X Loading Buffer (Thermo Scientific). Після закінчення розділення гелі забарвлювали в 0,005% розчині бромистого етидію протягом 5 хв та промивали дистильованою водою. Візуалізацію ДНК в гелі здійснювали за допомогою системи транс-ілюмінатор Vilber Lourmat TFX - 20.LM та пристрою для документації гелів "Vilber Lourmat" DP - 001.FDC (Vilber Lourmat, France).

2.22 Протокова цитофлуориметрія

Клітини лінії Vero знімали з поверхні пластикового планшету, інкубуючи у 2 мМ розчині двозаміщеної натрієвої солі ЕДТА в PBS при температурі 37°С впродовж 5 хв. За допомогою камери автоматичного лічильника клітин Countess FLII визначали кількість клітин у 1 мл отриманої суспензії та осаджували клітини шляхом центрифугування за 300 g впродовж 10 хв. Отриманий осад надалі ресуспендували у невеликому об’ємі 1% БСА та 0,02 % NaN_3 у PBS. Суспензію клітин вносили в пластикові пробірки по $0,5*10^6$ клітин і осаджували за 8000 g протягом 15 секунд.

Осад із живих клітин ресуспендували в 200 мкл 1% розчину БСА із 0,02% NaN_3 у PBS із додаванням відповідної концентрації флуоресцентних протеїнів eGFP-RBD (або eGFP як контролю) та інкубували при температурі 4°С впродовж 30 хв. У досліді з визначення ефектів нейтралізації біологічної активності RBD клітини забарвлювали протеїнами eGFP або eGFP-RBD (1,5 мкМ) у комбінації з сироватками імунізованих мишей (у розведенні 1:100 або 1:500 в 300 мкл 1% розчину БСА із 0,02% NaN_3) протягом 30 хв при 4°С. Після завершення інкубації для відмивання незв’язаних

флуорохромів клітини двічі промивали 1 мл 1% розчину БСА із 0,02% NaN_3 у PBS, осаджуючи клітини за 8000 g протягом 15 сек. Осад ресуспендували в 1 мл 1% БСА із 0,02% NaN_3 у PBS та переносили у пробірки для дослідження на проточному цитофлуориметрі.

Визначення інтенсивності флуоресценції клітин проводили за допомогою проточного цитофлуориметра DxFLEX (Beckman Coulter, США). Інтенсивність флуоресценції клітин знімали за каналом FL1. Результати зберігали у вигляді гістограм, що відображали кількості клітин із певним значенням логарифму інтенсивності флуоресценції у пробі та точкових графіків залежності структури клітин (параметр FS) від їх розміру (параметр SS). Для характеристики інтенсивності флуоресценції клітин використовували значення параметру Median (середнє значення інтенсивності флуоресценції клітин на основі гістограми розподілу клітин за флуоресценцією). Аналіз та обробку результатів проводили з використанням пакету спеціалізованих програм CytExpert для обробки даних протокового цитофлуориметра.

2.23 Випробування дослідного зразка вакцини проти COVID19 на тваринах

Випробування включали дослідження імуногенності, місцевої переносимості, а також гострої та хронічної токсичності, що проводили у відповідності до вимог регіонального Комітету з етики роботи з піддослідними тваринами та з дотриманням правил роботи з лабораторними тваринами, узгодженими з положеннями директиви Ради Європейського Союзу 86/609/ЕС «Про зближення законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей».

Тести проводили на мишах BALB/c віком 2-3 місяці, з початковою масою 22-24 г, які були розподілені на 4 дослідні групи: 1 – миші, яким вводили 200 мкг/тварину (10 мг/кг) злитого протеїну RBD–CRM197 у складі

дослідного зразка вакцини; 2 – миші, яким вводили 20 мкг/тварину (1 мг/кг) злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини; 3 – миші, яким вводили фізіологічний розчин (серія 1920721); 4 – миші, яким вводили буферний розчин (Tris-HCl).

Дослідження імуногенності проводили згідно з методиками, описаними у підрозділах 2.19 і 2.20. Доза злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини для імунізації становила 20 мкг/тварину (1 мг/кг). Дослідження місцевої переносимості проводили під час проведення випробувань на гостру і хронічну токсичність. Після інтраперітонеального введення різних доз злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини через 2 год і повторно через добу фіксували стан епільованої ділянки шкіри в місці ін'єкції.

Для випробувань на гостру токсичність мишам вводили інтраперитонеально дослідний зразок вакцини, що містив у об'ємі 0,2 мл різні дози злитого протеїну RBD–CRM197: 1 мг/кг (20 мкг/тварину), 10 мг/кг (200 мкг/тварину) і 27 мг/кг (550 мкг/тварину). Для дослідження хронічної токсичності тваринам вводили щодоби протягом 30 діб дозу 1 мг/кг (20 мкг/тварину) злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини, що відповідає очікуваній терапевтичній дозі. Для дослідження субхронічної токсичності тваринам вводили щодоби протягом 10 діб дозу 10 мг/кг (200 мкг/тварину) злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини, що перевищує очікувану терапевтичну дозу в 10 разів.

При дослідженні як гострої, так і хронічної токсичності оцінювали такі показники: 14-добова летальність (реєструвалась щоденно); клінічна картина: загальний стан тварин, поведінка, збудливість та спонтанна рухова активність; динаміка маси тіла; загальний неврологічний статус: стан м'язевої сили (хватальний рефлекс), м'язовий тонус, порушення пози тіла та координації рухів, стан дихання; стан вегетативних функцій: екзофтальмії, порушення дефекації та діурезу; макроскопічне дослідження внутрішніх органів при розтині евтаназованих тварин. Неперервне спостереження за

тваринами проводили протягом перших 8 год після введення препарату. В подальшому їх стан фіксували двічі на день протягом 14 днів. Патоморфологічні прояви токсичності визначали при автопсії в кінці експерименту при макроскопічному дослідженні внутрішніх органів тварин. Після декапітації тварин було проведено забір крові, внутрішні органи заморожено, сироватки крові використано для дослідження рівнів антитіл проти злитого протеїну RBD–CRM197 і рівнів хемокінів.

2.24 Статистична обробка отриманих результатів

Для обробки одержаних експериментальних даних використовували загальноприйняті статистичні методи. Нормальність розподілу даних у групах перевіряли за допомогою W-критерію Шапіро-Уілка. Кількісні показники були представлені на гістограмах у вигляді M ± SE, де M – середнє значення, а SE стандартна похибка середнього. Показники з вірогідністю помилки першого роду менше 5% ($p \leq 0,05$) вважалися статистично достовірними. Всі математичні розрахунки проведено за допомогою стандартних пакетів комп'ютерних програм. Для розрахунку та графічної презентації отриманих результатів використано комп'ютерні програми Microsoft Excel та Origin 9.0.

3 СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ КОНСТРУКЦІЙ НА ОСНОВІ ПЛАЗМІДНИХ ВЕКТОРІВ ДЛЯ ПРОКАРІОТИЧНОЇ ЕКСПРЕСІЇ, ЩО МІСТЯТЬ ГЕНИ ПРОТЕЇНІВ КОРОНАВІРУСУ SARS-COV-2 ТА ЇХ ЗЛИТИХ КОН'ЮГАТІВ З НОСІЄМ CRM197

3.1 Модифікація плазмідного вектору pET24a

Широке використання рекомбінантних протеїнів як в якості складових терапевтичних чи діагностичних засобів, так і для виконання дослідницьких завдань потребує ефективних та комерційно вигідних стратегій їх отримання. Використання афінних сорбентів вже стало традиційним методом для виділення та очистки протеїнів, тому наразі існує велика кількість експресійних векторів, що кодують необхідні тагові (маркерні) послідовності. Надалі для отримання чистого рекомбінантного протеїну рекомендується позбавлятися всіх допоміжних послідовностей за допомогою специфічних протеїназ. Так, при створенні нами генетичних конструкцій було вирішено ввести в плазмідний вектор *pET24a* послідовність, що кодує сайт щеплення ентерокіназою, що дозволить експресувати рекомбінантні протеїни з полігістидиновим тагом на С-кінці молекули і в подальшому відсікати його (рисунок 6).

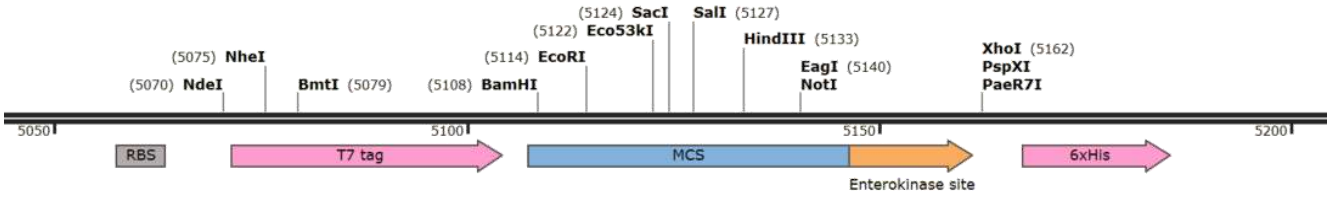

Рисунок 6 – Схема розміщення сайту щеплення ентерокіназою у мультиклонінг-сайті плазмідного вектору pET24a

Нами було отримано дві комплементарні олігонуклеотидні послідовності, які після відпалювання утворювали дволанцюгову ДНК з «липкими» кінцями для лігування за сайтами рестрикції NotI та XhoI. Вектор *pET24a* виділяли за допомогою лужного лізису та обробляли відповідними

рестрикційними ензимами. Надалі вектор та вставку об’єднували в єдину конструкцію за допомогою Т4 ДНК лігази та трансформували отриманою сумішшю ДНК клітини *E. coli* штаму DH10B. Наявність генетичної конструкції в клітинах бактерій перевіряли за допомогою ПЛР з використанням праймерів, комплементарних послідовності вектору з N-кінця та вбудованого сайту ендонуклеази з С-кінця (рисунок 7). Таким чином, нами було отримано модифікований вектор *pET24a-entero*, який буде зручно використовувати для отримання рекобінантних протеїнів без тагових послідовностей у прокаріотичній системі експресії.

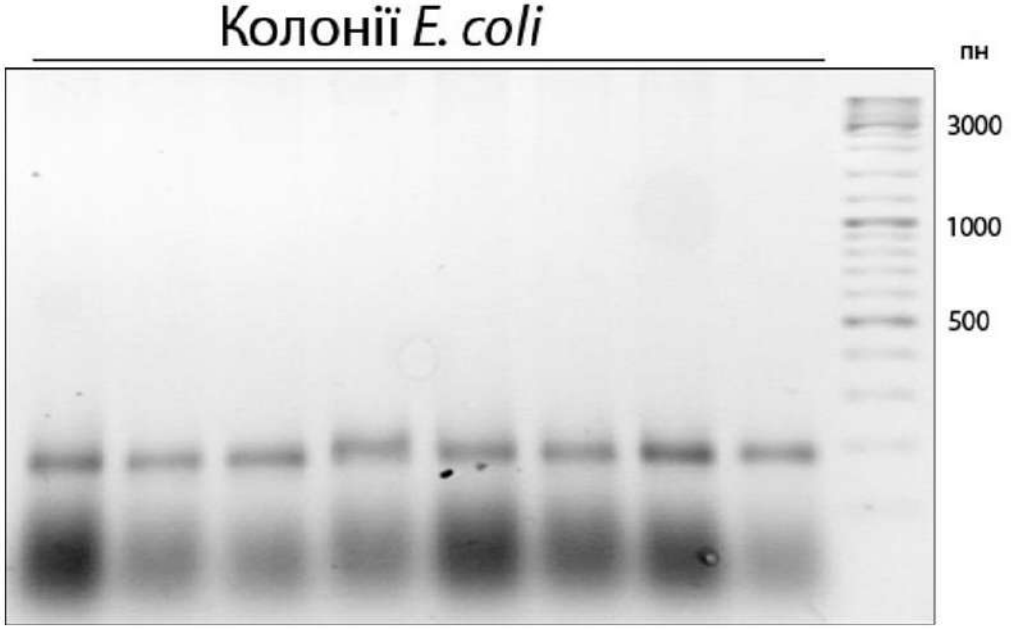

Рисунок 7 – Результати ПЛР аналізу ДНК бактерій *E. coli* DH10B, трансформованих генетичною конструкцією *pET24a-entero*

3.2 Створення генетичних конструкцій *pET24a-entero-S-protein(mut)* і *pET24a-entero-RBD-CRM197* із застосуванням ДНК-мутагенезу шляхом ПЛР-індукованого подовження ділянки перекривання

З літературних джерел відомо, що рецепторний (S) протеїн вірусу SARS-CoV-2 синтезується у вигляді прекурсору, в результаті протеолітичного розщеплення якого утворюється дві субодиниці S1 та S2, що залишається ковалентно з’єднаними та формують функціонально активний

протеїн. Протеолітичний сайт містить амінокислотну послідовність RRAR, що нагадує сайти щеплення фурином і підвищує здатність вірусу інфікувати клітини легень. Також було показано, що мутації в цій послідовності призводять до інгібування протеолізу S-протеїну [60]. Дієвим підходом для блокування розщеплення S-протеїну на субодиниці виявилась заміна позитивно-заряджених амінокислот у відповідному сайті (рисунок 8) [61].

```
SARS-CoV-2 spike (S)     675    QTQTNSPRRARSVASQSIIAY   695
                                ||||||| | ||||||||||
SARS-CoV-2 spike (S)     675    QTQTNSPQQAQSVASQSIIAY   695
                mutant
```

Рисунок 8 – Амінокислотні заміни у послідовності S-протеїну вірусу SARS-CoV-2, що призводять до блокування його розщеплення на субодиниці

Мутагенез ДНК було проведено за допомогою методу ПЛР-індукованого подовження ділянки перекривання, принцип якого схематично зображеного на рисунку 9. Внесення бажаних нуклеотидних замін було здійснено з використанням мутаційних праймерів (b та c). На першому етапі було отримано проміжні ПЛР продукти AB та CD, які є частинами повного продукту AD та містять комплементарні ділянки, що перекриваються. Продукти AB та CD використовували як матричну ДНК для проведення другої ПЛР з використанням фланкуючих праймерів a та d. Під час проходження ПЛР після стадії денатурації в результаті гібридизації ланцюгів кожного продукту в ділянці перекриття та подальшої ампліфікації було отримано продукт AD, що містив бажану мутацію і використовувався в реакції лігування з експресійним вектором.

Таким чином, нами було отримано мутовану послідовність гену S-протеїну, яка містила бажані нуклеотидні заміни між частинами, що кодують субодиниці S1 та S2. Ці модифікації в подальшому можуть бути корисними для подолання протеолітичного розщеплення при напрацюванні повнорозмірного рекомбінантного продукту в прокаріотичній чи

еукаріотичній системах експресії. Таким чином, з використанням мутантної форми потенційно ми зможемо більш точно оцінити імуногенні властивості S-протеїну.

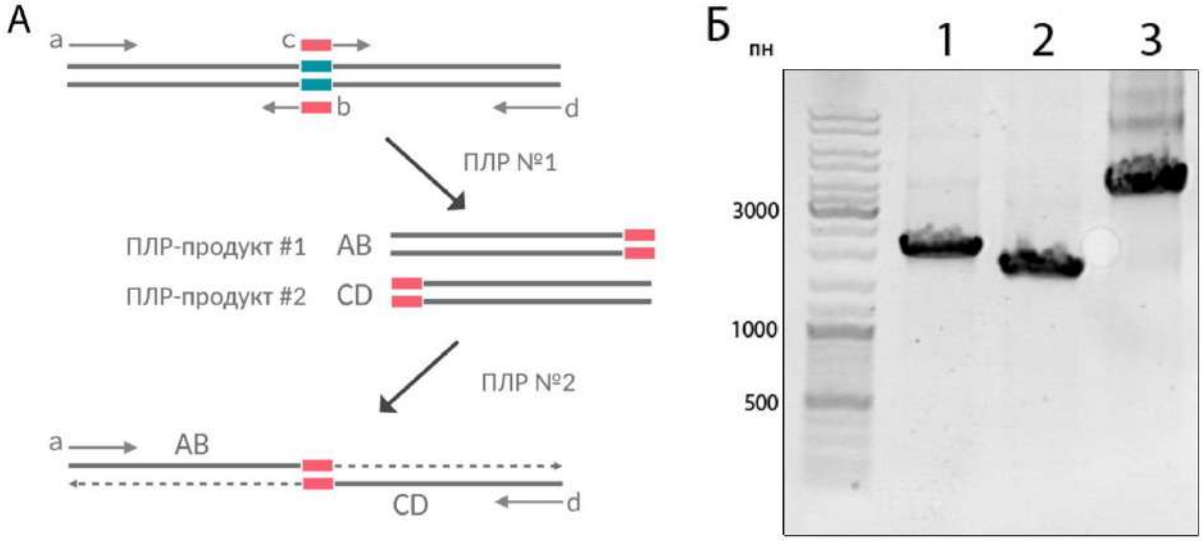

Рисунок 9 – Схематичне зображення методу ПЛР-індукованого подовження ділянки перекривання для внесення специфічних мутацій та створення химерних ДНК послідовностей [54]: Б – Електрофореграма ПЛР-продуктів, ампліфікованих на різних етапах створення мутованої форми S-протеїну, де доріжки 1 та 2 відповідають двом фрагментам, синтезованим на першому етапі, а доріжка 3 – фінальному продукту

Для створення іншого модифікованого протеїну коронавірусу, а саме рецептор-зв'язувального домену S-протеїну, об'єднаного в одній рамці зчитування з нетоксичним похідним ДТ CRM197, був також застосований підхід на основі ПЛР, що наведений вище. В цьому разі для першої ПЛР в якості мутаційних праймерів (на схемі b та c) використовувались праймери, що комплементарні ділянкам 3'-кінця RBD та 5'-кінця CRM197 та містили майбутню ділянку перекривання (рисунок 10 А). При проведенні другої ПЛР окремі фрагменти RBD та CRM197 об'єднувались в єдину нуклеотидну послідовність (рисунок 10 Б). Варто зазначити, що ділянка перекривання формувала лінкерну послідовність, яка є бажаною для просторового

розмежування окремих складових злитого протеїну та кращого забезпечення їх природної конформації.

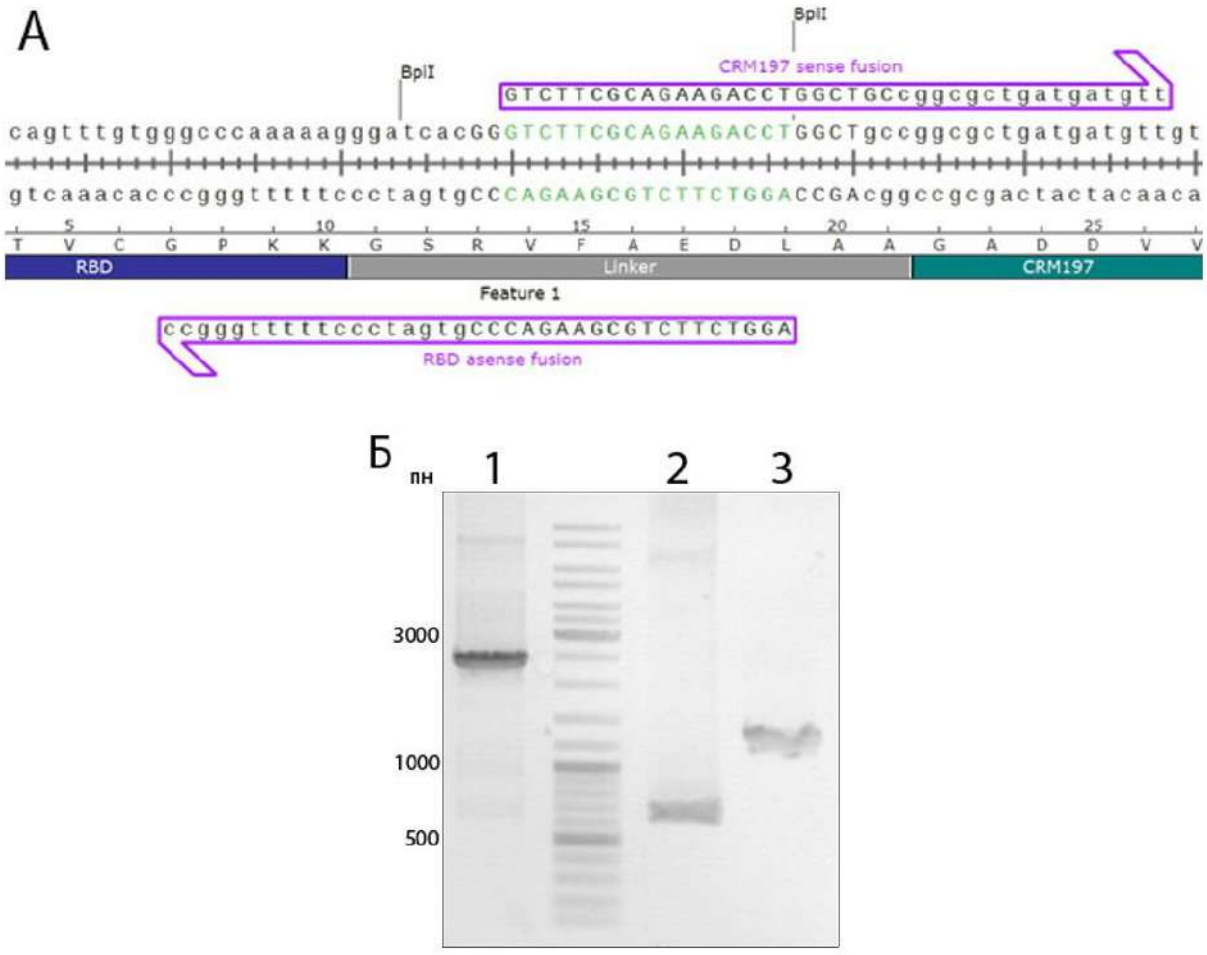

Рисунок 10 – А) Нуклеотидна послідовність місця об’єднання фрагментів злитого протеїну RBD-CRM197 з лінкерною послідовністю зі схематичним зображенням мутаційних праймерів. Б) електрофореграма ПЛР-продуктів двох етапів створення протеїну RBD-CRM197, де 1 – злитий протеїн RBD-CRM197, 2 та 3 – фрагменти злитого протеїну, що використовувались для його ампліфікації

3.3 Створення генетичних конструкцій на основі вектору *pET24a-entero*, що містили гени протеїнів вірусу SARS-CoV-2: N, S, Smut, RBD та кон’югату RBD з CRM197

Нуклеотидні послідовності генів, що кодують протеїн нуклеокапсиду (N), рецепторний S-протеїн та його мутовану форму, рецептор-зв’язувальний

домен S-протеїну окремо та у комбінації з CRM197, напрацьовували за допомогою ПЛР. Наявність та довжину ампліфікованих послідовностей аналізували за допомогою електофоретичного розділення ПЛР-продуктів в 1% агарозному гелі, результати якого наведені на рисунку 11.

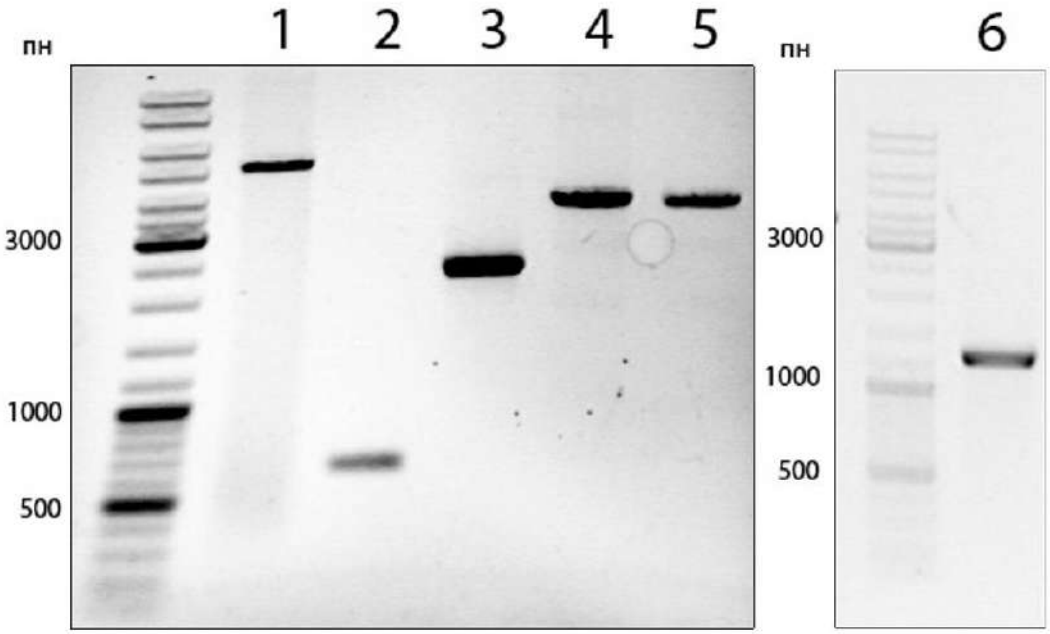

Рисунок 11 – Електофореграми вектору та ДНК-послідовностей протеїнів вірусу SARS-CoV-2, отриманих за допомогою ПЛР з використанням специфічних пар праймерів. 1 – оброблений ендонуклеазами рестрикції вектор *pET24a-entero*; 2 – RBD; 3 – RBD–CRM197; 4 – S-протеїн; 5 – мутована форма S-протеїну; 6 – N-протеїн

ДНК-послідовності майже всіх вставок (генів коронавірусу та їх кон'югату з носієм) містили сайти рестрикції NdeI та NotI на протилежних кінцях молекули, крім N-протеїну, у якого на 5'-кінці містився сайт NheI. ДНК-послідовності вставок та експресійний вектор *pET24a-entero* послідовно обробляли відповідними ендонуклеазами рестрикції та об'єднували в єдину генетичну конструкцію за «липкими» кінцями. Даний тип реакції лігування дозволив нам після проведення трансформації клітин *E.coli* штаму DH10B не перевіряти напрямок вставки генів вірусу SARS-CoV-2. З метою скринінгу отриманих колоній нами було проведено STAB-ПЛР для виявлення лише тих

колоній, які містили у своєму складі необхідні генетичні конструкції (рисунок 12).

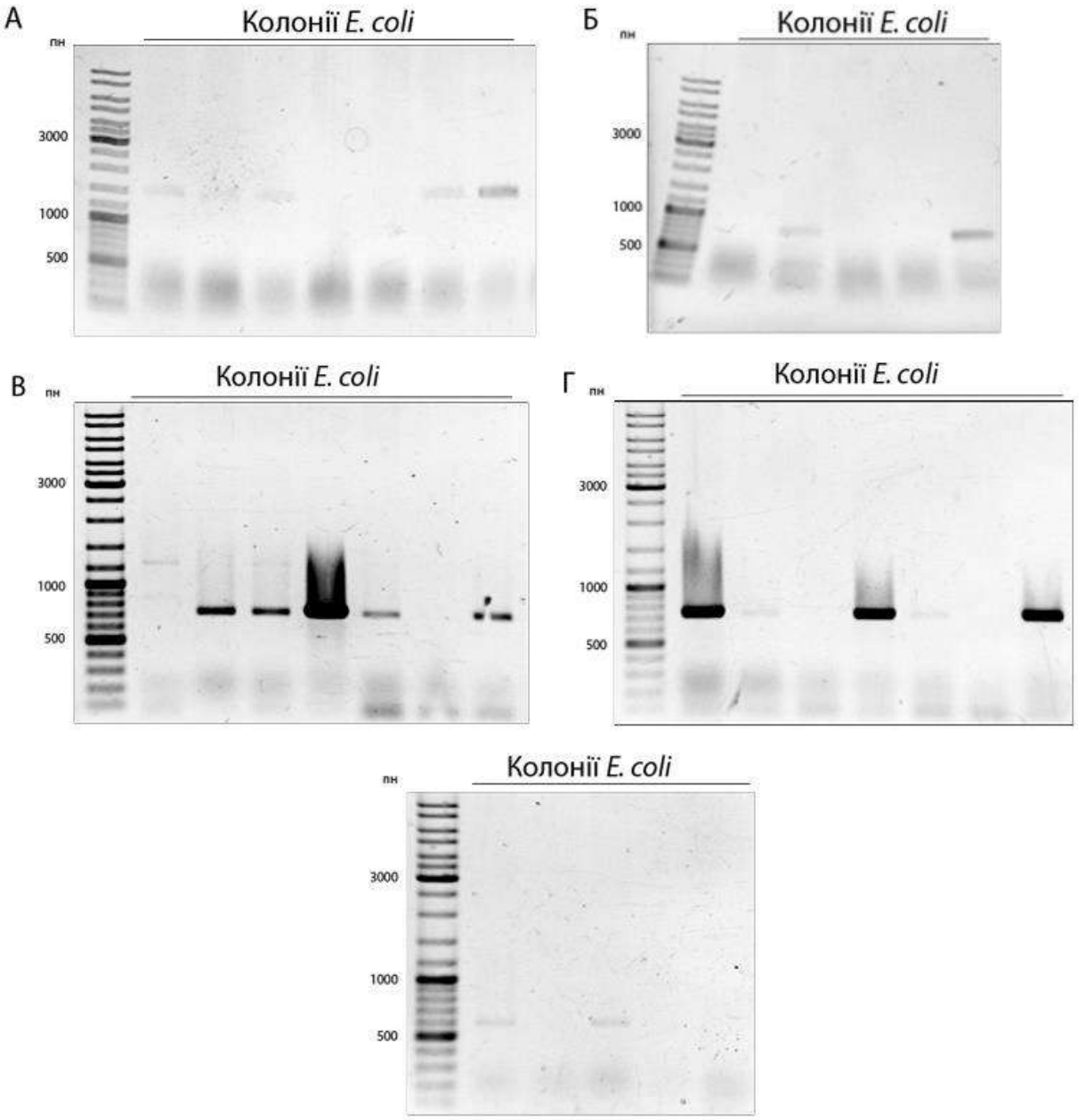

Рисунок 12 – Результати STAB-ПЛР ДНК колоній клітин *E.coli* штаму DH10B на наявність генетичних конструкцій А – *pET24a-entero-N-protein*, Б – *pET24a-entero-RBD*, В – *pET24a-entero-S-protein*, Г – *pET24a-entero-S-protein(mut)*, Д – *pET24a-entero-RBD-CRM197*

Адже, відсутність вставки гену у складі вектору може бути зумовлена неконтрольованими параметрами реакції лігування вставки та вектору та в результаті може призводити до появи колоній, які мають стійкість до

селективного антибіотику, проте, не несуть вставки гену протеїну, який необхідно клонувати. Для цього нами було використано пари праймерів, що були утворені з праймеру, комплементарному послідовності різних вставок у sence орієнтації, та праймеру, що фланкує полілінкерний сайт експресійного вектору в antisence напрямку. Такі пари дозволяють отримати ПЛР продукт, довжина якого вказує на наявність або відсутність вставки гену у складі вектору.

Таким чином, нами було одержано генетичні конструкції на основі плазмідного вектору pET24a для експресії протеїнів нуклеокапсиду (N), протеїну «шипа» (S) або його рецептор-зв'язувального домену (RBD) та його злитого кон'югату з носієм – дифтерійним токсоїдом CRM197 (рисунок 13).

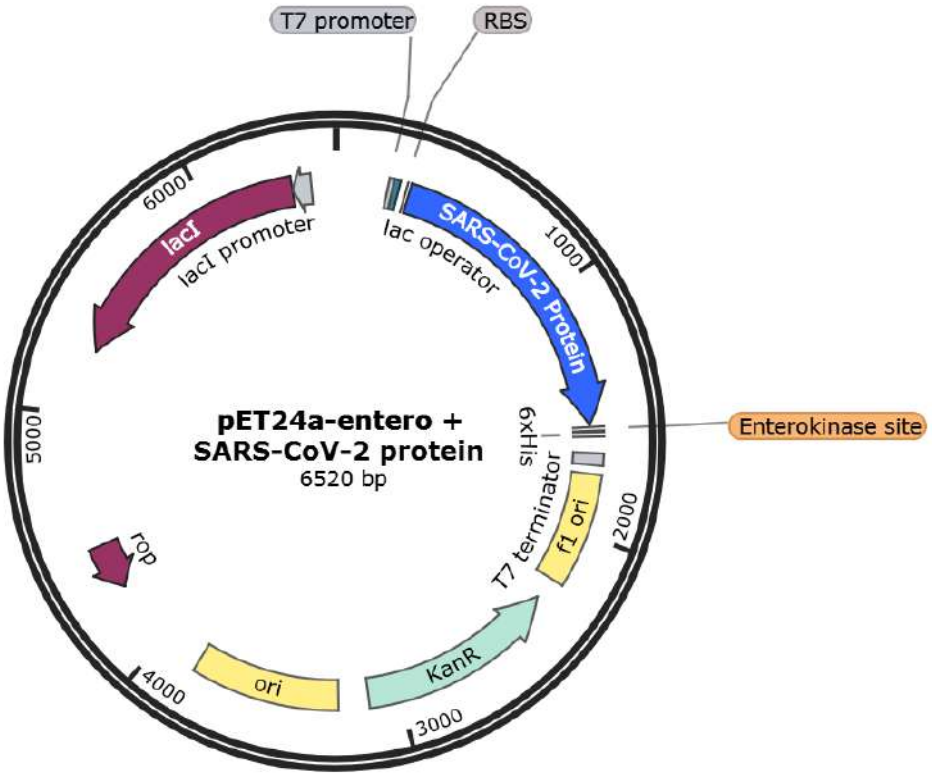

Рисунок 13 – Узагальнене схематичне зображення генетичних конструкцій на основі вектору *pET24(a)-entero,* що кодують різні протеїни вірусу SARS-CoV-2. Виконано з використанням програмного забезпечення SnapGene

Отже, створені нами генетичні конструкції мають ряд особливостей, які необхідні для забезпечення ефективної детекції та виділення цільового продукту.

1. Отримані білкові продукти міститимуть додаткову С-кінцеву нуклеотидну послідовність, що кодує гістидиновий таг (His-tag), який зручно використовувати для виділення протеїнового продукту за допомогою метало-афінної хроматографії.

2. У плазмідній конструкції між таговими послідовностями та послідовністю, яка кодує гени вірусу, наявний сайт розщеплення ентерокіназою. Наявність такого сайту дозволяє “відсікти” С-кінцеві додаткові послідовності та отримати протеїновий продукт без С-кінцевого тагу.

4 СТВОРЕННЯ ГЕНЕТИЧНИХ КОНСТРУКЦІЙ НА ОСНОВІ ПЛАЗМІДНИХ ВЕКТОРІВ ДЛЯ ЕУКАРІОТИЧНОЇ ЕКСПРЕСІЇ, ЩО МІСТЯТЬ ГЕНИ ПРОТЕЇНІВ КОРОНАВІРУСУ SARS-COV-2, ЇХ ЗЛИТИХ КОН'ЮГАТІВ З НОСІЄМ CRM197 АБО ЗЕЛЕНИМ ФЛУОРЕСЦЕНТНИМ ПРОТЕЇНОМ

4.1 Створення генетичних конструкцій на основі вектору pcDNA3, що містив гени протеїнів вірусу SARS-CoV-2: S, Smut, RBD, а також злитого кон'югату рецептор-зв'язуючого домену RBD протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 з дифтерійним токсоїдом CRM197

Рецепторний S-протеїн, як й інші гомологічні йому рецепторні протеїни коронавірусів SARS-CoV та MERS-CoV, що викликали попередні пандемії, характеризується високим рівнем глікозилювання. Глікани займають значну площу поверхні S-протеїну, що визначає кількість доступних сайтів для розпізнання антитілами [62]. Для забезпечення можливості посттрансляційних модифікацій, зокрема глікозилювання, та правильного фолдингу рекомбінантних аналогів протеїнів вважають доцільним використовувати еукаріотичну систему експресії, наприклад, експресію у клітинах ліній CHO або HEK293 [63]. Тому для одержання рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 було вирішено створити генетичні конструкції на основі плазмідного вектору pcDNA3, що містить всі необхідні регуляторні елементи для експресії протеїнів у клітинах еукаріот.

Нуклеотидні послідовності нормальної та мутованої форм S-протеїну, а також його рецептор-зв'язувального домену RBD, злитого з CRM197, ампліфікували за допомогою ПЛР, використовуючи як матрицю отримані генетичні конструкції на основі плазміди pET24a. Одержані ПЛР-продукти ідентифікували на електрофореграмі після розділення в 1% агарозному гелі. Плазмідний вектор *pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-8his* обробляли ендонуклеазою рестрикції BamHI з подальшим добудовуванням «липкого»

кінця фрагментом Кленова. Отримані нуклеотидні послідовності відповідно обробляли ендонуклеазою рестрикції NotI та фрагментом Кленова. Надалі вже лінійну форму вектору та всі вставки обробляли ендонуклеазою рестрикції NheI з подальшим лігуванням для утворення фінльних генетичних конструкцій (рисунок 14).

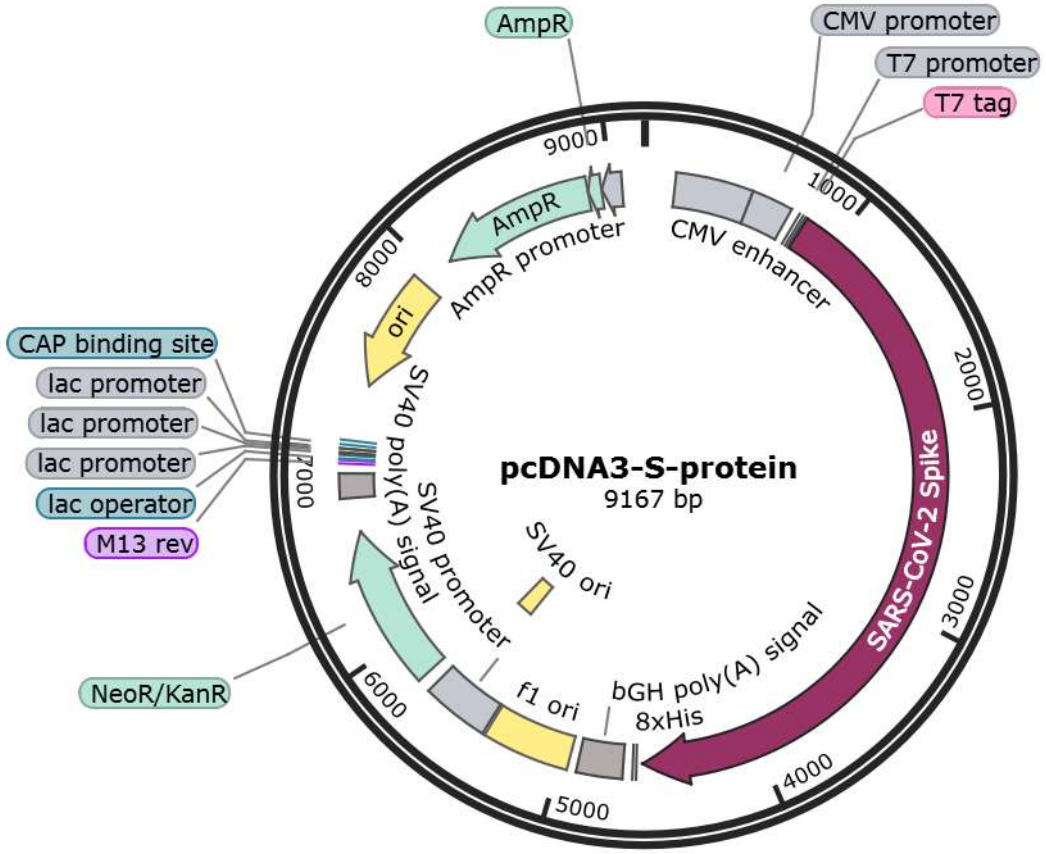

Рисунок 14 – Узагальнене схематичне зображення генетичних конструкцій на основі вектору *pcDNA3*, що кодують різні протеїни вірусу SARS-CoV-2. Виконано з використанням програмного забезпечення SnapGene

Відповідно до попередніх етапів роботи, клітини *E. coli* штаму DH10B трансформували створеними генетичними конструкціями та здійснювали пошук позитивних колоній бактерій за допомогою підходу STAB-ПЛР. Для ампліфікації фрагментів протеїнів вірусу SARS-CoV-2 використовували пари специфічних праймерів.

Схема побудови генетичної конструкції pcDNA3-Spike-RBD-CRM197 представлена на рисунку 15.

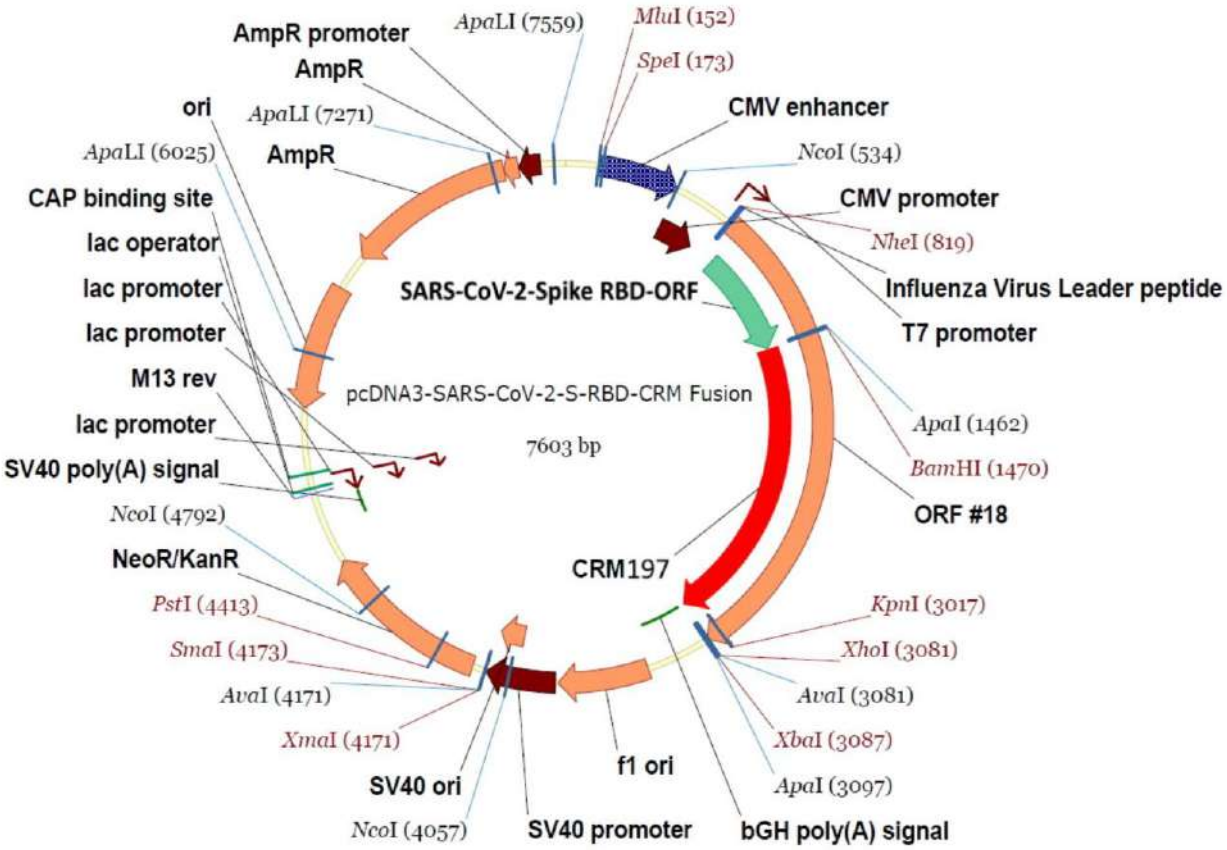

Рисунок 15 – Схема будови генетичної конструкції pcDNA3-Spike-RBD-CRM197

На першому етапі ген дифтерійного токсоїду CRM197 було вирізано з конструкції pET-CRM-6His, отриманої нами раніше, за допомогою пари ензимів BamHI та XhoI (рисунок 16).

На другому етапі ген дифтерійного токсоїду CRM197 вставили у плазмідний вектор pcDNA3-Spike-RBD, що містив ген рецептор-зв’язуючого домену RBD протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2. Наявність вставки гену CRM197 в структурі одержаної генетичної конструкції pcDNA3-Spike-RBD-CRM була підтверджена за допомогою рестрикційного аналізу (рисунок 17).

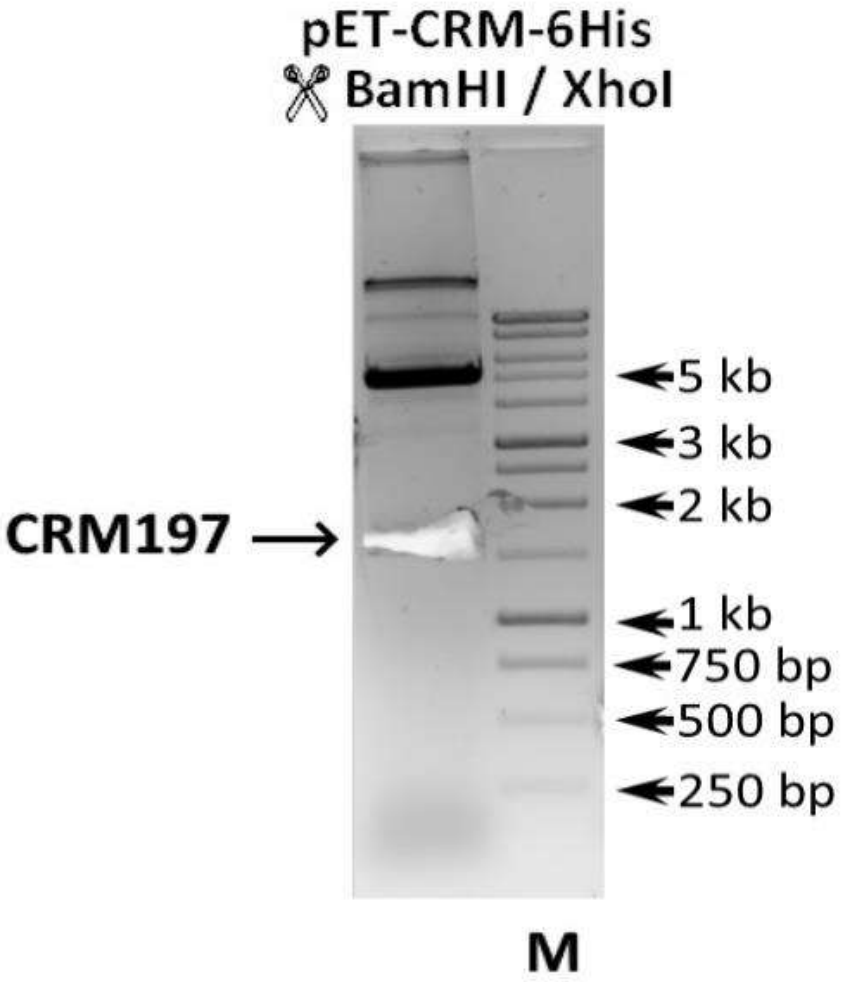

Рисунок 16 – ДНК-електрофореграма генетичної конструкції pET-CRM-6His після обробки рестриктазами BamHI та XhoI (вирізана в гелі смуга відповідає гену CRM197; М – ДНК-маркери)

Для остаточної перевірки генетичної конструкції pcDNA3-Spike-RBD-CRM її зразки (міні-препи) були просеквеновані за допомогою праймеру для секвенування, локалізованому в CMV-промоторі. Результати секвенування генетичної конструкції pcDNA3-Spike-RBD-CRM, що представлені на рисунку 18, повністю підтвердили правильність побудови одержаної конструкції.

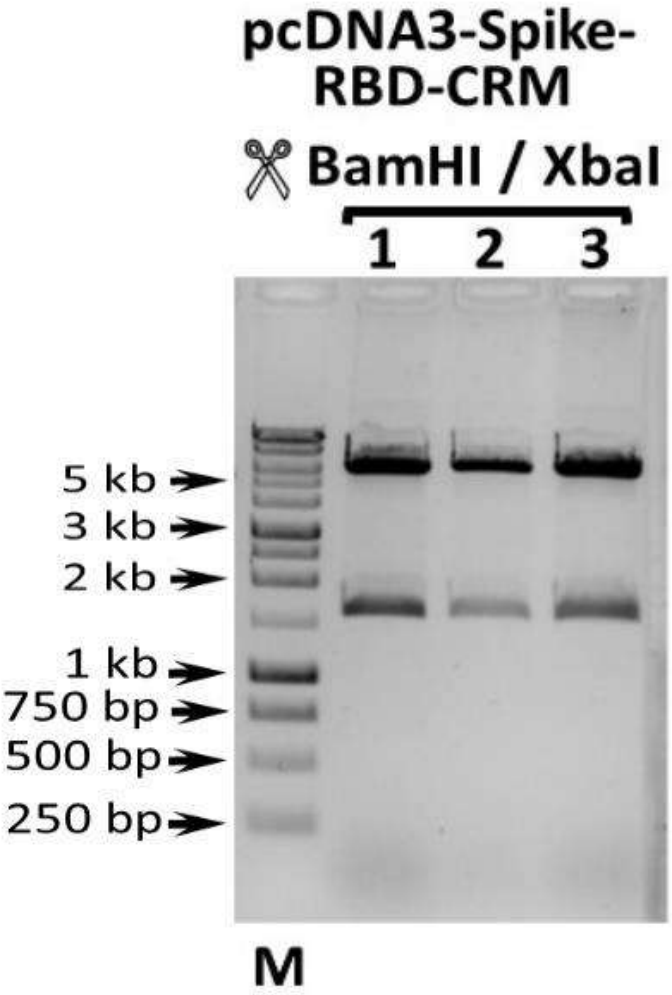

Рисунок 17 – Результати рестрикційного аналізу генетичної конструкції pcDNA3-Spike-RBD-CRM після обробки рестриктазами BamHI та XbaI (М – ДНК-маркери)

>CRM-CMV.ab1
CCCCGGTGTGGGCCAATTAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGAC
TCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCACCATGAAGACCATCATCGCCCTGAGCTACATCTTCTGCCTGGTGTTC
GCCACTAATCTTTGTCCGTTCGGTGAGGTTTTTAACGCGACAAGGTTCGCTAGTGTATATGCTTGGAACCGAAAGAGAAT
CTCCAATTGCGTAGCTGATTACTCCGTTCTCTATAACAGTGCGTCCTTTTCAACCTTTAAGTGTTACGGCGTTTCTCCAA
CGAAGCTGAATGATCTCTGTTTTACGAACGTGTATGCTGACTCTTTCGTTATACGGGGGGACGAAGTGAGACAGATAGCA
CCAGGTCAGACTGGGAAGATAGCGGATTACAACTATAAGTTGCCCGATGATTTTACGGGGTGCGTAATCGCATGGAACTC
AAACAACCTCGACTCCAAAGTAGGTGGTAATTATAATTACTTGTATCGCCTGTTTCGAAAGAGCAATTTGAAGCCTTTTG
AGCGGGATATTTCAACCGAAATTTACCAAGCAGGCAGTACGCCATGTAACGGAGTAGAGGGATTTAATTGCTACTTTCCT
CTTCAATCTTATGGCTTTCAACCAACAAACGGAGTGGGGTATCAACCTTATAGAGTGGTAGTATTGTCCTTTGAGCTCCT
CCACGCCCCGGCTACAGTTTGTGGGCCCAAAAAGGGATCCGGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTCCTAAATCTTTTGTGA
TGGAAAACTTTTCTTCGTACCACGGGACTAAACCTGGTTATGTAGATTCCATTCAAAAAGGTATACAAAAGCCAAAATCT
GGTACACAAGGGAAATTATGACGATGATTGGAAAAGAGTTTTATAGTACCGACATAAATACGACGCTGCGGGATACTCTG
TAGATATGAAAACCCGCTCTCTGGAAAGCTGGAGGCGGTGGTCAAGTGACGTATCCAGGACTGACGACGTCTCGCACTAA
AGTGGATATGCCGAACCTATAGATGAGTAGGTTAGTCTCACTGACGTGATGGAGCAGTCGGAACGAGAGTTTATCCAAGT
GCGTGATGTGCTTCGCGGGTATGGTCTAGCTCTGCCTGAGAGAGCCTTAGCGTTGAATAATTTAATACCTG

Рисунок 18 – Результати секвенування генетичної конструкції pcDNA3-Spike-RBD-CRM

Таким чином, на основі плазмідного вектору pcDNA3 нами було одержано генетичні конструкції для експресії різних рекомбінантних форм протеїну «шипа» (S) вірусу SARS-CoV-2, рецептор-зв'язувального домену (RBD) та його злитого кон'югату з носієм – дифтерійним токсоїдом CRM197. Всі ці протеїни мають на С-кінці полігістидиновий таг для їх очищення за допомогою металоафінної хроматографії.

4.2 Створення генетичної конструкції на основі вектору pEGFP-N1, що містив нуклеотидну послідовність кон'югату RBD протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 із зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP)

Для дослідження особливостей інтерналізації рецепторних молекул у комплексі з їх лігандами зручним підходом є створення протеїнів, злитих з репортерними флуоресцентними молекулами. Критичним фактором, на який слід звертати увагу, є можливість створити таку конструкцію, репортерні частини якої не будуть перешкоджати нормальному перебігу процесів синтезу, посттрансляційної модифікації та секреції.

Для створення генетичної конструкції, що кодує флуоресцентно-мічений рецептор-зв'язувальний домен рецепторного протеїну вірусу SARS-CoV-2 нами було обрано плазмідний вектор pEGFP-N1. Він дозволяє створити протеїн, злитий з зеленим флуоресцентним протеїном EGFP, в одній рамці зчитування для експресії в еукаріотичних клітинах *in vitro* (рисунок 19). Оскільки сайт мультиклонінгу розташований з N-кінця EGFP, при вбудовуванні у вектор сигнальна послідовність, що була нами додана у вектор *pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-8his* для адекватного синтезу та секреції RBD, зберіглася інтактною.

Як матриця для ампліфікації нуклеотидної послідовності RBD нами була використана плазміда *pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-8his*. Специфічні праймери, що використовувались для ампліфікації ДНК, містили на кінцях сайти щеплення ендонуклеазами рестрикції *NheI* та *NotI*. Після послідовної

обробки відповідними рестриктазами ПЛР-продукт та вектор були об'єднані в єдину конструкцію за «липкими» кінцями за допомогою Т4 ДНК лігази.

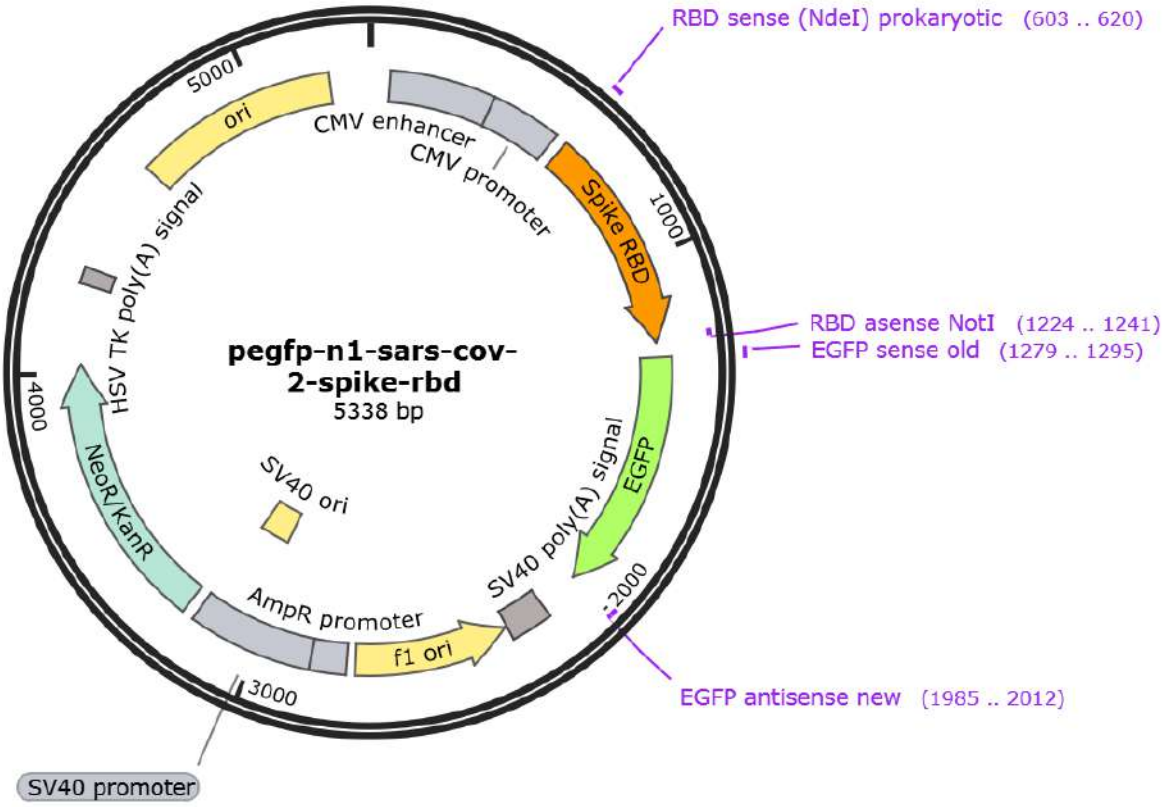

Рисунок 19 – Схематичне зображення генетичної конструкції на основі плазміди pEGFP-N1, що кодує RBD S-протеїну вірусу SARS-CoV-2, створене з використанням програмного забезпечення SnapGene

З метою створення бактерійного продуцента для зберігання та напрацювання цієї конструкції було проведено трансформацію клітин *E. coli* штаму DH10B. Аналіз ДНК отриманих колоній здійснювали за допомогою ПЛР з використанням праймерів, що фланкують послідовність RBD (рисунок 20). В результаті нами було одержано бактерійні продуценти генетичної конструкції pEGFP-N1-RBD.

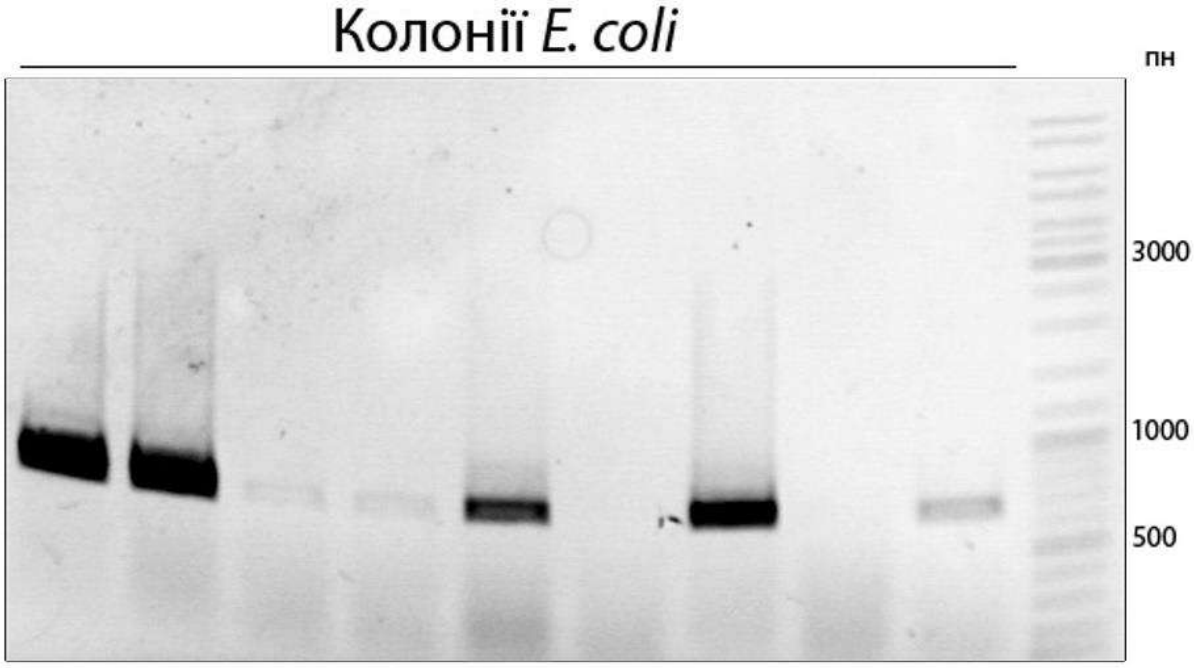

Рисунок 20 – Результати ПЛР аналізу ДНК бактерій *E. coli* DH10B, трансформованих генетичною конструкцією *pEGFP-N1-RBD*

4.3 Створення генетичних конструкцій на основі човникового вектору *pShuttle-CMV*, що містив гени коронавірусу SARS-CoV-2: протеїну S і його рецептор-зв'язуючого домену RBD

Ще однією з найбільш перспективних стратегій створення вакцин проти COVID19, окрім вакцин на основі рекомбінантних протеїнів, є стратегія створення вакцин на основі вірусних векторів, зокрема, на основі рекомбінантних аденовірусів, нездатних до самостійної реплікації. Такі штучно інактивовані аденовіруси одержують шляхом делеції E1a- та E3-регіонів (ΔE1a-ΔE3), внаслідок чого віруси втрачають здатність до самостійної реплікації і перетворюються на цілком безпечну ослаблену форму збудника. Раніше нами використовувались у дослідженнях рекомбінантні аденовіруси, створені за допомогою системи AdEasy на основі аденовірусу 5-го серотипу (Adv5) для гомологічної рекомбінації в бактерійних клітинах [64, 65].

Для збереження можливості використання одержаних нами кДНК повнорозмірного Spike-протеїну коронавірусу SARS-CoV-2 та його рецептор-зв'язуючого домену (RBD) при створенні вакцин проти COVID19 на основі аденовірусів, нездатних до реплікації, ми перенесли за допомогою молекулярного клонування кДНК цих антигенів SARS-CoV2 до човникового вектору pShuttle-CMV.

Для створення двох генетичних конструкцій на основі човникового вектора pShuttle-CMV, кожна з яких містила би відповідно кДНК повнорозмірного S-протеїну SARS-CoV-2 і кДНК RBD-домену S-протеїну SARS-CoV-2, було проведене: 1) виділення кДНК повнорозмірного S-протеїну SARS-CoV-2 за допомогою рестрикційних ферментів HindIII та AleI (Fermentas/Thermo-Fisher) з генетичної конструкції pCMV14-3xFLAG-Spike-FL; 2) виділення кДНК RBD-домену S-протеїну SARS-CoV-2 за допомогою пари рестрикційних ферментів NheI та XbaI з генетичної конструкції pcDNA3-Spike-RBD-8xHis. Після обробки рестрикційними ензимами зразок кожної з вихідних генетичних конструкцій було розділено у 1% агарозному гелі, виділено з гелю відповідні фрагменти кДНК разом з тагами та ліговано їх до плазмідного вектору pShuttle-CMV, лінеаризованого рестрикційними ферментами і виділеного із 1% агарозного гелю. Для створення першої генетичної конструкції, що містила кДНК повнорозмірного S-протеїну SARS-CoV-2, плазмідний вектор pShuttle-CMV було оброблено парою ензимів HindIII та EcoRV, а для створення другої генетичної конструкції, що містила кДНК RBD-домену S-протеїну SARS-CoV-2, плазмідний вектор pShuttle-CMV було оброблено рестриктазою XbaI та дефосфорильовано (рисунок 21).

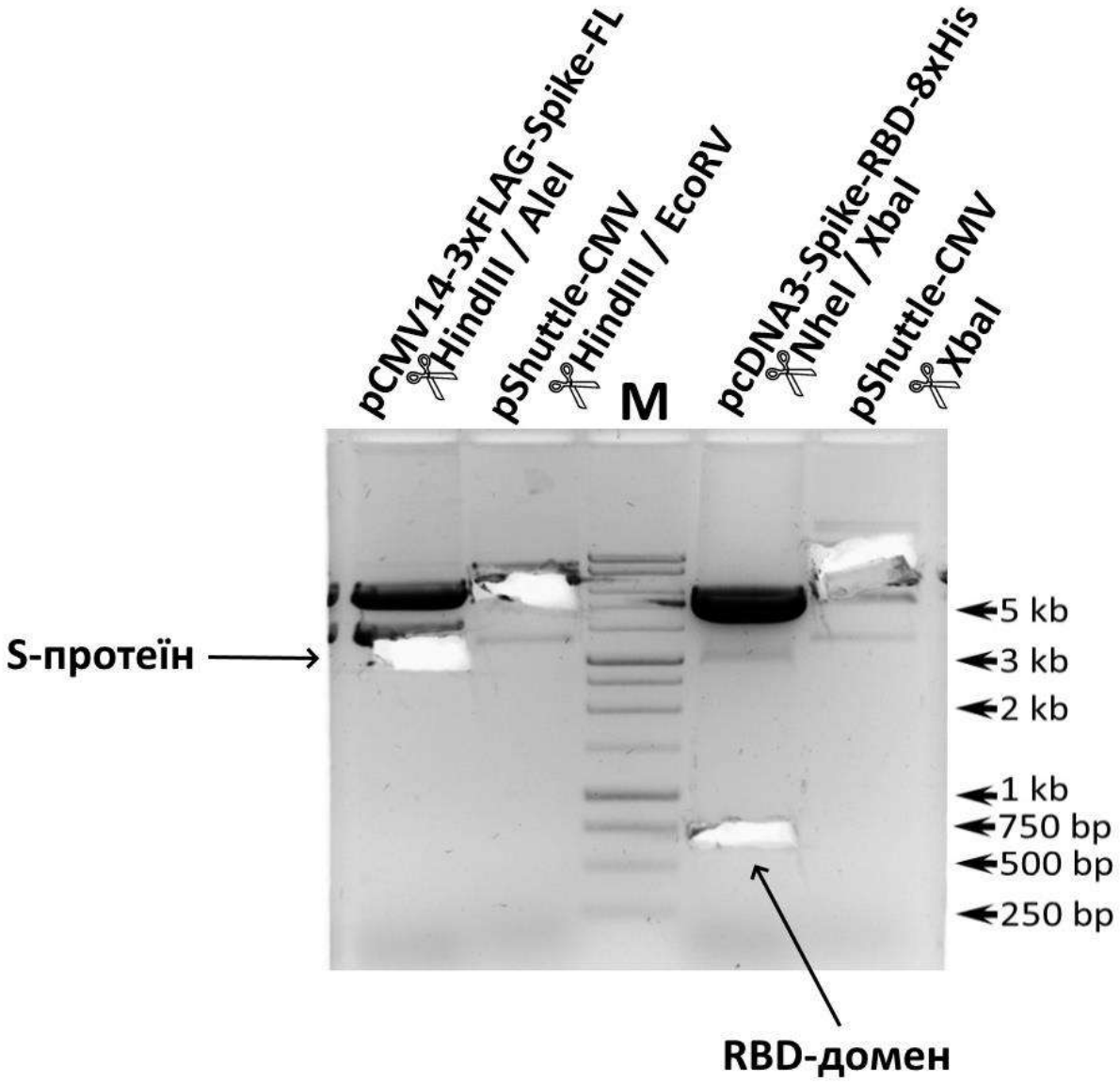

Рисунок 21 – ДНК-електрофореграма генетичних конструкцій pCMV14-3xFLAG-Spike-FL і pcDNA3-Spike-RBD-8xHis з вирізаними за допомогою специфічних рестриктаз відповідними вставками – кДНК протеїну S (3xFLAG-Spike-FL) і кДНК RBD-домену протеїну S (Spike-RBD-8xHis). M – ДНК-маркери

Правильність побудови генетичної конструкції pShuttle-CMV-3xFLAG-Spike-FL і наявність в ній вставки 3xFLAG-Spike-FL були підтверджені в усіх міні-препах за допомогою рестрикційного аналізу з використанням ензимів HindIII / EcoRI / BamHI (рисунок 22).

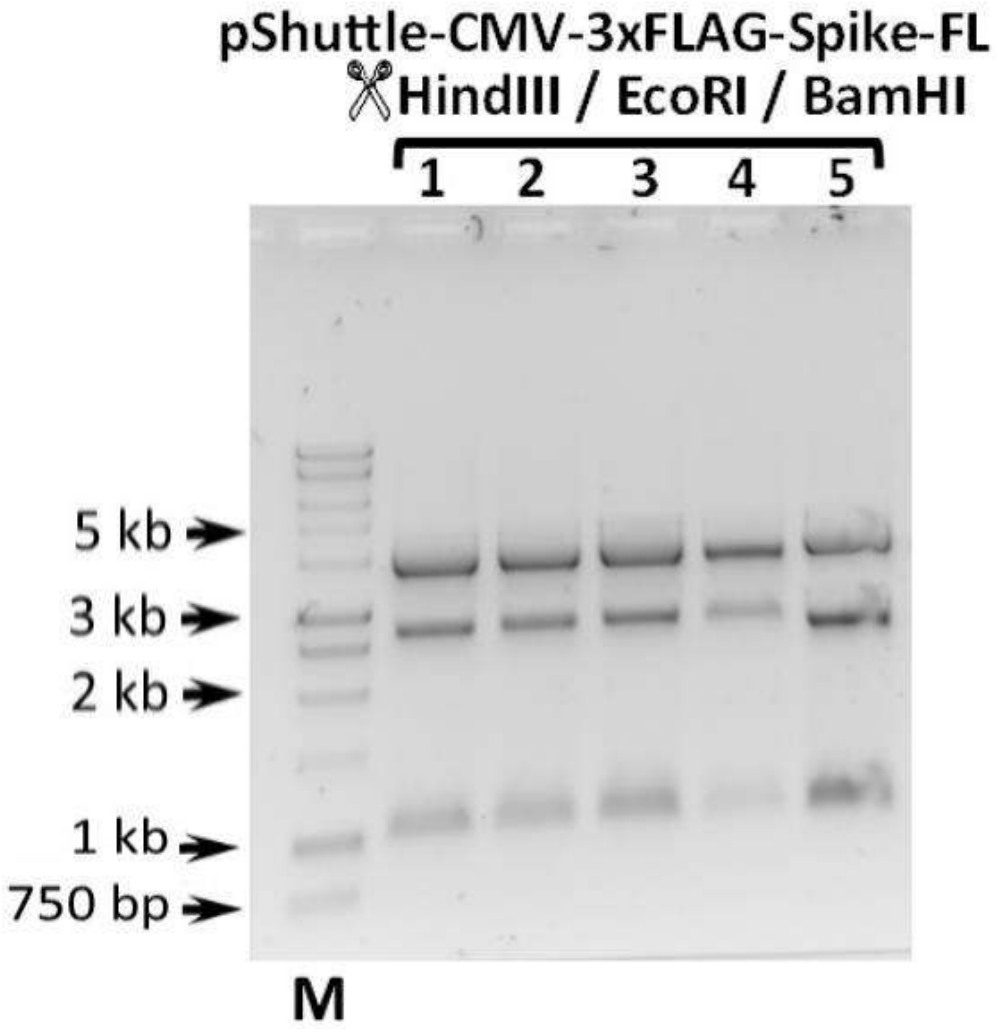

Рисунок 22 – Результати рестрикційного аналізу генетичної конструкцій pShuttle-CMV-3xFLAG-Spike-FL з використанням рестрикційних ензимів HindIII / EcoRI / BamHI. M – ДНК-маркери

Оскільки при створенні генетичної конструкції pShuttle-CMV-Spike-RBD-8xHis вставка Spike-RBD-8xHis могла вбудуватися в довільній орієнтації, то, відповідно, правильність орієнтації вставки перевіряли відразу двома способами: 1) за допомогою рестрикційного аналізу з використанням ензиму XhoI; 2) за допомогою рестрикційного аналізу з використанням пари ензимів HindIII / EcoRV. Як не дивно зі статистичної точки зору, у всіх міні-препах вставка виявились вбудованою у правильній орієнтації (рисунок 23).

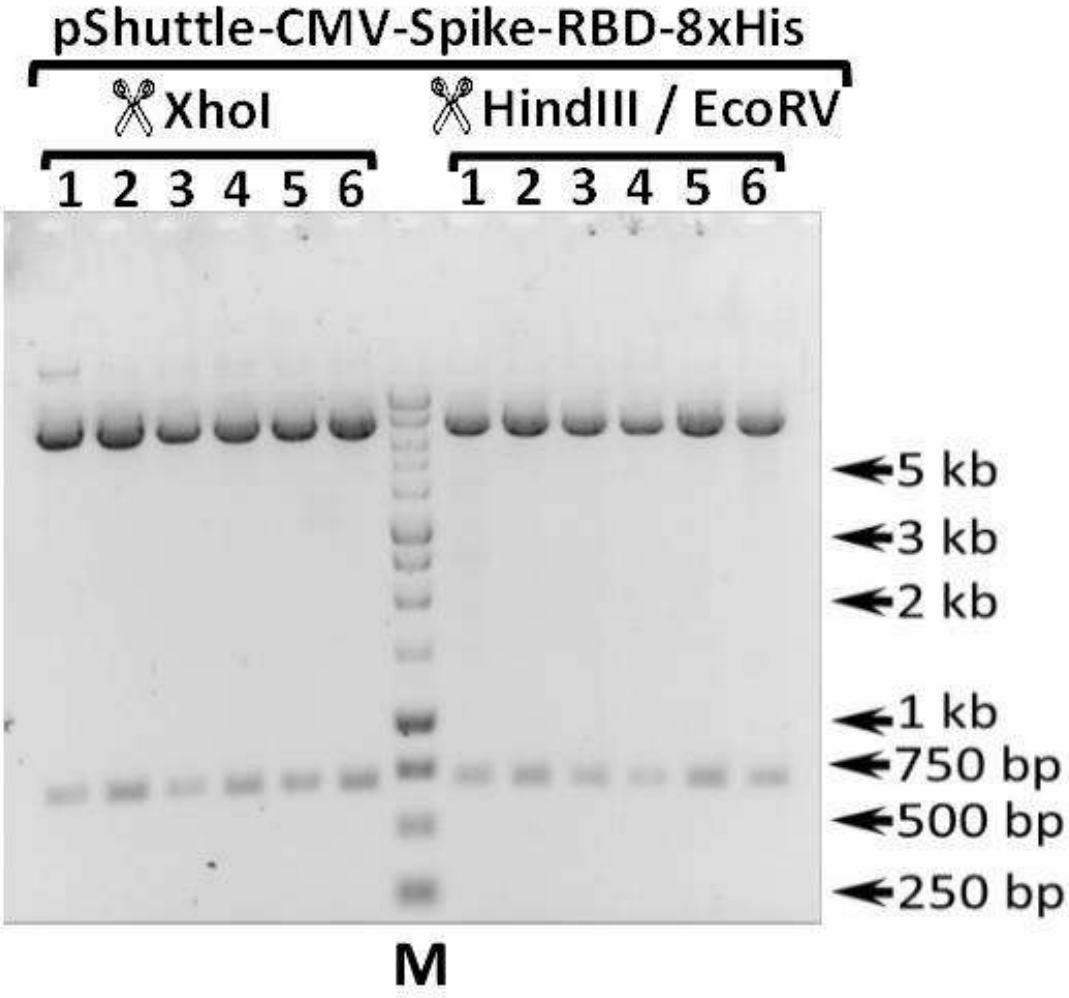

Рисунок 23 – Результати рестрикційного аналізу генетичної конструкцій pShuttle-CMV-Spike-RBD-8xHis з використанням рестрикційних ензимів XhoI, а також пари ензимів HindIII / EcoRV. М – ДНК-маркери

За допомогою рестрикційного ензиму PmeI з одержаних конструкцій pShuttle-CMV-3xFLAG-Spike-FL і pShuttle-CMV-Spike-RBD-8xHis були виділені фрагменти кДНК (рисунок 24) для гомологічної рекомбінації при створенні генетичних конструкцій на основі геному аденовірусу Adv5 – pAdv-CMV-Easy1-Spike-RBD-8xHis та pAdv-CMV-Easy1-3xFLAG-Spike-FL.

За допомогою гомологічної рекомбінації в клітинах BJ1586 човниковий вектор pShuttle був злитий із рештою ΔE1a-ΔE3 геному аденовірусу Adv5 у вигляді вектору Easy-1. Відібрані міні-препи були

підрощені та очищені за допомогою набору Hi-Speed midi prep Kit (Qiagen, Німеччина).

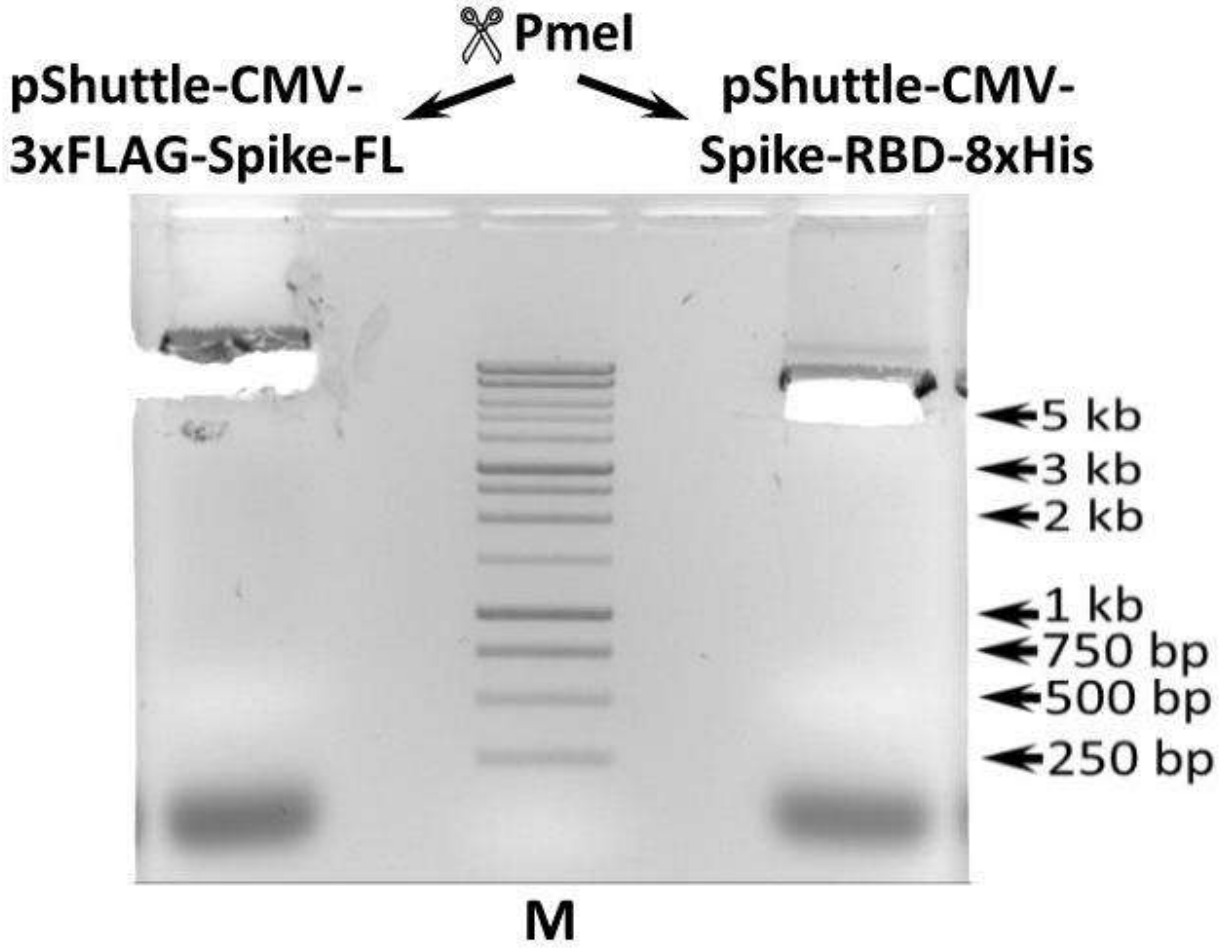

Рисунок 24 – ДНК-електрофореграма одержаних генетичних конструкцій pShuttle-CMV-3xFLAG-Spike-FL і pShuttle-CMV-Spike-RBD-8xHis після обробки рестрикційним ензимом PmeI

Для одержання первинного препарату рекомбінантного аденовірусу отримана космід (10 μг) була лінеаризована за допомогою рестрикційного ензиму PacI і трансфікована до клітин лінії HEK-293, які є так званою пакувальною лінією для рекомбінантних аденовірусів створених на основі Adv5. В подальшому первинний препарат рекомбінантного вірусу може бути розмножений у клітинах HEK-293 та очищений за допомогою класичного методу центрифугування в градієнті CsCl.

ВИСНОВКИ ЕТАПУ І
(РОЗДІЛИ 3-4)

1. Створено генетичні конструкції на основі плазмідних векторів для прокаріотичної та еукаріотичної експресії протеїнів, що містять гени протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2: протеїну нуклеокапсиду (N), протеїну «шипа» (S), його мутантної форми (Smut), рецептор-зв'язувального домену (RBD), злитого кон'югату RBD з носієм – дифтерійним токсоїдом CRM197, а також із зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP).

2. Дані секвенування та/або рестрикційного аналізу підтверджують правильність будови створених генетичних конструкцій.

3. У подальшому одержані генетичні конструкції можуть бути використані для створення прокаріотичних і еукаріотичних продуцентів рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 та їх кон'югатів, які дозволять безпечно, дешево і в необмеженій кількості одержувати антигенні субстанції для виробництва вакцини проти COVID19.

5 ОДЕРЖАННЯ І ОЧИЩЕННЯ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ SARS-COV-2 ТА ЇХ ЗЛИТИХ КОН'ЮГАТІВ

5.1 Структурно-функціональна характеристика протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2, рекомбінантні аналоги яких було одержано

5.1.1 Рецептор-зв'язуючий домен (RBD) S-протеїну коронавірусу SARS-CoV-2

Протеїн «шипа», або протеїн S (Spike) відповідає за взаємодію з рецептором на поверхні клітини-господаря та за входження вірусу в клітину-мішень. Він є гомотримером (рисунок 25), тобто утворюється трьома однаковими субодиницями (1273 амінокислотних залишки кожна), а кожна субодиниця має два домени — S1 (амінокислоти від 1 до 685) і S2 (амінокислоти від 686 до 1273).

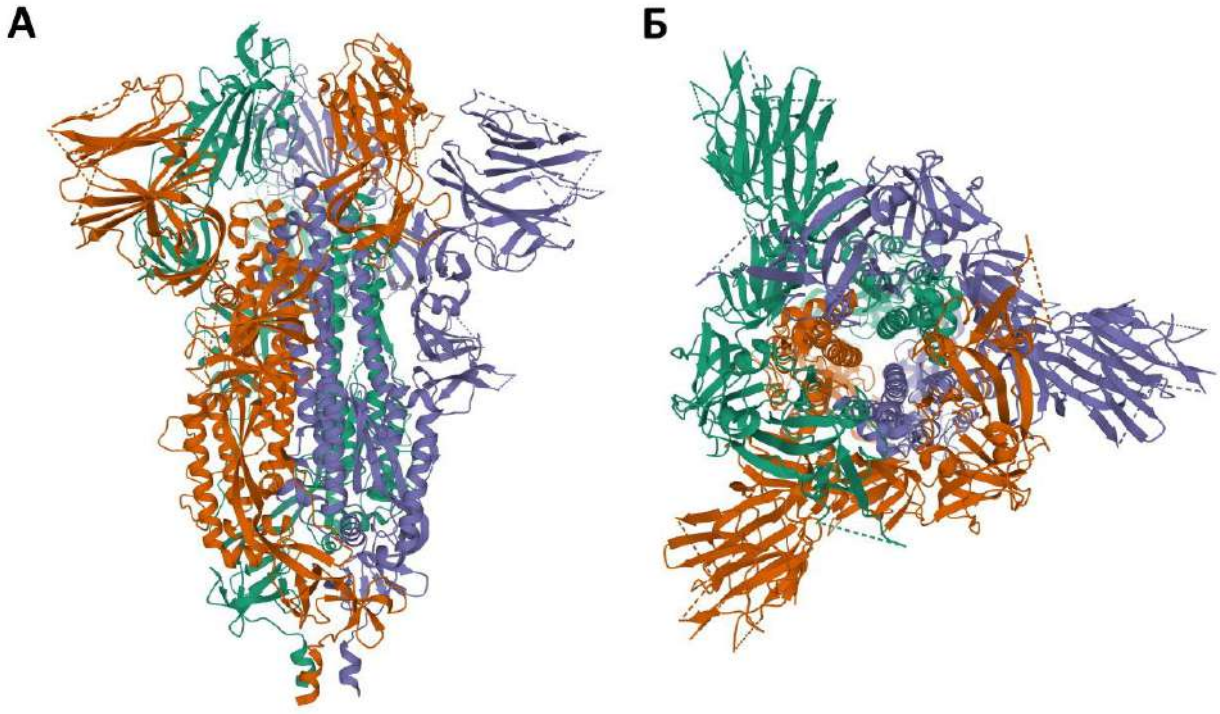

Рисунок 25 – Просторова структура тримеру протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 у закритій конформації: А – вигляд збоку; Б – вигляд зверху (на площину поверхні вірусу) [66].

Зовнішня частина субодиниці (з N-кінця) утворює зовнішній ектодомен (амінокислоти 1–1208), до якого з С-кінця прилягає трансмембранний «якір» та короткий С-кінцевий внутрішній «хвіст». Кожен S1-домен має один рецептор-зв'язувальний домен (RBD — амінокислоти від 319 до 541), який зв’язується з мембранним протеїном клітини — ангіотензин-перетворювальним ензимом 2 (ACE2), що є рецептором для проникнення вірусу всередину клітини [67].

Для того, щоб коронавірус проник у клітину, S-протеїн зазнає певних конформаційних змін: він переходить із закритої конформації «до злиття з мембраною» (коли всі три RBD-домени прилягають до тримерного ядра) у відкриту конформацію «після злиття» (коли один із трьох RBD-доменів піднятий угору) (рисунок 26).

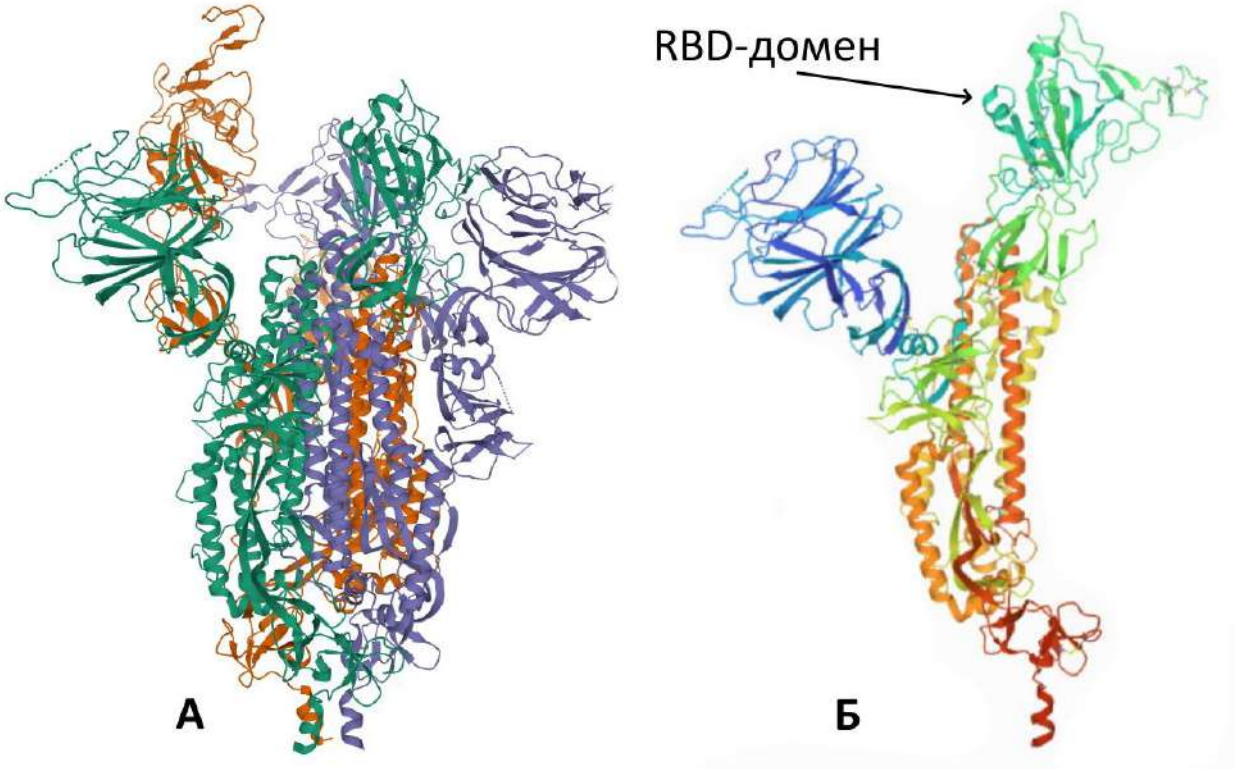

Рисунок 26 – Просторова структура протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2: А –тример протеїну S у відкритій конформації, при якій один ланцюг піднятий «угору» і не прилягає до тримерного ядра; Б – мономер протеїну S у конформації «угору» (стрілкою позначено рецептор-зв’язуючий домен) [68]

Для максимального імунної відповіді вакциновані люди повинні виробляти антитіла до S-протеїну, який знаходиться в конформації «до злиття з мембраною». В результаті зв'язування з клітинним рецептором ACE2 не відбувається, і вірус не проникає в клітину. Для цього були розроблені мутації, які фіксують S-протеїн SARS-CoV в конформації «до злиття з мембраною» [69], а також було створено стабілізовані «шипи» SARS-CoV-2, перспективні для розробки вакцини [70].

Але чи потрібно використовувати «шип» коронавірусу цілком? Друга стратегія полягає у створенні вакцини, яка містить тільки RBD-домен протеїну S, адже відомо, що RBD-домен (амінокислоти від 319 до 541 протеїну S), який зв'язується з мембранним рецептором ACE2 (рисунок 27), здатний викликати утворення нейтралізуючих антитіл, що перешкоджають проникненню вірусу в клітину.

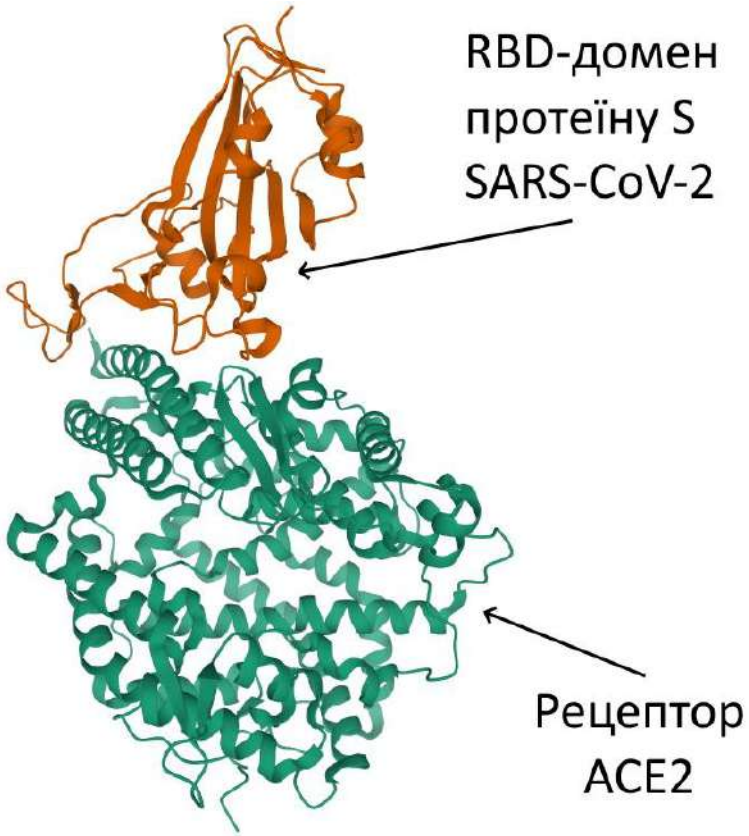

Рисунок 27 – Просторова структура рецептор-зв'язувального домену (RBD) протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2, що взаємодіє з клітинним рецептором ACE2 [71]

І хоча багато дослідників вважають протеїн S і його RBD-домен головними мішенями для розробки вакцин проти COVID19, існує ймовірність того, що імунна відповідь на ці антигени може сприяти розвитку антитілозалежного посилення інфекції (англ. Antibody-Dependent Enhancement, ADE) – явища, при якому зв'язування вірусу з субоптимальними нейтралізуючими або не нейтралізуючими антитілами сприяє його проникненню в імунні клітини організму і таким чином підсилює вірусну реплікацію. ADE може проявлятися в процесі розвитку первинної або вторинної вірусної інфекції, а також при інфікуванні після вакцинації.

Зазвичай фагоцитування комплексу вірус-антитіло супроводжується деградацією вірусу, але у випадку ADE, воно може, навпаки, сприяти реплікації вірусу та призводити до подальшої загибелі імунних клітин. Механізм ADE, який включає фагоцитоз імунних комплексів через рецептор FcγRII / CD32, вивчений краще, ніж механізм, що включає фагоцитування через рецептор комплементу.

Клітини, що експресують FcγRII / CD32 рецептор, представлені моноцитами, макрофагами, деякими категоріями дендритних клітин, В-клітинами і інш. Таким чином при зустрічі з інфекцією деякі вакцини, завдяки механізму ADE, замість захисту здатні провокувати більш важкий перебіг захворювання.

Оскільки явище ADE може значно ускладнити розробку противірусних вакцин, ми окрім RBD-домену протеїну S одержали також протеїн нуклеокапсиду коронавірусу SARS-CoV-2, або протеїн N.

5.1.2 Нуклеокапсидний N-протеїн коронавірусу SARS-CoV-2

Нуклеокапсидний N-протеїн є основним структурним компонентом віріону, він бере участь у реплікації коронавірусу, збиранні віріону та імунній регуляції, відіграє важливу роль у життєвому циклі вірусу. Передусім, N-протеїн захищає РНК коронавірусу, зберігаючи її в стійкому

стані всередині вірусної оболонки. Велика кількість N-протеїнів з'єднуються один з одним, утворюючи довгу спіраль, що намотується на РНК і обертає її (рисунок 28). За зв'язування N-протеїну з РНК відповідають його С-кінцевий і N-кінцевий домени (рисунок 29).

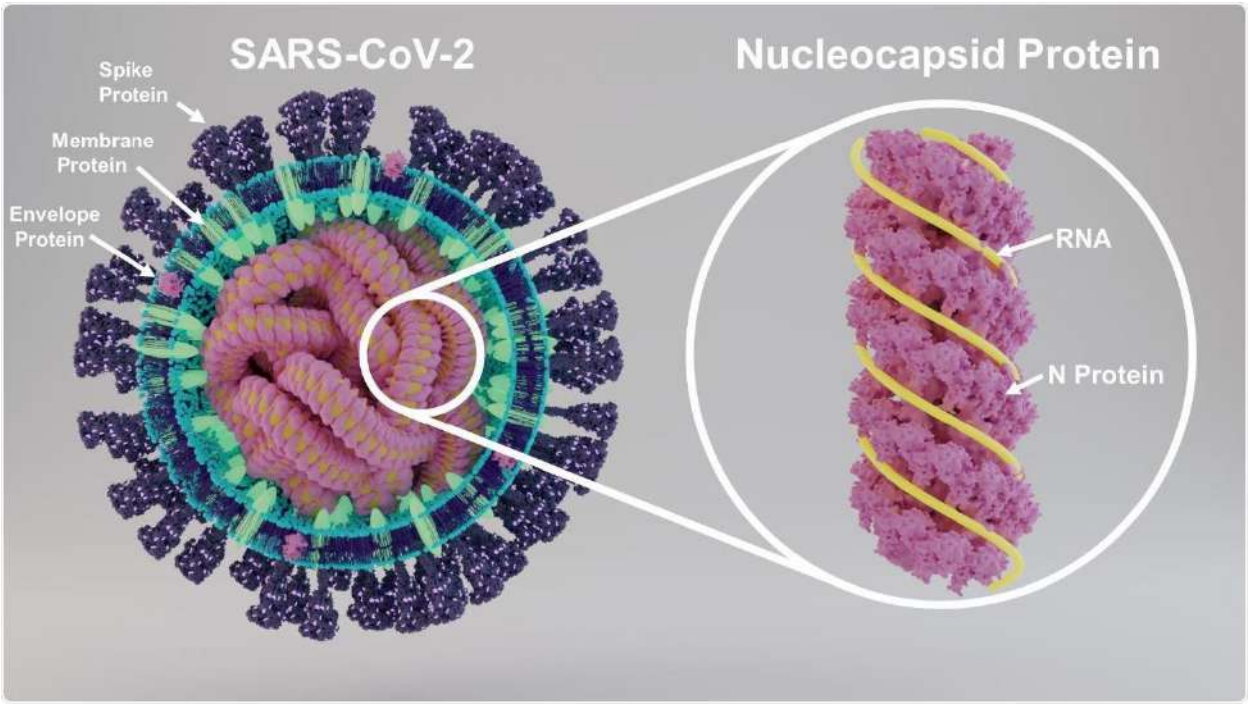

Рисунок 28 – Структура віріону коронавірусу SARS-CoV-2 та розташування нуклеокапсидного протеїну (N) в структурі вірусу (дивись виноску) [72]

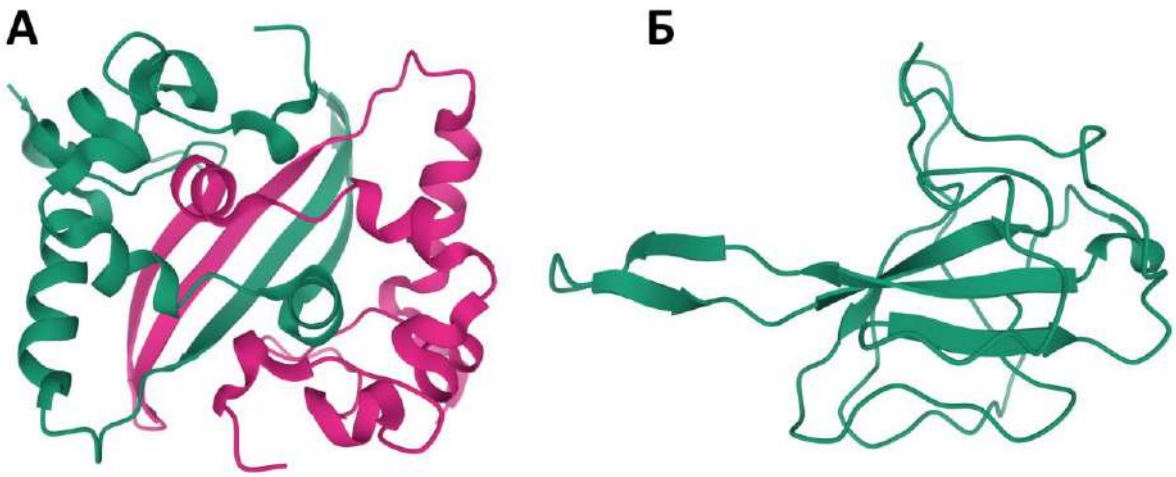

Рисунок 29 – Просторова структура кінцевих доменів протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2: А – С-кінцевий домен; Б – N-кінцевий домен [73]

Крім того, відомо, що N-протеїн здатний індукувати інтенсивну імунну відповідь, що також робить його перспективною мішенню для створення вакцини проти COVID19.

5.1.3 Злитий кон'югат RBD-домену з дифтерійним токсоїдом CRM197

Для підсилення імунної відповіді на RBD-домен протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 було вирішено використати високоімуногенний носій – протеїн CRM197, який є нетоксичним похідним дифтерійного токсину (ДТ) збудника дифтерії – *Corynebacterium diphtheriae*. CRM197 відрізняється від ДТ лише однією заміною в амінокислотній послідовності каталітичного домену (Gly52Glu) (рисунок 30) [74].

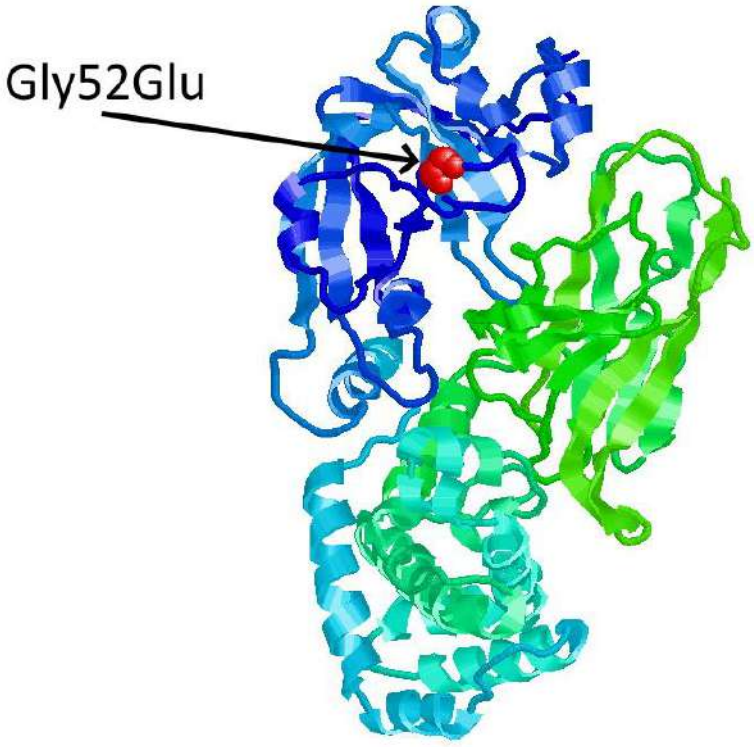

Рисунок 30 – Просторова структура високоімуногенного носія – нетоксичного дифтерійного токсоїду CRM197 (стрілкою показано амінокислотну заміну в активному центрі Gly52Glu) [75]

Внаслідок втрати каталітичної активності С-домену молекула CRM197, яка була отримана в результаті такої заміни, позбувається цитотоксичності.

Незважаючи на втрату токсичності, молекула CRM197 зберігає у незмінному вигляді усі структурні компоненти, притаманні молекулі ДТ, у тому числі структури, що відповідають за високу імуногенність.

CRM197 є офіційно дозволеним і широко вживаним носієм у складі багатьох кон'югованих вакцин, зокрема, вакцин проти менінгіту, пневмонії, гемофільної інфекції тощо. CRM197, як і субодиниця В ДТ (SbB) є нетоксичними протеїнами, здатними до транслокації в цитозоль клітини. Тому кон'югація вірусних антигенів з цими носіями з N-кінця дозволить транспортувати їх в цитозоль антиген-презентувальних клітин, і ефективно презентувати на поверхні з антигенами гістосумісності І класу, що є необхідною умовою для індукції цитотокисчних Т-лімфоцитів, які відіграють ключову роль у противірусному захисті. Крім того, наявність у людей імунітету до дифтерії також надає певні переваги: імунна відповідь на носій (CRM197 або SbB) буде розвиватися за вторинним типом, значно швидше і потужніше, навіть за умов одноразової імунізації. Це призведе до посилення імунної відповіді і на зв'язані з носієм протеїни коронавірусу. Тому очікувалось, що використання CRM197 як носія дозволило би значно підсилити імуногенність RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2.

5.1.4 Злитий кон'югат RBD-домену з підсиленим зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP)

Нами також було заплановано отримати злитий кон'югат RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 з підсиленим зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP – від англ. enhanced Green Fluorescent Protein). GFP являє собою протеїн, виділений з медузи *Aequorea victoria*, який флуоресціює в зеленому діапазоні при опроміненні його світлом від синього до ультрафіолетового діапазону. Цей протеїн широко використовується в клітинній та молекулярній біології як флуоресцентна мітка для вивчення експресії протеїнів. GFP має типову бета-складчасту структуру, яка формує «циліндр» з 11 поворотів первинної послідовності, всередині якого

знаходиться флуорофор (рисунок 31). Оболонка циліндра захищає флуорофор від гасіння його флуоресценції компонентами мікрооточення.

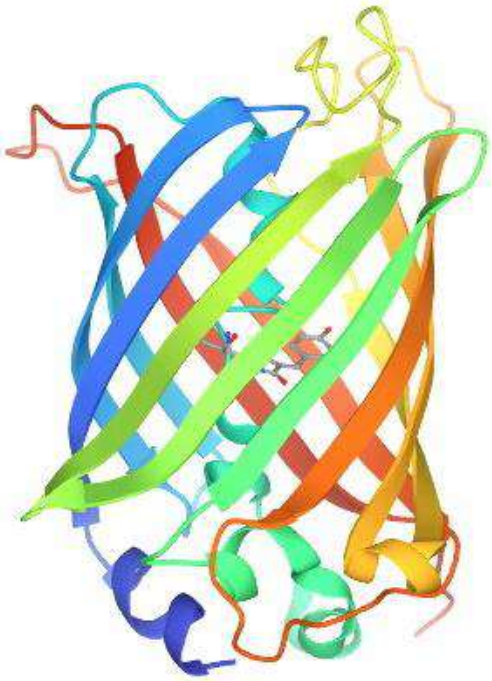

Рисунок 31 – Просторова структура підсиленого зеленого флуоресцентного протеїну (eGFP) [76]

В подальшому одержаний злитий кон’югат домену RBD протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 із eGFP може бути використаний для досліджень рівня експресії, механізму дії та можливих антагоністів ангіотензинперетворювального ферменту 2 (ACE2), що є мембранним протеїном клітини та рецептором для проникнення вірусу SARS-CoV-2 всередину клітини.

5.2 Методологія виділення і очищення рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та їх злитих кон'югатів

В результаті виконання І етапу проєкту у 2020 р. було створено генетичні конструкції на основі плазмідних векторів для прокаріотичної та еукаріотичної експресії протеїнів, що містять гени протеїнів коронавірусу

SARS-CoV-2: протеїну нуклеокапсиду (N), протеїну «шипа» (S), його мутантної форми (Smut), рецептор-зв'язувального домену (RBD), злитого кон'югату RBD з носієм – дифтерійним токсоїдом CRM197, а також із зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP). Слід відзначити, що кДНК мутантної форми протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 (Smut) і злитого кон'югату RBD з CRM197 були одержані із застосуванням ДНК-мутагенезу шляхом ПЛР-індукованого подовження ділянки перекривання.

Створені генетичні конструкції мали певні особливості, які забезпечили їх зручне одержання в бактеріях *E. coli* у необхідній кількості. Так, протеїнові продукти, отримані в результаті експресії генів, закодованих в цих генетичних конструкціях, містили додаткову С-кінцеву послідовність, що кодувала полігістидиновий таг – 6(8)xHis-tag (додаток А). Ця амінокислотна послідовність дозволила зручно виділяти рекомбінантні протеїни за допомогою метало-афінної хроматографії. Крім того, розташування тагу в кінці амінокислотної послідовності протеїнів дозволило одержувати в результаті очищення лише повнорозмірні молекули цільових протеїнів.

Генетичні конструкції для еукаріотичної експресії протеїнів, які містили гени протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2, описані в підрозділі 2.8. Основою для створення п'яти генетичних конструкцій для прокаріотичної експресії протеїнів, які містили гени протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2: N, S, Smut, RBD і злитого кон'югату RBD з CRM197, став плазмідний вектор *pET24entero*, який було одержано шляхом введення у плазміду *pET24(+)* сайту щеплення ентерокіназою. Це в подальшому дало можливість відрізати полігістидинові таги за допомогою ентерокінази з утворенням рекомбінантних аналогів природних протеїнів SARS-CoV-2, що не містять зайвих послідовностей.

Злиті кон'югати RBD–CRM197 та RBD–eGFP кодувалися нуклеотидною послідовністю, утвореною при злитті генів відповідних протеїнів через невелику лінкерну послідовність, яка забезпечувала збереження структурно-

функціональних властивостей складових частин. Ця лінкерна послідовність також містила сайт щеплення рестрикційною ендонуклеазою, що дозволило проводити її модифікацію та оптимізацію генетичних конструкцій. Така особливість виявилась корисною для одержання стабільних злитих протеїнів зі збереженням природної конформації їх окремих частин.

При експресії рекомбінантних протеїнів у клітинах бактерій-продуцентів цільові протеїни, як правило, виділялися у складі нерозчинної фракції у вигляді тілець включення. Оскільки в такій формі рекомбінантні протеїни є неактивними, їх функціональні властивості були відновлені шляхом проведення додаткових стадій рефолдингу під час очищення.

5.3 Одержання рекомбінантного протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2

Для отримання достатнього виходу протеїнового продукту бактеріальну культуру перед початком експресії нарощували до досягнення OD600 ≈ 0,5 – 0,6. Експресію протеїну проводили протягом 3 год в живильному середовищі LB з додаванням індуктора IPTG у концентрації 1 мМ. Надалі проводили очищення протеїну за допомогою метало-афінної хроматографії на Ni-NTA агарозі. Шляхом електрофоретичного розділення перевіряли чистоту отриманих протеїнів.

Як видно з електрофореграм, наведених на рисунках 32 і 33, фракції очищеного протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2 містили мінімальну кількість домішок та мали велику концентрацію цільового продукту. Основна смуга на електрофореграмі знаходиться на рівні ~ 48 кДа, що відповідає молекулярній масі N-протеїну [77], хоча і є дещо меншим за теоретично розраховану молекулярну масу (55 кДа) через наявність у складі протеїну N позитивно-заряджених залишків лізину і аргініну, які впливають на електрофоретичну рухливість. Відповідність амінокислотних послідовностей одержаного рекомбінантного протеїну та протеїну N

коронавірусу SARS-CoV-2 була підтверджена за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії (підрозділ 2.18).

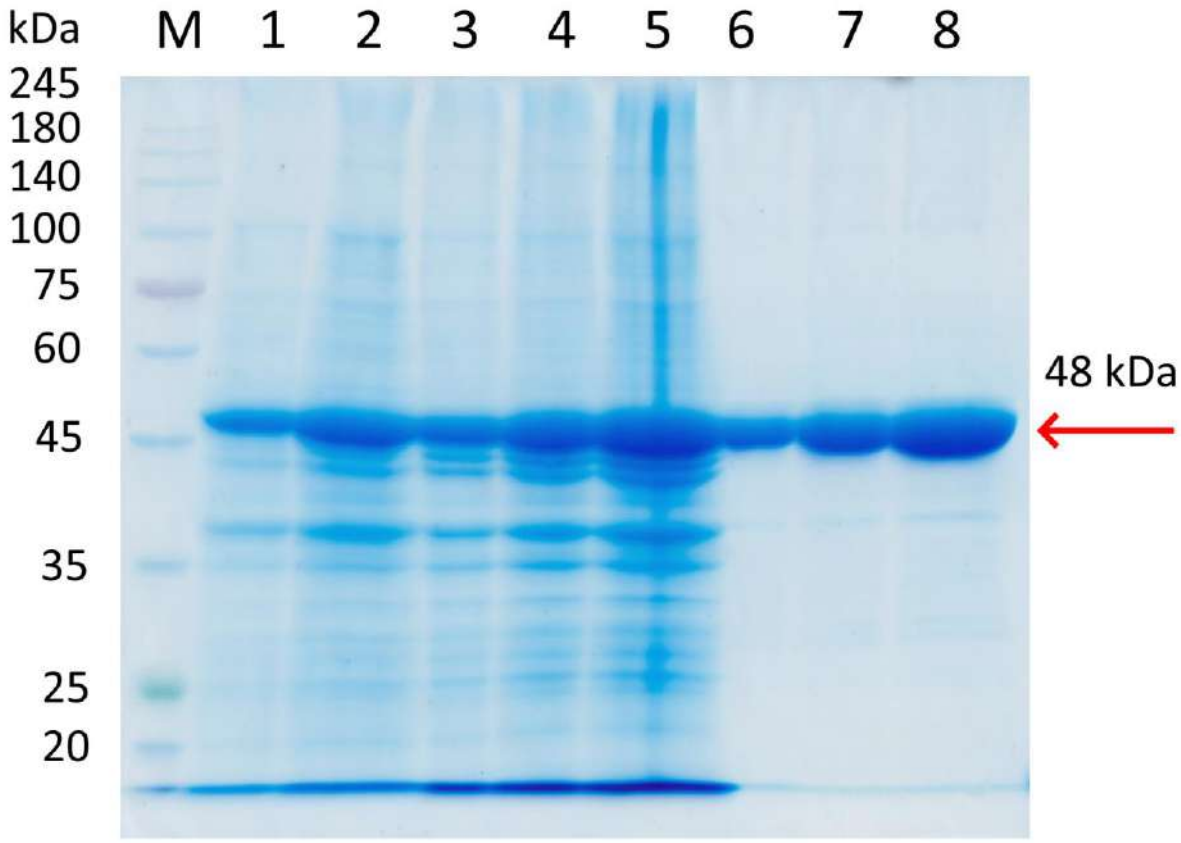

Рисунок 32 – Електрофореграма зразків рекомбінантного протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2 на різних етапах його виділення: 1-2 – індукція синтезу протеїну N в клітинах *E. coli* за протоколом аутоіндукції (об'єм зразків відповідно 5 мкл і 20 мкл); 3-5 – виділені тільця включення, що містять протеїн N (об'єм зразків відповідно 5 мкл, 10 мкл і 20 мкл); 6-8 – очищений протеїн N після діалізу (об'єм зразків відповідно 5 мкл, 10 мкл і 20 мкл); M – протеїнові маркери молекулярної маси Roti-Mark Tricolor (Carl Roth , Німеччина).

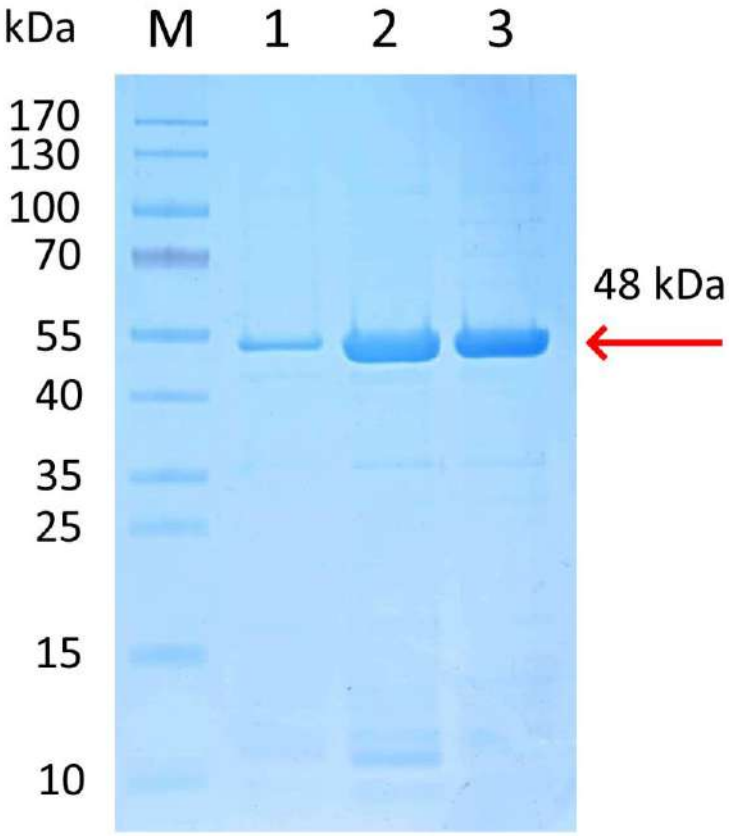

Рисунок 33 – Електрофореграма очищеного рекомбінантного протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2: 1-3 – різні фракції після очистки; M – протеїнові маркери молекулярної маси Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, США).

5.4 Одержання рекомбінантного протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2

Для отримання протеїну S коронавірусу використовували клітини *E. coli* штаму Rosetta (DE3), трансформовані генетичною конструкцією *pET24a-entero-S-protein*. Аналітичне напрацювання цільового протеїну здійснювали за стандартним протоколом з використанням IPTG як індуктору експресії. Надалі протеїн S виділяли з тотальної фракції за допомогою афінного сорбенту Ni-NTA агарози з проведенням рефолдингу у градієнті імідазолу. Чистоту отриманого протеїну перевіряли шляхом електрофоретичного розділення.

Результати електрофоретичного розділення, представлені на рисунку 34, свідчать, що нам не вдалось отримати повнорозмірний протеїн S коронавірусу, оскільки смуга, що відповідає очікуваній молекулярній масі протеїну S – 140 кДа відсутня і в зразках очищених фракцій, і в зразках фракцій тотального бактерійного лізату після індукції.

З метою підтвердження наявності в лізаті бактеріальних клітин фрагментів протеїну S нами було проведено хемілюмінесцентний вестерн-блот-аналіз із використанням поліклональних антитіл кроля до RBD-домену протеїну S. Результати вестерн-блот-аналізу (рисунок 35) підтвердили наявність декількох цільових продуктів з різними молекулярними масами у лізатах бактерій-продуцентів.

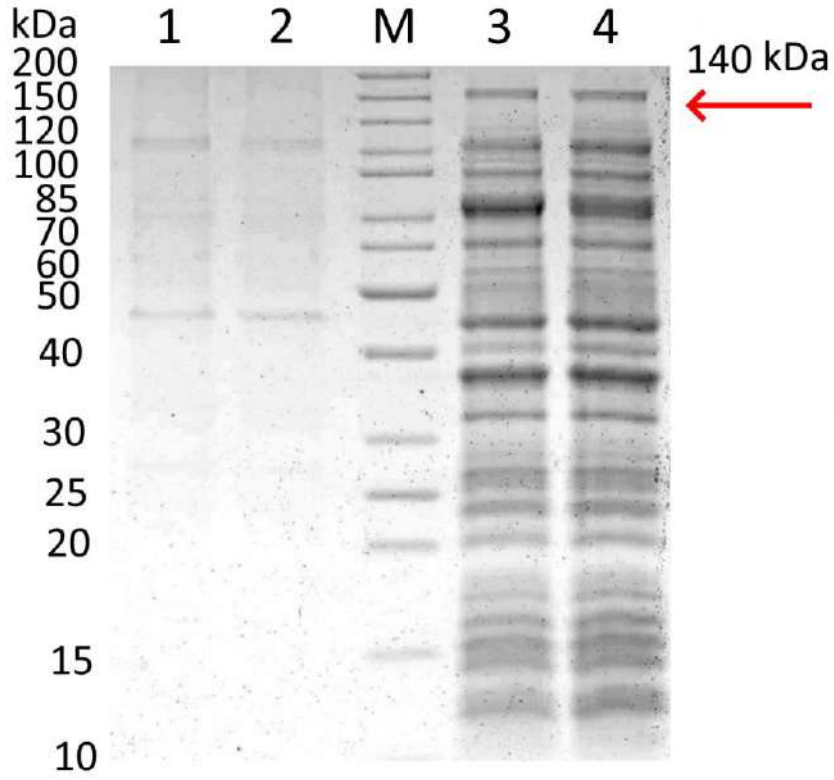

Рисунок 34 – Електрофореграма зразків рекомбінантного протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 на різних етапах його виділення: 3 – бактерійний лізат до індукції синтезу протеїну S; 4 – бактерійний лізат після індукції синтезу протеїну S; 1-2 – різні фракції після очистки протеїну S; M – протеїнові маркери молекулярної маси Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, США).

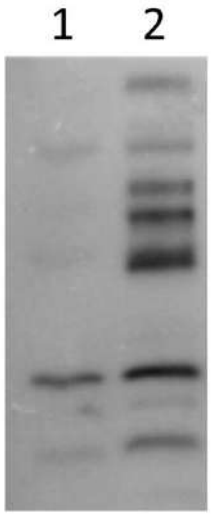

Рисунок 35 – Результати вестерн-блот аналізу бактерійних лізатів клонів-продуцентів рекомбінантного протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 (детекція поліклональними антитілами кроля до RBD). 1 – негативний контроль (відсутня індукція IPTG), 2 – фрагменти протеїну S різного розміру, що містять у своєму складі RBD-домен.

З наведеної на рисунку 35 блотограми видно, що на етапі експресії протеїну S в клітинах бактерій відбувається його деградація. Причинами цього може бути активне протеолітичне розщеплення або передчасна термінація трансляції. Така проблема часто виникає при одержанні великих рекомбінантних протеїнів у прокаріотичних системах експресії. Налагодження повноцінної експресії повнорозмірного протеїну S у клітинах *E. coli* потребує значної кількості оптимізаційних кроків на різних етапах отримання рекомбінантного продукту, і навіть це не завжди гарантує успішне вирішення проблеми [78]. Тому для подальшої роботи було використано фрагмент протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 – RBD-домен та його злитий кон’югат з похідним дифтерійного токсину – RBD–CRM197. Для одержання цих рекомбінантних протеїнів початкові генетичні конструкції були оптимізовані для експресії в клітинах еукаріотів і прокаріотів.

5.5 Оптимізація генетичних конструкцій, що кодують RBD-домен протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2, для експресії в клітинах еукаріотів

Для забезпечення можливості посттрансляційних модифікацій, зокрема глікозилювання, та правильного фолдингу рекомбінантних аналогів протеїнів вважають доцільним використовувати еукаріотичну систему експресії, наприклад, експресію у клітинах ліній CHO або HEK293.

Тому на І етапі виконання проєкту для одержання рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 були створені генетичні конструкції, що містили всі необхідні регуляторні елементи для експресії протеїнів у клітинах еукаріотів.

Основою для створення генетичних конструкцій для еукаріотичної експресії протеїнів, які містили гени протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2: S, RBD і злитого кон'югату RBD з CRM197, став плазмідний вектор pcDNA3, здатний забезпечити природні посттрансляційні модифікації, зокрема глікозилювання, і покращити фолдинг рекомбінантних протеїнів, що синтезуватимуться в клітинах еукаріотичних ліній.

Ще дві генетичні конструкції для еукаріотичної експресії протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2: S і RBD були додатково створені на основі човникового плазмідного вектору pShuttle-CMV, а потім переклоновані у конструкції на основі геному аденовірусу Adv5 – pAdv-CMV-Easy1. У випадку недостатньої ефективності одержаної вакцини проти COVID19 з використанням рекомбінантних протеїнів вірусу SARS-CoV-2 та їх кон'югатів із носіями, конструкції pAdv-CMV-Easy1 дадуть можливість розробити вакцину на основі рекомбінантних аденовірусів, нездатних до самостійної реплікації.

pShuttle-CMV-Spike-RBD-8xHis лінеаризували за допомогою рестрикційного ензиму PmeI та очищали отриманий продукт із 1% агарозного гелю. За допомогою гомологічної рекомбінації в клітинах BJ1586 лінеаризований вектор pShuttle-CMV-Spike-RBD-8xHis був злитий із рештою

ΔE1a-ΔE3 геному Adv5 у вигляді Easy-1 вектора. Отримані клони було перевірено за допомогою рестрикційного аналізу із використанням рестрикційних ензимів PacI та перевірено за допомогою рестрикційного ензиму BamHI (рисунок 36).

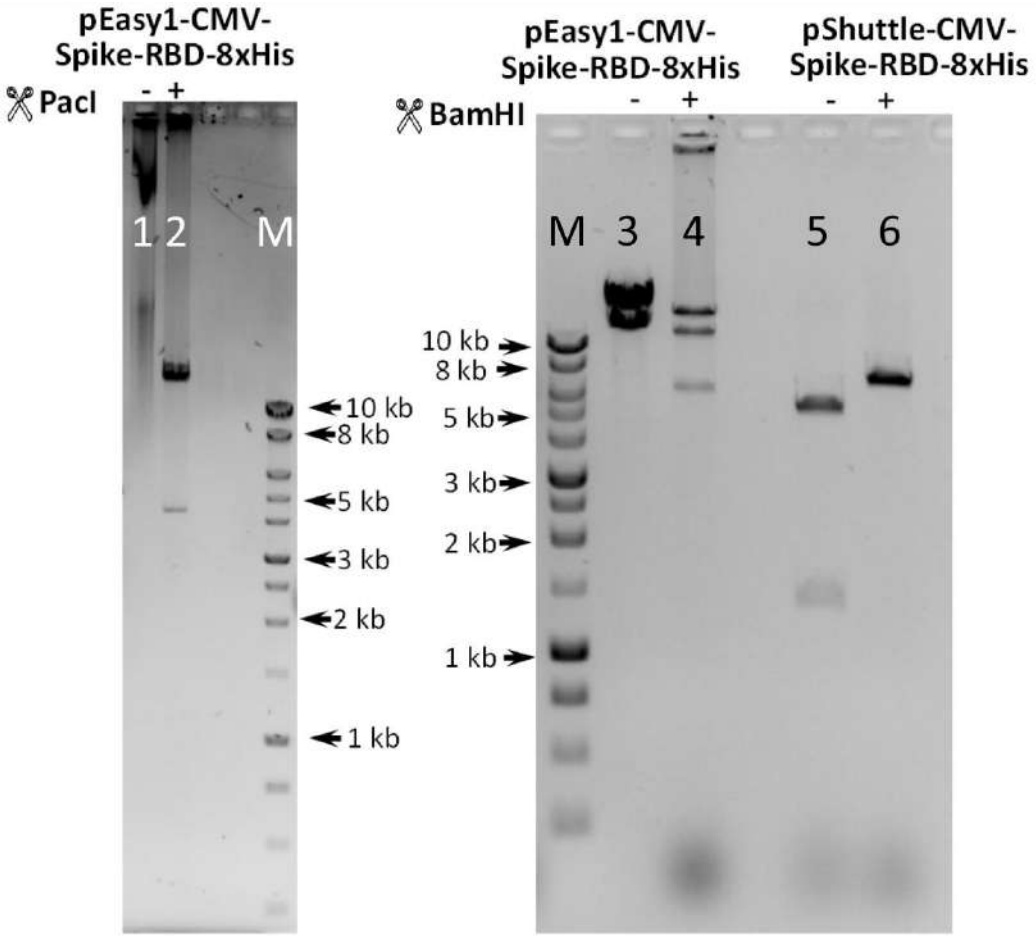

Рисунок 36 – ДНК-електрофореграма, що демонструє основні етапи переклонування вставки кДНК RBD-домену протеїну S (Spike-RBD-8xHis) із генетичної конструкції pShuttle-CMV-Spike-RBD-8xHis в плазмідний вектор pEasy1-CMV-Spike-RBD-8xHis: 5-6 – до і після злиття pShuttle-CMV-Spike-RBD-8xHis із ΔE1a-ΔE3 Adv5 із утворенням pEasy1-CMV-Spike-RBD-8xHis; 1-4 – рестрикційний аналіз генетичної конструкції pEasy1-CMV-Spike-RBD-8xHis (1-2 – до і після оброблення рестриктазою PacI; 3-4 – до і після оброблення рестриктазою BamHI); M – ДНК-маркери.

Правильний клон було використано для трансформації бактерій штаму DH-10B з метою розмноження і очистки за допомогою Endo-Free Maxi-prep набору (Qiagen, Нідерланди). Для отримання первинного препарату рекомбінантного аденовірусу отримана космід (10 μг) була лінеаризована за допомогою рестрикційного ензиму PacI і трансфікована до клітин лінії HEK-293, які є т.з. пакувальною лінією для рекомбінантних аденовірусів створених на основі Adv5. Після початку самостійної ампліфікації вірусу (11 днів після трансфекції) початковий препатат вірусу збирали, руйнували клітини шляхом трикратної заморозки-розморозки. Первинний препарат рекомбінантного вірусу був далі розмножений у клітинах HEK-293 та очищений за допомогою класичного способу центрифугування в градієнті CsCl.

Для продукції та очистки рекомбінантного RBD-домену протеїну S SARS-CoV-2, що містив у своєму складі 8xHis-таг, одержаним препаратом аденовірусу інфікували клітини-продуценти лінії HEK-293 (10 чашок Петрі діаметром 14 см), зібраний супернатант із секретованим протеїном очищали за допомогою метало-афінної хроматографії.

Слід зазначити, що вихід рекомбінантного протеїну RBD при одержанні в еукаріотичній системі експресії виявився низьким. Тому для швидкого одержання цього протеїну в кількості, достатній для імунізації лабораторних тварин, було виконано оптимізацію генетичних конструкцій, що кодують RBD-домен протеїну S, для експресії в прокаріотичній системі.

5.6 Оптимізація генетичних конструкцій, що кодують RBD-домен протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2, для експресії в клітинах прокаріотів

При отриманні рекомбінантних протеїнів часто часто виникають проблеми, пов’язані з неправильним фолдингом протеїнової молекули. Тому в генетичні конструкції включають додаткові сигнальні елементи, які

спрямовують синтезовані молекули протеїну в певний клітинний компартмент, де можуть бути забезпечені умови для правильного фолдингу чи необхідних посттрансляційних модифікацій.

Створені нами генетичні конструкції на основі *pET24a-entero* для експресії RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 та злитих кон'югатів RBD–CRM197 і RBD–eGFP містили сигнальну послідовність гемаглютиніну вірусу грипу (MKTIIALSYIFCLVFA) [79], яка забезпечує секрецію рекомбінантних протеїнів у поживне середовище під час синтезу в еукаріотичних системах експресії. Для запобігання негативного впливу даної послідовності на вихід цільового білка в клітинах бактерій-продуцентів було одержано відповідні генетичні конструкції, які містили нуклеотидну послідовність RBD-домену протеїну S без цієї сигнальної послідовності.

Ще одним важливим елементом генетичних конструкцій, який може визначати фінальний вихід рекомбінантного протеїну, є лінкерні ділянки. Злиті протеїни часто деградують на структурні компоненти, оскільки лінкерні ділянки є зручною та доступною мішенню для клітинних протеїназ.

В конструкції *pET24a-entero-RBD-CRM197* була передбачена можливість заміни лінкерної послідовності, що дозволило оптимізувати структуру фінального злитого кон'югату RBD–CRM197. Для заміни було обрано класичний гнучкий лінкер $(Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Gly\text{-}Ser)_3$, який дозволяє достатній рух частин злитого протеїну одна відносно одної [80]. Його розмір і структура мінімізували стеричні обмеження, які можуть зашкодити формуванню правильної конформації частин протеїну, а також перекриття певних епітопних ділянок, що може стати критичним при дослідженні імуногенних властивостей кон'югату. Із урахуванням змін, описаних вище, оптимізована структура злитого кон'югату RBD–CRM197 може бути представлена схематично таким чином (рисунок 37).

При створенні генетичних конструкцій на основі вектору *pET28a* перед полігістидиновим тагом також було вставлено сайт щеплення ентерокіназою,

що дозволило після виділення і очищення одержувати рекомбінантні протеїни, які не містять тагової послідовності.

Рисунок 37 – Схема розташування елементів нуклеотидної послідовності злитого кон'югату RBD–CRM197 після проведення оптимізації.

ДНК-послідовності RBD та RBD–CRM197 містили сайти рестрикції XhoI на 3'-кінці, а 5'-кінець не мав ніякого рестрикційного сайту. Експресійний вектор *pET28a* послідовно обробляли рестриктазою NcoI та фрагментом Кленова, з метою утворення одного «тупого» кінця. Надалі ДНК-послідовності вставок та вектору обробляли рестриктазою XhoI та об'єднували в єдину генетичну конструкцію.

Проведений тип реакції лігування дозволив нам після проведення трансформації клітин *E.coli* штаму DH10B не перевіряти напрямок вставки генів коронавірусу SARS-CoV-2. З метою скринінгу отриманих колоній нами було проведено STAB-ПЛР для виявлення лише тих колоній, які містили у своєму складі необхідні генетичні конструкції (рисунок 38).

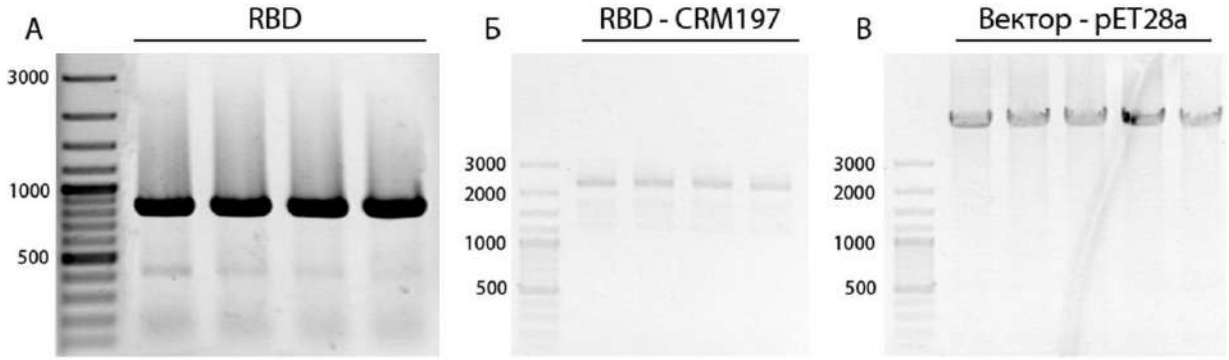

Рисунок 38 – ДНК-електрофореграми вектору та кДНК протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2, отриманих за допомогою ПЛР з використанням специфічних пар праймерів. А – RBD; Б – RBD–CRM197; В – оброблений ендонуклеазами рестрикції вектор *pET28a*.

Далі в плазміді *pET28a-entero-RBD(wo signal)-CRM197* була проведена заміна нуклеотидної послідовності, що кодує лінкерну ділянку між RBD та CRM197. Олігонуклеотидні послідовності нового лінкеру були синтезовані на замовлення компанією Metabion (Німеччина) та очищені за допомогою HPLC-хроматографії. Плазміду *pET28a-entero-RBD(wo signal)-CRM197* інкубували з ендонуклеазою рестрикції BpiI, після чого об'єднували з новим лінкером в єдину генетичну конструкцію за «липкими» кінцями. Отриманою сумішшю трансформували клітини *E. coli* штаму DH10B. При пошуку позитивно-трансфікованих колоній, декілька випадкових колоній аналізували за допомогою STAB-ПЛР (рисунок 39).

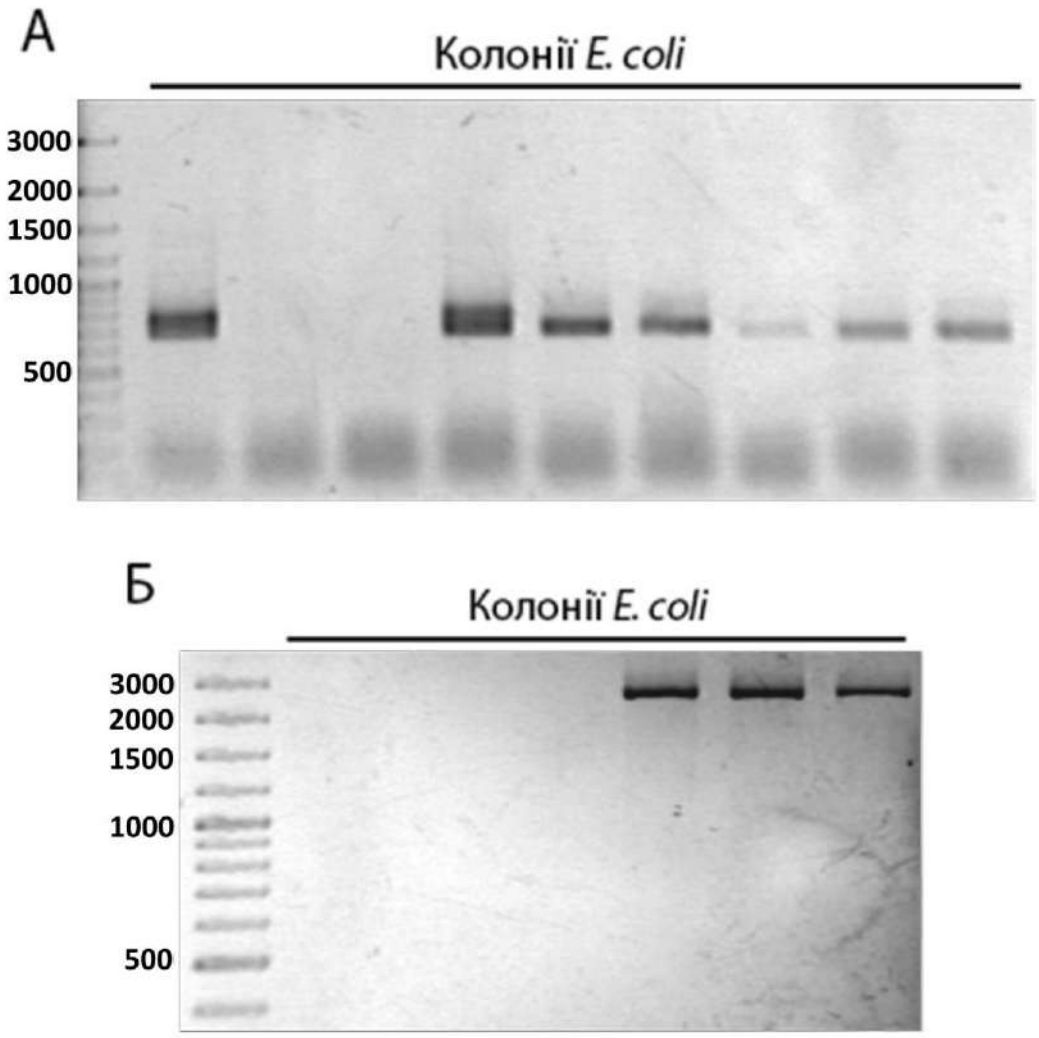

Рисунок 39 – Результати STAB-ПЛР ДНК колоній клітин *E.coli* штаму DH10B на наявність генетичних конструкцій А – *pET28a-entero-RBD(wo signal)*; Б – *pET28a-entero-RBD(wo signal)-CRM197*.

В результаті створені плазміди було виділено за допомогою методу лужного лізису з позитивних колоній трансформованих клітин *E. coli* штаму DH10B. Надалі вони використовувались для трансформації клітин *E. coli* експресійного штаму Rosetta (DE3) для отримання клонів-продуцентів RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 та злитого крн'югату RBD–CRM197.

5.7 Одержання рекомбінантного RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2

Для напрацювання досліджуваних протеїнів культуру клітин *E. coli*, трансформованих плазмідою *pET28a-entero-RBD(wo signal)* перед початком експресії нарощували до досягнення OD600 ≈ 0,5 – 0,6. Надалі для запуску індукції до середовища додавали IPTG до фінальної концентрації в 0,5 мМ та інкубували протягом 3 год. Результати ДСН-електрофорезу в ПААГ лізатів бактерій-продуцентів (*E. col*i) на різних етапах індукції експресії рекомбінантного RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 представлено на рисунку 40.

Для ідентифікації RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 було також проведено вестерн-блот аналіз лізатів бактерій-продуцентів до і після індукції експресії RBD-домену, який підтвердив наявність цільового продукту в бактерійних лізатах (рисунок 41).

Очищення RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 здійснювали окремо з розчинної фракції та з тілець включення з подальшим рефолдингом за допомогою Ni-NTA агарози за стандартним протоколом. Якість очищення оцінювали за допомого електофоретичного розділення в поліакриламідному гелі (рисунок 42).

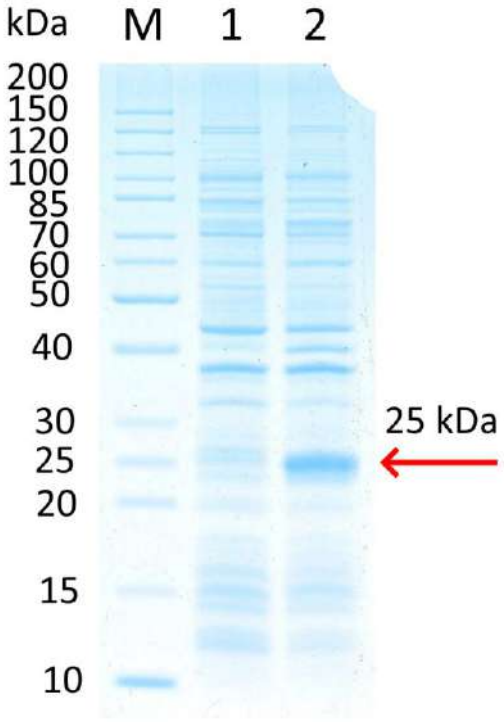

Рисунок 40– Електрофореграма зразків культури бактерій-продуцентів (*E. coli*) на різних етапах індукції експресії рекомбінантного RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2: 1 – до індукції синтезу RBD-домену протеїну S; 2 – після індукції синтезу RBD-домену протеїну S; M – протеїнові маркери молекулярної маси Unstained protein ladder (Thermo Scientific, США).

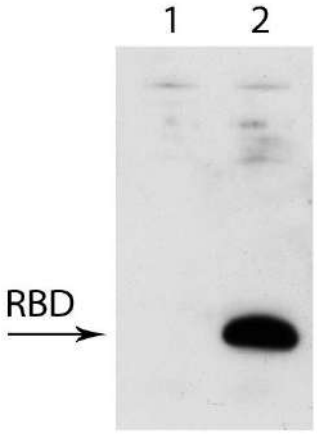

Рисунок 41– Результати вестерн-блот аналізу бактерійних лізатів клонів-продуцентів рекомбінантного RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 (детекція поліклональними антитілами кроля до RBD). 1 –до індукції експресії RBD; 2 – після індукції експресії RBD.

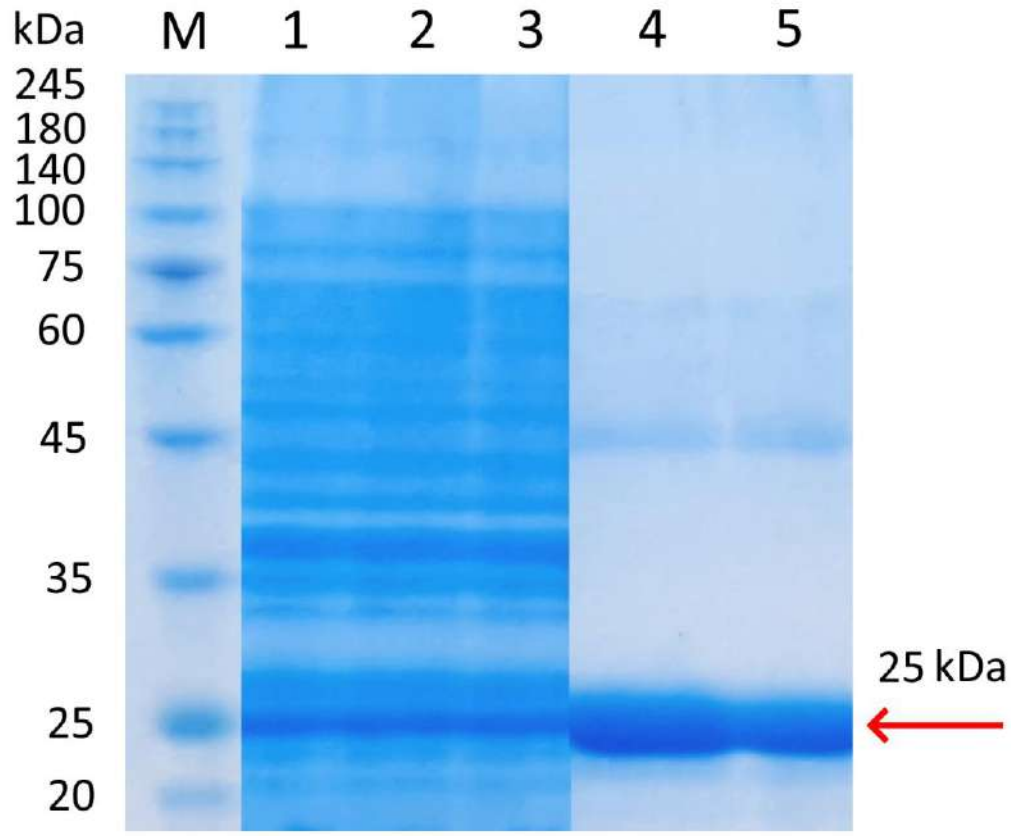

Рисунок 42 – Електрофореграма зразків, що містять рекомбінантний RBD-домен протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2, на різних етапах виділення RBD: 1-3 – виділені тільця включення, що містять рекомбінантний RBD-домен протеїну S; 4-5 – очищений рекомбінантний RBD-домен протеїну S (об’єм зразків відповідно 25 мкл і 15 мкл); M – протеїнові маркери молекулярної маси Roti-Mark Tricolor (Carl Roth , Німеччина).

5.8 Одержання рекомбінантного злитого кон’югату RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 із дифтерійним токсоїдом CRM197 (RBD–CRM197)

Для забезпечення достатнього виходу цільового продукту бактеріальну культуру перед початком експресії нарощували до досягнення OD600 ≈ 0,5 – 0,6. З метою підтвердження наявності в лізаті бактеріальних клітин цільового продукту проводили електрофоретичний аналіз тотальних лізатів *E. coli* до та після індукції IPTG з подальшим вестерн-блот-аналізом з використанням

поліклональних антитіл кроля до RBD фрагменту S протеїну коронавірусу. Результати, представлені на рисунках 43 і 44, підтвердили наявність злитого кон'югату RBD-CRM197 у лізатах бактеріальних клітин.

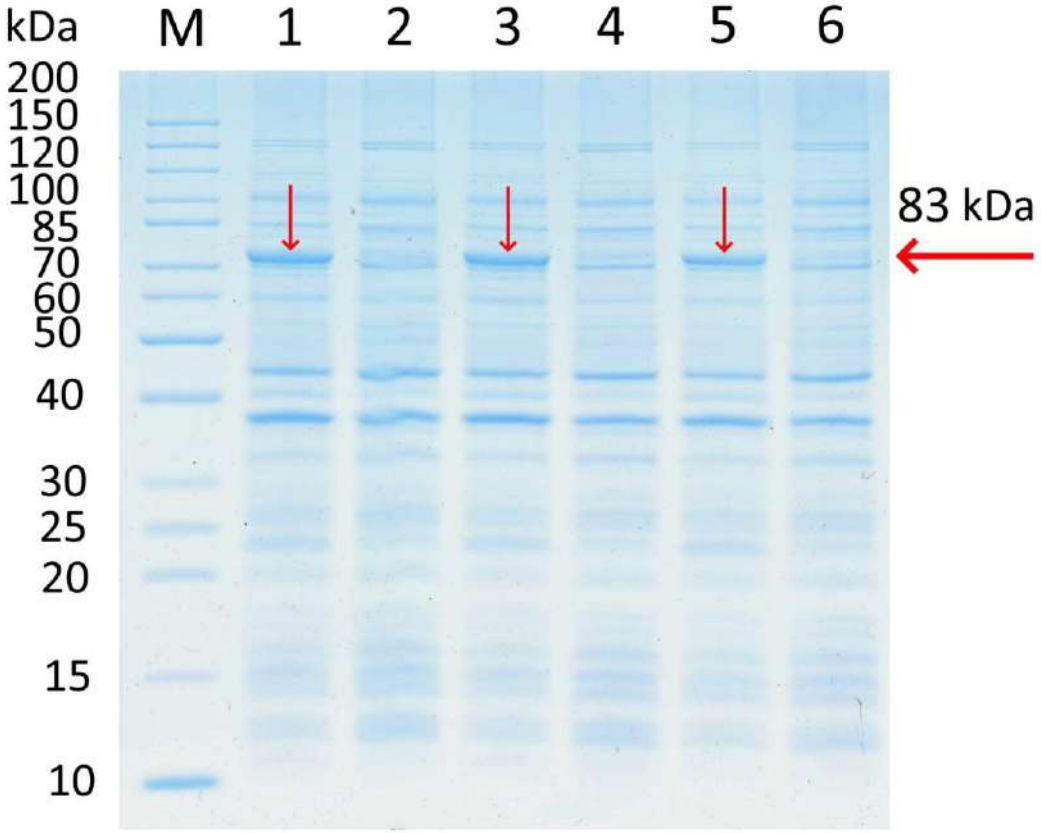

Рисунок 43 – Електрофореграма зразків культури бактерій-продуцентів *E. coli* на різних етапах індукції експресії рекомбінантного злитого кон'югату RBD-CRM197: 2, 4, 6 – до індукції синтезу злитого кон'югату RBD-CRM197; 1, 3, 5 – після індукції синтезу злитого кон'югату RBD-CRM197; M – протеїнові маркери молекулярної маси Unstained protein ladder (Thermo Scientific, США).

Проведення електрофоретичного розділення протеїнів в ДСН-ПААГ виявило, що RBD-CRM197 синтезуються лише у вигляді тілець включення. Очистку здійснювали з тілець включення з подальшим рефолдингом за допомогою Ni-NTA агарози за стандартним протоколом. Якість очищення оцінювали за допомого електофоретичного розділення в поліакриламідному гелі (рисунок 45).

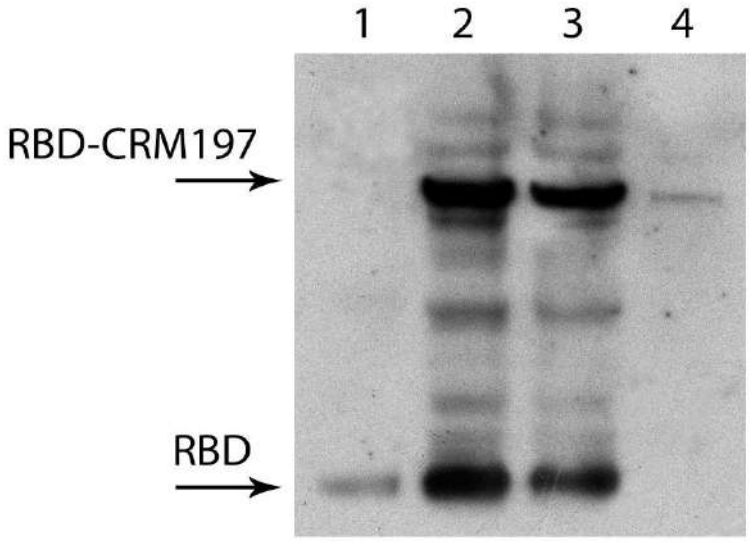

Рисунок 44 – Результати вестерн-блот аналізу бактерійних лізатів клонів-продуцентів RBD-домену протеїну S та злитого кон'югату RBD-CRM197 (детекція поліклональними антитілами кроля до RBD). 1 – RBD, 2 та 3 – RBD-CRM197 (різні клони продуценти), 4 – очищений RBD-CRM197.

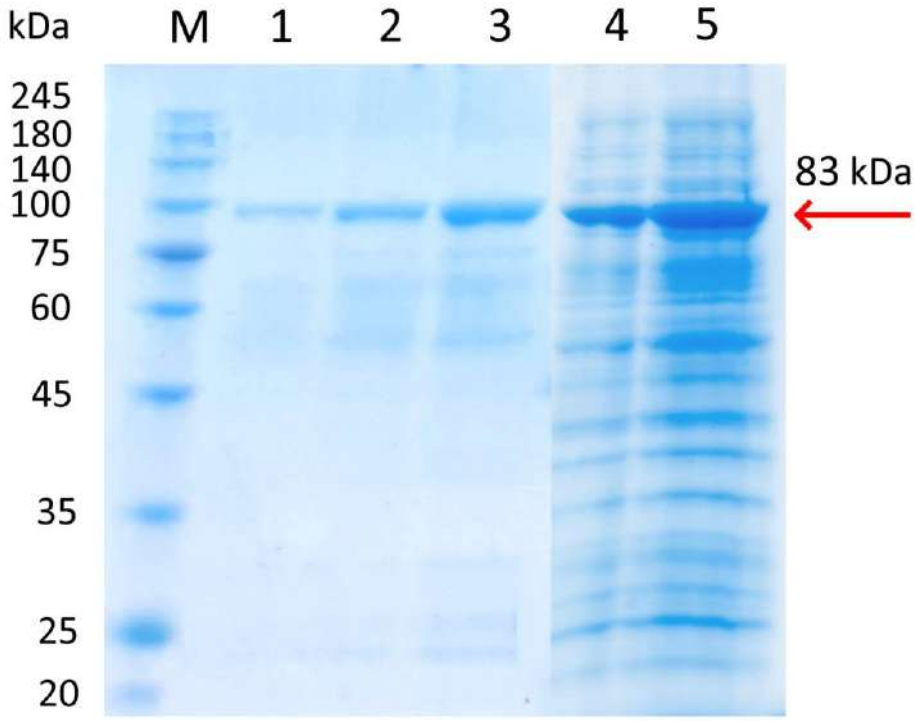

Рисунок 45 – Електрофореграма зразків, що містять рекомбінантний злитий кон'югат RBD–CRM197, на різних етапах виділення: 4-5 – виділені тільця включення (об'єм зразків відповідно 5 мкл і 20 мкл); 1-3 – очищений RBD–CRM197 (об'єм зразків відповідно 5 мкл, 10 мкл і 20 мкл); M – протеїнові маркери молекулярної маси Roti-Mark Tricolor (Carl Roth , Німеччина).

5.9 Одержання рекомбінантного злитого кон'югату RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 із зеленим флуоресцентним протеїном (RBD–eGFP)

Для вивчення на III етапі виконання проєкту захисних властивостей антитіл проти рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 нами було створено генетичну конструкцію *pEGFP-N1-RBD*, яка кодує RBD-домен протеїну S злитий із підсиленим зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP). eGFP є зручним та широко вживаним репортером експресії та біомаркером, який можна використовувати для досліджень особливостей формування ліганд-рецепторних комплексів на поверхні клітини. Оскільки, генетична конструкція *pEGFP-N1-RBD* призначалась для експресії в клітинах еукаріотів, нами додатково була створена генетична конструкція для експресії злитого кон'югату RBD-eGFP у клітинах прокаріотів.

Всі етапи клонування кДНК RBD-eGFP було виконано аналогічним чином за методиками, описаними у звіті за I етап виконання проєкту. Після трансформацій клітин *E. coli* штаму DH10B методом STAB-ПЛР із використанням специфічних до вектору праймерів (рисунок 46), нами були виявлені плазміди *pET28a-entero-RBD(wo signal)-EGFP*. Надалі їх напрацьовували, виділяли методом лужного лізису та використовували для трансформації клітин *E. coli* штаму Rosetta (DE3) для отримання клону-продуценту.

Клони бактерій, що містили плазміду *pET28a-entero-RBD(wo signal)-EGFP*, були відібрані для продукування рекомбінантного злитого кон'югату RBD-eGFP. Для достатнього виходу протеїнового продукту бактеріальну культуру перед початком експресії нарощували до досягнення OD600 ≈ 0,5 – 0,6. З метою підтвердження наявності в лізаті бактеріальних клітин цільового продукту RBD-eGFP проводили електрофоретичний аналіз тотальних лізатів *E. coli* до та після індукції IPTG із подальшим вестерн-блот-аналізом із використанням поліклональних антитіл кроля до RBD фрагменту S протеїну

коронавірусу. Результати електрофорезу і вестерн-блотингу, представлені відповідно на рисунках 47 і 48, підтвердили наявність злитого кон'югату RBD–eGFP у лізатах бактерій-продуцентів.

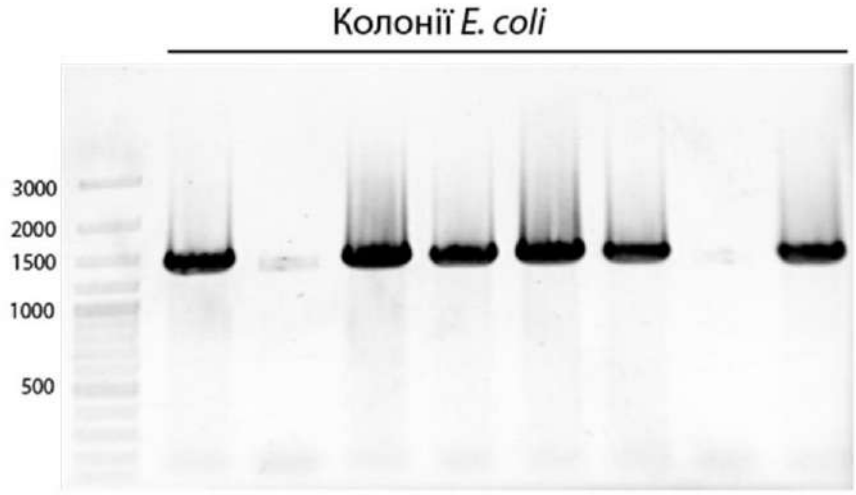

Рисунок 46 – Результати STAB-ПЛР ДНК колоній клітин *E.coli* штаму DH10B, що демонструють наявність генетичних конструкцій *pET28a-entero-RBD(wo signal)-EGFP.*

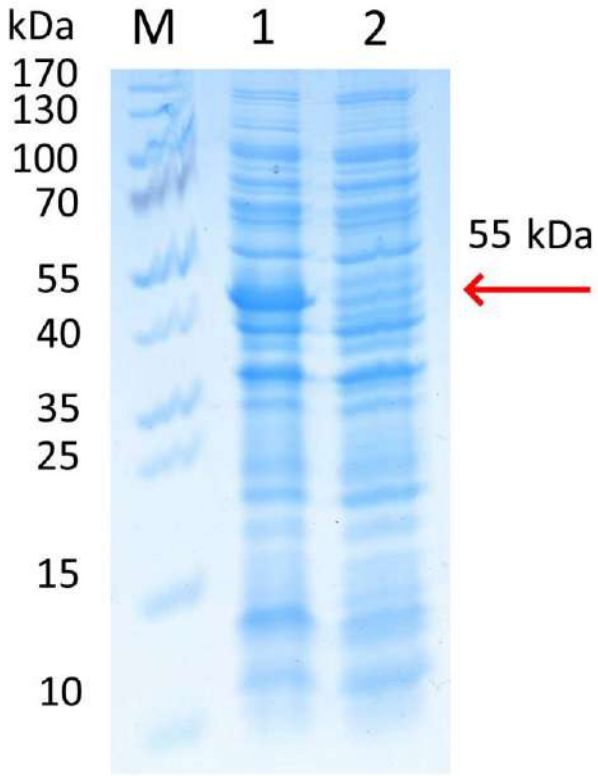

Рисунок 47 – Електрофореграма зразків, що містять рекомбінантний злитий кон'югат RBD–eGFP, на різних етапах виділення: 2 – до індукції синтезу

RBD-eGFP; 1 – після індукції синтезу RBD-eGFP; M – протеїнові маркери молекулярної маси Prestained Protein Ladder (ThermoScientific, США).

Рисунок 48 –- Результати вестерн-блот аналізу бактерійних лізатів клонів-продуцентів рекомбінантного злитого кон'югату RBD–eGFP (детекція поліклональними антитілами кроля до RBD). 1 – негативний контроль (відсутня індукція IPTG), 2 – виявлений RBD–eGFP.

Очищення злитого кон'югату RBD–eGFP здійснювали з тілець включення з подальшим рефолдингом за допомогою Ni-NTA агарози за стандартним протоколом. Наявність у складі тілець включення, якість очищення та сукупній вихід оцінювали за допомого електрофоретичного розділення в поліакриламідному гелі (рисунок 49).

5.10 Підтвердження відповідності антигенних властивостей одержаних рекомбінантних протеїнів за допомогою вестерн-блот аналізу та імуноензимного аналізу

Для підтвердження відповідності антигенних властивостей одержаних рекомбінантних протеїнів використовували метод вестерн-блот аналізу, в якому за допомогою поліклональних антитіл кроля до RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 можна виявляти цей структурний елемент у

складі інших протеїнів, зокрема злитих кон'югатів RBD–CRM197 і RBD–eGFP.

Результати вестерн-блот аналізу одержаних рекомбінантних протеїнів (рисунок 50) підтвердили за ідентичністю антигенних властивостей наявність RBD-домену у складі одержаних рекомбінантних протеїнів RBD, RBD–CRM197 і RBD–eGFP.

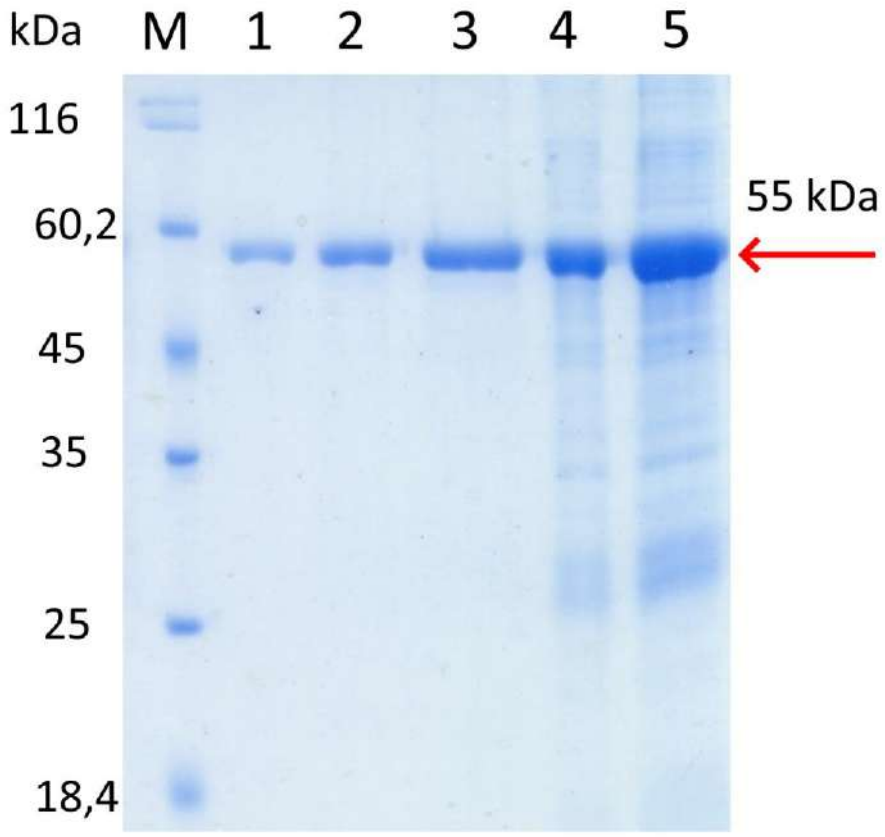

Рисунок 49 – Електрофореграма зразків, що містять рекомбінантний злитий кон'югат RBD–eGFP, на різних етапах виділення: 4-5 – виділені тільця включення, що містять рекомбінантний злитий кон'югат RBD–eGFP (об'єм зразків відповідно 5 мкл і 20 мкл); 1-3 – очищений рекомбінантний злитий кон'югат RBD–eGFP (об'єм зразків відповідно 5 мкл, 10 мкл і 20 мкл); М – протеїнові маркери молекулярної маси.

Ще одним імунологічним методом ідентифікації протеїнів є імуноензимний аналіз, який здатний виявити складові частини з відповідною антигенною структурою в молекулі протеїну. Для підтвердження

відповідності антигенних властивостей одержаних рекомбінантних протеїнів RBD та RBD–CRM197 було проведено непрямий імуноензимний аналіз із використанням поліклональних антитіл кроля до RBD-домену протеїну S SARS-CoV-2, а також біотинильованих $F(ab')_2$-фрагментів антитіл коня до дифтерійного анатоксину, які здатні розпізнавати дифтерійний токсоїд CRM197.

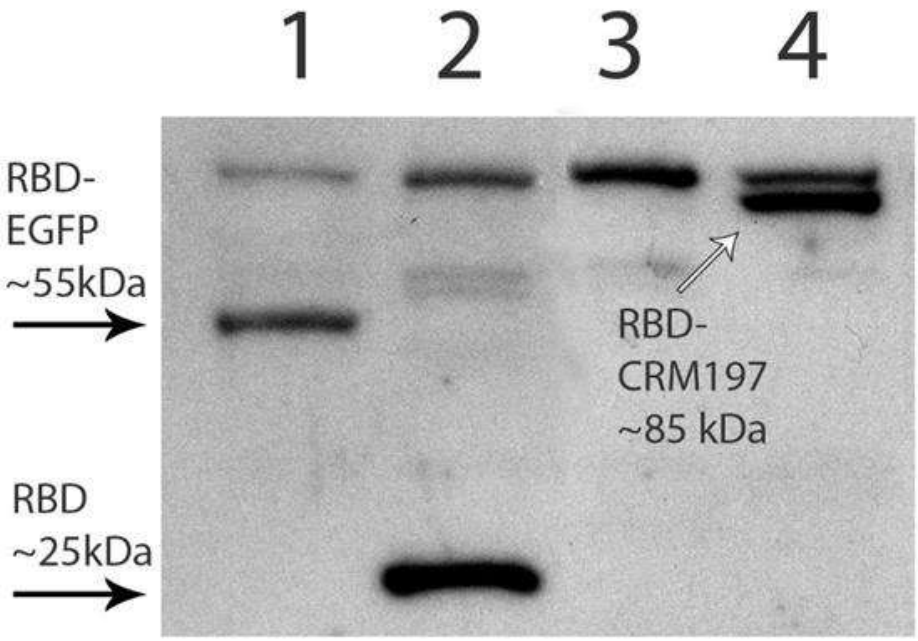

Рисунок 50 – Результати вестерн-блот аналізу бактерійних лізатів клонів-продуцентів різних варіантів рекомбінантнтних похідних RBD спайк-протеїну коронавірусу (детекція поліклональними антитілами кроля до RBD). 1 – RBD-eGFP, 2 – RBD, 3 – негативний контроль (відсутня індукція IPTG), 4 – RBD-CRM197.

Результати імуноензимного аналізу із використанням поліклональних антитіл кроля до RBD-домену протеїну S SARS-CoV-2, представлені на рисунку 51, підтвердили наявність і правильну конформацію RBD-домену в структурі рекомбінантних протеїнів RBD (А) та RBD–CRM197 (Б).

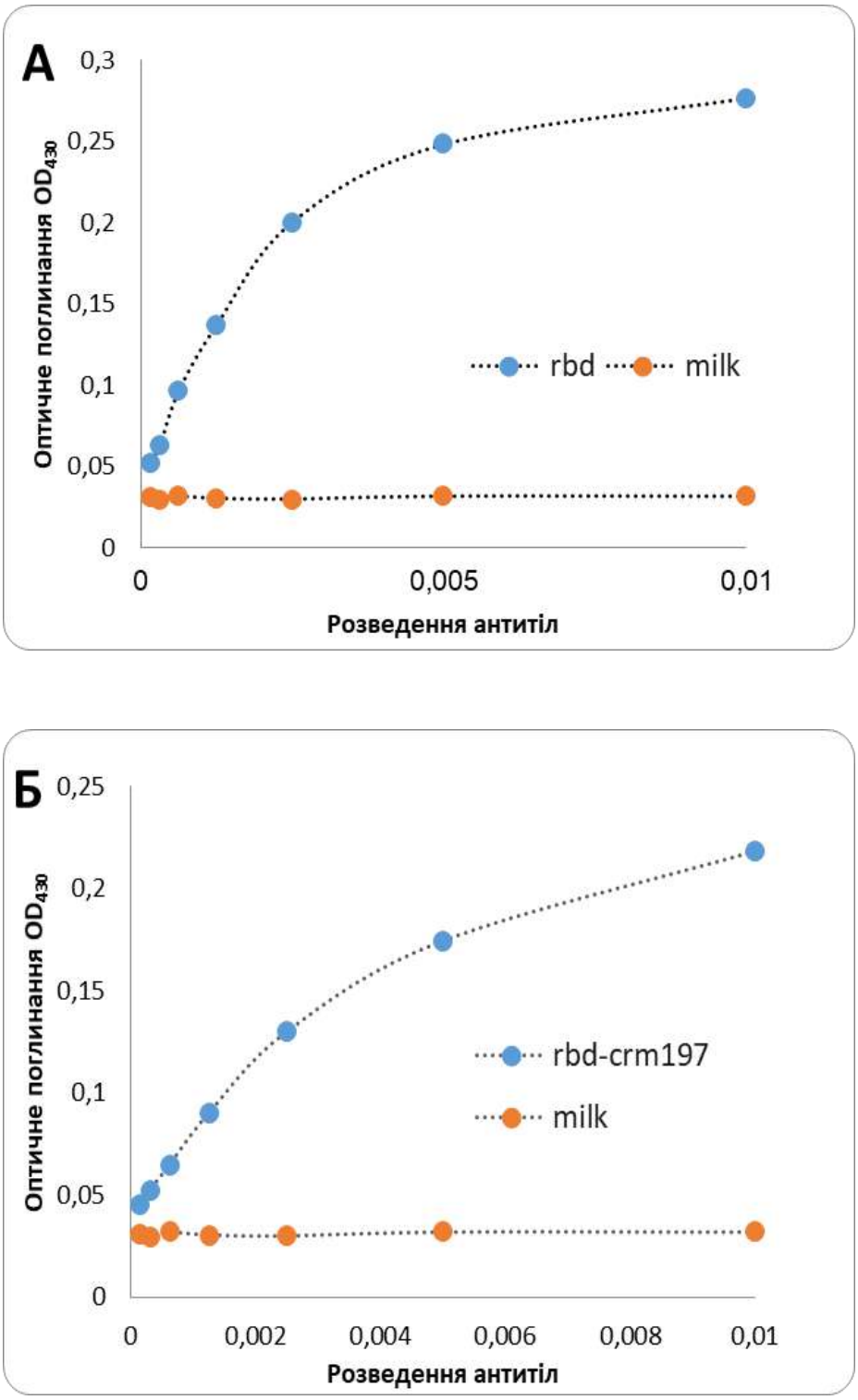

Рисунок 51 – Результати імуноензимного аналізу зв’язування рекомбінантних протеїнів RBD, RBD–CRM197 та контрольного антигену (протеїнів молока) із антитілами проти RBD.

Результати імуноензимного аналізу із використанням біотинильованих F(ab´)$_2$-фрагментів антитіл коня до дифтерійного анатоксину, здатних розпізнавати CRM197, представлені на рисунку 52, підтвердили наявність і правильну конформацію CRM197 в структурі рекомбінантних протеїнів CRM197 та RBD–CRM197.

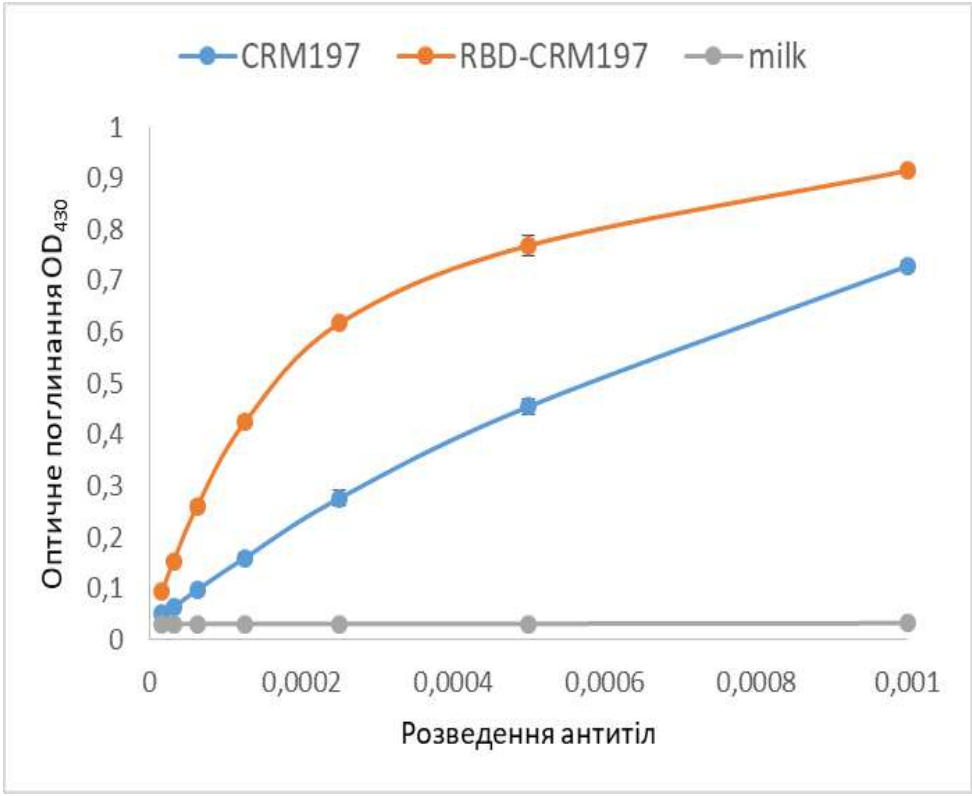

Рисунок 52 – Результати імуноензимного аналізу зв’язування рекомбінантних протеїнів CRM197, RBD–CRM197 та контрольного антигену (протеїнів молока) із антитілами проти дифтерійного анатоксину.

На основі отриманих результатів можна зробити висновок, що фрагмент CRM197 у складі рекомбінантного злитого кон’югату RBD-CRM197 має правильну конформацію і може використовуватись для подальших досліджень.

5.11 Підтвердження відповідності амінокислотної послідовності одержаних рекомбінантних протеїнів за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії

MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight) – мас-спектрометрія, яка базується на матрично-активованій лазерній десорбційній іонізації з час-прольотним аналізатором. Завдяки інформативності, точності та високій продуктивності вона стала незамінним методом дослідження високомолекулярних біологічних сполук, включаючи протеїни, нуклеїнові кислоти та ліпіди. Можливість ідентифікувати протеїни за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії обумовило розвиток протеоміки і дотепер використовується як один із важливих її інструментів [81]. Тому цей метод було використано для перевірки відповідності між теоретично очікуваними і реальними амінокислотними послідовностями одержаних рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2.

Для дослідження одержаних рекомбінантних протеїнів за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії після проведення ДСН-електрофорезу з поліакриламідного гелю вирізали відповідні смуги, що містили рекомбінантні протеїни коронавірусу SARS-CoV-2, і готували зразки триптичних пептидів для MALDI-TOF мас-спектрометрії (див. розділ 2.18), які досліджували на спектрометрі Voyager DE PRO Serial No 6393 (Applied Biosystems, США). На рисунку 53 представлено спектр, одержаний при MALDI-TOF мас-спектрометрії рекомбінантного протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2.

Амінокислотні послідовності пептидів, що відповідають кожному піку спектру, наведені у таблиці 6. Пептиди, послідовність яких співпадала з амінокислотною послідовністю протеїну N, позначені зірочкою. Як видно, вся послідовність протеїну N перекривалася цими пептидами, що є свідченням ідентичності послідовностей рекомбінантного і природного протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2.

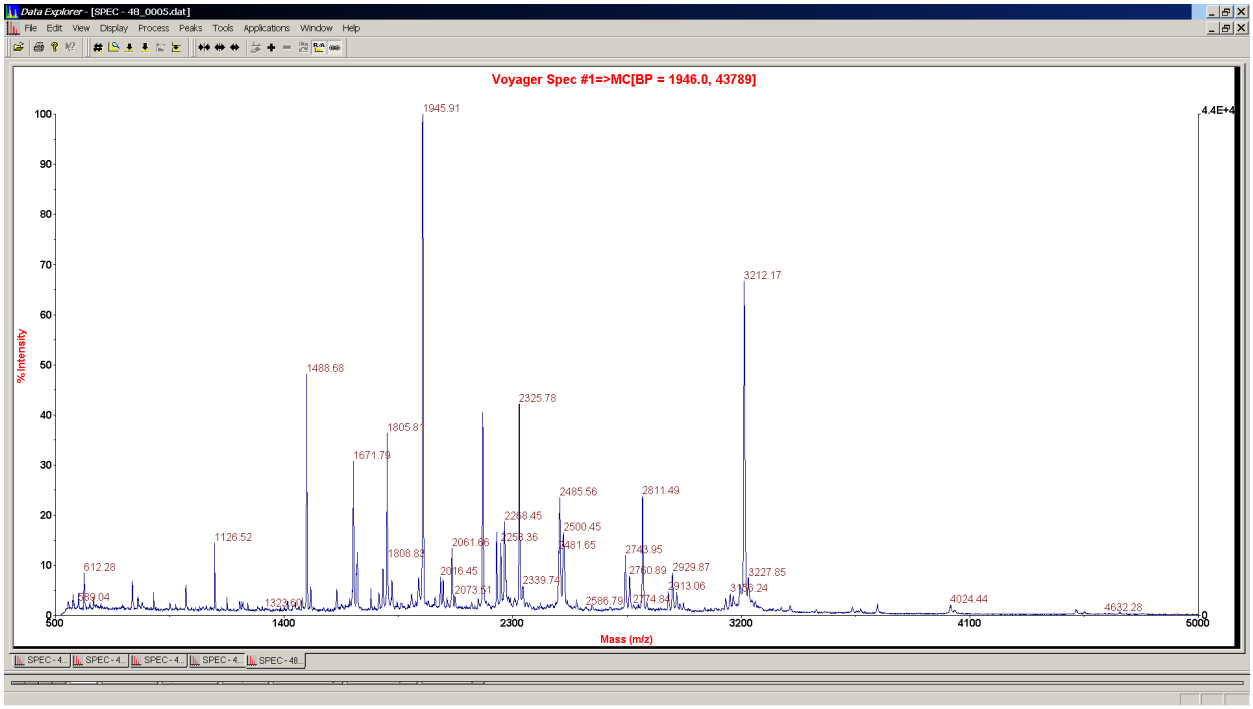

Рисунок 53 – Спектр, одержаний при MALDI-TOF мас-спектрометрії рекомбінантного протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2

Таблиця 6 – Результати MALDI-TOF мас-спектрометрії рекомбінантного протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2

№ п/п	Пік спектру	Амінокислотна послідовність	№ п/п	Пік спектру	Амінокислотна послідовність
1	2928,3886	296-321*	24	1788,8511	280-295
2	2927,5373	152-179*	25	1742,7987	1—16*
3	2809,4379	43-67*	26	1684,8904	130-145
4	2759,2451	408-432	27	1670,8894	212-228
5	2739,49	146-171*	28	1643,8427	358-371*
6	2608,3491	41-63*	29	1605,8013	236-250*
7	2581,2429	68-90*	30	1330,7073	240-251*
8	2496,269	322-344*	31	1256,6593	377-387*
9	2483,3286	212-235*	32	1234,646	229-239*
10	2481,164	280-301*	33	1202,6124	240-250

11	2364,2306	130-151*	34	1126,564	269-278
12	2337,1218	71-91*	35	1044,5796	252-261*
13	2324,1894	43-63	36	1044,5724	364-372*
14	2267,0807	110-129	37	904,4887	64-70*
15	2236,0756	302-321	38	886,4053	172-179
16	2195,0071	17-38*	39	846,4502	103-109*
17	2181,0207	71-90	40	805,3799	198-205
18	2060,1498	152-171	41	679,3482	188-193*
19	2025,0361	322-340	42	656,4202	259-263*
20	1990,0491	390-407*	43	605,3365	35-40*
21	1944,9522	279-295*	44	588,31	206-211
22	1861,9541	391-407	45	587,3147	105-109
23	1823,8154	17-34			

Примітка: * – ідентифіковані пептиди протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2

Аналогічні дослідження були проведені й для інших одержаних рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2. На рисунку 54 представлено спектр, одержаний при MALDI-TOF мас-спектрометрії рекомбінантного злитого протеїну RBD-CRM197, який також підтвердив відповідність його амінокислотної послідовності.

Отже, за допомогою методів ДСН-електрофорезу в ПААГ, вестерн-блот аналізу, імуноензимного аналізу та MALDI-TOF мас-спектрометрії було підтверджено, що одержані рекомбінантні протеїни за своєю амінокислотною послідовністю, молекулярною масою та антигенними властивостями відповідають протеїнам коронавірусу SARS-CoV-2.

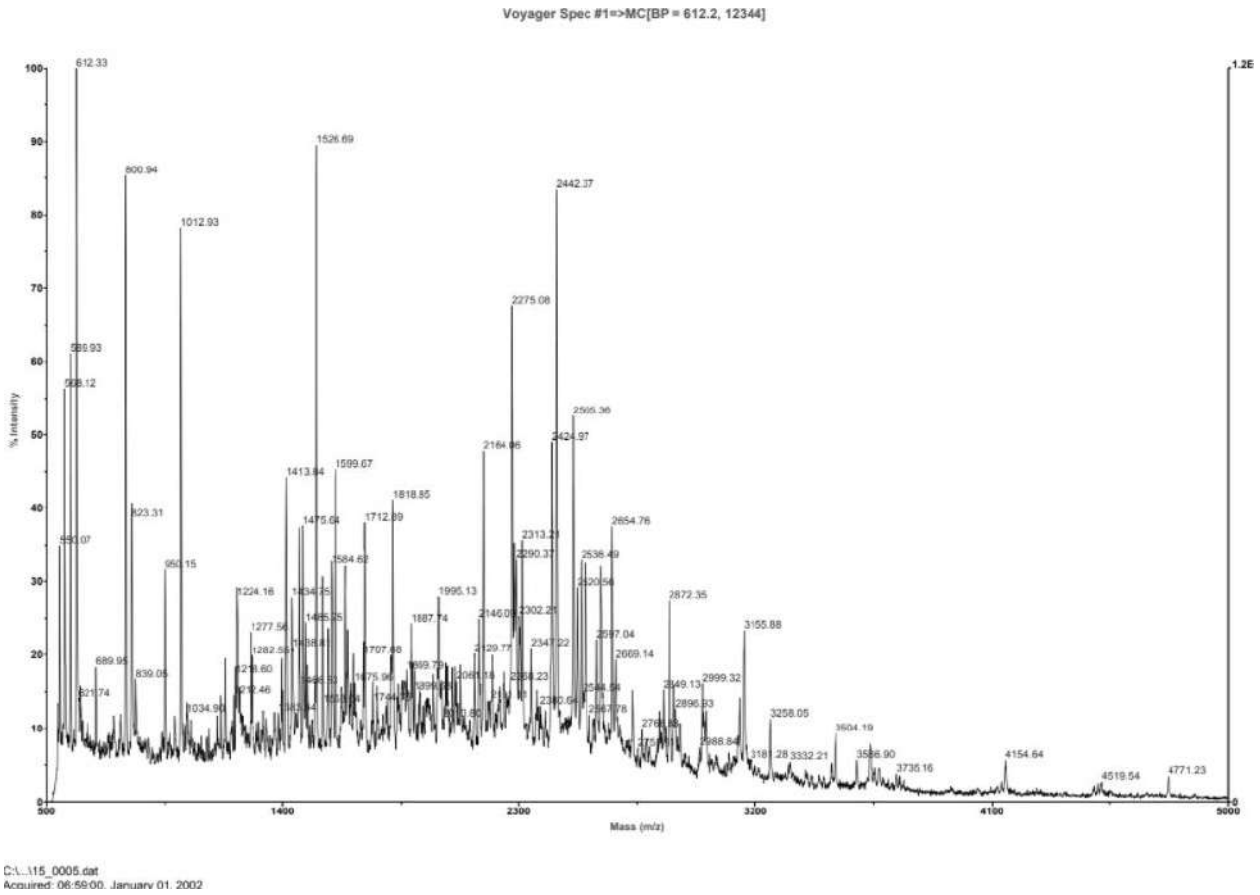

Рисунок 54 – Спектр, одержаний при MALDI-TOF мас-спектрометрії рекомбінантного злитого протеїну RBD-CRM197

Крім того, відповідність структури підтверджено даними секвенування нуклеотидних послідовностей одержаних рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2. Результати співставлення С-кінцевих нуклеотидних і амінокислотних послідовностей RBD-домену протеїну S SARS-CoV-2 та злитих кон’югатів RBD-CRM197 і RBD-eGFP наведено в додатку А.

6 ДОСЛІДЖЕННЯ ІМУНОГЕННОСТІ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ SARS-COV-2 ТА ЗЛИТОГО КОН'ЮГАТУ RBD–CRM197

6.1 Визначення рівнів антитіл IgM проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 і носія CRM197 у сироватках крові мишей після першої імунізації

Гуморальну ланку адаптивної імунної відповіді опосередковують антитіла, які є головними розчинними захисними факторами організму. Зумовлений антитілами імунітет називають гуморальним. При потраплянні чужорідного антигену в організм спочатку (на п'ятий день після імунізації) утворюються антитіла класу M (IgM), а потім антитіла класу G (IgG). Утворення IgM є дуже важливим для подальшого перебігу імунної відповіді, оскільки IgM дає змогу концентрувати антиген на поверхні фолікулярних дендритних клітин за первинної імунної відповіді, що є необхідною умовою для повноцінного розвитку зародкових центрів, де утворюються плазматичні клітини, що синтезують усі інші ізотипи імуноглобулінів.

Тому перш за все ми дослідили рівні антитіл IgM проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 і носія CRM197 в сироватках крові мишей через тиждень після імунізації. Результати представлені на рисунку 55. Як видно, найвищі рівні антитіл IgM були виявлені проти протеїну N (при імунізації тварин протеїном N і RBD+CRM197+N), а також проти носія CRM197 (при імунізації тварин протеїном CRM197 і RBD+CRM197). Найнижчими були рівні антитіл IgM проти RBD (при імунізації тварин протеїном RBD і RBD+CRM197). Хоча присутність більш імуногенних протеїнів (CRM197 та/або N) сприяла незначному підвищенню імуногенності RBD. У випадку дослідження антитіл проти CRM197 спостерігалась протилежна тенденція: поява інших антигенів (RBD та/або N) знижувала імуногенність CRM197, ймовірно, за механізмом конкуренції антигенів.

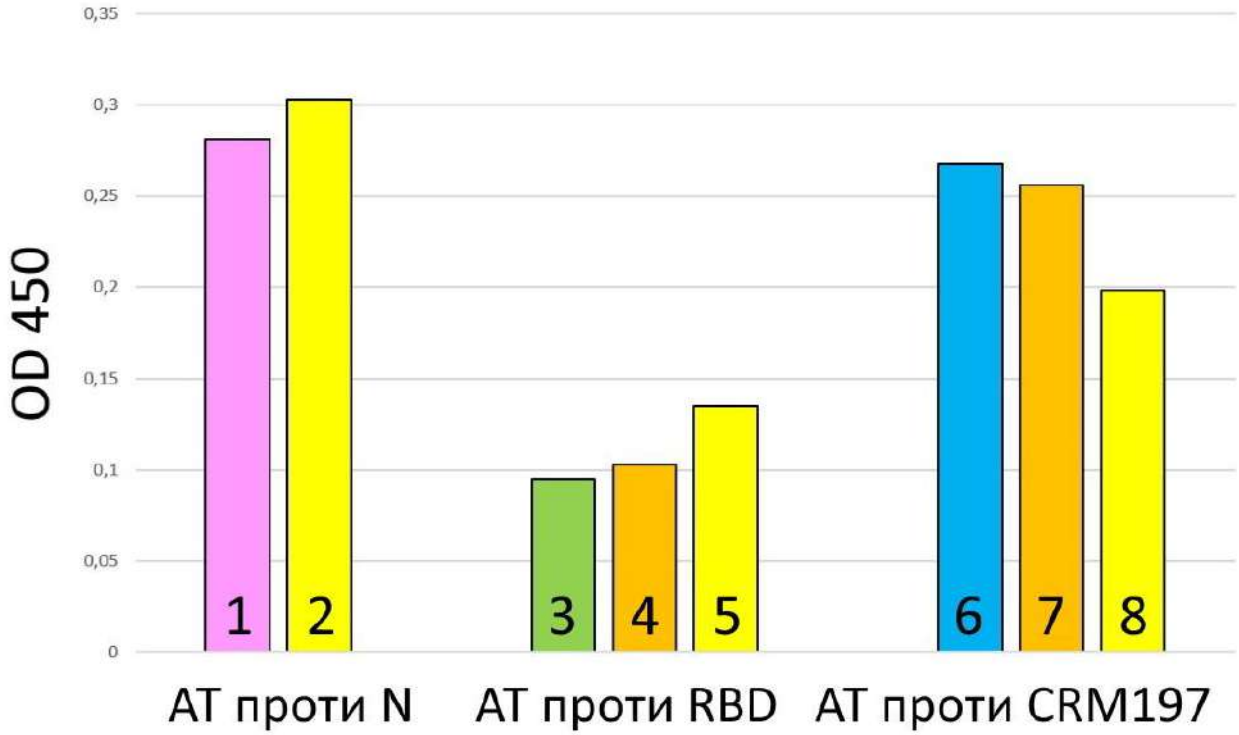

Рисунок 55 – Рівні антитіл IgM проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 (N і RBD), а також носія CRM197 в сироватках крові мишей через тиждень після імунізації антигенами N (1), RBD (3), CRM197 (6), RBD+CRM197 (4, 7), RBD+CRM197+N (2, 5, 8)

Примітка: цифрами в дужках позначено номер стовпчика зліва направо.

6.2 Визначення рівнів антитіл IgG проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 і носія CRM197 у сироватках крові мишей після першої імунізації

Головним захисним фактором потужної вторинної гуморальної імунної відповіді є антитіла IgG. Тому ми також дослідили рівні антитіл IgG проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 і носія CRM197 у сироватках крові мишей через тиждень після імунізації. Результати представлені на рисунку 56. Як видно, найвищі рівні антитіл IgG були виявлені також проти протеїну N (при імунізації тварин протеїном N і RBD+CRM197+N).

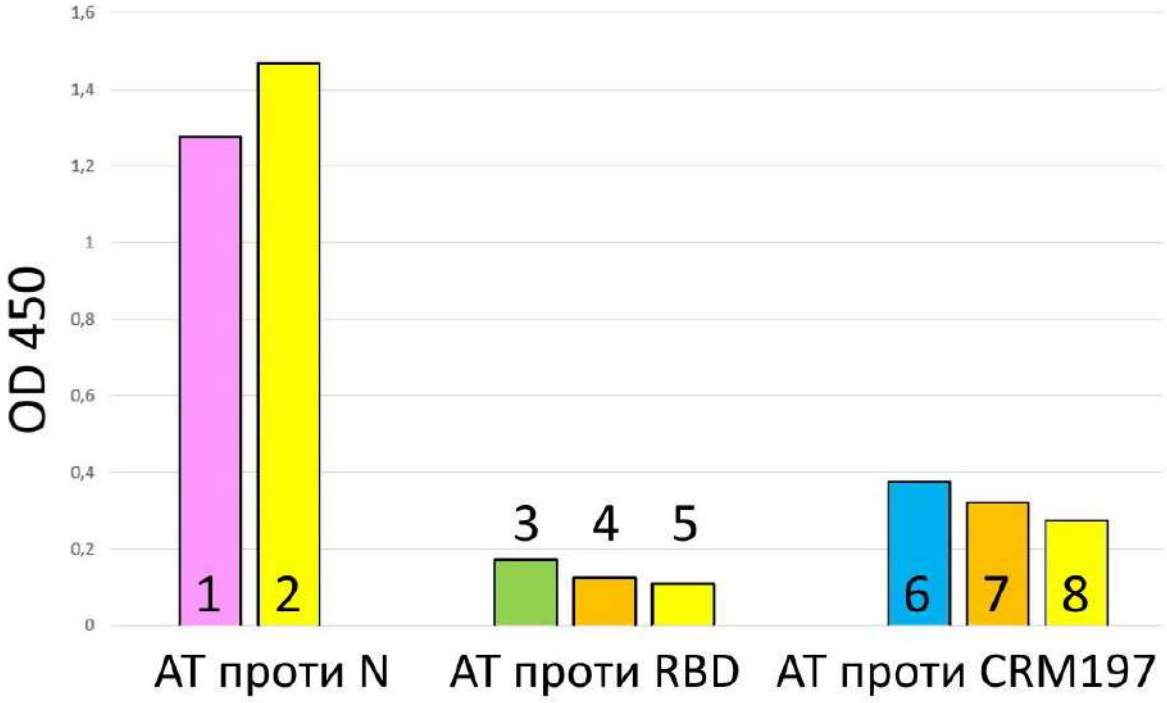

Рисунок 56 – Рівні антитіл IgG проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 (N і RBD), а також носія CRM197 в сироватках крові мишей через тиждень після імунізації антигенами N (1), RBD (3), CRM197 (6), RBD+CRM197 (4, 7), RBD+CRM197+N (2, 5, 8)

Примітка: цифрами в дужках позначено номер стовпчика зліва направо.

Найнижчими були рівні антитіл IgG проти RBD (при імунізації тварин протеїном RBD, RBD+CRM197 і RBD+CRM197+N). У випадку дослідження антитіл проти CRM197 також спостерігався ефект конкуренції антигенів, а невисокий рівень антитіл, ймовірно, пояснюється більш повільним розвитком IgG відповіді.

Слід зазначити, що у проведених дослідженнях рівнів антитіл IgM і IgG найбільш ефективним імуногеном був RBD+CRM197+N, до складу якого входили високоімуногенні протеїни CRM197 і протеїн N SARS-CoV-2.

6.3 Визначення рівнів антитіл IgG проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 і носія CRM197 в сироватках крові мишей після триразової імунізації

Для дослідження імунної відповіді в динаміці та встановлення кількості вакцинацій, необхідних для досягнення максимального рівня антитіл проти коронавірусу SARS-CoV-2, окрім першої імунізації було проведено ще дві додаткових (бустерних) імунізації (період між всіма імунізаціями становив 2 тижні). Результати цих досліджень представлені на рисунку 57.

З рисунку видно, що тенденція, виявлена після першої імунізації, зберіглася: найбільш імуногенними були протеїн N SARS-CoV-2 і дифтерійний токсоїд CRM197. Однак повторні імунізації дозволили значно підвищити рівень антитіл до RBD-домену протеїну S: у випадку використання як антигену RBD-домену рівень анти-RBD антитіл досягнув рівня антитіл проти протеїнів N і CRM197; у випадку використання як антигену злитого кон'югату RBD–CRM197 рівень антитіл проти RBD був нижчий (в тому числі і у суміші з протеїном N). Виявлення невеликої кількості антитіл проти RBD-|домену у сироватках крові мишей, імунізованих протеїном N, ймовірно, пояснюється перехресною реактивністю.

6.4 Визначення рівнів антитіл IgG проти рекомбінантного протеїну RBD SARS-CoV-2 у сироватках крові щурів, імунізованих рекомбінантними протеїнами RBD або RBD–CRM197 (з попередньою імунізацією CRM197)

У більшості людей, імунізованих протидифтерійними вакцинами, є імунітет проти дифтерійного анатоксину, що входить до складу цих вакцин, а отже є імунітет і до дифтерійного токсоїду CRM197, який за антигенними властивостями є дуже подібним до анатоксину.

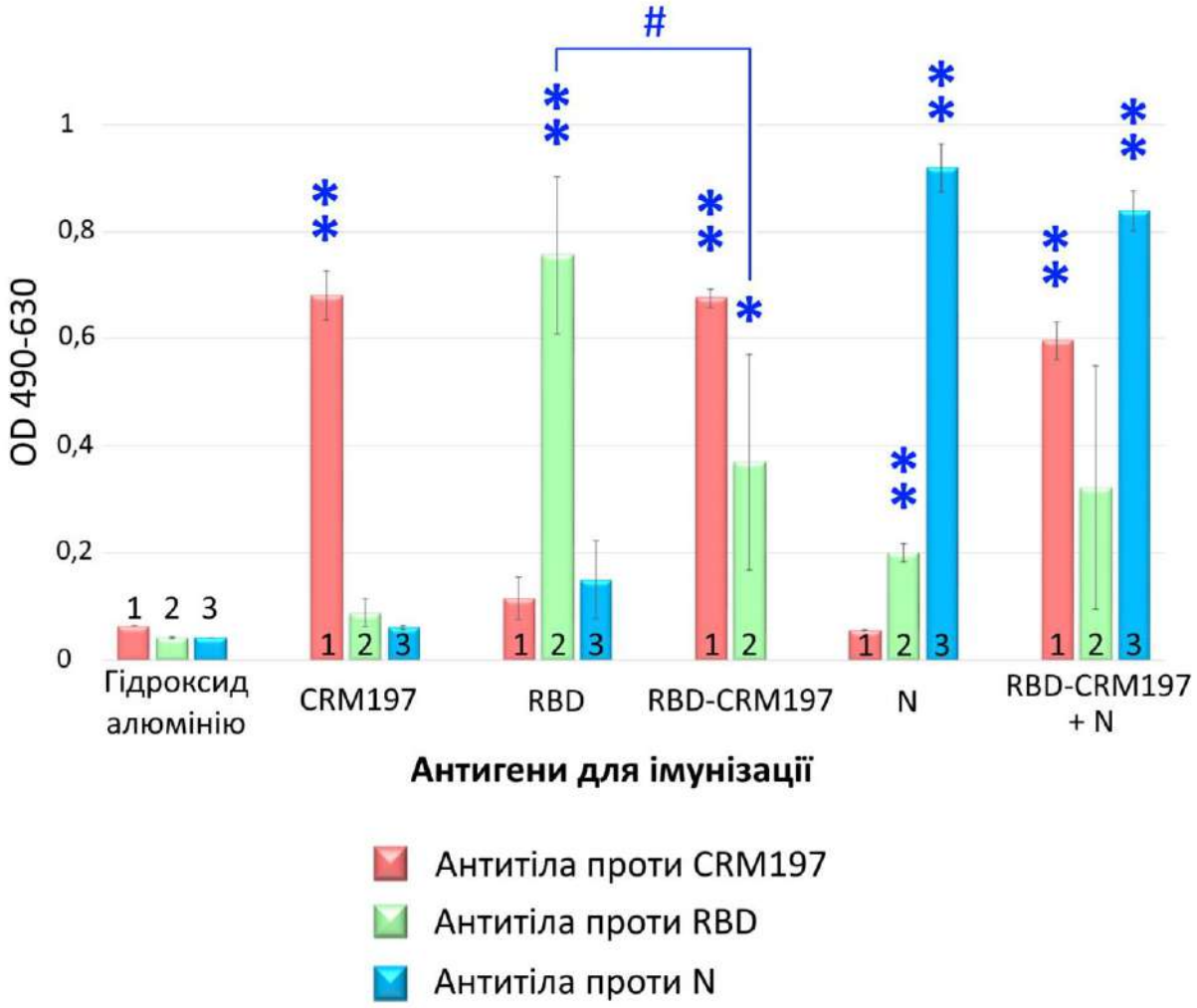

Рисунок 57 – Рівні антитіл IgG проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2: N (3) і RBD (2), а також носія CRM197 (1) в сироватках крові мишей (розведення1:1600) через 2 тижні після триразової імунізації рекомбінантними протеїнами CRM197, RBD, N, злитим кон'югатом RBD–CRM197 і сумішшю рекомбінантних протеїнів RBD–CRM197+N. Статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності: # - $p < 0,05$; по відношенню до контролю: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$.

Важливим завданням є встановити, чи впливатиме наявність імунітету проти CRM197 на утворення антитіл проти RBD-домену протеїну S SARS-CoV-2 у випадку використання у складі вакцини проти COVID19 злитого кон'югату RBD–CRM197.

Для того, щоб дослідити, як впливає попередня імунізація дифтерійним токсоїдом CRM197 на утворення антитіл проти RBD при імунізації злитим кон'югатом RBD–CRM197 провели наступні експерименти з лабораторними щурами, які були розподілені на три групи. Щурів I та II груп двічі імунізували CRM197 з інтервалом у два тижні, а через 8 місяців всіх щурів двічі імунізували з інтервалом у два тижні рекомбінантними протеїнами SARS-CoV-2: щурам I групи вводили RBD, щурам II та III груп вводили RBD–CRM197 (схема імунізації докладно описана у підрозділі 2.19). Результати цих досліджень представлені на рисунку 58.

В результаті не було виявлено статистично достовірних відмінностей між рівнями антитіл проти RBD в сироватках крові щурів, імунізованих за різними схемами. По-перше, це означає, що попередня імунізація CRM197 ніяк не впливає на утворення антитіл проти RBD-домену при імунізації злитим кон'югатом RBD–CRM197, що свідчить про відсутність перепон для можливого використання RBD–CRM197 у складі вакцин. Хоча при використанні RBD–CRM197 без попередньої імунізації CRM197 відмінності між рівнями антитіл після I і II імунізацій були статистично більш значимими. По-друге, експерименти на щурах не виявили статистично достовірної різниці між рівнями антитіл проти RBD у випадках використання як антигенів для імунізації RBD і RBD–CRM197.

Отже, проведені дослідження імуногенності одержаних рекомбінантних протеїнів N і RBD коронавірусу SARS-CoV-2, а також злитого кон'югату RBD–CRM197 показали, що всі три протеїни здатні викликати імунну відповідь проти себе. Однак протеїн N є найбільш імуногенним, оскільки гуморальна імунна відповідь на нього розвивалася швидше і досягала більш високого рівня вже після першої імунізації. При порівнянні імуногенних властивостей протеїнів RBD і RBD–CRM197 виявилося, що RBD був більш ефективним антигеном, ніж RBD–CRM197, в експериментах на мишах і мав однакову ефективність у порівнянні з ним в експериментах на щурах.

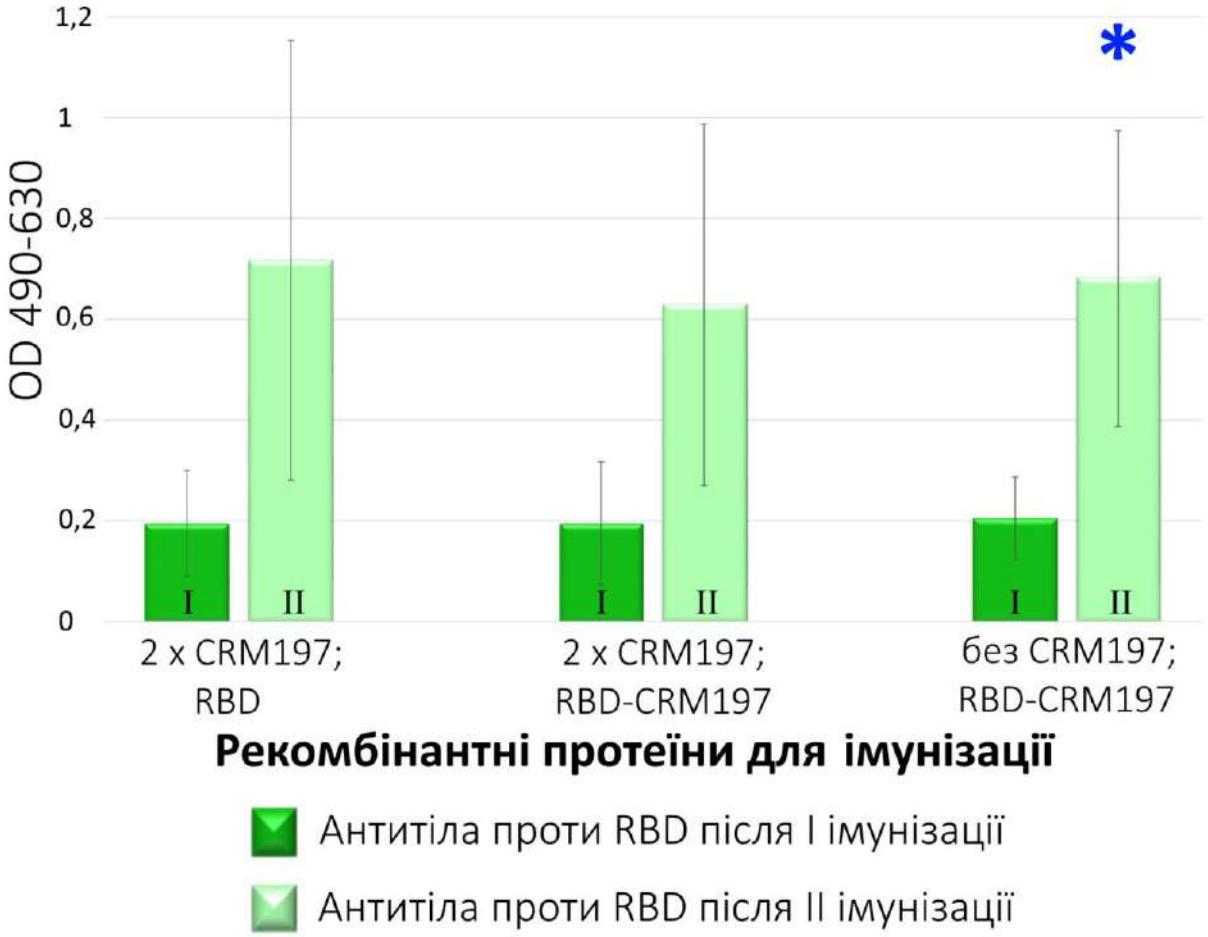

Рисунок 58 – Рівні антитіл IgG проти рекомбінантного протеїну RBD SARS-CoV-2 у сироватках крові щурів після I та II імунізації за різними схемами (зліва направо): 2 попередні імунізації CRM197, а потім 2 імунізації RBD; 2 попередні імунізації CRM197, а потім 2 імунізації RBD–CRM197; без попередніх імунізацій CRM197 2 імунізації RBD–CRM197. * - статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності по відношенню до першої імунізації, $p < 0,05$

7 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ КЛІТИННОЇ ІМУННОЇ ВІДПОВІДІ НА РЕКОМБІНАНТНІ ПРОТЕЇНИ КОРОНАВІРУСУ SARS-COV-2

7.1 Визначення рівнів цитокінів у клітинах селезінки імунізованих мишей за допомогою RT-PCR

Окрім гуморальної імунної відповіді, яка реалізується завдяки синтезу нащадками В-клітин антитіл і допомозі спеціальних клітин – Т-хелперів другого типу (Тх2), важливою складовою імунного захисту є клітинна імунна відповідь, що розвивається за участі цитотоксичних лімфоцитів і Т-хелперів першого типу (Тх1). Тому під час імунізації мишей рекомбінантними протеїнами коронавірусу SARS-CoV-2 було досліджено рівні експресії цитокінів, характерних для Тх1 і Тх2, в клітинах селезінки імунізованих мишей. Крім того, було досліджено рівні експресії індуцибельної NO-синтази – ферменту важливого для розвитку імунної відповіді та запалення, експресія якого індукується в макрофагах і нейтрофілах у відповідь на стимуляцію цитокінами. Для цього було використано метод RT-PCR із застосуванням праймерів до IL12b, IFN-gamma, IL-4 та iNOS миші:

FW IL12b GTGAACCTCACCTGTGACACGC
RV IL12b TGAATACTTCTCATAGTCCCTTTGG

FW IFN-gamma TGCATCTTGGCTTTGCAGCTCTTCCTCATGGC
RV IFN-gamma TGGACCTGGGTTGTTGACCTCAAACTTGGC

FW IL-4 GGGGGGATTTGTTAGCATCTCTTG
RV IL-4 CACTCTCTGTGGTGTTCTTCGTTGC

FW iNOS CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGC
RV iNOS GGCTGTCAGAGAGCCTCGTGGCTTTGG

При імунізації протеїном N в клітинах селезінки спостерігалось підвищення експресії IFN-gamma і меншою мірою IL12b та IL-4 (рисунок 59), мРНК iNOS не було виявлено (рисунок 60). Аналогічні дослідження рівня цитокінів IL12b, IFN-gamma, IL-4 та iNOS у мишей, імунізованих RBD-доменом протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2, показали відсутність стимуляції експресії даних цитокінів (результати RT-PCR не представлені).

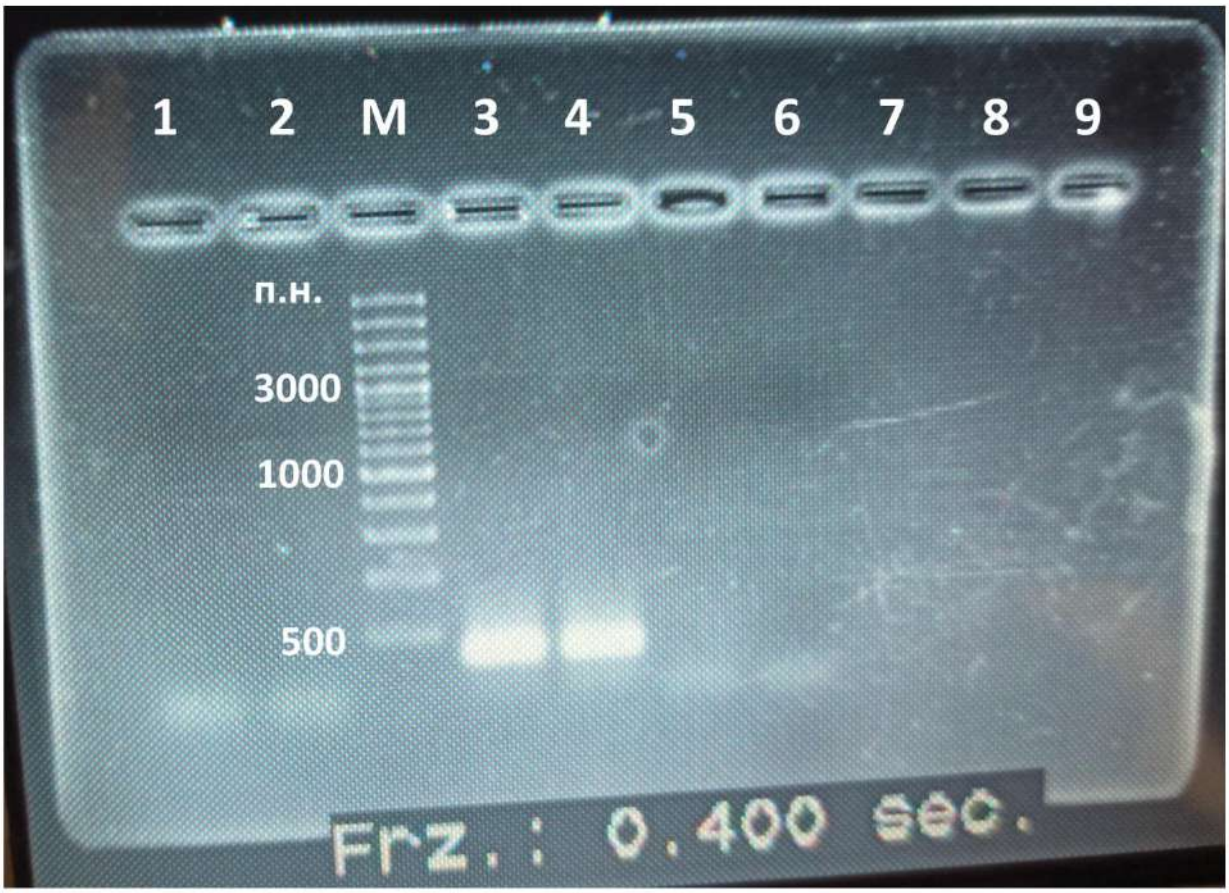

Рисунок 59 – Результати визначення за допомогою RT-PCR рівня цитокінів IL12b, IFN-gamma і IL-4 у клітинах селезінки миші, імунізованої протеїном N коронавірусу SARS-CoV-2: 1, 2 – IL12b; 3, 4 – IFN-gamma; 5, 6 – IL-4; 7, 8, 9 – негативні контролі; M – ДНК-маркери

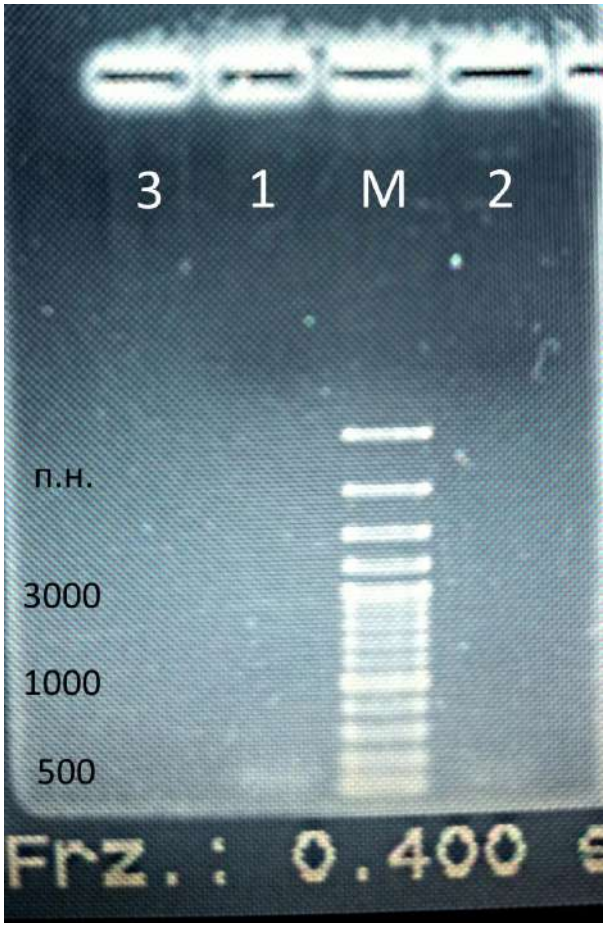

Рисунок 60 – Результати визначення за допомогою RT-PCR рівня індуцибельної NO-синтази (iNOS) у клітинах селезінки миші, імунізованої протеїном N коронавірусу SARS-CoV-2: 1, 2 – iNOS; 3 – негативний контроль; M – ДНК-маркери

7.2 Визначення рівнів хемокінів у сироватках крові імунізованих мишей за допомогою RT-PCR

Окрім цитокінів безпосередній вплив на розвиток клітинної імунної відповіді мають хемокіни. Хемокіни або хемотактичні цитокіни відносяться до великої родини структурно-гомологічних цитокінів, які стимулюють пересування лейкоцитів (в тому числі і Т-лімфоцитів, що відповідають за клітинну імунну відповідь) і регулюють їх міграцію із крові в тканини. За фізіологічними функціями хемокіни поділяють на гомеостатичні та

запалювальні, хоча у деяких з них ці функції перекриваються. Гомеостатичні хемокіни продукуються постійно (тобто є конституційними), синтез запалювальних індукується цитокінами (IL-1b, TNF). Перші визначають рух клітин при нормальних процесах, таких як заселення вторинних лімфоїдних органів наївними лімфоцитами, що мігрували з центральних, здійснення імунологічного нагляду клітинами пам’яті; другі забезпечують рух клітин при запальних процесах і приваблюють у вогнище запалення ефекторні Т-клітини, моноцити, нейтрофіли. Більшість хемокінів продукуються лейкоцитами, а деякі – самими ендотеліоцитами і зв’язуються на поверхні ендотелію сульфатними групами гепарину. Фіксовані на ендотелії хемокіни виконують роль сигнальних молекул – стимулюють лімфоцити до міграції шляхом активації і підвищення авідності інтегринів та визначають її напрямок. Дія всіх хемокінів опосередкована взаємодією з особливими трансмембранними серпентиновими рецепторами, які зустрічаються на поверхні лімфоцитів і пов'язані з G-протеїном [82].

Зараз відомо біля 50 хемокінів, які є поліпептидами з масою 8-10 кДа, молекули яких містять два дисульфідні зв'язки. За положенням цистеїнів у N-кінцевій ділянці молекули хемокіни поділяють на чотири основні групи: XCL, CCL, CXCL і CX3CL (за новою класифікацією). Хемокіни XCL мають один дисульфідний зв’язок, у хемокінів CCL два залишки цистеїну розташовані поруч, у хемокінів CXCL – розділені одним амінокислотним залишком, а у хемокінів CX3CL – розділені трьома залишками. Як правило, до міграції нейтрофілів залучені хемокіни родини CXCL, моноцити мігрують під дією хемокінів CCL, а міграція лімфоцитів залежить від хемокінів CXCL і CCL [83].

Нами було досліджено рівні запальних хемокінів (переважно родини CCL) у сироватках крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами N і RBD SARS-CoV-2, злитим кон’югатом RBD–CRM197, сумішшю рекомбінантних протеїнів RBD–CRM197+N, контрольними антигенами (дифтерійним токсоїдом CRM197 і гідроксидом алюмінію), а також у

сироватках крові двох груп мишей, яким щоденно протягом 28 днів вводили злитий кон'югат RBD–CRM197 або фізіологічний розчин хлориду натрію (під час випробувань на токсичність). Було досліджено рівні шести хемокінів (в дужках вказано їх тривіальні назви): CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL4 (MIP-1β), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3) і GM-CSF (CSF2). Результати цих досліджень представлені на рисунках 61-63.

7.2.1 Дослідження рівнів хемокінів CCL2 і CCL7 (MCP-1 і MCP-3)

Хемокіни CCL2 і CCL7 (MCP-1 і MCP-3) – хемотактичні протеїни моноцитів. CCL2 є найбільш потужним фактором хемотаксису моноцитів в організмі ссавців, здійснює контроль за трафіком клітин із кровотворних органів до епіцентрів запалення. Результат активації рецептора CCR2 може бути як проінфламаторним (опосередкований антиген-презентуючими та Т-клітинами), так і антиінфламаторним (опосередкований регуляторними Т-клітинами). CCL7 є мультипотентним хемокіном, який бере участь у антибактеріальних, противірусних та протигрибкових імунних реакціях, залучаючи лейкоцити до інфікованих тканин. Наприклад, в експериментах на мишах було встановлено, що CCL7 відіграє важливу роль у імунній відповіді проти вірусу Західного Нілу [84]. Останнім часом активно досліджується роль CCL2 і CCL7 у протипухлинному захисті організму [85, 86].

Дослідження рівнів хемокінів CCL2 і CCL7 в сироватках крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами N і RBD SARS-CoV-2, їх комбінаціями та злитим кон'югатом RBD–CRM197, виявило підвищення рівня хемокіну CCL7 у мишей, яким щоденно протягом 28 днів вводили злитий кон'югат RBD–CRM197 (рисунок 61). При разовому введенні цього антигену такого ефекту не спостерігалось. Очевидно, підвищення рівня хемокіну CCL7 в даному випадку пов'язано з напруженою схемою імунізації.

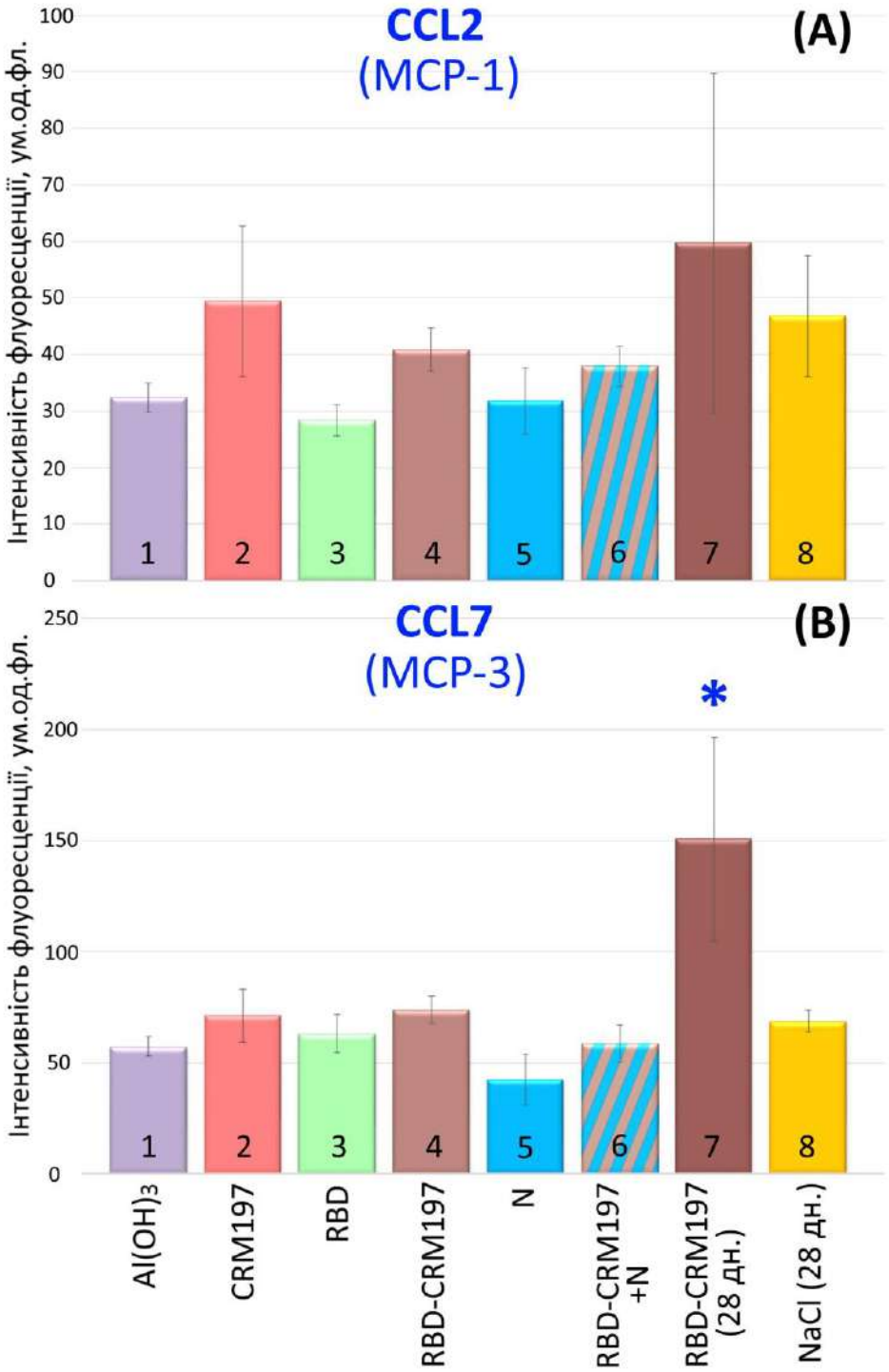

Рисунок 61 – Рівні хемокінів CCL2 (A) та CCL7 (B) у сироватках крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами CRM197 (2), RBD (3), RBD-CRM197 (4), N (5), RBD-CRM197 + N (6), RBD-CRM197 (щоденно протягом 28 днів) (7), а також фізіологічним розчином хлориду натрію (щоденно протягом 28 днів) (8) і гідроксидом алюмінію (1).

* – статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності по відношенню до контролів (1, 8), $p < 0,05$

7.2.2 Дослідження рівнів хемокінів CCL3 і CCL4 (MIP-1α і MIP-1β)

Хемокіни CCL3 і CCL4 (MIP-1α і MIP-1β) – запальні протеїни макрофагів – основні фактори, які продукуються макрофагами, моноцитами та деякими іншими клітинами після їх стимуляції бактеріальним ендотоксином або прозапальними цитокінами, такими як IL-1β. Ці хемокіни мають вирішальне значення для імунної відповіді на інфекцію та запалення. В основному вони сприяють запаленню шляхом стимуляції хемотаксису та трансендотеліальної міграції, але також можуть активувати клітини для вивільнення деяких біологічно активних речовин. Наприклад, ці хемокіни індукують синтез і вивільнення інших прозапальних цитокінів, таких як IL-1, IL-6 і TNF-α з фібробластів і макрофагів [87].

Дослідження рівнів хемокінів CCL3 і CCL4 в сироватках крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами N і RBD SARS-CoV-2, їх комбінаціями та злитим кон'югатом RBD–CRM197, виявило підвищення рівня хемокіну CCL4 у мишей, імунізованих протеїном N SARS-CoV-2 (рисунок 62). Крім того, спостерігались високі рівні хемокіну CCL4 у частини мишей, імунізованих антигенами (2, 4, 7), що містили у своєму складі сильний бактеріальний імуноген CRM197, а також високі рівні хемокіну CCL3 у частини мишей, імунізованих RBD-доменом протеїну S (хоча середні значення цих показників не мали статистично достовірних відмінностей).

7.2.3 Дослідження рівнів хемокінів CCL5 (RANTES) і GM-CSF (CSF2)

Хемокін CCL5 (RANTES) стимулює хемотаксис Т-клітин, еозинофілів і базофілів, відіграє активну роль у залученні лейкоцитів у вогнища запалення. За допомогою цитокінів IL-2 та IFN-γ, які вивільняються Т-клітинами, CCL5 також індукує проліферацію та активацію певних клітин-кілерів (NK). Цей хемокін бере участь у патогенезі більш ніж 100 захворювань людини.

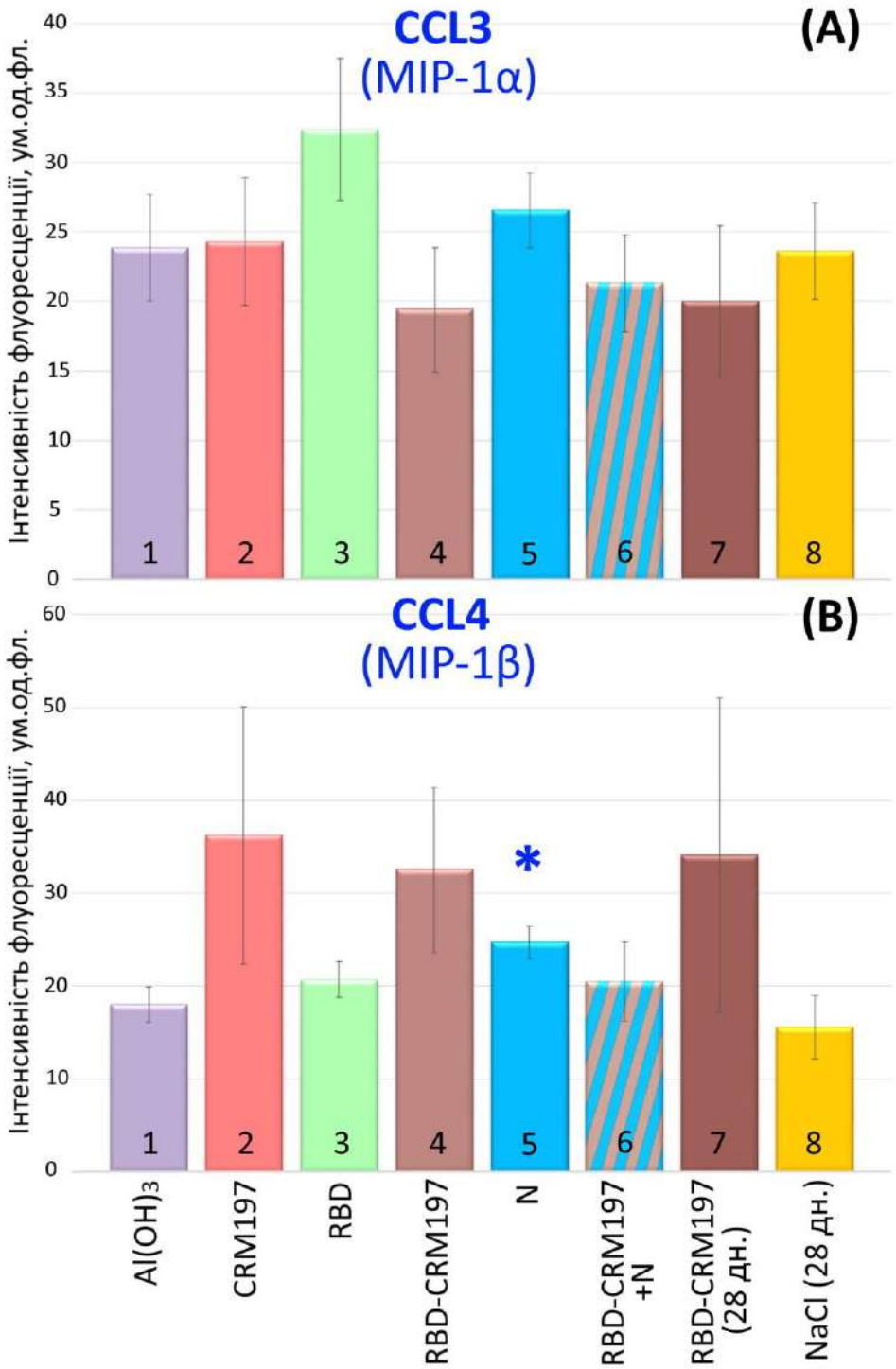

Рисунок 62 – Рівні хемокінів CCL3 (A) та CCL4 (B) у сироватках крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами CRM197 (2), RBD (3), RBD-CRM197 (4), N (5), RBD-CRM197 + N (6), RBD-CRM197 (щоденно протягом 28 днів) (7), а також фізіологічним розчином хлориду натрію (щоденно протягом 28 днів) (8) і гідроксидом алюмінію (1).

* – статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності по відношенню до контролів (1, 8), $p < 0,05$

Разом із спорідненими хемокінами CCL3 та CCL4 він був ідентифікований як природний супресивний фактор вірусу імунодефіциту людини, що секретується активованими CD8+ Т-клітинами та іншими імунними клітинами [88].

Хемокін GM-CSF (CSF2) – колонієстимулюючий фактор гранулоцитів-макрофагів або колонієстимулюючий фактор 2 є фактором росту лейкоцитів, який секретується макрофагами, Т-клітинами та деякими іншими клітинами і впливає на багато типів клітин, в першу чергу, на макрофаги та еозинофіли. GM-CSF стимулює стовбурові клітини до вироблення гранулоцитів (нейтрофілів, еозинофілів і базофілів) і моноцитів. Моноцити виходять з кровообігу і мігрують у тканини, після чого дозрівають у дендритні клітини та макрофаги, які під впливом GM-CSF виробляють прозапальні цитокіни. Таким чином, GM-CSF є частиною імунного/запального каскаду, за допомогою якого активація невеликої кількості макрофагів може швидко призвести до збільшення їх кількості, процесу, важливого для боротьби з інфекцією [89]. GM-CSF розглядають як перспективну мішень для лікування пацієнтів із COVID-19 [90].

Дослідження рівнів хемокінів CCL5 і GM-CSF у сироватках крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами N і RBD SARS-CoV-2, їх комбінаціями та злитим кон’югатом RBD–CRM197, не виявило змін рівня цих хемокінів у порівнянні з контролем (рисунок 63).

7.3 Аналіз одержаних даних у контексті ролі цитокінів і хемокінів у розвитку клітинної та гуморальної імунної відповіді

Гуморальний і клітинний типи імунної відповіді взаємопов'язані, проте існують механізми, що зумовлюють їх поляризацію та деяку автономність. Центральна роль в індукції імунної відповіді того чи іншого типу належить різним субпопуляціям Т-хелперів, що беруть участь в імунних реакціях: Тх1 беруть участь в активації реакцій клітинного типу, а Тх2 - гуморального.

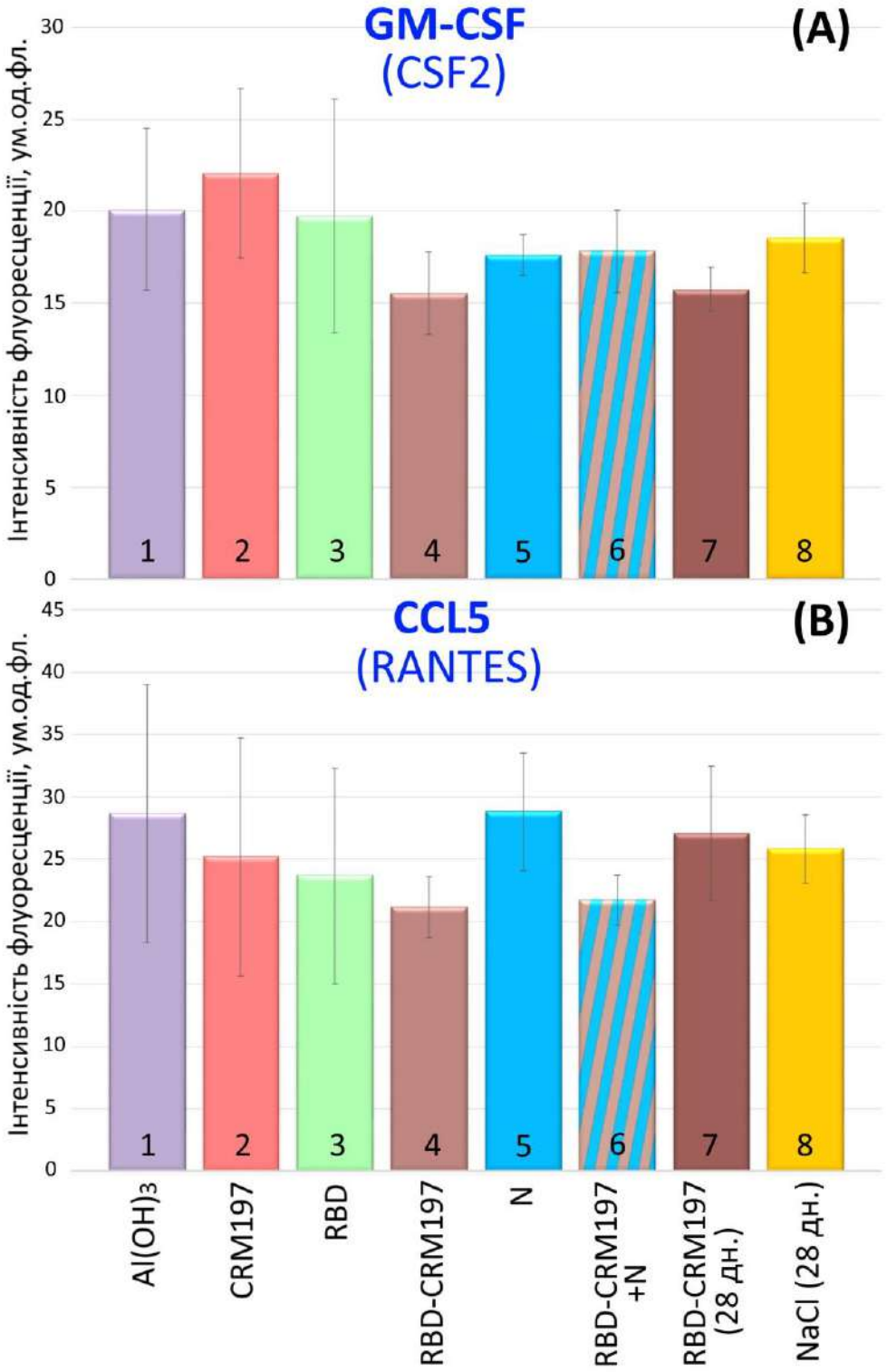

Рисунок 63 – Рівні хемокінів GM-CSF (A) та CCL5 (B) в сироватках крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами CRM197 (2), RBD (3), RBD-CRM197 (4), N (5), RBD-CRM197 + N (6), RBD-CRM197 (щоденно протягом 28 днів) (7), а також фізіологічним розчином хлориду натрію (щоденно протягом 28 днів) (8) і гідроксидом алюмінію (1)

Тх1 і Тх2 відрізняються за набором цитокінів, які вони синтезують. Цей процес називають поляризацією Т-хелперів за цитокіновим профілем. Спочатку наївні Т-клітини (пре-Тх), активуючись на антиген-презентувальних клітинах, перетворюються на Тх0 і продукують лише IL-2, після кількох поділів — IL-4 та IFN-gamma, а після диференціювання на Тх1 і Тх2 — характерний для них набір цитокінів. Тх1 продукують IL-2, IFN-gamma і TNF-alpha, а Тх2 - IL-4, -5, -6, -10, -13. Слід зазначити, що IL-2, -12 і IFN-gamma важливі для активації попередників цитотоксичних лімфоцитів, а IL-4, IL-5, IL-10 - для активації В-клітин та переключення синтезу ізотипів антитіл [83]. Саме тому в дослідженні були використані праймери для маркерних цитокінів Тх1 – IFN-gamma і IL12b, а також Тх2 – IL-4.

Одержані результати свідчать, що протеїн N SARS-CoV-2, який індукував високі рівні антитіл IgM та IgG, виявився здатним активно стимулювати клітинну імунну відповідь. Водночас при імунізації RBD-доменом протеїну S стимуляції клітинної імунної відповіді не спостерігалось, що відповідає результатам дослідження гуморальної імунної відповіді на цей антиген, яке виявило низькі рівні антитіл IgM та IgG проти RBD у сироватках мишей після першої імунізації. Ймовірно, що низька імуногенність RBD-домену обумовлена його низькою молекулярною масою (25 кДа), і для розвитку сильної імунної відповіді на цей антиген необхідно використовувати повторні імунізації та ефективні ад’юванти.

Одержані нами дані узгоджуються із результатами досліджень так званого цитокінового «шторму» у людей, хворих на COVID19, який є причиною розвитку генералізованого запалення і часто призводить до смерті пацієнтів. Аналіз численних досліджень рівнів цитокінів у хворих на COVID19 показав, що у багатьох із них відзначалось зростання рівня IFgamma, а рівні IL12 та IL4 були відносно нижчими. Окрім IFgamma часто спостерігалось зростання TNF-alpha, IL-2, IL-10 і практично у всіх дослідженнях відзначалось зростання рівнів IL-IRA, CXCL10, IL18 та IL6 [91]. Виявлене нами підвищення рівня хемокіну CCL4 у сироватках крові

мишей, імунізованих протеїном N, є свідченням здатності цього антигену активно стимулювати клітини, задіяні у запальних процесах, сприяти виділенню ними цитокінів і завдяки цьому підсилювати клітинну імунну відповідь. Не виключено, що протеїн N, може відігравати певну роль у розвитку цитокінового «шторму».

Подальше вивчення особливостей імунної відповіді на протеїни коронавірусу SARS-CoV-2, а також дослідження їх ролі в патогенезі COVID19, зокрема у розвитку запалення, сприятиме зменшенню ймовірності виникнення побічних реакцій на вакцини проти COVID19, що розробляються.

ВИСНОВКИ ЕТАПУ ІІ
(РОЗДІЛИ 5-7)

1. Одержано рекомбінантні протеїни коронавірусу SARS-CoV-2: протеїн нуклеокапсиду (N) і рецептор-зв'язувальний домен S-протеїну (RBD) та злиті кон'югати протеїну RBD з носієм (дифтерійним токсоїдом CRM197) і зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP).

2. Показано, що при першій імунізації найбільш імуногенним був протеїн N, а найменш імуногенним – RBD-домен протеїну S, що, ймовірно, обумовлено його низькою молекулярною масою. При повторних імунізаціях вдалося досягти високого рівня антитіл проти RBD-домену, однак злитий кон'югат RBD–CRM197 не виявив переваг щодо імуногенності у порівнянні з RBD-доменом протеїну S.

3. Виявлено, що протеїн N на відміну від RBD-домену стимулював підвищення експресії IFN-gamma і меншою мірою IL12b та IL-4 в клітинах селезінки мишей, а також підвищення рівня хемокіну CCL4 в крові мишей, що свідчить про участь протеїну N у запальних процесах і активацію ним насамперед клітинної імунної відповіді.

8 ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАХИСНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АНТИТІЛ ПРОТИ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ SARS-COV-2

8.1 Розроблення методики дослідження захисних властивостей антитіл проти рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2

Рекомбінантні протеїни, що входять до складу вакцини проти COVID19, повинні не тільки викликати потужну імунну відповідь (гуморальну та клітинну), але й стимулювати продукування таких антитіл, які здатні нейтралізувати коронавірус, запобігти його проникненню у клітину. Саме тому переважна більшість розробників включають до складу вакцини проти COVID19 протеїн S коронавірусу SARS-CoV-2 або його фрагменти, що містять RBD-домен, який відповідає за зв'язування з клітинним рецептором ACE2 і проникнення вірусу всередину клітини [92].

Оскільки структура рекомбінантних протеїнів може відрізнятися від структури їх природних аналогів, важливим завданням було перевірити, чи викликають одержані нами рекомбінантні протеїни утворення захисних (нейтралізуючих) антитіл. В ідеалі це можна би було перевірити в експерименті із використанням функціонально повноцінного коронавірусу SARS-CoV-2 і лінії клітин людини, що експресують рецептор ACE2, або трансгенних мишей, клітини яких експресують людський рецептор ACE2 [93]. Однак, в Україні немає лабораторії з відповідним ступенем біологічного захисту, де такі експерименти можна було би провести. Тому для дослідження захисних властивостей антитіл було необхідно розробити безпечну методику, яка би не потребувала використання патогенного коронавірусу. З цією метою використовують підходи, засновані на використанні штучно створених вірусів на основі вірусу імунодефіциту людини типу 1 та вірусу везикулярного стоматиту, які експресують протеїн S коронавірусу SARS-CoV-2 [94].

Ми запропонували більш простий підхід: використати замість повноцінного коронавірусу рекомбінантний злитий протеїн RBD–eGFP, який складається з RBD-домену протеїну S, що зв'язується з рецептором ACE2, і підсиленого зеленого флуоресцентного протеїну eGFP (рисунок 64), що дозволить реєструвати зв'язування з клітинами за допомогою методу протокової цитофлуориметрії. В цьому випадку додавання до клітин сироваток крові імунізованих мишей, які містять захисні антитіла проти рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2, повинно запобігати зв'язуванню злитого кон'югату RBD–eGFP із клітинами.

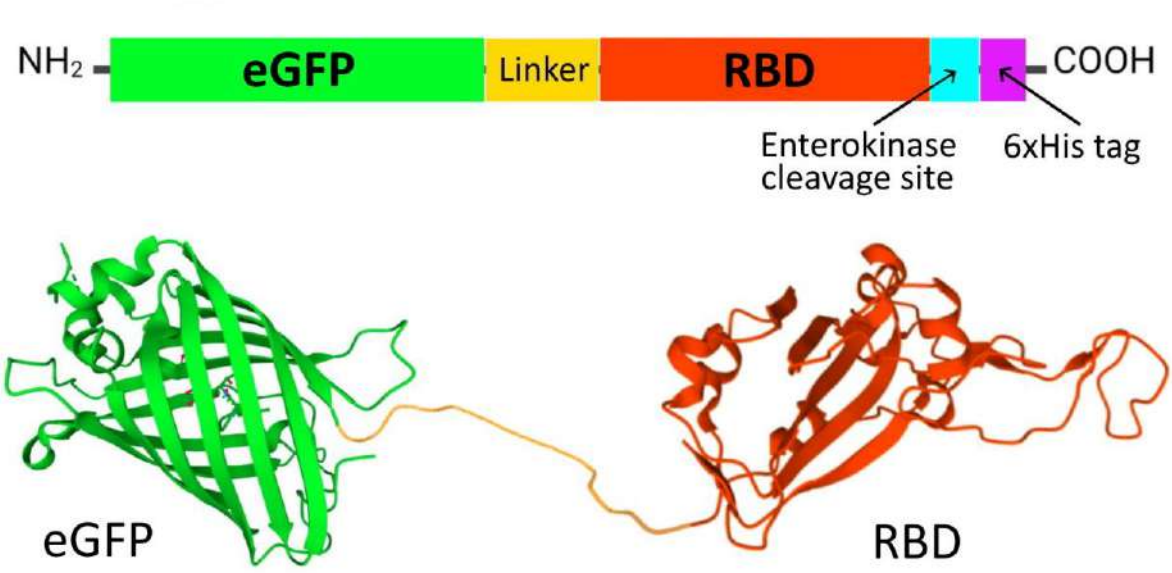

Рисунок 64 – Схема будови злитого кон'югату RBD–eGFP (вгорі) та модель просторової структури RBD–eGFP, відтворена за даними кристалографії RBD-домену (PDB 6M0J) і eGFP (PDB 6OFK) [95]

Схема такого експерименту представлена на рисунку 65, на якому ліворуч показано схему експерименту із використанням патогенного коронавірусу SARS-CoV-2 і вимірюванням його цитотоксичного ефекту, наприклад, за допомогою МТТ-тесту, а праворуч показано схему

експерименту із використанням рекомбінантного злитого кон’югату RBD–eGFP і вимірюванням інтенсивності флуоресценції клітин за допомогою протокової цитофлуориметрії.

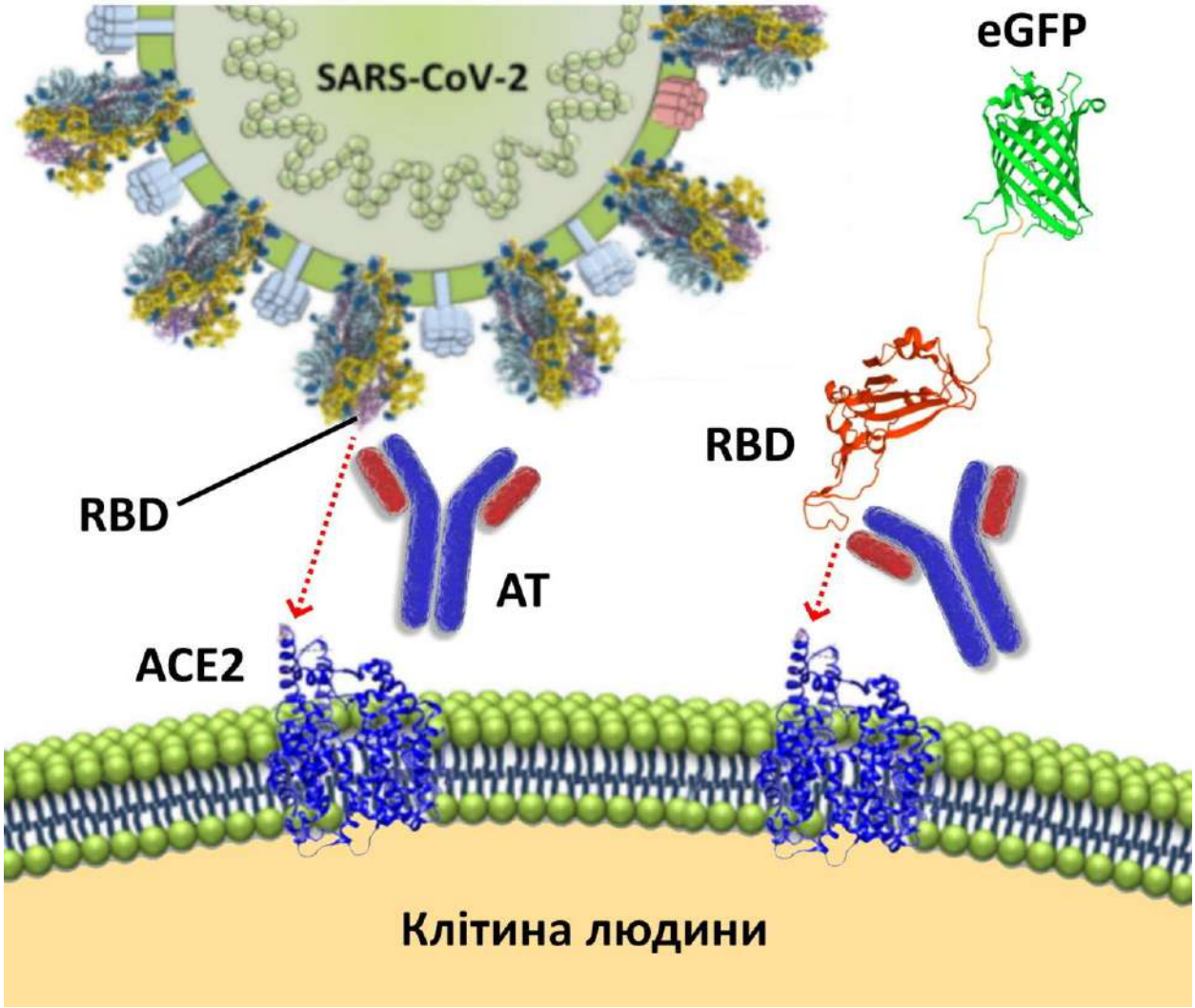

Рисунок 65 – Принцип методики дослідження захисних властивостей антитіл проти рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 із використанням: патогенного коронавірусу SARS-CoV-2 (ліворуч); рекомбінантного злитого кон’югату RBD–eGFP (праворуч)

8.2 Цитофлуориметричне визначення захисних властивостей антитіл проти рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2 із використанням злитого кон'югату RBD–eGFP

Для дослідження захисних властивостей антитіл мишей, імунізованих різними рекомбінантними протеїнами (RBD, RBD–CRM197 і N), ми провели цитофлуориметричне визначення здатності імунних сироваток перешкоджати зв'язуванню рекомбінантного злитого протеїну RBD–eGFP, що містив у своєму складі флуоресцентний протеїн eGFP, із рецептором ACE2 на клітинах лінії Vero. Було висунуто припущення, що додавання до клітин імунної сироватки, що містить поліклональні антитіла проти RBD, призведе до утворення комплексів антиген-антитіло та запобігатиме зв'язуванню RBD-eGFP з клітинними рецепторами. Рекомбінантний злитий кон'югат RBD–eGFP було одержано у клітинах *E. coli* штаму Rosetta (DE3), як описано у підрозділі 5.9. Сироватки крові мишей використовували у розведенні 1:100 в 1% розчині БСА із 0,02% NaN_3. Результати цитофлуориметричного дослідження сироваток крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами RBD, RBD–CRM197 і N представлено відповідно на рисунках 66-68.

На рисунках 66 і 67 помітне зниження інтенсивності флуоресценції RBD–eGFP, зв'язаного з клітинами, у присутності сироваток крові мишей, імунізованих відповідно рекомбінантними протеїнами RBD і RBD-CRM197. Слід зазначити, що цей ефект був менш виражений при використанні сироваток крові мишей, імунізованих RBD-CRM197. Натомість при використанні у досліді сироваток крові мишей, імунізованих N-протеїном, такого ефекту не спостерігалося. Для того, щоб оцінити величину цього зниження інтенсивності флуоресценції і з'ясувати, чи є виявлені відмінності статистично достовірними, було обраховано середні значення медіани інтенсивності флуоресценції для груп сироваток крові мишей, імунізованих

різними рекомбінантними протеїнами. Одержані результати представлені на рисунку 69.

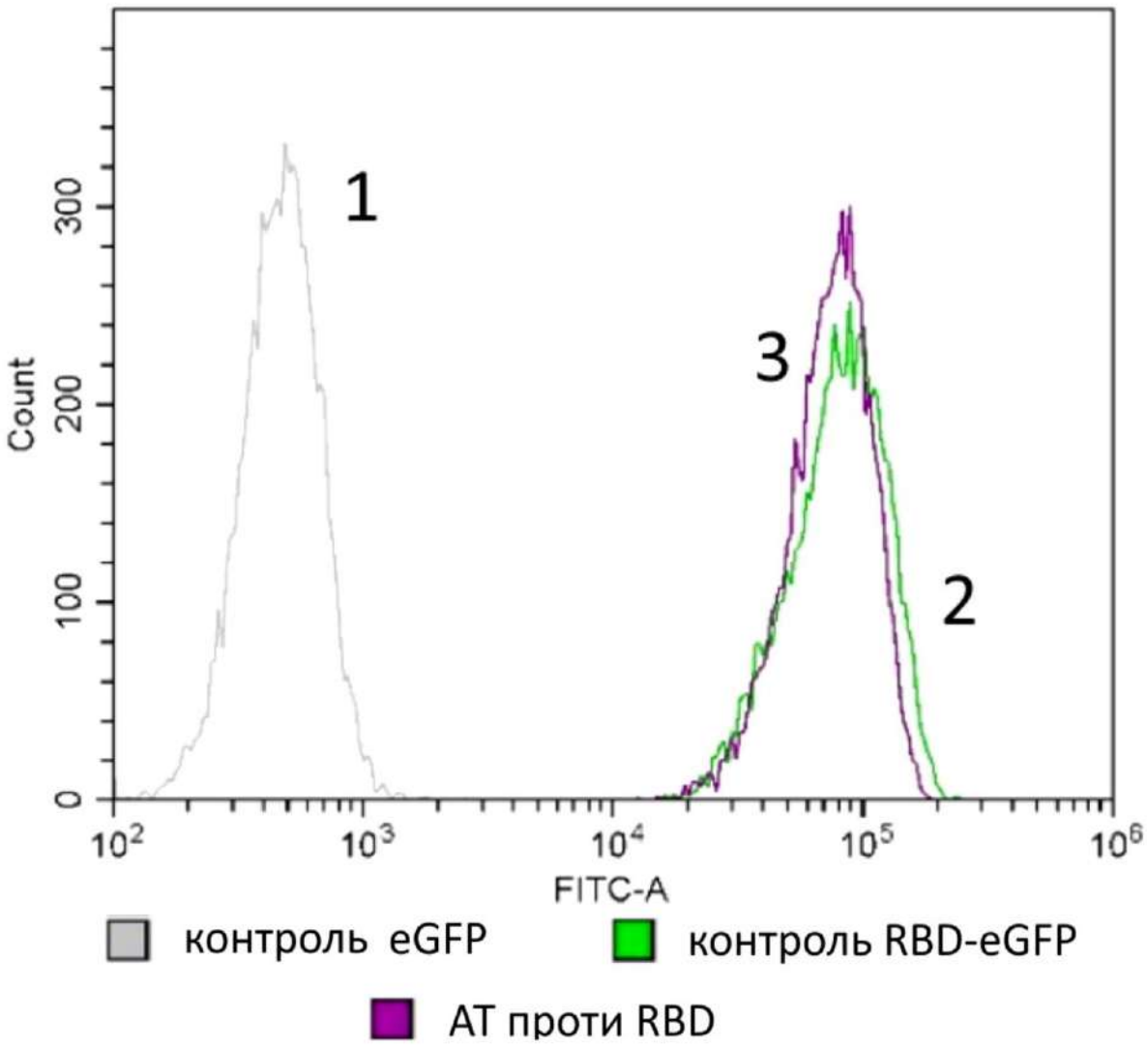

Рисунок 66 – Результати цитофлуориметричного дослідження клітин лінії Vero, інкубованих з рекомбінантним злитим кон'югатом RBD–eGFP у присутності сироватки крові (в розведенні 1:100) миші, імунізованої рекомбінантним RBD-доменом протеїну S SARS-CoV-2. На рисунку позначено: 1 – контроль eGFP; 2 – контроль RBD–eGFP; 3 – RBD–eGFP + антитіла проти протеїну RBD

Як видно з рисунку, у дослідах з використанням сироваток крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами RBD і RBD–CRM197,

середні медіани інтенсивності флуоресценції дійсно відрізнялися в меншу сторону від аналогічного показника контролю (RBD).

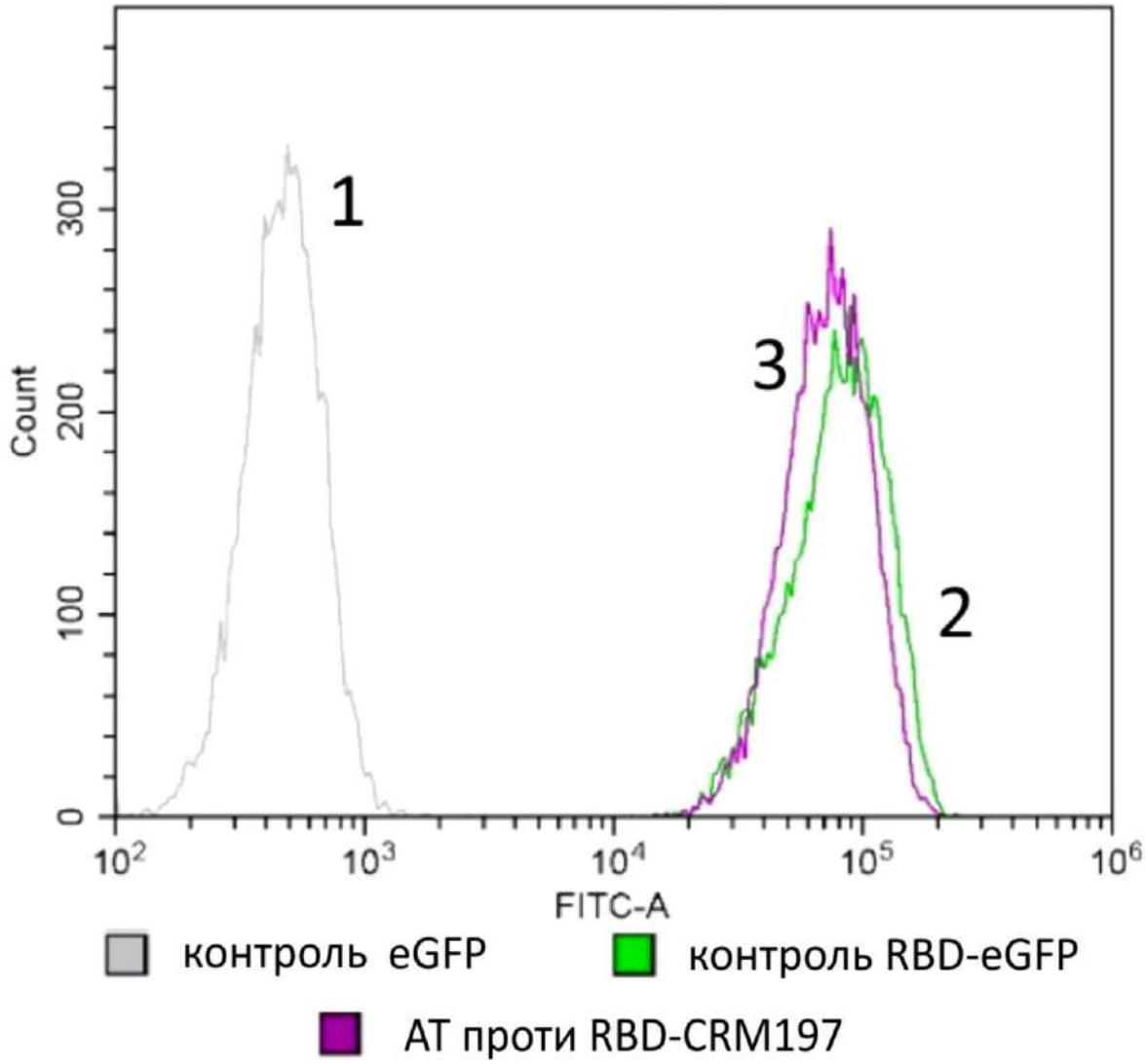

Рисунок 67 – Результати цитофлуориметричного дослідження клітин лінії Vero, інкубованих з рекомбінантним злитим кон'югатом RBD–eGFP у присутності сироватки крові (в розведенні 1:100) миші, імунізованої рекомбінантним злитим кон'югатом RBD–CRM197. На рисунку позначено: 1 – контроль eGFP; 2 – контроль RBD–eGFP; 3 – RBD–eGFP + антитіла проти протеїну RBD–CRM197

При використанні сироваток крові мишей, імунізованих рекомбінантним протеїном N, середня медіана не мала статистично достовірних відмінностей від показника контролю.

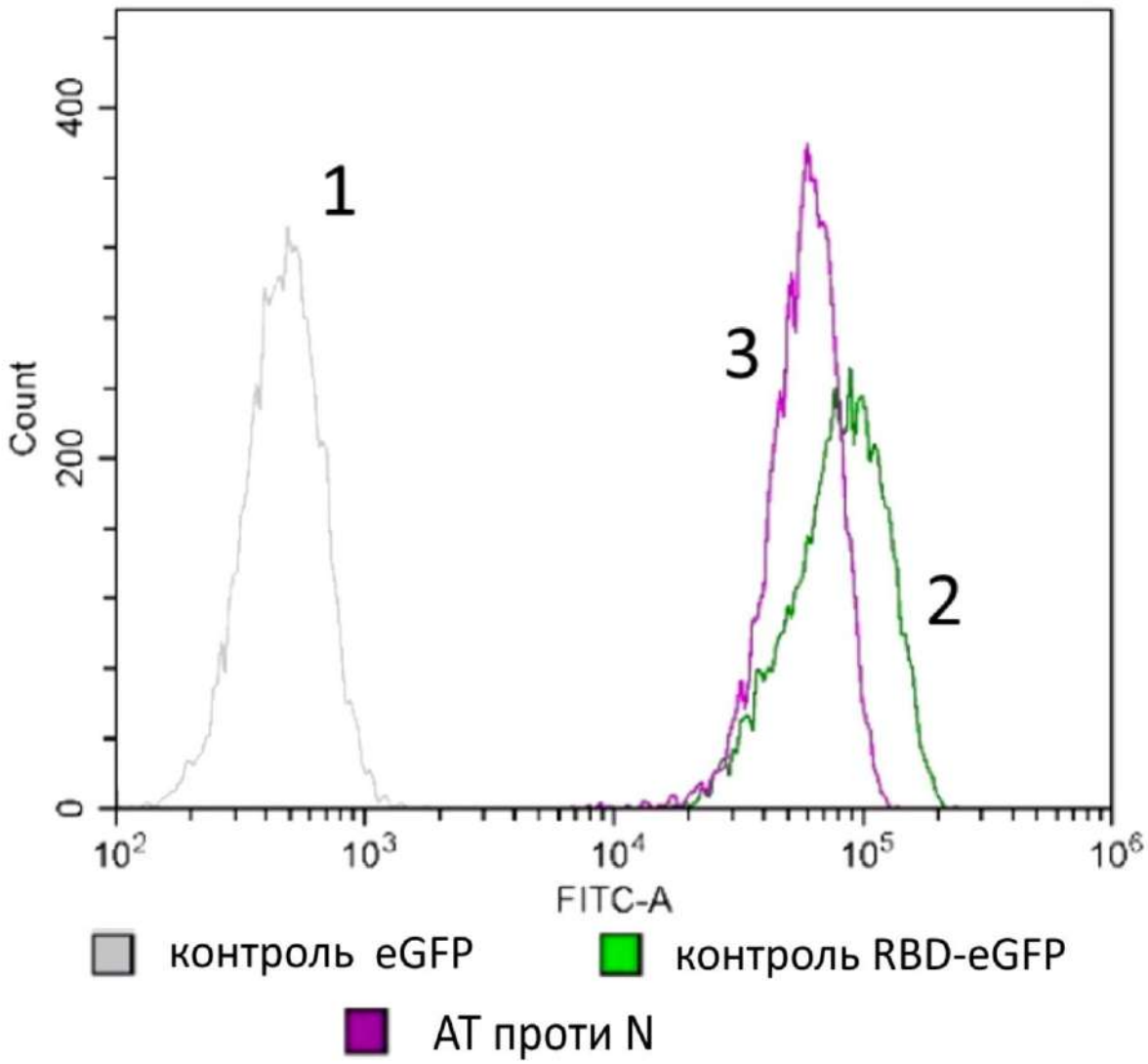

Рисунок 68 – Результати цитофлуориметричного дослідження клітин лінії Vero, інкубованих з рекомбінантним злитим кон'югатом RBD–eGFP у присутності сироватки крові (в розведенні 1:100) миші, імунізованої рекомбінантним протеїном N SARS-CoV-2. На рисунку позначено: 1 – контроль eGFP; 2 – контроль RBD–eGFP; 3 – RBD–eGFP + антитіла проти протеїну N

Отже, в результаті проведених досліджень було показано, що антитіла проти RBD-домену протеїну S і злитого кон'югату RBD–CRM197 володіють більшими захисними властивостями, ніж антитіла проти протеїну N, оскільки вони здатні конкурувати з клітинними рецепторами за зв'язування з RBD–eGFP і, ймовірно, здатні запобігати взаємодії RBD-домену протеїну S

коронавірусу SARS-CoV-2 з цими рецепторами та проникненню вірусу в клітину.

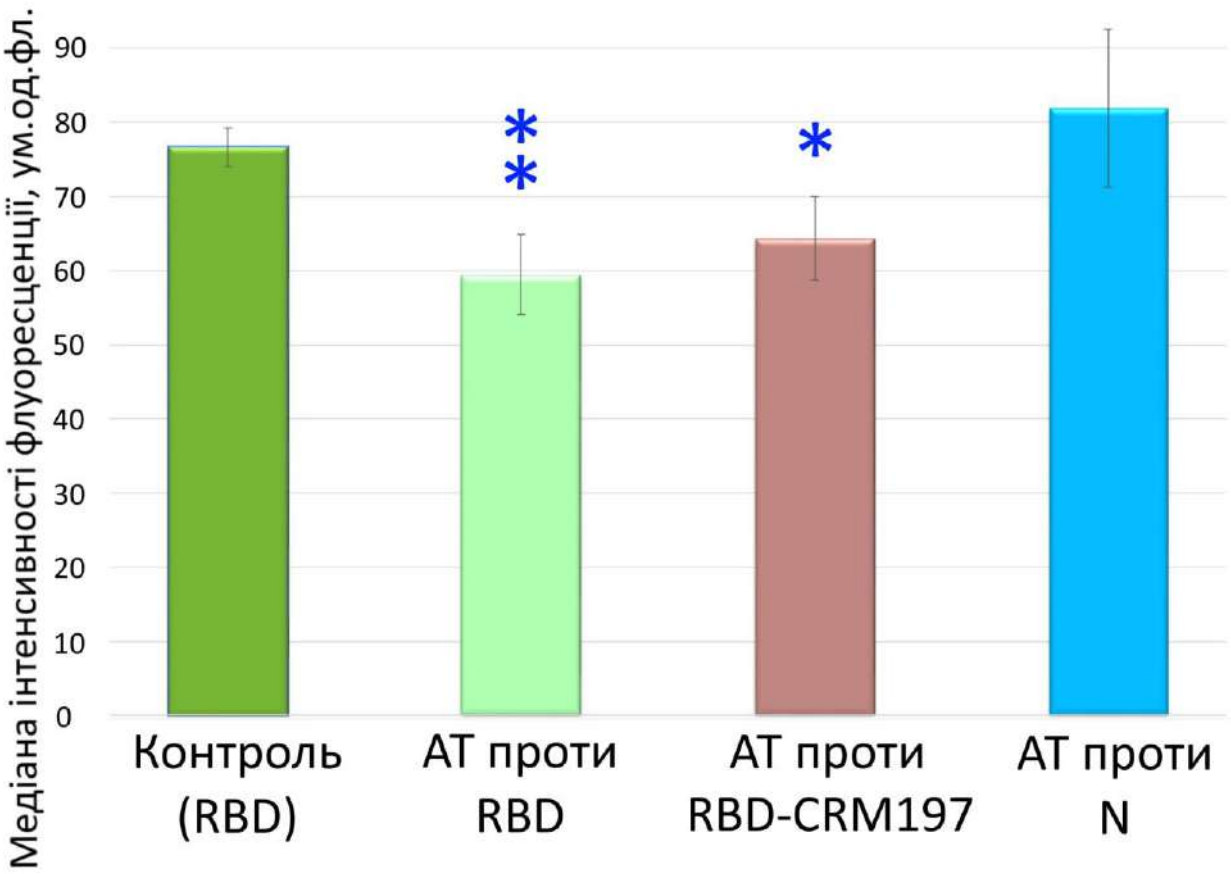

Рисунок 69 – Медіани інтенсивності флуоресценції клітин лінії Vero, інкубованих із рекомбінантним злитим кон'югатом RBD–eGFP у присутності сироваток крові (в розведенні 1:100) мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами RBD, RBD–CRM197 та N. Статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності по відношенню до контролю: * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$

9 ДОСЛІДЖЕННЯ АНТИГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ SARS-COV-2

Взаємодія у імуноензимному аналізі одержаних рекомбінантних протеїнів N, RBD і RBD–CRM197 із сироватками крові імунізованих мишей була продемонстрована у розділі 6. У підрозділі 5.10 наведено результати дослідження відповідності антигенних властивостей одержаних рекомбінантних протеїнів RBD і RBD–CRM197 за допомогою вестерн-блот аналізу та імуноензимного аналізу з використанням поліклональних антитіл кроля до RBD-домену. Ці результати підтвердили, що рекомбінантний RBD-домен має правильну конформацію і розпізнається антитілами кроля, імунізованого зразком рекомбінантного RBD-домену, одержаного в іншій лабораторії.

Однак рекомбінантні протеїни можуть відрізнятись від своїх природних аналогів за антигенними властивостями. В цьому випадку вакцина на основі таких рекомбінантних протеїнів буде викликати синтез антитіл, що не здатні розпізнати антигени природного збудника захворювання, зокрема коронавірусу SARS-CoV-2. Тому важливим завданням було перевірити, чи взаємодіють одержані нами рекомбінантні протеїни N, RBD і RBD–CRM197 з антитілами, специфічними до природних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2. Для виконання цього завдання було досліджено антигенні властивості рекомбінантних протеїнів N, RBD і RBD–CRM197 за допомогою імуноензимного аналізу з використанням сироваток крові людей, що перехворіли на COVID19. Для порівняння були досліджені сироватки крові вакцинованих людей, зокрема співробітників лабораторії, імунізованих вакциною Spikevax (Moderna, США), що містить мРНК протеїну S, складовою частиною якого є RBD-домен, а також сироватки крові вагітних жінок, що не хворіли на COVID19, зібрані до початку пандемії COVID19 (у 2019 р) та під час пандемії (у 2021 р), люб’язно надані ДУ «Інститут педіатрії, акушерства і гінекології НАМН України».

9.1 Дослідження взаємодії рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 з сироватками крові людей, що перехворіли на COVID19

За допомогою імуноензимного аналізу було досліджено 96 сироваток крові людей, які перехворіли на COVID19, щодо рівнів антитіл проти рекомбінантних протеїнів N і RBD коронавірусу SARS-CoV-2 (рисунок 70).

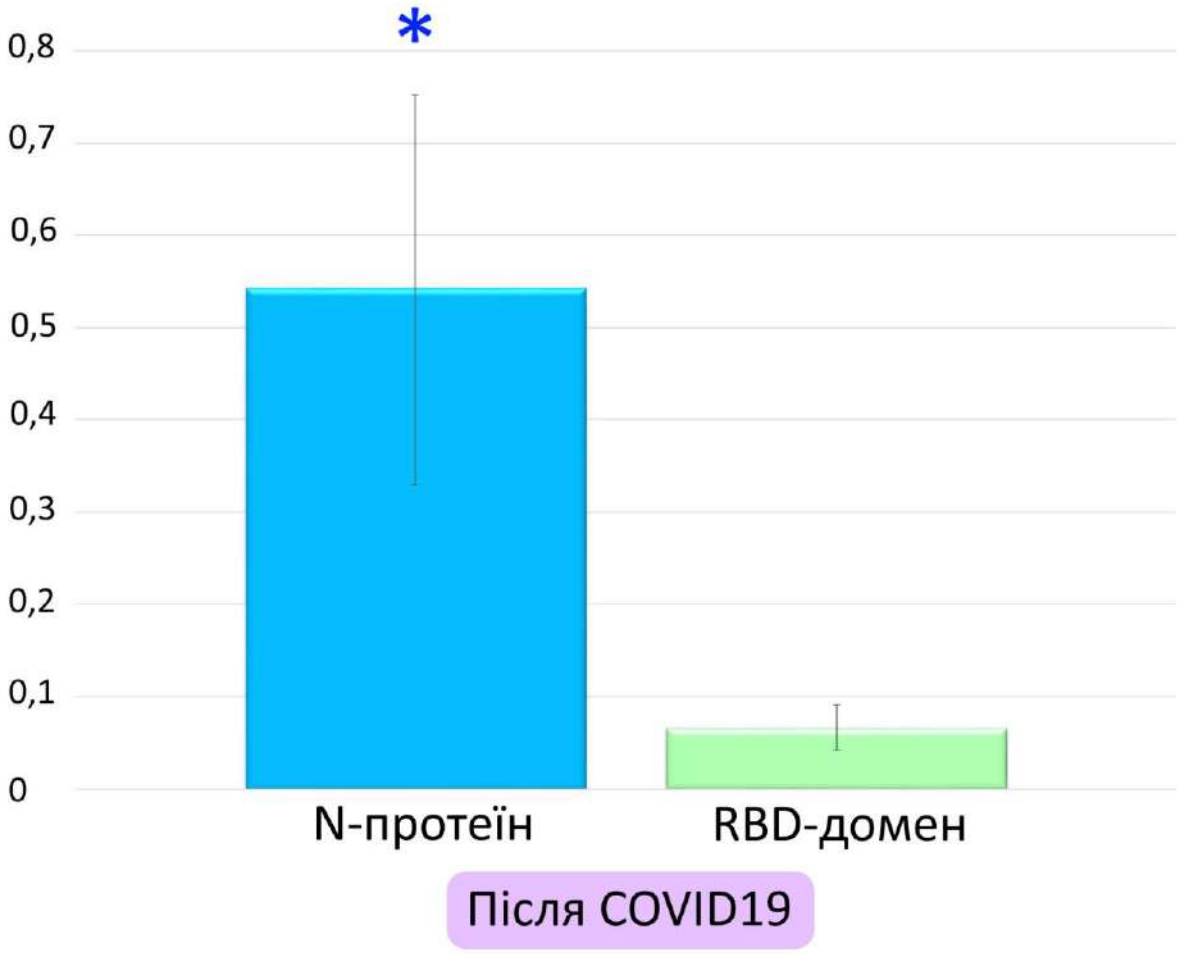

Рисунок 70 – Результати імуноензимного аналізу рівнів антитіл проти рекомбінантних протеїнів N та RBD коронавірусу SARS-CoV-2 у сироватках крові людей, що перехворіли на COVID19. * – статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності по відношенню до рівня антитіл проти RBD-домену ($p < 0,01$)

Як видно з рисунку, у людей, що перехворіли на COVID19, рівень антитіл до протеїну N значно перевищував рівень антитіл до RBD-домену

протеїну S. Це можна пояснити більшим розміром молекули протеїну N, яка містить більшу кількість епітопів для розпізнавання антитілами, а також більшою імуногенністю протеїну N, що підтверджують результати наших досліджень сироваток крові мишей, імунізованих рекомбінантними протеїнами коронавірусу SARS-CoV-2 (розділ 6). З літератури відомо, що антитіла до протеїну N з'являються на ранній стадії коронавірусної інфекції, тому саме цей протеїн використовують для серологічної діагностики COVID19 [96]. Протеїн N міститься всередині капсиду коронавірусу SARS-CoV-2, захищаючи його генетичний матеріал – РНК [73]. І антитіла до протеїну N можуть утворитися лише, якщо організм контактує з незібраними вірусними частками, які потрапляють у міжклітинний простір із зруйнованих клітин під час циклу розмноження вірусу. Саме такий контакт відбувається під час розвитку в організмі коронавірусної інфекції при COVID19.

Для того, щоб оцінити, як впливає злиття дифтерійного токсоїду CRM197 і RBD-домену на антигенні властивості кожної зі складових частин злитого протеїну RBD–CRM197, було досліджено рівні антитіл проти CRM197, RBD–CRM197 і RBD у сироватках крові людей, що перехворіли на COVID19 (рисунок 71). Наявність антитіл проти CRM197 в сироватках крові людей пояснюється вакцинацією проти дифтерії, яка передбачена календарем щеплень і здійснюється шляхом введення комбінованих протидифтерійних вакцин, що містять дифтерійний анатоксин, подібний за антигенними властивостями до дифтерійного токсину, а також до його токсоїдів, зокрема до CRM197 [97].

Як видно з рисунку, рівень антитіл проти CRM197 в сироватках крові людей, що перехворіли на COVID19, був вище, ніж рівні антитіл проти злитого протеїну RBD–CRM197 і RBD-домену. Це свідчить на користь можливого впливу злиття CRM197 і RBD на їх антигенні властивості. Передусім, це стосується дифтерійного токсоїду CRM197, однак можливі зміни конформації його молекули не повинні суттєво впливати на виконання функцій носія.

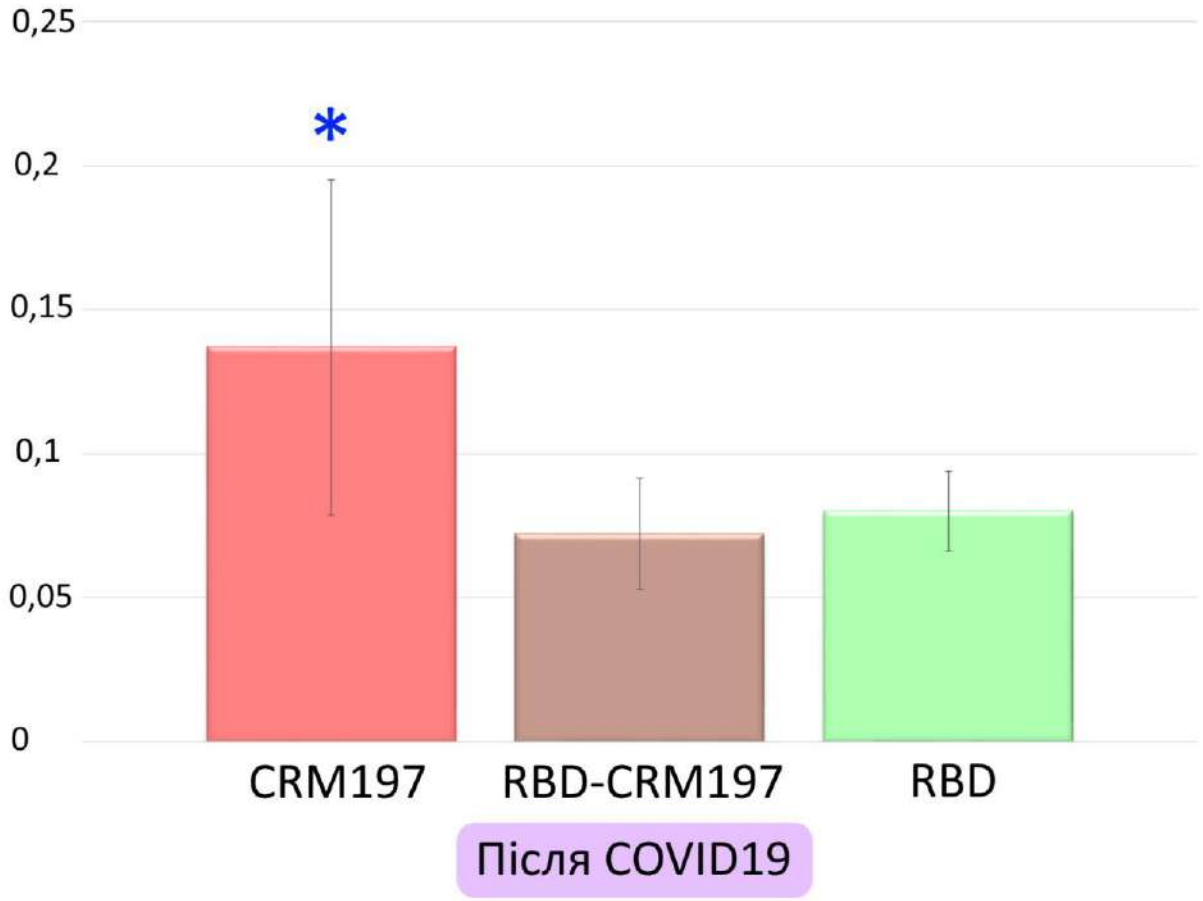

Рисунок 71 – Результати імуноензимного аналізу рівнів антитіл проти рекомбінантних протеїнів CRM197, RBD–CRM197 і RBD у сироватках крові людей, що перехворіли на COVID19. * – статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності по відношенню до інших двох показників ($p < 0,01$)

Тим більше, що наші попередні дослідження антигенних властивостей RBD–CRM197 за допомогою імуноензимного аналізу з використанням високоспецифічних $F(ab')_2$-фрагментів антитіл коня до дифтерійного анатоксину підтвердили відповідність антигенних властивостей CRM197 у складі RBD–CRM197 (підрозділ 5.10).

9.2 Дослідження взаємодії рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 з сироватками крові вагітних жінок, що не хворіли на COVID19, зібраними до та під час пандемії COVID19

Також було досліджено вміст антитіл проти рекомбінантних протеїнів N і RBD коронавірусу SARS-CoV-2 у 89 сироватках крові вагітних жінок, які не хворіли на COVID19, зібраних до початку пандемії COVID19 (у 2019 році) та під час пандемії (у 2021 році) (рисунок 72).

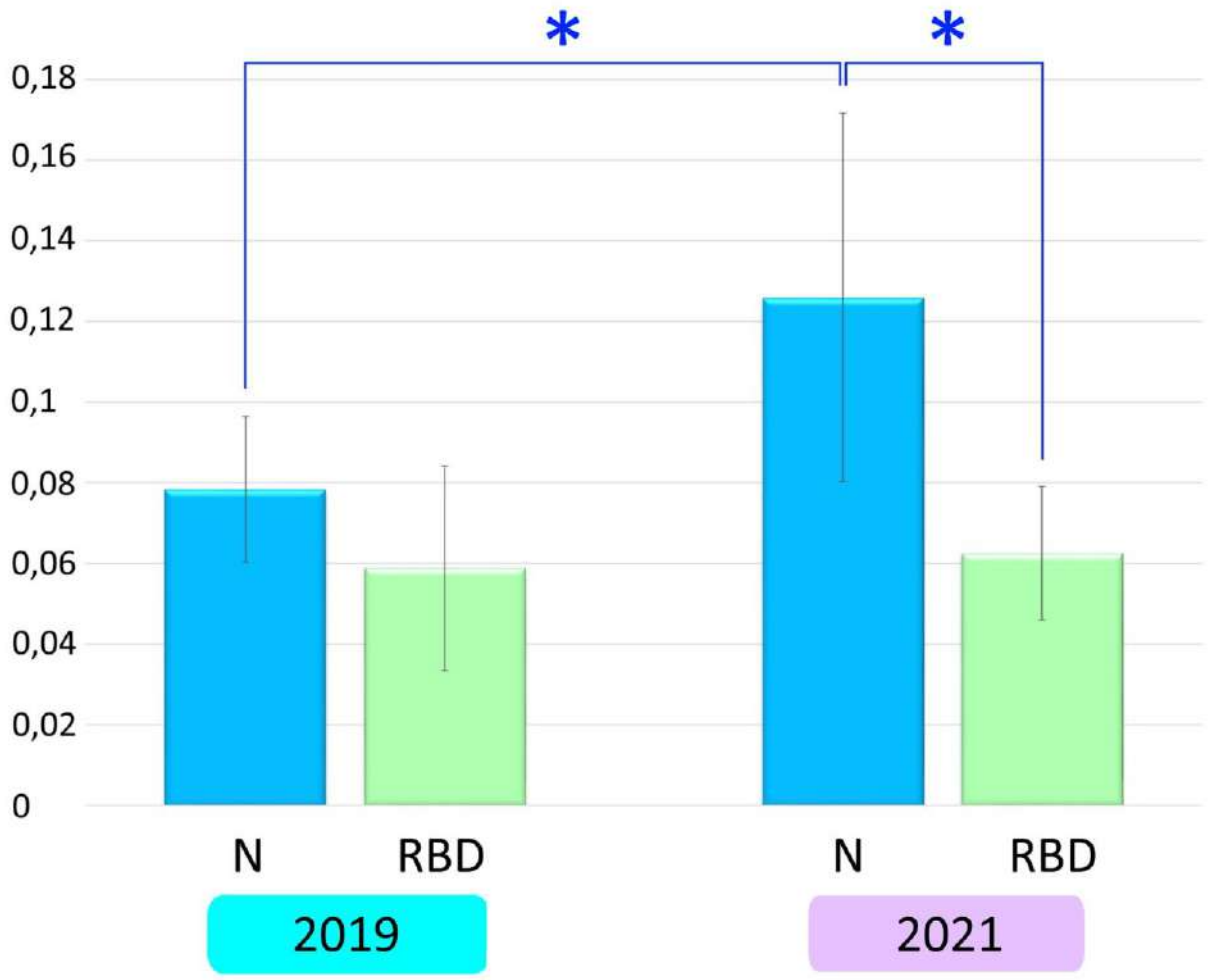

Рисунок 72 – Рівні антитіл проти рекомбінантних протеїнів N і RBD у сироватках крові вагітних жінок, які не хворіли на COVID19, зібраних у 2019 та у 2021 роках. * – статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності ($p < 0,01$)

В цілому рівні антитіл проти рекомбінантних протеїнів N і RBD коронавірусу SARS-CoV-2 були низькими, оскільки жінки не хворіли на COVID19. Однак середній вміст антитіл проти протеїну N був достовірно вищим у сироватках крові, зібраних у 2021 році, ніж у сироватках крові, зібраних у 2019 році. Це підтверджує існування випадків безсимптомного перебігу захворювання на COVID19 [98], під час яких утворюються антитіла проти протеїнів SARS-CoV-2, в першу чергу проти протеїну N.

9.3 Дослідження взаємодії рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 з сироватками крові вакцинованих людей

Деякі вакцини проти COVID19, що знаходяться зараз на стадії розробки чи випробувань, містять протеїн N, але основна частина (в тому числі вакцини проти COVID19, затверджені до використання) націлені на стимуляцію імунної відповіді проти протеїну S або його фрагментів, що містять у своєму складі RBD-домен (через захисні властивості антитіл проти RBD) [92]. Тому ми також дослідили рівні антитіл проти рекомбінантних протеїнів N і RBD у сироватках вакцинованих людей.

Рівні антитіл до рекомбінантних протеїнів N та RBD у сироватках крові 17 людей, що були імунізовані вакциною Spikevax (Moderna, США), в тому числі 7 виконавців проєкту, та у сироватках крові 12 людей, що перехворіли на COVID19, показані на рисунку 73.

Як видно з рисунку, рівні антитіл проти рекомбінантних протеїнів N і RBD у більшості вакцинованих людей є низькими та приблизно однаковими. У деяких вакцинованих осіб, що не хворіли на COVID19, були виявлені антитіла проти протеїну N. Це пояснюється можливістю безсимптомного перебігу коронавірусної інфекції.

Відсутність у вакцинованих осіб імунної відповіді до протеїну N пояснюється його відсутністю у складі вакцин, що зараз використовуються на території України. Низький рівень антитіл проти RBD-домену може бути

обумовлений багатьма причинами: 1) утворенням антитіл переважно до інших ділянок молекули протеїну S, який міститься у складі (або кодується мРНК) вакцин проти COVID19; 2) неефективною або неповною вакцинацією людей; 3) конформаційними відмінностями одержаного нами рекомбінантного RBD-домену і RBD-домену у складі вакцин проти COVID19.

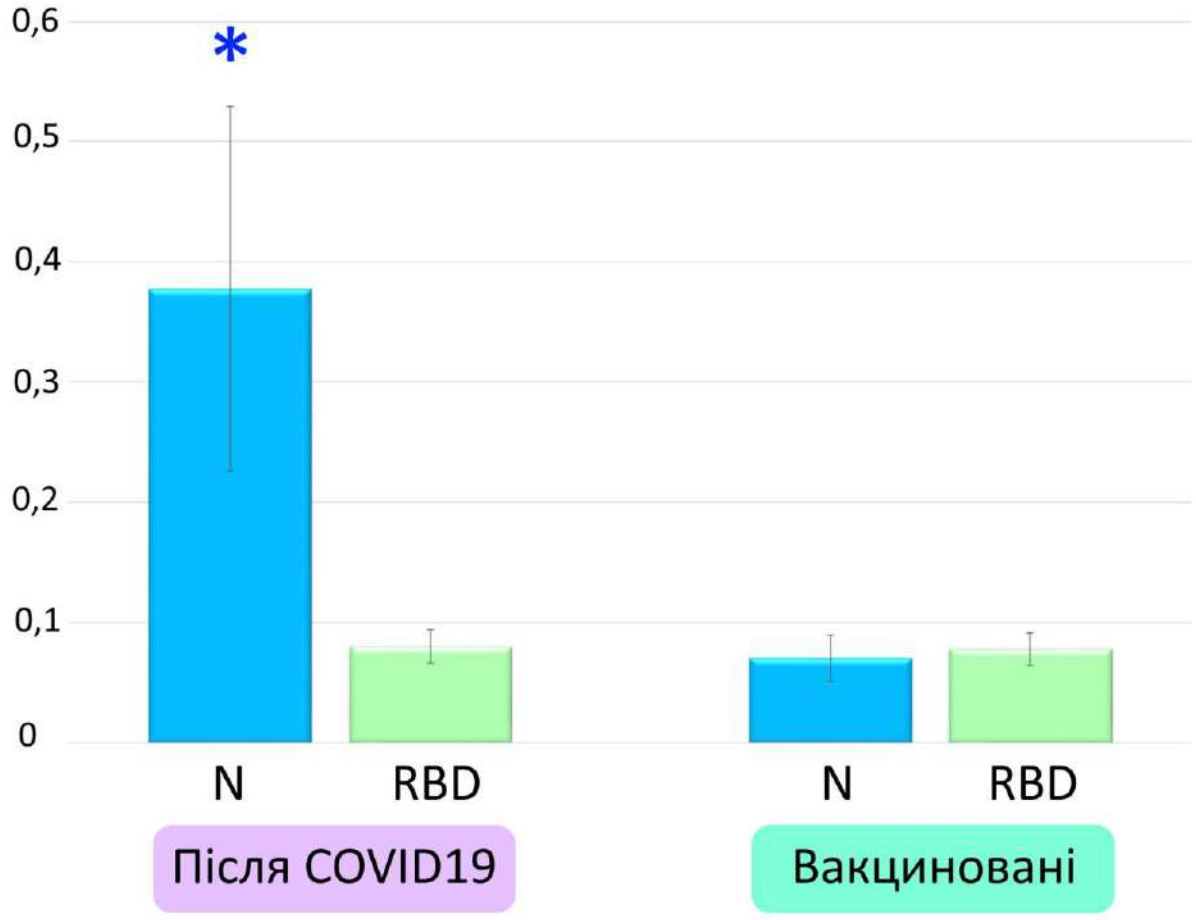

Рисунок 73 – Результати імуноензимного аналізу рівнів антитіл до рекомбінантних протеїнів N та RBD у сироватках крові людей, що були імунізовані вакциною Spikevax (Moderna, США), та у сироватках крові людей, що перехворіли на COVID19. * – статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності по відношенню до інших трьох показників ($p < 0,01$)

Хоча проти останньої гіпотези свідчить той факт, що за даними імуноензимного аналізу та вестерн-блот аналізу одержаний нами RBD-домен

розпізнавався поліклональними антитілами кроля проти RBD-домену, наданими іншою компанією (одержаними проти іншого рекомбінантного варіанту RBD-домену).

Отже, проведені дослідження показали, що за антигенними властивостями одержаний рекомбінантний протеїн N відповідає природному протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2 і може бути використаний у складі вакцин проти COVID19, а також діагностичних тест-систем для виявлення антитіл проти SARS-CoV-2. Оцінювання відповідності антигенних властивостей рекомбінантного протеїну RBD (у тому числі, RBD у складі злитого кон'югату RBD–CRM197) є ускладненим через низький вміст антитіл до RBD у сироватках крові, що досліджувались.

10 РОЗРОБКА ОПТИМАЛЬНОГО СКЛАДУ ВАКЦИННОГО ПРЕПАРАТУ ПРОТИ COVID19 І ПРОВЕДЕННЯ ДОКЛІНІЧНИХ ВИПРОБУВАНЬ ЙОГО ДОСЛІДНОГО ЗРАЗКА

10.1 Розроблення оптимального складу вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2

Основними компонентами вакцин є антигени і ад'юванти, а допоміжними – консерванти, стабілізатори, детергенти та розчинники. При створенні дослідного зразка вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 ми обрали речовини з кожної категорії складників, спираючись переважно на одержані нами результати досліджень, дані літератури, а також досвід практичного використання цих речовин у складі інших вакцин.

10.1.1 Вибір антигену для вакцини проти COVID19

Активним компонентом вакцини є антиген, що індукує імунну відповідь проти себе (наприклад, протеїн), або носій інформації (РНК або ДНК) для створення антигену. Антигеном можуть бути окремі протеїни чи олігосахариди патогенного мікроорганізму або це може бути весь мікроорганізм в ослабленій або інактивованій формі [99].

Ця робота була спрямована на створення вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2. Ми одержали і дослідили три рекомбінантних протеїни – ймовірні кандидати на роль антигену: протеїн N, RBD-домен протеїну S і злитий кон'югат RBD–CRM197. Властивості цих рекомбінантних протеїнів представлені у таблиці 7. Оцінювання проводилось за чотирма показниками: імуногенність, протективність, відповідність за антигенними властивостями природним протеїнам SARS-CoV-2 та стабільність конформації молекули.

Аналіз результатів наших попередніх досліджень дозволив оцінити кожний рекомбінантний протеїн за вищезгаданими показниками та визначити, що найбільш оптимальним виявилось використання злитого кон'югату RBD–CRM197 (рисунок 74) як антигену у складі вакцини проти COVID19.

Таблиця 7 – Властивості одержаних рекомбінантних протеїнів, що можуть бути включені до складу вакцини проти COVID19

Показник	**Одержані рекомбінантні протеїни**		
Скорочена назва протеїну	**N**	**RBD**	**RBD–CRM197**
Молекулярна маса	**48 кДа**	**25 кДа**	**83 кДа**
Імуногенність	**+ + +**	**+ +**	**+ +**
Протективність	**–**	**+ + +**	**+ + +**
Відповідність за антигенними властивостями природним протеїнам SARS-CoV-2	**+ + +**	**+ +**	**+ +**
Стабільність конформації молекули	**+ +**	**+**	**+ +**
Підсумкова оцінка	**8 +**	**8 +**	**9 +**

Не зважаючи на те, що протеїн N є найбільш імуногенним і викликає сильну гуморальну і клітинну імунну відповідь, антитіла проти нього не здатні запобігти проникненню вірусу в клітину, а здатність цього протеїну стимулювати потужні імунні і запальні реакції, ймовірно, може сприяти виникненню «цитокінового шторму» і погіршенню стану хворих на COVID19 [100].

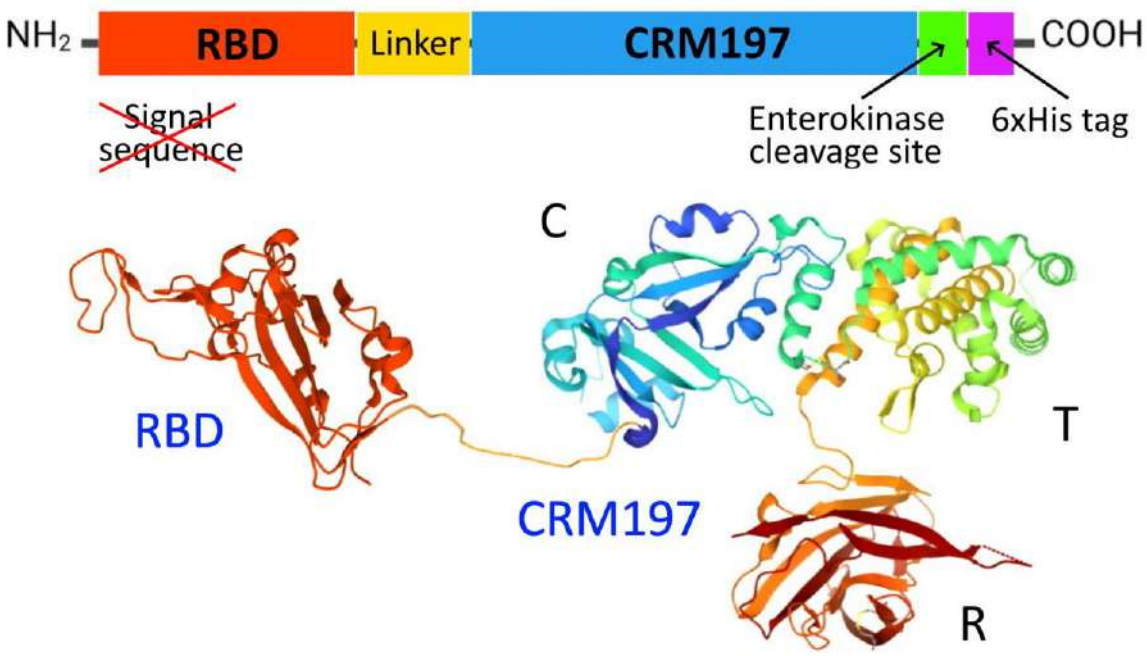

Рисунок 74 – Схема будови злитого кон'югату RBD–CRM197 (вгорі) та модель просторової структури RBD–CRM197, відтворена за даними кристалографії RBD-домену (PDB 6M0J) і CRM197 (PDB 4AE0) [95]. C – каталітичний домен, T – трансмембранний домен, R – рецептор-зв'язувальний домен CRM197

10.1.2 Вибір ад'юванту для вакцини проти COVID19

Деякі вакцини окрім антигену також містять ад'юванти. В нашому випадку ад'ювант обов'язково повинен бути включений до складу вакцини, оскільки відомо, що вакцини на основі рекомбінантних протеїнів (субодиничні вакцини) є слабо-імуногенними і потребують наявності речовин (ад'ювантів), здатних підсилити імунну реакцію на вакцину [101],

зокрема шляхом більш тривалого утримання вакцини у місці ін’єкції або за рахунок стимулювання місцевих імунних клітин.

Існує багато різновидів ад’ювантів і постійно створюються нові, оскільки ідеального і універсального ад’юванту поки що не винайдено. Оскільки у технічному завданні, календарному плані та кошторисі проєкту не передбачена можливість тестування різних варіантів непротеїнових компонентів дослідного зразка, ми обирали компоненти, що широко використовуються у складі вакцин, безпечність і ефективність яких підтверджена на практиці. Так, було вирішено використовувати як ад’ювант гідроксид алюмінію, що широко використовується (як і солі алюмінію, наприклад, фосфат алюмінію або сульфат калію-алюмінію) завдяки своїй ефективності, дешевизні і безпечності. Антивакцинатори використовували деякі поодинокі публікації про шкоду сполук алюмінію для обґрунтування протестів проти вакцинації. Однак було продемонстровано, що алюміній не викликає жодних довготривалих проблем зі здоров’ям, і люди регулярно споживають алюміній зі звичайною їжею та напоями [102].

10.1.3 Вибір консерванту для вакцини проти COVID19

Консерванти запобігають контамінації вакцини після відкриття флакона, якщо вона використовується більш ніж для однієї людини. Деякі вакцини не містять консервантів, оскільки вони зберігаються у однодозових флаконах, які викидаються після введення однієї дози. Для підвищення безпечності вакцини ми також вирішили не включати консервант до складу вакцини і фасувати кожну дозу в стерильні однодозові флакони.

10.1.4 Вибір стабілізатору для вакцини проти COVID19

Стабілізатори перешкоджають перебігу хімічних реакцій між компонентами вакцини. Як стабілізатори можуть використовуватись цукри (лактоза, сахароза), амінокислоти (гліцин, аланін), протеїни (желатин, рекомбінантний альбумін людини тощо) [103]. Цукри здатні викликати

небажані реакції у хворих на діабет, протеїни можуть проявляти небажану імуногенність і викликати алергічні реакції. Тому як стабілізатор було обрано амінокислоту аланін.

10.1.5 Вибір детергенту для вакцини проти COVID19

Детергенти (поверхнево-активні речовини) запобігають злипанню компонентів вакцини, їх прилипанню до флакона, утворенню осаду, підтримують гомогенність суміші. З цією метою детергенти також часто використовуються у харчових продуктах.

Як детергент було вирішено використовувати Тритон Х-100, який широко використовується тривалий час, а також довів свою ефективність і безпечність для здоров'я людини.

10.1.6 Вибір розчинника для вакцини проти COVID19

Розчинник використовується для розведення вакцини до правильної концентрації перед її використанням. Найчастіше як розчинник використовується стерильна вода або фізіологічний сольовий розчин. Для підтримання правильної конформації рекомбінантного протеїну RBD–CRM197 ми вирішили використовувати стерильний фізіологічний розчин хлориду натрію.

Концентрації обраних компонентів дослідного зразка вакцини проти COVID-19 наведені у таблиці 8.

Таблиця 8 – Склад розробленого дослідного зразка вакцини проти COVID19

№ з/п	**Компонент вакцини проти COVID19**	**Назва речовини**	**Концентрація**
1.	Антиген	RBD–CRM197 Рекомбінантний злитий	100 мкг/мл (20 мкг/тварину)

		кон’югат RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 з дифтерійним токсоїдом CRM197	
2.	Ад’ювант	Гідроксид алюмінію	50 % (100 мкл /тварину)
3.	Консервант	Відсутній (кожна доза вакцини фасується у стерильні флакони)	----------
4.	Стабілізатор	Аргінін	3 %
5.	Детергент	Тритон Х-100	0,05 %
6.	Розчин для розведення	Натрію хлорид	0,9%
		Вода для ін’єкцій	100 мкл/тварину

Примітка: * – склад компонентів дослідного зразка вакцини розраховано для введення мишам під час доклінічних випробувань.

10.2 Результати доклінічних випробувань на тваринах дослідного зразка вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантного злитого кон’югату RBD–CRM197

Доклінічні випробування на тваринах одержаного дослідного зразка вакцини проти COVID19 включали вивчення імуногенності та місцевої переносимості, як і передбачалось Технічним завданням (розділ «Методологія досліджень») Договору до проєкту з виконання наукових досліджень і розробок на 2021 рік, а також додатково включали дослідження

гострої та хронічної токсичності дослідного зразка. Тести проводили на мишах BALB/c віком 2-3 місяці, з початковою масою 22-24 г у відповідності до вимог регіонального Комітету з етики роботи з піддослідними тваринами та з дотриманням правил роботи з лабораторними тваринами, узгодженими з положеннями директиви Ради Європейського Союзу 86/609/ЕС «Про зближення законів, постанов та адміністративних положень держав ЄС з питань захисту тварин, що використовуються для експериментів та інших наукових цілей».

10.2.1 Дослідження імуногенності дослідного зразка вакцини проти COVID19

Дослідження імуногенності дослідного зразка вакцини проти COVID19 проводили шляхом триразової інтраперитонеальної імунізації мишей Balb/c із інтервалами у 2 тижні дослідним зразком вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2, що містив злитий кон'югат RBD-домену протеїну S із дифтерійним токсоїдом CRM197, гідроксид алюмінію як ад'ювант і допоміжні речовини (таблиця 8). Доза злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини для імунізації становила 20 мкг/тварину (1 мг/кг). Через тиждень після кожної імунізації відбирали кров із хвостової вени і одержували сироватки крові, які досліджували за допомогою імуноензимного аналізу щодо рівнів антитіл проти рекомбінантного протеїну RBD. Одержані результати імуноензимного аналізу (рисунок 75) показали, що дослідний зразок вакцини викликає утворення помірної кількості антитіл (титр більше 1:12800) проти RBD-домену після другої імунізації.

Сироватки крові мишей, яким вводили при випробуваннях на токсичність щоденно протягом 10 днів 200 мкг/тварину (10 мг/кг) злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини, також були перевірені на вміст антитіл проти RBD. Одержані результати імуноензимного аналізу представлені на рисунку 76. Показано, що така доза рекомбінантного

антигену призводить до значного зростання (більше, ніж у 2 рази) рівня антитіл проти RBD.

Отже, розроблений дослідний зразок вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантного злитого протеїну RBD–CRM197 є достатньо імуногенним.

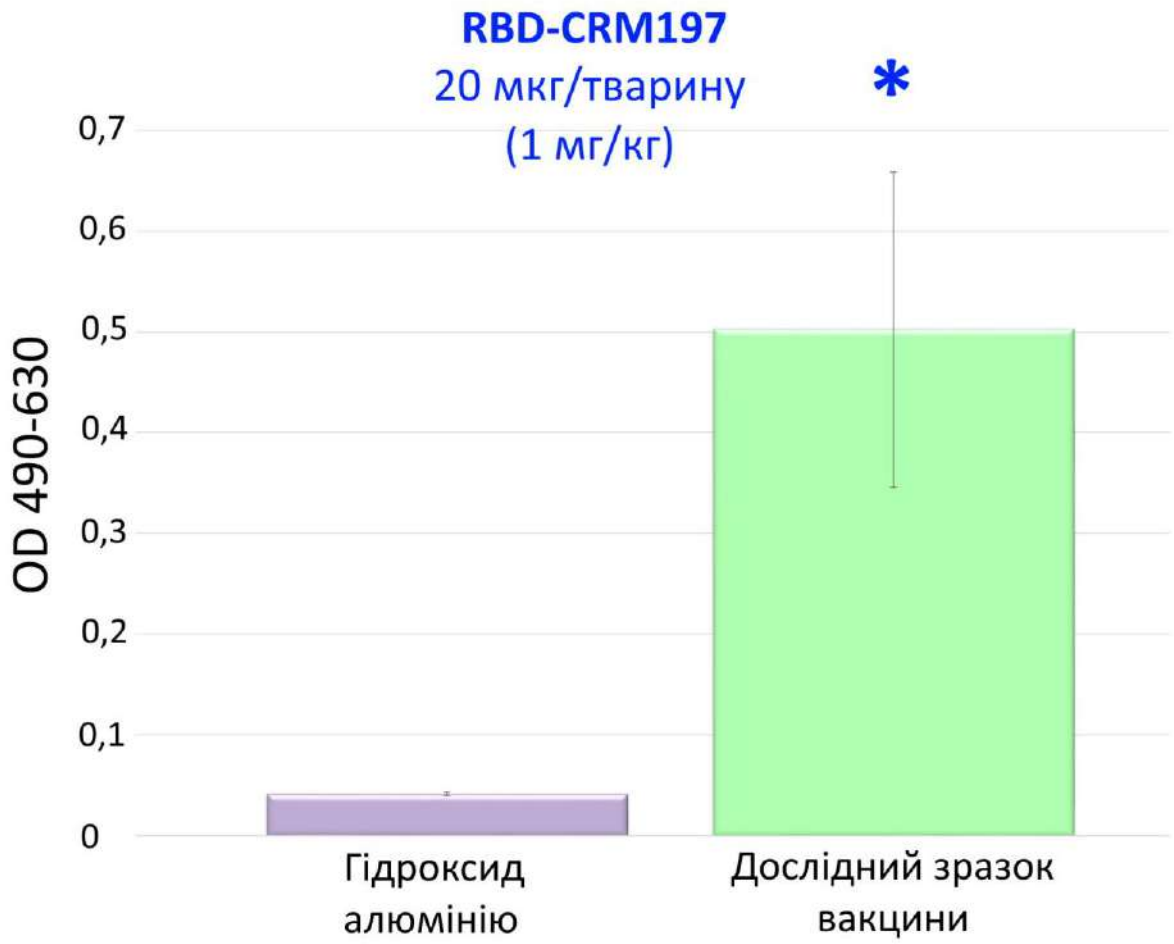

Рисунок 75 – Рівень антитіл IgG проти рекомбінантного протеїну RBD SARS-CoV-2 в сироватках крові мишей, імунізованих дослідним зразком вакцини, що містив рекомбінантний злитий протеїн RBD–CRM197 в дозі 20 мкг/тварину, а також контрольних мишей, імунізованих гідроксидом алюмінію. * – статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності по відношенню до контролю, $p < 0,01$

10.2.2 Дослідження місцевої переносимості дослідного зразка вакцини проти COVID19

Дослідження місцевої переносимості дослідного зразка вакцини проти COVID19 проводили під час проведення випробувань на гостру і хронічну токсичність. Після інтраперитонеального введення різних доз злитого протеїну RBD–CRM197 (20 мкг/тварину і 200 мкг/тварину) у складі дослідного зразка вакцини через 2 год і через добу фіксували стан епільованої ділянки шкіри в місці ін'єкції.

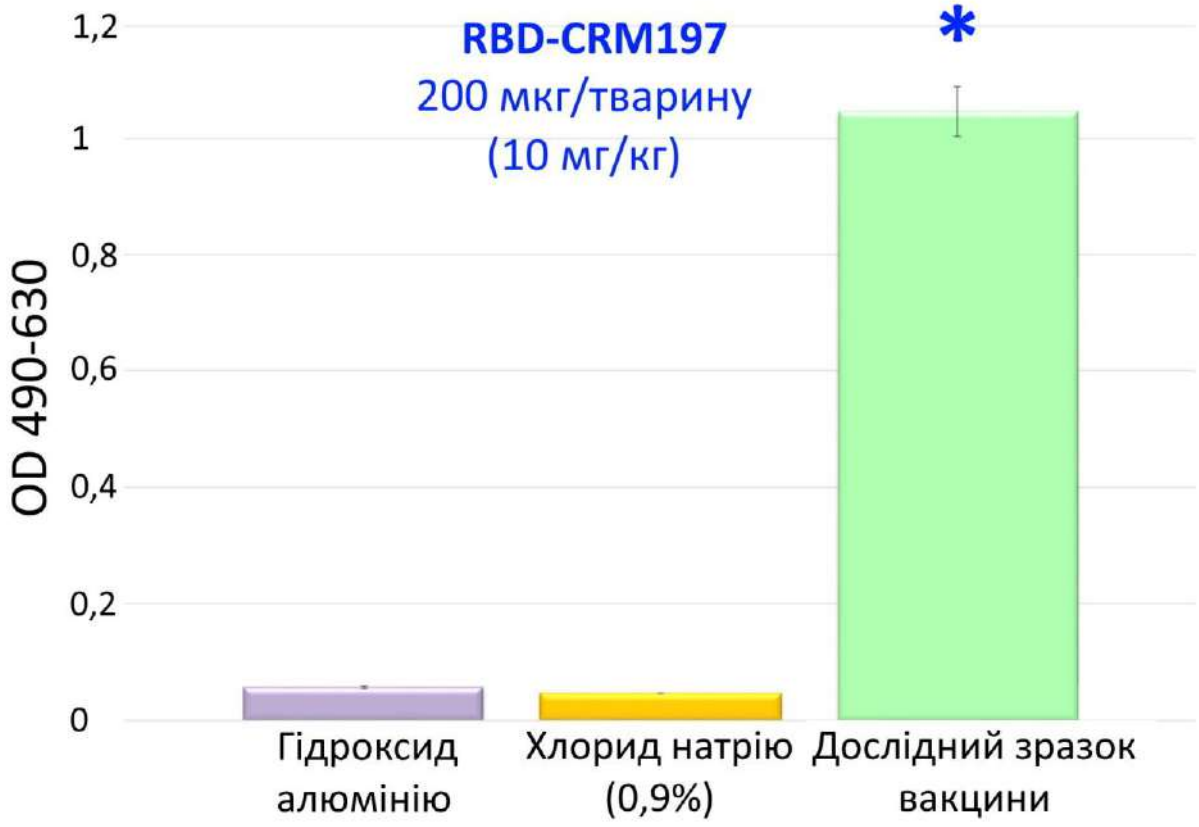

Рисунок 76 – Рівень антитіл IgG проти рекомбінантного протеїну RBD SARS-CoV-2 в сироватках крові мишей, імунізованих щоденно протягом 10 днів дослідним зразком вакцини, що містив рекомбінантний злитий протеїн RBD–CRM197 в дозі 200 мкг/тварину, а також контрольних мишей, імунізованих гідроксидом алюмінію або за аналогічною схемою фізіологічним розчином

хлориду натрію. * – статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності по відношенню до контролів, $p < 0,01$

На рисунку 77 представлена фотографія місця введення (шерсть видалено з метою обстеження) через добу після інтраперитонеального введення миші дослідного зразка вакцини проти COVID19, що містив 200 мкг рекомбінантного антигену RBD–CRM197. Проведені дослідження показали повну відсутність будь-яких місцевих реакцій шкіри (алергічних чи набрякових реакцій) після введення дослідного зразка.

Рисунок 77 – Ділянка шкіри миші через добу після введення дослідного зразка вакцини, що містив 200 мкг рекомбінантного антигену RBD–CRM197

Аналогічні результати були одержані при введенні дослідного зразка вакцини, що містив 20 мкг рекомбінантного злитого кон’югату RBD–CRM197.

Отже, можна зробити висновок, що розроблений дослідний зразок вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантного злитого протеїну RBD–CRM197 добре переноситься навіть при використанні дози антигену, що в 10 разів перевищує дозу, достатню для ефективної імунізації.

10.2.3 Дослідження гострої та хронічної токсичності дослідного зразка вакцини проти COVID19

Для випробувань на гостру токсичність мишам вводили інтраперитонеально дослідний зразок вакцини, що містив у об'ємі 0,2 мл різні дози злитого протеїну RBD–CRM197: 1 мг/кг (20 мкг/тварину), 10 мг/кг (200 мкг/тварину) і 27 мг/кг (550 мкг/тварину). Для дослідження хронічної токсичності тваринам вводили щодоби протягом 30 діб дозу 1 мг/кг (20 мкг/тварину) злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини, що відповідає очікуваній терапевтичній дозі. Для дослідження субхронічної токсичності тваринам вводили щодоби протягом 10 діб дозу 10 мг/кг (200 мкг/тварину) злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини, що перевищує очікувану терапевтичну дозу в 10 разів. У дві контрольні групи входили миші, яким вводили відповідно фізіологічний розчин (серія 1920721) та буферний розчин (Tris-HCl), у якому був розчинений головний компонент дослідного зразка – рекомбінантний злитий протеїн RBD–CRM197.

При дослідженні як гострої, так і хронічної токсичності оцінювали такі показники: 14-добова летальність (реєструвалась щоденно); клінічна картина: загальний стан тварин, поведінка, збудливість та спонтанна рухова активність; динаміка маси тіла; загальний неврологічний статус: стан м'язової сили (хватальний рефлекс), м'язовий тонус, порушення пози тіла та координації рухів, стан дихання; стан вегетативних функцій: екзофтальмії, порушення дефекації та діурезу; макроскопічне дослідження внутрішніх органів при розтині евтаназованих тварин. Неперервне спостереження за тваринами проводили протягом перших 8 год після введення препарату. В

подальшому їх стан фіксували двічі на день протягом 14 днів. Патоморфологічні прояви токсичності визначали при автопсії в кінці експерименту при макроскопічному дослідженні внутрішніх органів тварин.

При однократному внутрішньочеревному введені мишам дослідного зразка вакцини, що містив різні дози рекомбінантного злитого протеїну RBD–CRM197 (1 мг/кг, 10 мг/кг та 27 мг/кг), визначити середню смертельну дозу не вдалося, оскільки жодна з тварин не загинула. Одразу після введення дослідного зразка вакцини спостерігали збудливість та підвищену рухливість тварин, часте поверхневе дихання; порушення координації не спостерігали. Згодом активність тварин відновлювалась, реакції на зовнішні збудники відповідали нормі, спостерігався грумінг. В подальшому реєстрували чергування рухової активності тварин та спокою, що відповідало нормальному стану тварин. Порушень дефекації та діурезу не зареєстровано.

При однократному внутрішньочеревному введені рекомбінантного протеїну RBD–CRM197 у 300 мМ розчині гуанідину гідрохлориду 5 мишам в дозі 25 мг/кг зафіксували 2 летальні випадки через 12-18 годин. Причому, в місці введення розчину спостерігали хімічний опік шкіри та оголення ділянки шерсті розміром 1,5 см в діаметрі. При цьому всі внутрішні органи зберігали цілісність і нормальний вигляд, внутрішніх крововиливів не було зафіксовано. Однак у тварини № 3 спостерігали збільшення розміру легень. Слід відмітити, що після введення рекомбінантного протеїну RBD–CRM197 у 500 мМ розчині гуанідину гідрохлориду спостерігали збудливість тварин при взятті до рук, а в місці ін’єкції з’являлися крововиливи. Це свідчить про токсичний вплив гуанідину гідрохлориду на організм і неприпустимість його використання у складі вакцин як розчинника для рекомбінантних протеїнів.

При щоденному введенні мишам протягом 30 діб рекомбінантного протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини в дозі 1 мг/кг (20 мкг/тварину) не спостерігали загальнотоксичної дії препарату на організм тварин. Загальнотоксичний вплив дослідного зразка оцінювали, вивчаючи динаміку маси тіла тварин шляхом їх зважування двічі на тиждень.

Вегетативний статус оцінювали за станом слизових, шкіряного покриву, шириною очних щілин, наявністю салівації, діареї та охайністю тварин. Спостереження показали, що тварини залишалися охайними, зберігався апетит, всі реакції на зовнішні подразники були в межах норми. Слід зазначити, що внутрішні органи зберігали свій зовнішній вигляд, структуру та стан такий самий, як і в контрольних групах. Динаміка маси тіла мишей різних груп представлена на рисунку 78.

Одержані дані свідчать, що миші всіх груп (як дослідних, так і контрольних) протягом часу проведення експерименту збільшували масу тіла. Найбільші темпи зростання маси тіла спостерігались у дослідної групи мишей, яким вводили 200 мкг/тварину злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини, та у контрольної групи мишей, яким вводили буферний розчин (Tris-HCl). Найменші темпи зростання маси тіла спостерігались у дослідної групи мишей, яким вводили 20 мкг/тварину злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини.

По завершенню експерименту тварини були умертвлені шляхом декапітації. З метою перевірки стану внутрішніх органів вакцинованих тварин було проведено їх розтин. Результати дослідження показали, що внутрішні органи були неушкодженими, їх розмір, колір, розташування відповідали фізіологічній нормі (рисунок 79).

Хоча середні показники мишей в дослідних групах практично не відрізнялись від показників мишей контрольних груп, було помічено окремі індивідуальні випадки появи відхилень від фізіологічної норми в групі мишей, яким щоденно протягом 10 діб вводили рекомбінантний злитий протеїн в дозі 10 мг/кг (200 мкг/тварину) RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини. Так, у тварини № 1 реєстрували зменшення розміру селезінки, а у тварини № 2 тривалий час не утворювався фібриновий згусток крові при центрифугуванні в однакових умовах разом із зразками крові інших мишей.

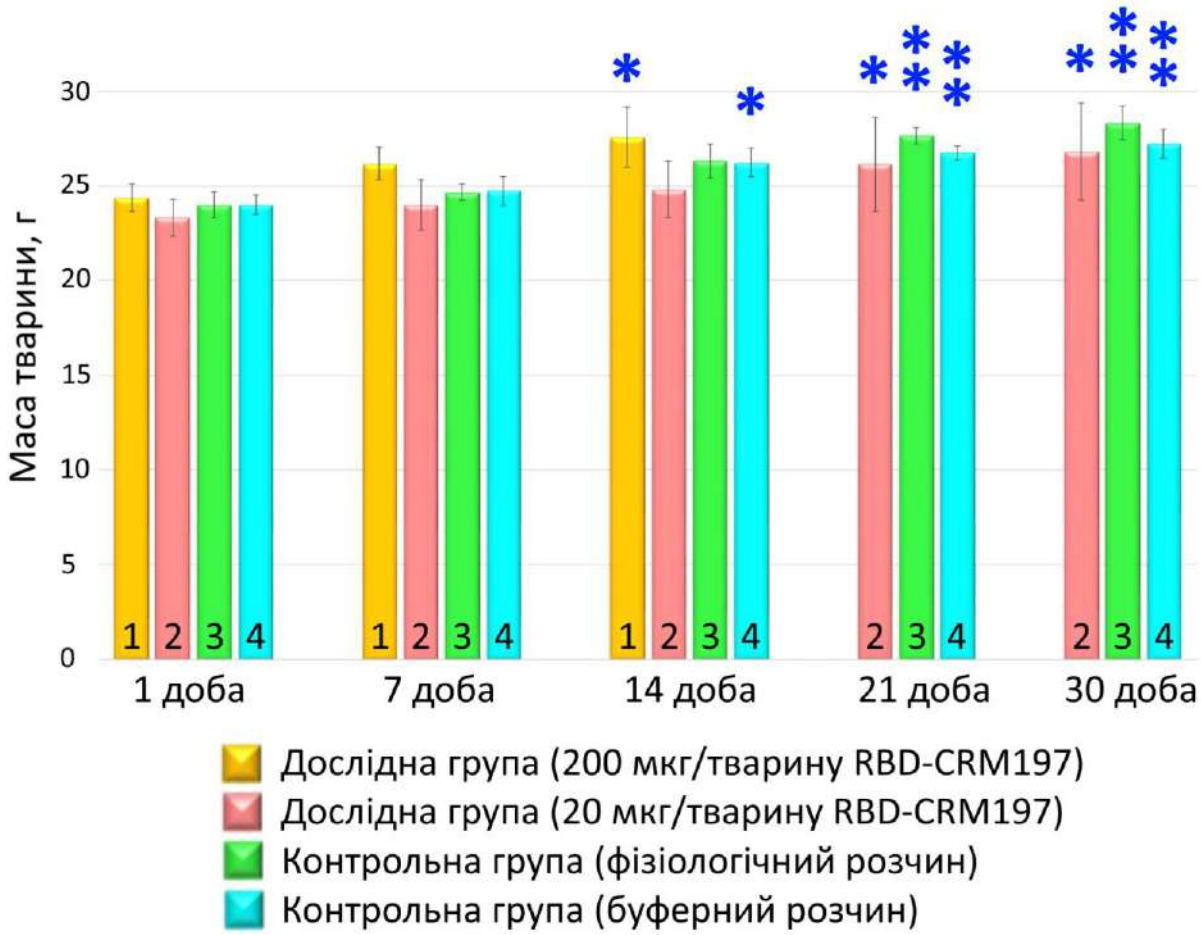

Рисунок 78 – Динаміка маси мишей різних груп: 1 – дослідної групи мишей, яким вводили 200 мкг/тварину злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини; 2 – дослідної групи мишей, яким вводили 20 мкг/тварину злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини; 3 – контрольної групи мишей, яким вводили фізіологічний розчин; 4 – контрольної групи мишей, яким вводили буферний розчин (Tris-HCl). Статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності по відношенню до показника за 1 добу у своїй групі: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Примітка: показник 14 доби для дослідної групи мишей, яким вводили 200 мкг/тварину злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини, насправді відповідає 10 добі експерименту.

Маса органів мишей різних груп представлена на рисунку 80.

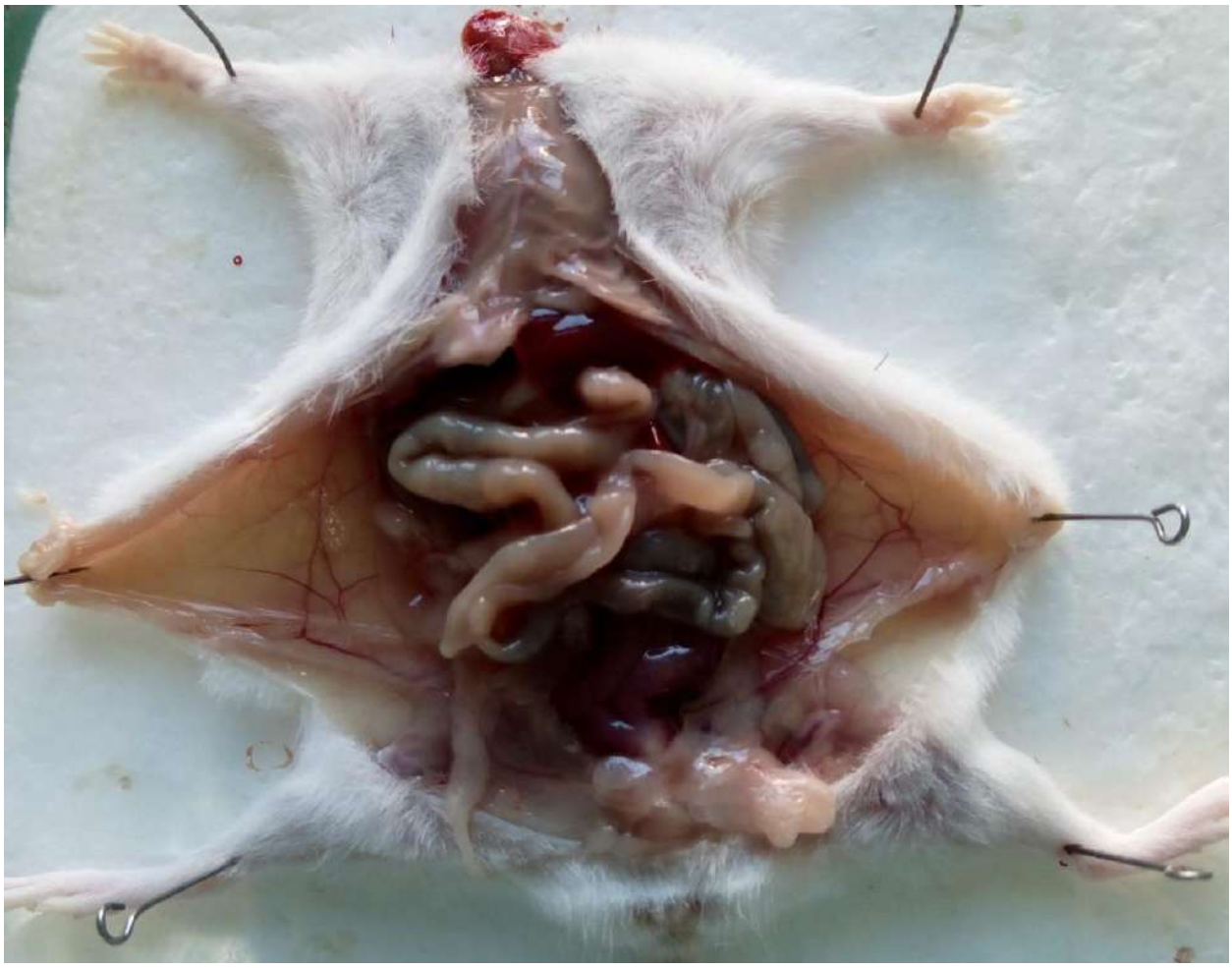

Рисунок 79 – Вигляд внутрішніх органів миші, імунізованої щоденно протягом 1 місяця дозою дослідного зразка вакцини проти COVID19, що містив 200 мкг рекомбінантного злитого кон’югату RBD–CRM197

Було встановлено, що середня маса серця, селезінки та легень не відрізняється у мишей досліджених груп. Маса нирок у мишей дослідних груп, яким вводили дослідний зразок вакцини, була нижчою у порівнянні з мишами контрольних груп, однак ця відмінність була незначною. Виявлено зменшення маси печінки у мишей обох дослідних груп, яким вводили дослідний зразок вакцини, у порівнянні з мишами контрольної групи, яким вводили фізіологічний розчин. Відмінностей у порівнянні з контрольною групою мишей, яким вводили буферний розчин, не спостерігалось. Тим більше, що, як відомо, при токсичному враженні печінки її маса, навпаки, збільшується [104].

Проведені дослідження свідчать, що розроблений дослідний зразок вакцини проти COVID19 не виявляв ознак токсичності, а також не викликав алергічних місцевих реакцій. Жодних змін стану внутрішніх органів у імунізованих особин порівняно з тваринами, які отримували плацебо (фізіологічний розчин), виявлено не було.

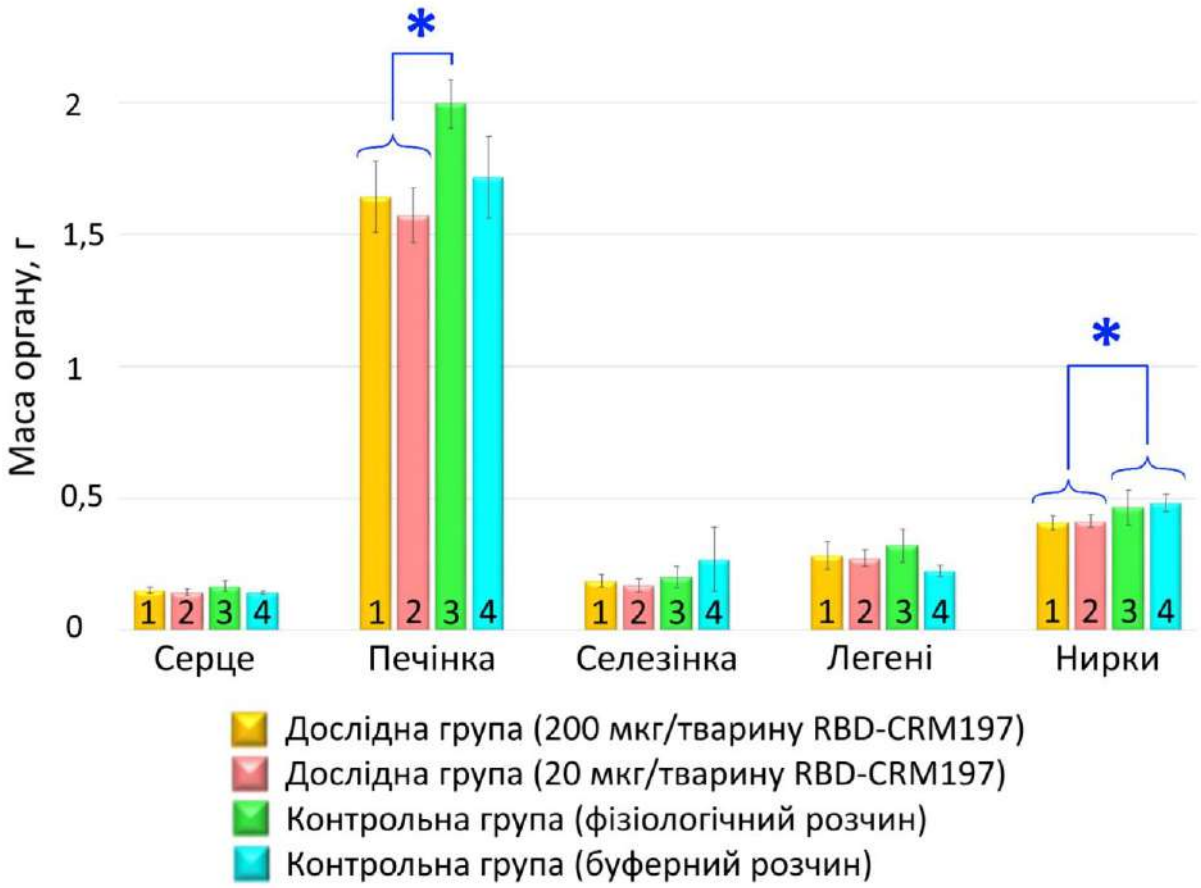

Рисунок 80 – Маса внутрішніх органів мишей різних груп: 1 – дослідної групи мишей, яким вводили 200 мкг/тварину злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини; 2 – дослідної групи мишей, яким вводили 20 мкг/тварину злитого протеїну RBD–CRM197 у складі дослідного зразка вакцини; 3 – контрольної групи мишей, яким вводили фізіологічний розчин; 4 – контрольної групи мишей, яким вводили буферний розчин (Tris-HCl). Статистично достовірні за t-критерієм Стьюдента відмінності: * – $p < 0,05$.

Отже, проведені дослідження показали, що розроблений дослідний зразок рекомбінантної вакцини проти COVID19 характеризується достатньою імуногенністю, гарною місцевою переносимістю і низькою токсичністю в дозах, що застосовуються для імунізації.

На сьогоднішній день, у рамках Меморандуму про співробітництво між НАН України і ПрАТ «По виробництву інсулінів «Індар» щодо розробки вакцин проти COVID19 розпочато співпрацю з цією фармацевтичною компанією з метою проведення оптимізації та адаптації до умов виробництва процесів одержання і очищення рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2, а також виготовлення промислової дослідної партії вакцини проти COVID19 для подальших випробувань.

ВИСНОВКИ ЕТАПУ ІІІ
(РОЗДІЛИ 8-10)

1. Цитофлуориметричні дослідження із використанням злитого протеїну RBD–eGFP показали, що антитіла проти RBD-домену протеїну S і злитого кон'югату RBD–CRM197 володіють більшими захисними властивостями, ніж антитіла проти протеїну N.

2. За антигенними властивостями одержаний рекомбінантний протеїн N відповідає природному протеїну N коронавірусу SARS-CoV-2 і може бути використаний у складі вакцин проти COVID19, а також діагностичних тест-систем для виявлення антитіл проти SARS-CoV-2. Оцінювання відповідності антигенних властивостей рекомбінантного протеїну RBD (у тому числі, RBD у складі злитого кон'югату RBD–CRM197) є ускладненим через низький вміст антитіл до RBD у сироватках крові, що досліджувались.

3. Випробування на тваринах довели, що розроблений дослідний зразок вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантного злитого кон'югату RBD-домену протеїну S SARS-CoV-2 із дифтерійним токсоїдом CRM197 характеризувався достатньою імуногенністю, гарною місцевою переносимістю і низькою токсичністю в дозах, що застосовуються для імунізації.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

1. Створено продуценти таких рекомбінантних протеїнів коронавірусу SARS-CoV-2, як протеїн нуклеокапсиду (N), рецептор-зв'язувальний домен (RBD) протеїну «шипа» (S), а також злитий кон'югат RBD із дифтерійним токсоїдом CRM197, які дозволяють безпечно і дешево одержувати антигенні субстанції для виробництва імунодіагностикумів і вакцин проти COVID19.

2. Одержано рекомбінантний злитий кон'югат домену RBD із зеленим флуоресцентним протеїном (eGFP), який може бути використаний для тестування терапевтичних препаратів (зокрема, антитіл) щодо можливості блокування взаємодії коронавірусу SARS-CoV-2 із клітинними рецепторами та запобігання його проникнення у клітину.

3. Показано, що рекомбінантний протеїн N є більш імуногенним у порівнянні з рекомбінантними протеїнами RBD і RBD–CRM197, а високого рівня антитіл проти RBD-домену можна досягти при застосуванні повторних імунізацій.

4. Протеїн N на відміну від RBD-домену стимулював підвищення експресії IFN-gamma і меншою мірою IL12b та IL-4 в клітинах селезінки мишей, а також підвищення рівня хемокіну CCL4 в крові мишей, що свідчить про участь протеїну N у запальних процесах і активацію ним насамперед клітинної імунної відповіді.

5. Цитофлуориметричні дослідження із використанням злитого протеїну RBD–eGFP показали, що антитіла проти RBD-домену протеїну S і злитого кон'югату RBD–CRM197 володіють більшими захисними властивостями, ніж антитіла проти протеїну N.

6. Розроблено дослідний зразок вакцини проти COVID19 на основі рекомбінантного злитого кон’югату RBD–CRM197, який має більш стабільну конформацію, ніж RBD. Протеїн N може бути введений у склад вакцини за умови появи доказів його безпечності як компонента, здатного викликати запалення і надмірну реакцію імунної системи.

7. Випробування на тваринах довели, що дослідний зразок вакцини проти COVID19 характеризується достатньою імуногенністю, гарною місцевою переносимістю і низькою токсичністю в дозах, що застосовуються для імунізації.

8. Результати виконання проєкту можуть стати відправним пунктом для проведення клінічних випробувань (за наявності відповідного фінансування) і впровадження в Україні рекомбінантної вакцини проти COVID19 власного виробництва.

ПЕРЕЛІК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Komisarenko S. The global coronavirus crisis. K.: LAT&K, 2020. 120 p. (In Ukrainian).

2. COVID19 dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). Available at https://coronavirus.jhu.edu/map.html (accessed, December 1, 2021).

3. World Health Organization. COVID19 vaccine tracker and landscape. Available at https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-COVID19-candidate-vaccines (accessed, November 5, 2021).

4. PFIZER and BIONTECH achieve first authorization in the world for a vaccine to combat COVID19. https://www.pfizer.com/news/press-release/press-release-detail/pfizer-and-biontech-achieve-first-authorization-world (accessed, December 2, 2020).

5. Zimmer C., Corum J., Wee S.-L. Coronavirus vaccine tracker. Available at https://www.nytimes.com/interactive/2020/science/coronavirus-vaccine-tracker.html (accessed, November 5, 2021).

6. Corum J., Zimmer C. How the Novavax vaccine works. Available at https://www.nytimes.com/interactive/2020/health/novavax-COVID19-vaccine.html (accessed, May 7, 2021).

7. Wrapp D., Wang N., Corbett K. S., Goldsmith J. A., Hsieh C.-L., Abiona O., Graham B. S., McLellan J. S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. *Science.* 2020; 367(6483): 1260-1263.

8. Ahlen G., Frelin L., Nikouyan N., Weber F., Hoglund U., Larsson O., Westman M., Tuvesson O., Gidlund E. K., Cadossi M., Appelberg S., Mirazimi A., Sällberg M. The SARS-CoV-2 N protein is a good component in a vaccine. *J Virol.* 2020; 94(18): e01279-20.

9. Malito E., Bursulaya B., Chen C., Lo Surdo P., Picchianti M., Balducci E., Biancucci M., Brock A., Berti F., Bottomley M. J., Nissum M., Costantino P.,

Rappuoli R., Spraggon G. Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2012; 109(14): 5229-5234.

10. Broker M., Berti F., Schneider J., Vojtek I. Polysaccharide conjugate vaccine protein carriers as a "neglected valency" – Potential and limitations. *Vaccine*. 2017; 35(25): 3286-3294.

11. Jaffe J., Wucherer K., Sperry J., Zou Q., Chang Q., Massa M. A., Bhattacharya K., Kumar S., Caparon M., Stead D., Wright P., Dirksen A., Francis M. B. Effects of conformational changes in peptide-CRM197 conjugate vaccines. *Bioconjug Chem*. 2019; 30(1): 47-53.

12. Reimann H.A. Landmark article Dec 24, 1938: An acute infection of the respiratory tract with atypical pneumonia. A disease entity probably caused by a filtrable virus. JAMA. 1984. 251(7): 936–944.

13. Severe acute respiratory syndrome. https://en.wikipedia.org/wiki/Severe_acute_respiratory_syndrome

14. Middle East respiratory syndrome. https://en.wikipedia.org/wiki/Middle_East_respiratory_syndrome

15. Coronaviruses cause respiratory infections in humans. https://www. nature.com/articles/d41586-020-00262-7?utm_source=twt_nnc&utm_medium=social&utm_campaign=naturenews&sf229556213=1]

16. Beaudette F.R., Hudson C.B. Cultivation of the virus of infectious bronchitis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 1937. 90: 51–58.

17. Tyrrell D.A., Bynoe M.l. Cultivation of a novel type of common-cold virus in organ cultures. Br. Med. J. 1965. 1(5448): 1467–1470.

18. Woo P.C., Lau S.K., Huang Y., Yuen K.Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. Exp. Biol. Med. (Maywood). 2009. 234(10): 1117–1127.

19. Derek Wong's Virology. http://virology-online.com/viruses/CORZA4.htm

20. Phylogeny of SARS-like betacoronaviruses including novel coronavirus SARS-CoV-2. https://nextstrain.org/groups/blab/sars-like-cov

21. Davidson H. First COVID19 case happened in November, China government records show — report. https://www.theguardian.com/world/2020/mar/13/first-COVID19-case-happened-in-november-china-government-records-show-report

22. Huang C., Wang Y., Li X. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. Lancet. 2020. 395(10223): 497–506.

23. Osborne H. Coronavirus Outbreak May Have Started As Early As September, Scientists Say. https://www.newsweek.com/coronavirus-outbreak-september-not-wuhan-1498566

24. Lu R., Zhao X., Li J. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. Lancet. 2020. 395(10224): 565–574.

25. Readfearn G. How did coronavirus start and where did it come from? Was it really Wuhan's animal market? https://www.theguardian.com/world/2020/apr/28/how-did-the-coronavirus-start-where-did-it-come-from-how-did-it-spread-humans-was-it-really-bats-pangolins-wuhan-animal-market

26. Liu P., Jiang J.Z., Wan X.F., Hua Y., Li L., Zhou J., Wang X., Hou F., Chen J., Zou J., Chen J. Are pangolins the intermediate host of the 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2)? PLoS Pathog. 2020. 16(5): e1008421.

27. Andersen K.G., Rambaut A., Lipkin W.I., Holmes E.C., Garry R.F. The proximal origin of SARS-CoV-2. Nat. Med. 2020. 26(4): 450–452.

28. https://globalhealthnewswire.com/research/2020/05/07/coronavirus-structure-clue-to-high-infection-rate

29. Scudellari M. The sprint to solve coronavirus protein structures — and disarm them with drugs. Nature. 2020. 581(7808): 252-255.

30. Zhang L., Lin D., Sun X. et al. Crystal structure of SARS-CoV-2 main protease provides a basis for design of improved α-ketoamide inhibitors. Science. 2020. 368(6489): 409–412.

31. Finkel Y., Mizrahi O., Nachshon A. et al. The coding capacity of SARS-CoV-2. Nature. 2021. 589(7840): 125-130.

32. Wu F., Zhao S., Yu B., Chen Y.M., Wang W., Song Z.G., Hu Y., Tao Z.W., Tian J.H., Pei Y.Y., Yuan M.L., Zhang Y.L., Dai F.H., Liu Y., Wang Q.M., Zheng J.J., Xu L., Holmes E.C., Zhang Y.Z. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. Nature. 2020. 579(7798): 265–269.

33. Schmidt A., Wolff M.H., Weber O. Coronaviruses with special emphasis on first insights concerning SARS. Springer, 2005. 232 p.

34. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.-L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science. 2020. 367(6483): 1260–1263.

35. Zhang X., Li Sh., Niu Sh. ACE2 and COVID19 and the Resulting ARDS. Postgrad. Med. J. 2020. 96(1137): 403–407.

36. One of the spike proteins (red) on a SARS-CoV-2 particle grabs a receptor on a cell. Credit: SPL https://www.nature.com/articles/d41586-020-00502-w

37. Watanabe Ya., Allen J.D., Wrapp D., McLellan J.S., Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. Science. 2020. 369(6501): 330–333.

38. Hoffman M. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. Cell. 2020. 181(2): 271-280.e8.

39. Sakai K., Ami Y., Tahara M. et al. The Host Protease TMPRSS2 Plays a Major Role in in Vivo Replication of Emerging H7N9 and Seasonal Influenza. Viruses J. Virol. 2014. 88(10): 5608–5616.

40. Vankadari N., Wilce J.A. Emerging WuHan (COVID19) Coronavirus: Glycan Shield and Structure Prediction of Spike Glycoprotein and Its Interaction With Human CD26. Emerg. Microbes Infect. 2020. 9(1): 601–604.

41. Wang K., Chen W., Zhang Z. et al. CD147-spike protein is a novel route for SARS-CoV-2 infection to host cells. Signal Transduct Target Ther. 2020. 5(1): 283.

42. Konwarh R. Nanobodies: Prospects of Expanding the Gamut of Neutralizing Antibodies Against the Novel Coronavirus, SARS-CoV-2. Front Immunol. 2020 Jun 23;11:1531.

43. Sun J., Zhuang Zh., Zheng J. et al. Generation of a Broadly Useful Model for COVID19 Pathogenesis, Vaccination, and Treatment. Cell. 2020. 182: 1–10.

44. Lipsitch M. Who Is Immune to the Coronavirus? https://www.nytimes.com/2020/04/13/opinion/coronavirus-immunity.html

45. COVID19 Antibodies Can Disappear After 2-3 Months, Study Shows. https://www.medscape.com/viewarticle/932671

46. Gudbjartsson D.F., Norddahl G.L., Melsted P. et al. Humoral Immune Response to SARS-CoV-2 in Iceland. N Engl J Med. 2020. Sep 1. 10.1056/NEJMoa2026116.

47. Mateus J., Grifoni A., Tarke A. et al. Selective and cross-reactive SARS-CoV-2 T cell epitopes in unexposed humans. Science. 2020. Aug 4:eabd3871.

48. To K.K., Hung I.F., Ip J.D. et al. COVID19 re-infection by a phylogenetically distinct SARS-coronavirus-2 strain confirmed by whole genome sequencing. Clin Infect Dis. 2021. 73(9): e2946-e2951.

49. Ledford H. Coronavirus reinfections: three questions scientists are asking. https://www.nature.com/articles/d41586-020-02506-y

50. Zheng M., Song L. Novel antibody epitopes dominate the antigenicity of spike glycoprotein in SARS-CoV-2 compared to SARS-CoV. Cell. Mol. Immunol. 2020. 17(5): 536–538.

51. Achenbach J. The coronavirus isn’t mutating quickly, suggesting a vaccine would offer lasting protection. https://www.washingtonpost.com/health/the-coronavirus-isnt-mutating-quickly-suggesting-a-vaccine-would-offer-lasting-protection/2020/03/24/406522d6-6dfd-11ea-b148-e4ce3fbd85b5_story.html

52. Funk C.D., Laferriere C., Ardakani A. A Snapshot of the Global Race for Vaccines Targeting SARS-CoV-2 and the COVID19 Pandemic. Front. Pharmacol. 2020. 11:937.

53. Moderna Announces Positive Interim Phase 1 Data for its mRNA Vaccine (mRNA-1273) Against Novel Coronavirus. https://investors.modernatx.com/news-releases/news-release-details/moderna-announces-positive-interim-phase-1-data-its-mrna-vaccine

54. Heckman K.L., Pease L.R. Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. Nature protocols. 2007. 2(4): 924–932.

55. Rudolph R., Lilie H. In vitro folding of inclusion body proteins. FASEB J. 1996. 10(1): 49–56.

56. Basu A., Li X., Leong S.S.J. Refolding of proteins from inclusion bodies: rational design and recipes. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2011. 92(2): 241–251.

57. Schägger H., von Jagow G. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. Anal. Biochem. 1987. 166(2): 368–379.

58. Expasy Swiss Bioinformatics Resurs Portal. https://www.expasy.org

59. Hempel D.M., Smith K.A., Claussen K.A., Perricone M.A. Analysis of cellular immune responses in the peripheral blood of mice using real-time RT-PCR. J Immunol Methods. 2002. 259(1-2): 129-138.

60. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Pöhlmann S. A multibasic cleavage site in the spike protein of sars-cov-2 is essential for infection of human lung cells. Mol Cell. 2020. 78(4): 779–784.e5.

61. Bangaru S., Ozorowski G., Turner H.L., Antanasijevic A., Huang D., Wang X., Torres J.L., Diedrich J.K., Tian J.H., Portnoff A.D., Patel N., Massare M.J., Yates J.R. 3rd, Nemazee D., Paulson J.C., Glenn G., Smith G., Ward A.B. Structural analysis of full-length SARS-CoV-2 spike protein from an advanced vaccine candidate. Science. 2020. 370(6520): 1089–1094.

62. Grant O.C., Montgomery D., Ito K., Woods R.J. Analysis of the SARS-CoV-2 spike protein glycan shield reveals implications for immune recognition. Sci Rep. 2020. 10(1): 14991.

63. Walsh G., Jefferis R. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. Nat Biotechnol. 2006. 24(10): 1241–1252.

64. Luo J.L., Tan W., Ricono J.M., Korchynskyi O., Zhang M., Gonias S.L., Cheresh D.A., Karin M. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. Nature. 2007. 446(7136): 690–694.

65. Mottershead D.G., Pulkki M.M., Muggalla P., Pasternack A., Tolonen M., Myllymaa S., Korchynskyi O., Nishi Y., Yanase T., Lun S., Juengel J.L., Laitinen M., Ritvos O. Characterization of recombinant human growth differentiation factor-9 signaling in ovarian granulosa cells. Mol Cell Endocrinol. 2008. 283(1-2): 58–67.

66. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., Seattle Structural Genomics Center for Infectious Disease (SSGCID), McGuire A.T., Veesler D. Structure of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein (closed state). Cell. 2020. 181: 281.

67. Wrapp D., Wang N., Corbett K.S., Goldsmith J.A., Hsieh C.-L., Abiona O., Graham B.S., McLellan J.S. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. Science. 2020. 367(6483): 1260–1263.

68. Zhang C., Wang Y., Zhu Y. et al. Development and structural basis of a two-MAb cocktail for treating SARS-CoV-2 infections. Nat Commun. 2021. 12(1): 264.

69. Kirchdoerfer R.N., Wang N., Pallesen J., Wrapp D., Turner H.L., Cottrell C.A., Corbett K.S., Graham B.S., McLellan J.S., Ward A.B. Stabilized coronavirus spikes are resistant to conformational changes induced by receptor recognition or proteolysis. Sci Rep. 2018. 8(1): 15701.

70. McCallum M., Walls A.C., Bowen J.E., Corti D., Veesler D. Structure-guided covalent stabilization of coronavirus spike glycoprotein trimers in the closed conformation. Nat Struct Mol Biol. 2020. 27(10): 942–949.

71. Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. Nature. 2020. 581(7807): 215–220.

72. Liji T. SARS-CoV-2 Neucleocapside (N) protein is heavily glycosylated https://www.news-medical.net/news/20200830/SARS-CoV-2-Neucleocapside-(N)-protein-is-heavily-glycosylated.aspx

73. Peng Y., Du N., Lei Y., Dorje S., Qi J., Luo T., Gao G.F., Song H. Structures of the SARS-CoV-2 nucleocapsid and their perspectives for drug design. EMBO J. 2020. 39(20): e105938.

74. Giannini G., Rappuoli R., Ratti G. The amino-acid sequence of two non-toxic mutants of diphtheria toxin: CRM45 and CRM197. Nucleic Acids Res. 1984. 12(10): 4063–4069.

75. Malito E., Bursulaya B., Chen C., Lo Surdo P., Picchianti M., Balducci E., Biancucci M., Brock A., Berti F., Bottomley M.J., Nissum M., Costantino P., Rappuoli R., Spraggon G. Structural basis for lack of toxicity of the diphtheria toxin mutant CRM197. Proc Natl Acad Sci USA. 2012. 109(14): 5229–5234.

76. Arpino J.A., Rizkallah P.J., Jones D.D. Crystal structure of enhanced green fluorescent protein to 1.35 A resolution reveals alternative conformations for Glu222. PLoS One. 2012. 7(10): e47132.

77. Recombinant SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein https://www.novusbio.com/products/sars-cov-2-nucleocapsid-recombinant-protein_nbp2-90975

78. Jia B., Jeon C.O. High-throughput recombinant protein expression in Escherichia coli : current status and future perspectives. Open Biology. 2016. 6(8): 160196.

79. Quitterer U., Pohl A., Langer A., Koller S., Abdalla S. A cleavable signal peptide enhances cell surface delivery and heterodimerization of Cerulean-tagged angiotensin II AT1 and bradykinin B2 receptor. Biochem Biophys Res Commun. 2011. 409(3): 544-549.

80. Yu K., Liu C., Kim B.G., Lee D.Y. Synthetic fusion protein design and applications. Biotechnol Adv. 2015. 33(1): 155-164.

81. Porubl'ova L.V., Rebriiev A.V., Hromovyĭ T.Iu., Minia I.I., Obolens'ka M.Iu. MALDI-TOF mass spectrometry in the investigation of large high-molecular biological compounds. Ukr Biokhim Zh. 2009. 81(3): 46-56.

82. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai S. Cellular and Molecular Immunology. – Philadelphia: Elsevier Saunders, 2015. ISBN 978-0-323-22275-4

83. Імунологія: Підручник / А.Ю. Вершигора, Є.У. Пастер, Д.В. Колибо та ін.; за заг. ред. Є.У. Пастер. - К.: Видавництво КНУ, 2011. - 911 с.

84. Bardina S.V., Michlmayr D., Hoffman K.W., Obara C.J., Sum J., Charo I.F., Lu W., Pletnev A.G., Lim J.K. Differential roles of chemokines CCL2 and CCL7 in monocytosis and leukocyte migration during West Nile virus infection. J Immunol. 2015. 195(9): 4306-4318.

85. Hao Q., Vadgama J.V., Wang P. CCL2/CCR2 signaling in cancer pathogenesis. Cell Commun Signal. 2020. 18(1): 82.

86. Liu Y., Cai Y., Liu L., Wu Y., Xiong X. Crucial biological functions of CCL7 in cancer. PeerJ. 2018. 6: e4928.

87. Menten P., Wuyts A., Van Damme J. Macrophage inflammatory protein-1. Cytokine & Growth Factor Reviews. 2002. 13 (6): 455-481.

88. Cocchi F., DeVico A.L., Garzino-Demo A., Arya S.K., Gallo R.C., Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major

HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. Science. 1995. 270 (5243): 1811-1815.

89. Lee K.M., Achuthan A.A., Hamilton J.A. GM-CSF: A promising target in inflammation and autoimmunity. ImmunoTargets and Therapy. 2020. 9: 225-240.

90. Lang F.M., Lee K.M.-C., Teijaro J.R., Becher B., Hamilton J.A. GM-CSF-based treatments in COVID-19: reconciling opposing therapeutic approaches. Nat Rev Immunol. 2020. 20(8): 507-514.

91. Olbei M., Hautefort I., Modos D., Treveil A., Poletti M., Gul L., Shannon-Lowe C.D. Korcsmaros T. SARS-CoV-2 Causes a different cytokine response compared to other cytokine storm-causing respiratory viruses in severely ill patients. Front Immunol. 2021. 12: 629193.

92. How nine Covid-19 vaccines work. https://www.nytimes.com/interactive/2021/health/how-covid-19-vaccines-work.html

93. Bao L., Deng W., Huang B. et al. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. Nature. 2020. 583(7818): 830-833. DOI: https://doi.org/10.1038/s41586-020-2312-y

94. Schmidt F., Weisblum Y., Muecksch F. et al. Measuring SARS-CoV-2 neutralizing antibody activity using pseudotyped and chimeric viruses. J Exp Med. 2020. 217(11): e20201181.

95. Protein Data Bank. https://www.rcsb.org

96. Di B., Hao W., Gao Y., Wang M., Wang Y., Qiu L. Monoclonal antibody-based antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high sensitivity of the nucleocapsid protein in acute-phase sera of severe acute respiratory syndrome patients. Clin Diagn Lab Immunol. 2020; 12: 135-140.

97. Porro M., Saletti M., Nencioni L., Tagliaferri L., Marsili I. Immunogenic correlation between cross-reacting material (CRM197) produced by a mutant of Corynebacterium diphtheriae and diphtheria toxoid. J Infect Dis. 1980. 142(5): 716-724.

98. Wang R., Chen J., Hozumi Y., Yin C., Wei G.W. Decoding asymptomatic COVID-19 infection and transmission. J Phys Chem Lett. 2020. 11(23): 10007-10015.

99. Francis M.J. Recent Advances in Vaccine Technologies. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2018. 48(2): 231-241.

100. Tufan A., Avanoğlu G.A., Matucci-Cerinic M. COVID-19, immune system response, hyperinflammation and repurposing antirheumatic drugs. Turk J Med Sci. 2020. 50(SI-1): 620-632.

101. Mascola J.R., Fauci A.S. Novel vaccine technologies for the 21st century. Nat Rev Immunol. 2020. 20(2): 87-88.

102. Shah R.R., Hassett K.J., Brito L.A. Overview of vaccine adjuvants: introduction, history, and current status. Methods Mol Biol. 2017. 1494: 1-13.

103. Wang J., Peng Y., Xu H., Cui Z., Williams R.O. 3rd. The COVID-19 vaccine race: challenges and opportunities in vaccine formulation. AAPS PharmSciTech. 2020. 21(6): 225.

104. Nygaard U.C., Vege Å., Rognum T., Grob K., Cartier C., Cravedi J.P., Alexander J. Toxic effects of mineral oil saturated hydrocarbons (MOSH) and relation to accumulation in rat liver. Food Chem Toxicol. 2019.123: 431-442.

ПУБЛІКАЦІЇ ЗА ПРОЄКТОМ ЗА ЗВІТНИЙ ПЕРІОД
(2020 - 2021 рр.)

1. Krynina O.I., Romaniuk S.I., Gorbatiuk O.B., Korchynskyi O.H., Rebriiev A.V., Kulyk Ya.S., Kozadaieva Ye.O., Siromolot A.A., Guzyk M.M., Kolybo D.V., Komisarenko S.V. Production of recombinant SARS-CoV-2 proteins and diphtheria toxoid CRM197-based fusion. *Ukr Biochem J.* 2021. 93(6): 31-45.

Наукометричні показники видання:
Ukr Biochem J. індексується в наукометричних базах Scopus (SJR 0.17) та Web of Science (IF 0.386); квартиль – Q4.

Посилання на публікацію:
Публікацію буде розміщено на сайті видання http://ukrbiochemjournal.org/current-issue

Участь авторів проєкту у науково-дослідній роботі, результати якої представлено у статті:

1. Krynina O.I. (Криніна О. І.) – одержання генетичних конструкцій для експресії рекомбінантних протеїнів N і RBD SARS-CoV-2 та злитих кон'югатів у клітинах прокаріотів і еукаріотів; виділення та електрофоретичне дослідження рекомбінантних протеїнів;
2. Romaniuk S.I. (Романюк С. І.) – моделювання просторової структури злитого кон'югату RBD–CRM197, відтвореної за даними кристалографії RBD-домену протеїну S коронавірусу SARS-CoV-2 і CRM197; аналіз і статистична обробка даних; підготовка зображень, що ілюструють одержані дані; написання тексту статті;

3. Gorbatiuk O.B. (Горбатюк О. Б.) – виділення і очищення рекомбінантних протеїнів SARS-CoV-2 та злитих кон'югатів із клітин прокаріотів; їх електрофоретичне дослідження;
4. Korchynskyi O.H. (Корчинський О. Г.) – одержання генетичних конструкцій (в тому числі, на основі аденовірусних векторів) для експресії рекомбінантного протеїну RBD SARS-CoV-2 та злитого кон'югату RBD–CRM197 у клітинах еукаріотів;
5. Siromolot A.A. (Сіромолот А. А.) – дослідження відповідності антигенних властивостей рекомбінантних протеїнів, експресованих у клітинах прокаріотів, за допомогою імуноензимного аналізу та вестерн-блот аналізу;
6. Guzyk M.M. (Гузик М. М.) – допомога у дослідженні відповідності амінокислотної послідовності одержаних рекомбінантних протеїнів за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії;
7. Kolybo D.V. (Колибо Д. В.) – планування проміжних цілей, завдань дослідження та шляхів їх вирішення, розподіл завдань між безпосередніми виконавцями та контроль виконання, аналіз одержаних результатів; редагування тексту статті;
8. Komisarenko S.V. (Комісаренко С. В.) – загальне керівництво науково-дослідною роботою.

Участь інших авторів у науково-дослідній роботі, результати якої представлено у статті:

1. Rebriiev A.V. (Ребрієв А.В.) – дослідження відповідності амінокислотної послідовності одержаних рекомбінантних протеїнів за допомогою MALDI-TOF мас-спектрометрії;
2. Kulyk Ya.S., Kozadaieva Ye.O. (Кулик Я. С., Козадаєва Є. О.) – виконання технічної роботи на всіх етапах дослідження.

Додаток А

Нуклеотидні послідовності вставок протеїнів вірусу SARS-CoV-2 та їх кон'югатів (з протеїном-носієм CRM197 та флуоресцентним протеїном eGFP) у складі одержаних генетичних конструкцій

pET24a-entero-N-protein

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTG
TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGCTAGCTCTGATAATGGACCCCAAAATCAGCGA
AATGCACCCCGCATTACGTTTGGTGGACCCTCAGATTCAACTGGCAGTAACCAGAATGGAGA
ACGCAGTGGGGCGCGATCAAAACAACGTCGGCCCCAAGGTTTACCCAATAATACTGCGTCTT
GGTTCACCGCTCTCACTCAACATGGCAAGGAAGACCTTAAATTCCCTCGAGGACAAGGCGTT
CCAATTAACACCAATAGCAGTCCAGATGACCAAATTGGCTACTACCGAAGAGCTACCAGAC
GAATTCGTGGTGGTGACGGTAAAATGAAAGATCTCAGTCCAAGATGGTATTTCTACTACCTA
GGAACTGGGCCAGAAGCTGGACTTCCCTATGGTGCTAACAAAGACGGCATCATATGGGTTG
CAACTGAGGGAGCCTTGAATACACCAAAAGATCACATTGGCACCCGCAATCCTGCTAACAA
TGCTGCAATCGTGCTACAACTTCCTCAAGGAACAACATTGCCAAAAGGCTTCTACGCAGAAG
GGAGCAGAGGCGGCAGTCAAGCCTCTTCTCGTTCCTCATCACGTAGTCGCAACAGTTCAAGA
AATTCAACTCCAGGCAGCAGTAGGGGAACTTCTCCTGCTAGAATGGCTGGCAATGGCGGTG
ATGCTGCTCTTGCTTTGCTGCTGCTTGACAGATTGAACCAGCTTGAGAGCAAAATGTCTGGT
AAAGGCCAACAACAACAAGGCCAAACTGTCACTAAGAAATCTGCTGCTGAGGCTTCTAAGA
AGCCTCGGCAAAAACGTACTGCCACTAAAGCATACAATGTAACACAAGCTTTCGGCAGACG
TGGTCCAGAACAAACCCAAGGAAATTTTGGGGACCAGGAACTAATCAGACAAGGAACTGAT
TACAAACATTGGCCGCAAATTGCACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAGCGTTCTTCGGAATGTC
GCGCATTGGCATGGAAGTCACACCTTCGGGAACGTGGTTGACCTACACAGGTGCCATCAAAT
TGGATGACAAAGATCCAAATTTCAAAGATCAAGTCATTTTGCTGAATAAGCATATTGACGCA
TACAAAACATTCCCACCAACAGAGCCTAAAAAGGACAAAAAGAAGAAGGCTGATGAAACTC
AAGCCTTACCGCAGAGACAGAAGAAACAGCAAACTGTGACTCTTCTTCCTGCTGCAGATTTG
GATGATTTCTCCAAACAATTGCAACAATCCATGAGCAGTGCTGACTCAACTCAGGCCGCGGC
CGGCCGCGATGACGATGATAAGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCT
AACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC

pET24a-entero-S-protein

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTG
TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTCGTTTTCCTTGTTCTGTTGCCTCTCGTTAGTA
GCCAATGCGTCAACCTTACTACTAGAACCCAGCTCCCTCCAGCATATACCAACTCTTTCACC
AGGGGCGTATATTACCCGGACAAAGTGTTCCGCTCAAGTGTGCTGCATTCTACGCAGGACCT
TTTCTTGCCCTTTTTCAGTAATGTTACTTGGTTTCATGCTATCCATGTGTCTGGAACTAACGGA
ACCAAGCGCTTTGACAACCCCGTCCTCCCTTTCAACGATGGCGTGTACTTCGCTTCCACGGA
AAAGTCAAACATAATTCGCGGCTGGATCTTTGGTACAACACTCGACTCAAAGACGCAGAGC
CTGCTGATCGTTAATAACGCTACAAATGTTGTGATAAAGGTGTGTGAATTTCAGTTCTGCAA
TGATCCCTTCCTGGGTGTGTACTACCATAAGAATAACAAGAGCTGGATGGAATCCGAATTTA
GGGTTTACAGTTCCGCTAACAACTGCACATTCGAATACGTAAGCCAGCCATTTCTTATGGAT
CTTGAGGGCAAGCAAGGAAACTTCAAGAACTTGAGGGAGTTCGTGTTCAAAAATATCGACG
GCTATTTTAAGATATATAGCAAGCACACTCCAATAAACTTGGTGCGCGACCTGCCCCAGGGA
TTCTCTGCTCTGGAGCCCCTGGTGGATCTGCCCATTGGAATAAACATAACTCGCTTTCAAACA
CTGCTCGCCCTGCATCGCAGTTACCTCACCCCTGGTGATAGTAGTTCAGGATGGACAGCAGG
AGCCGCCGCATACTACGTCGGCTACCTGCAGCCTAGGACCTTCTTGCTGAAGTACAACGAGA
ACGGTACAATAACTGACGCTGTGGACTGCGCTCTGGACCCTCTGTCCGAGACGAAGTGCACC
CTGAAGAGCTTTACTGTTGAAAAAGGCATTTACCAAACCAGCAACTTCCGCGTCCAGCCAAC
CGAGAGCATCGTCAGATTTCCCAACATTACAAATCTGTGTCCCTTCGGCGAGGTGTTCAACG
CCACACGCTTCGCTTCAGTGTACGCATGGAACCGCAAGCGCATATCTAACTGCGTCGCGGAT
TATTCTGTCCTCTACAACTCCGCCTCTTTCTCCACCTTCAAGTGCTACGGAGTGTCACCGACT
AAGCTGAACGATCTCTGCTTTACCAACGTCTACGCGGACTCCTTCGTGATAAGAGGTGATGA
AGTGAGACAAATAGCCCCAGGTCAGACTGGTAAGATCGCAGATTACAACTACAAATTGCCT
GATGATTTCACTGGTTGCGTTATCGCGTGGAACTCTAATAACCTCGATTCTAAGGTCGGTGGT
AACTACAATTACCTGTACCGCTTGTTTAGGAAGTCAAACCTGAAGCCTTTCGAGAGGGATAT
TTCAACCGAAATCTATCAAGCGGGTTCAACACCGTGTAACGGTGTGGAAGGATTTAACTGCT
ACTTCCCCCTGCAGTCTTACGGATTCCAGCCAACCAATGGCGTGGGTTACCAACCTTATCGC
GTGGTGGTTCTGAGTTTCGAACTGTTGCACGCTCCCGCCACGGTATGCGGTCCCAAGAAGAG
CACTAACTTGGTGAAGAATAAGTGCGTGAATTTCAATTTCAATGGCCTCACTGGAACTGGAG
TGCTGACCGAATCCAATAAGAAGTTCTTGCCCTTCCAGCAGTTCGGAAGAGACATTGCTGAC

ACAACCGACGCGGTGCGCGATCCTCAGACTCTGGAGATATTGGACATTACACCATGTTCTTT
CGGCGGTGTGTCTGTCATTACTCCGGGCACGAATACTAGCAACCAGGTAGCCGTGCTGTACC
AAGACGTGAATTGCACAGAGGTTCCCGTCGCAATTCACGCTGACCAGCTGACCCCCACGTGG
AGGGTTTACAGCACTGGTAGTAACGTCTTCCAGACGAGAGCCGGTTGCTTGATCGGAGCGGA
ACATGTGAATAACTCCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGAGCCGGTATATGCGCCTCTTATC
AGACACAAACTAACTCACCCAGGAGAGCCCGCAGTGTGGCTTCTCAAAGCATTATAGCATA
CACTATGTCTCTTGGTGCCGAAAATTCCGTGGCCTATTCTAACAATTCAATCGCCATCCCAAC
CAACTTCACAATTAGCGTGACTACCGAAATACTGCCTGTGAGCATGACGAAAACCAGCGTA
GACTGCACTATGTATATCTGTGGAGACTCCACTGAGTGCTCCAACCTTCTCCTGCAGTACGGT
AGCTTCTGTACCCAATTGAACCGCGCCCTTACAGGCATCGCTGTTGAGCAAGATAAGAATAC
CCAGGAAGTTTTTGCCCAGGTTAAGCAGATATACAAAACACCGCCCATTAAGGACTTCGGAG
GCTTCAACTTCTCTCAGATACTGCCTGACCCCTCCAAGCCATCAAAACGCAGCTTCATTGAG
GACCTCTTGTTCAACAAAGTGACTCTGGCTGATGCTGGCTTCATTAAGCAGTACGGAGATTG
CCTGGGAGATATTGCTGCCAGGGACCTCATCTGCGCCCAGAAGTTTAATGGCCTGACAGTCT
TGCCCCCACTTCTGACAGACGAGATGATTGCTCAGTACACATCTGCCCTCCTCGCTGGCACC
ATAACATCCGGATGGACATTTGGTGCTGGTGCTGCCCTCCAGATTCCCTTCGCAATGCAGAT
GGCGTATCGCTTTAACGGCATCGGTGTCACACAAAACGTGTTGTATGAGAACCAAAAGCTCA
TCGCTAACCAGTTTAATTCTGCTATTGGTAAGATTCAGGACAGCCTGTCATCAACCGCGTCTG
CCCTTGGTAAGTTGCAGGACGTGGTGAACCAGAATGCTCAGGCTTTGAATACTCTGGTGAAG
CAACTCTCTTCAAATTTCGGCGCTATCTCTTCTGTGTTGAACGACATCCTGAGTCGCCTTGAT
AAGGTGGAAGCTGAAGTTCAAATTGATAGATTGATTACTGGCAGGCTCCAGTCTTTGCAGAC
CTACGTTACACAGCAGCTGATTAGGGCGGCTGAAATTAGAGCTTCCGCCAATCTGGCTGCAA
CCAAGATGTCCGAATGCGTCCTGGGTCAGTCAAAGCGCGTTGACTTTTGTGGTAAAGGCTAC
CACCTCATGTCATTTCCCCAGTCAGCACCTCACGGAGTAGTGTTCCTCCACGTCACCTACGTT
CCAGCACAGGAAAAGAATTTTACCACTGCGCCGGCAATCTGTCACGACGGTAAGGCACACT
TCCCCCGCGAGGGCGTATTCGTGTCTAACGGAACTCATTGGTTCGTCACACAGAGAAACTTC
TATGAGCCTCAGATCATTACCACCGACAATACATTTGTGTCCGGTAACTGCGACGTTGTGAT
TGGAATCGTCAACAACACTGTGTACGATCCACTTCAGCCAGAACTGGATAGCTTCAAGGAAG
AATTGGACAAATATTTCAAAAATCACACTTCACCCGATGTGGACCTGGGTGACATTAGTGGT
ATCAATGCGTCCGTGGTCAATATTCAAAAAGAGATTGACAGGCTCAACGAAGTGGCCAAGA
ACCTGAACGAAAGTCTTATCGATCTGCAAGAATTGGGAAAGTATGAGCAGTACATCAAGTG
GCCGTGGTACATTTGGTTGGGTTTTATCGCCGGTCTGATCGCCATCGTTATGGTTACCATTAT
GCTTTGCTGCATGACGAGCTGTTGCTCCTGTCTGAAGGGATGCTGCTCTTGCGGATCATGTTG
CAGCGGCCGCGATGACGATGATAAGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCT
GCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC

pET24a-entero-S-protein(mut)

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTG
TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTTCGTTTTCCTTGTTCTGTTGCCTCTCGTTAGTA
GCCAATGCGTCAACCTTACTACTAGAACCCAGCTCCCTCCAGCATATACCAACTCTTTCACC
AGGGGCGTATATTACCCGGACAAAGTGTTCCGCTCAAGTGTGCTGCATTCTACGCAGGACCT
TTTCTTGCCCTTTTTCAGTAATGTTACTTGGTTTCATGCTATCCATGTGTCTGGAACTAACGGA
ACCAAGCGCTTTGACAACCCCGTCCTCCCTTTCAACGATGGCGTGTACTTCGCTTCCACGGA
AAAGTCAAACATAATTCGCGGCTGGATCTTTGGTACAACACTCGACTCAAAGACGCAGAGC
CTGCTGATCGTTAATAACGCTACAAATGTTGTGATAAAGGTGTGTGAATTTCAGTTCTGCAA
TGATCCCTTCCTGGGTGTGTACTACCATAAGAATAACAAGAGCTGGATGGAATCCGAATTTA
GGGTTTACAGTTCCGCTAACAACTGCACATTCGAATACGTAAGCCAGCCATTTCTTATGGAT
CTTGAGGGCAAGCAAGGAAACTTCAAGAACTTGAGGGAGTTCGTGTTCAAAAATATCGACG
GCTATTTTAAGATATATAGCAAGCACACTCCAATAAACTTGGTGCGCGACCTGCCCCAGGGA
TTCTCTGCTCTGGAGCCCCTGGTGGATCTGCCCATTGGAATAAACATAACTCGCTTTCAAACA
CTGCTCGCCCTGCATCGCAGTTACCTCACCCCTGGTGATAGTAGTTCAGGATGGACAGCAGG
AGCCGCCGCATACTACGTCGGCTACCTGCAGCCTAGGACCTTCTTGCTGAAGTACAACGAGA
ACGGTACAATAACTGACGCTGTGGACTGCGCTCTGGACCCTCTGTCCGAGACGAAGTGCACC
CTGAAGAGCTTTACTGTTGAAAAAGGCATTTACCAAACCAGCAACTTCCGCGTCCAGCCAAC
CGAGAGCATCGTCAGATTTCCCAACATTACAAATCTGTGTCCCTTCGGCGAGGTGTTCAACG
CCACACGCTTCGCTTCAGTGTACGCATGGAACCGCAAGCGCATATCTAACTGCGTCGCGGAT

TATTCTGTCCTCTACAACTCCGCCTCTTTCTCCACCTTCAAGTGCTACGGAGTGTCACCGACT
AAGCTGAACGATCTCTGCTTTACCAACGTCTACGCGGACTCCTTCGTGATAAGAGGTGATGA
AGTGAGACAAATAGCCCCAGGTCAGACTGGTAAGATCGCAGATTACAACTACAAATTGCCT
GATGATTTCACTGGTTGCGTTATCGCGTGGAACTCTAATAACCTCGATTCTAAGGTCGGTGGT
AACTACAATTACCTGTACCGCTTGTTTAGGAAGTCAAACCTGAAGCCTTTCGAGAGGGATAT
TTCAACCGAAATCTATCAAGCGGGTTCAACACCGTGTAACGGTGTGGAAGGATTTAACTGCT
ACTTCCCCCTGCAGTCTTACGGATTCCAGCCAACCAATGGCGTGGGTTACCAACCTTATCGC
GTGGTGGTTCTGAGTTTCGAACTGTTGCACGCTCCCGCCACGGTATGCGGTCCCAAGAAGAG
CACTAACTTGGTGAAGAATAAGTGCGTGAATTTCAATTTCAATGGCCTCACTGGAACTGGAG
TGCTGACCGAATCCAATAAGAAGTTCTTGCCCTTCCAGCAGTTCGGAAGAGACATTGCTGAC
ACAACCGACGCGGTGCGCGATCCTCAGACTCTGGAGATATTGGACATTACACCATGTTCTTT
CGGCGGTGTGTCTGTCATTACTCCGGGCACGAATACTAGCAACCAGGTAGCCGTGCTGTACC
AAGACGTGAATTGCACAGAGGTTCCCGTCGCAATTCACGCTGACCAGCTGACCCCCACGTGG
AGGGTTTACAGCACTGGTAGTAACGTCTTCCAGACGAGAGCCGGTTGCTTGATCGGAGCGGA
ACATGTGAATAACTCCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGAGCCGGTATATGCGCCTCTTATC
AGACACAAACTAACTCACCCCAGCAAGCCCAGAGTGTGGCTTCTCAAAGCATTATAGCATAC
ACTATGTCTCTTGGTGCCGAAAATTCCGTGGCCTATTCTAACAATTCAATCGCCATCCCAACC
AACTTCACAATTAGCGTGACTACCGAAATACTGCCTGTGAGCATGACGAAAACCAGCGTAG
ACTGCACTATGTATATCTGTGGAGACTCCACTGAGTGCTCCAACCTTCTCCTGCAGTACGGTA
GCTTCTGTACCCAATTGAACCGCGCCCTTACAGGCATCGCTGTTGAGCAAGATAAGAATACC
CAGGAAGTTTTTGCCCAGGTTAAGCAGATATACAAAACACCGCCCATTAAGGACTTCGGAG
GCTTCAACTTCTCTCAGATACTGCCTGACCCCTCCAAGCCATCAAAACGCAGCTTCATTGAG
GACCTCTTGTTCAACAAAGTGACTCTGGCTGATGCTGGCTTCATTAAGCAGTACGGAGATTG
CCTGGGAGATATTGCTGCCAGGGACCTCATCTGCGCCCAGAAGTTTAATGGCCTGACAGTCT
TGCCCCCACTTCTGACAGACGAGATGATTGCTCAGTACACATCTGCCCTCCTCGCTGGCACC
ATAACATCCGGATGGACATTTGGTGCTGGTGCTGCCCTCCAGATTCCCTTCGCAATGCAGAT
GGCGTATCGCTTTAACGGCATCGGTGTCACACAAAACGTGTTGTATGAGAACCAAAAGCTCA
TCGCTAACCAGTTTAATTCTGCTATTGGTAAGATTCAGGACAGCCTGTCATCAACCGCGTCTG
CCCTTGGTAAGTTGCAGGACGTGGTGAACCAGAATGCTCAGGCTTTGAATACTCTGGTGAAG
CAACTCTCTTCAAATTTCGGCGCTATCTCTTCTGTGTTGAACGACATCCTGAGTCGCCTTGAT
AAGGTGGAAGCTGAAGTTCAAATTGATAGATTGATTACTGGCAGGCTCCAGTCTTTGCAGAC
CTACGTTACACAGCAGCTGATTAGGGCGGCTGAAATTAGAGCTTCCGCCAATCTGGCTGCAA
CCAAGATGTCCGAATGCGTCCTGGGTCAGTCAAAGCGCGTTGACTTTTGTGGTAAAGGCTAC
CACCTCATGTCATTTCCCCAGTCAGCACCTCACGGAGTAGTGTTCCTCCACGTCACCTACGTT
CCAGCACAGGAAAAGAATTTTACCACTGCGCCGGCAATCTGTCACGACGGTAAGGCACACT
TCCCCCGCGAGGGCGTATTCGTGTCTAACGGAACTCATTGGTTCGTCACACAGAGAAACTTC
TATGAGCCTCAGATCATTACCACCGACAATACATTTGTGTCCGGTAACTGCGACGTTGTGAT
TGGAATCGTCAACAACACTGTGTACGATCCACTTCAGCCAGAACTGGATAGCTTCAAGGAAG
AATTGGACAAATATTTCAAAAATCACACTTCACCCGATGTGGACCTGGGTGACATTAGTGGT
ATCAATGCGTCCGTGGTCAATATTCAAAAAGAGATTGACAGGCTCAACGAAGTGGCCAAGA
ACCTGAACGAAAGTCTTATCGATCTGCAAGAATTGGGAAAGTATGAGCAGTACATCAAGTG
GCCGTGGTACATTTGGTTGGGTTTTATCGCCGGTCTGATCGCCATCGTTATGGTTACCATTAT
GCTTTGCTGCATGACGAGCTGTTGCTCCTGTCTGAAGGGATGCTGCTCTTGCGGATCATGTTG
CAGCGGCCGCGATGACGATGATAAGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCT
GCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC

pET24a-entero-RBD

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTG
TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGACCATCATCGCCCTGAGCTACATCTTCTGC
CTGGTGTTCGCCACTAATCTTTGTCCGTTCGGTGAGGTTTTTAACGCGACAAGGTTCGCTAGT
GTATATGCTTGGAACCGAAAGAGAATCTCCAATTGCGTAGCTGATTACTCCGTTCTCTATAA
CAGTGCGTCCTTTTCAACCTTTAAGTGTTACGGCGTTTCTCCAACGAAGCTGAATGATCTCTG
TTTTACGAACGTGTATGCTGACTCTTTCGTTATACGGGGGGACGAAGTGAGACAGATAGCAC
CAGGTCAGACTGGGAAGATAGCGGATTACAACTATAAGTTGCCCGATGATTTTACGGGGTGC
GTAATCGCATGGAACTCAAACAACCTCGACTCCAAAGTAGGTGGTAATTATAATTACTTGTA
TCGCCTGTTTCGAAAGAGCAATTTGAAGCCTTTTGAGCGGGATATTTCAACCGAAATTTACC

AAGCAGGCAGTACGCCATGTAACGGAGTAGAGGGATTTAATTGCTACTTTCCTCTTCAATCT
TATGGCTTTCAACCAACAAACGGAGTGGGGTATCAACCTTATAGAGTGGTAGTATTGTCCTT
TGAGCTCCTCCACGCCCCGGCTACAGTTTGTGGGCCCAAAAAGTGCGGCCGCGATGACGATG
ATAAGCTCGAGCACCACCACCACCACCACTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGA
AGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAGCAATAACTAGC

pET24a-entero-RBD-CRM197

TAATACGACTCACTATAGGGGAATTGTGAGCGGATAACAATTCCCCTCTAGAAATAATTTTG
TTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGAAGACCATCATCGCCCTGAGCTACATCTTCTGC
CTGGTGTTCGCCACTAATCTTTGTCCGTTCGGTGAGGTTTTTAACGCGACAAGGTTCGCTAGT
GTATATGCTTGGAACCGAAAGAGAATCTCCAATTGCGTAGCTGATTACTCCGTTCTCTATAA
CAGTGCGTCCTTTTCAACCTTTAAGTGTTACGGCGTTTCTCCAACGAAGCTGAATGATCTCTG
TTTTACGAACGTGTATGCTGACTCTTTCGTTATACGGGGGGACGAAGTGAGACAGATAGCAC
CAGGTCAGACTGGGAAGATAGCGGATTACAACTATAAGTTGCCCGATGATTTTACGGGGTGC
GTAATCGCATGGAACTCAAACAACCTCGACTCCAAAGTAGGTGGTAATTATAATTACTTGTA
TCGCCTGTTTCGAAAGAGCAATTTGAAGCCTTTTGAGCGGGATATTTCAACCGAAATTTACC
AAGCAGGCAGTACGCCATGTAACGGAGTAGAGGGATTTAATTGCTACTTTCCTCTTCAATCT
TATGGCTTTCAACCAACAAACGGAGTGGGGTATCAACCTTATAGAGTGGTAGTATTGTCCTT
TGAGCTCCTCCACGCCCCGGCTACAGTTTGTGGGCCCAAAAAGGGATCACGGGTCTTCGCAG
AAGACCTGGCTGCCATGGGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTTCTAAATCTTTTGTGATGGAAA
ACTTTTCTTCGTACCACGGGACTAAACCTGGTTATGTAGATACCATTCAAAAAGGTATACAA
AAGCCAAAATCTGGTACACAAGGAAATTATGACGATGATTGGAAAGAGTTTTATAGTACCG
ACAATAAATACGACGCTGCGGGATACTCTGTAGATAATGAAAACCCGCTCTCTGGAAAAGC
TGGAGGCGTGGTCAAAGTGACGTATCCAGGACTGACGAAGGTTCTCGCACTAAAAGTGGAT
AATGCCGAAACTATTAAGAAAAAATTAGGTTTAAGTCTCACTGGACCGTTGATGGAACAAGT
CGGAACGGAAAAGTTTATCAAAAGGTTCGGTGATGGTGCTTCGCGTGTAGTGCTCAGCCTTC
CCTTCGCTGAGGGGAGTTCTAGCGTTGAATATATTAATAACTGGGAACAGGCGAAAGCGTTA
AGCGTAGAACTTGAGATTAATTTTGAAACCCGTGGAAAACGTGGCCAAGATGCGATGTATG
AGTATATGGCTCAAGCCTGTGCAGGAAATCGTGTCAGGCGATCAGTAGGTAGCTCATTGTCA
TGCATAAATCTTGATTGGGATGTCATAAGGGATAAAACTAAGACAAAGATAGAGTCTTTGA
AAGAGCATGGCCCTATCAAAAATAAAATGAGCGAAAGTCCCAATAAAACAGTATCTGAGGA
AAAAGCTAAACAATACCTAGAAGAATTTCATCAAACGGCATTAGAGCATCCTGAATTGTCA
GAACTTAAAACCGTTACTGGGACCAATTCCGTATTCGCTGGGGCTAACTATGCGGCGTGGGC
AGTAAACGTTGGGCCAGTTATCGAAAGCGAAACAGCTGATAATTTGGAAAAGACAACTGGT
GCTCTTTCGATACTTCCTGGTATCGGTAGCGTAATGGGCATTGCAGACGGTGCCGTTCACCCC
AATACAGAAGAGATAGTGGCACAATCAATAGCTTTATCGTCTTTAATGGTTGCTCAAGCTAT
TCCATTGGTAGGAGAGCTAGTTGATATTGGTTTCGCTGCATATAATTTTGTAGAGAGTATTAT
CAATTTATTTCAAGTAGTTCATAATTCGTATAATCGTCCCGCGTATTCTCCGGGGCATAAAAC
GCAACCATTTCTTCATGACGGGTATGCTGTCAGTTGGAACACTGTTGAAGATTCGATAATCC
GAACTGGTTTTCAAGGGGAGAGTGGGCACGACATAAAAATTACTGCTGAAAATACCCCGCT
TCCAATCGCGGGTGTCCTACTACCGACTATTCCTGGAAAGCTGGACGTTAATAAGTCCAAGA
CTCATATTTCCGTAAATGGTCGGAAAATAAGGATGCGTTGCAGAGCTATAGACGGTGATGTA
ACTTTTTGTCGCCCTAAATCTCCTGTTTATGTTGGTAATGGTGTGCATGCGAATCTTCACGTG
GCATTTCACAGAAGCAGCTCGGAGAAAATTCATTCTAATGAAATTTCGTCGGATTCCATAGG
CGTTCTTGGGTACCAGAAAACAGTAGATCACACCAAGGTTAATTCTAAGCTATCGCTATTTT
TTGAAATCAAAAGCTGCGGCCGCGATGACGATGATAAGCTCGAGCACCACCACCACCACCA
CTGAGATCCGGCTGCTAACAAAGCCCGAAAGGAAGCTGAGTTGGCTGCTGCCACCGCTGAG
CAATAACTAGC

pEGFP-N1-RBD

GCCACCATGAAGACCATCATCGCCCTGAGCTACATCTTCTGCCTGGTGTTCGCCACTAATCTT
TGTCCGTTCGGTGAGGTTTTTAACGCGACAAGGTTCGCTAGTGTATATGCTTGGAACCGAAA
GAGAATCTCCAATTGCGTAGCTGATTACTCCGTTCTCTATAACAGTGCGTCCTTTTCAACCTT
TAAGTGTTACGGCGTTTCTCCAACGAAGCTGAATGATCTCTGTTTTACGAACGTGTATGCTGA
CTCTTTCGTTATACGGGGGGACGAAGTGAGACAGATAGCACCAGGTCAGACTGGGAAGATA
GCGGATTACAACTATAAGTTGCCCGATGATTTTACGGGGTGCGTAATCGCATGGAACTCAAA

CAACCTCGACTCCAAAGTAGGTGGTAATTATAATTACTTGTATCGCCTGTTTCGAAAGAGCA
ATTTGAAGCCTTTTGAGCGGGATATTTCAACCGAAATTTACCAAGCAGGCAGTACGCCATGT
AACGGAGTAGAGGGATTTAATTGCTACTTTCCTCTTCAATCTTATGGCTTTCAACCAACAAAC
GGAGTGGGGTATCAACCTTATAGAGTGGTAGTATTGTCCTTTGAGCTCCTCCACGCCCCGGC
TACAGTTTGTGGGCCCAAAAAGGGATCGACGGTACCGCGGGCCCGGGATCCACCGGTCGCC
ACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGG
ACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTA
CGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCC
TCGTGACCACCCTGACCTACGGCGTGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAG
CACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAA
GGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAAC
CGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGG
AGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAA
GGTGAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTAC
CAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCA
CCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTT
CGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCGC

pcDNA3-S-protein

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCACCATGTTCGTTTTCCTTGTTC
TGTTGCCTCTCGTTAGTAGCCAATGCGTCAACCTTACTACTAGAACCCAGCTCCCTCCAGCAT
ATACCAACTCTTTCACCAGGGGCGTATATTACCCGGACAAAGTGTTCCGCTCAAGTGTGCTG
CATTCTACGCAGGACCTTTTCTTGCCCTTTTTCAGTAATGTTACTTGGTTTCATGCTATCCATG
TGTCTGGAACTAACGGAACCAAGCGCTTTGACAACCCCGTCCTCCCTTTCAACGATGGCGTG
TACTTCGCTTCCACGGAAAAGTCAAACATAATTCGCGGCTGGATCTTTGGTACAACACTCGA
CTCAAAGACGCAGAGCCTGCTGATCGTTAATAACGCTACAAATGTTGTGATAAAGGTGTGTG
AATTTCAGTTCTGCAATGATCCCTTCCTGGGTGTGTACTACCATAAGAATAACAAGAGCTGG
ATGGAATCCGAATTTAGGGTTTACAGTTCCGCTAACAACTGCACATTCGAATACGTAAGCCA
GCCATTTCTTATGGATCTTGAGGGCAAGCAAGGAAACTTCAAGAACTTGAGGGAGTTCGTGT
TCAAAAATATCGACGGCTATTTTAAGATATATAGCAAGCACACTCCAATAAACTTGGTGCGC
GACCTGCCCCAGGGATTCTCTGCTCTGGAGCCCCTGGTGGATCTGCCCATTGGAATAAACAT
AACTCGCTTTCAAACACTGCTCGCCCTGCATCGCAGTTACCTCACCCCTGGTGATAGTAGTTC
AGGATGGACAGCAGGAGCCGCCGCATACTACGTCGGCTACCTGCAGCCTAGGACCTTCTTGC
TGAAGTACAACGAGAACGGTACAATAACTGACGCTGTGGACTGCGCTCTGGACCCTCTGTCC
GAGACGAAGTGCACCCTGAAGAGCTTTACTGTTGAAAAAGGCATTTACCAAACCAGCAACT
TCCGCGTCCAGCCAACCGAGAGCATCGTCAGATTTCCCAACATTACAAATCTGTGTCCCTTC
GGCGAGGTGTTCAACGCCACACGCTTCGCTTCAGTGTACGCATGGAACCGCAAGCGCATATC
TAACTGCGTCGCGGATTATTCTGTCCTCTACAACTCCGCCTCTTTCTCCACCTTCAAGTGCTA
CGGAGTGTCACCGACTAAGCTGAACGATCTCTGCTTTACCAACGTCTACGCGGACTCCTTCG
TGATAAGAGGTGATGAAGTGAGACAAATAGCCCCAGGTCAGACTGGTAAGATCGCAGATTA
CAACTACAAATTGCCTGATGATTTCACTGGTTGCGTTATCGCGTGGAACTCTAATAACCTCG
ATTCTAAGGTCGGTGGTAACTACAATTACCTGTACCGCTTGTTTAGGAAGTCAAACCTGAAG
CCTTTCGAGAGGGATATTTCAACCGAAATCTATCAAGCGGGTTCAACACCGTGTAACGGTGT
GGAAGGATTTAACTGCTACTTCCCCCTGCAGTCTTACGGATTCCAGCCAACCAATGGCGTGG
GTTACCAACCTTATCGCGTGGTGGTTCTGAGTTTCGAACTGTTGCACGCTCCCGCCACGGTAT
GCGGTCCCAAGAAGAGCACTAACTTGGTGAAGAATAAGTGCGTGAATTTCAATTTCAATGGC
CTCACTGGAACTGGAGTGCTGACCGAATCCAATAAGAAGTTCTTGCCCTTCCAGCAGTTCGG
AAGAGACATTGCTGACACAACCGACGCGGTGCGCGATCCTCAGACTCTGGAGATATTGGAC
ATTACACCATGTTCTTTCGGCGGTGTGTCTGTCATTACTCCGGGCACGAATACTAGCAACCA
GGTAGCCGTGCTGTACCAAGACGTGAATTGCACAGAGGTTCCCGTCGCAATTCACGCTGACC
AGCTGACCCCCACGTGGAGGGTTTACAGCACTGGTAGTAACGTCTTCCAGACGAGAGCCGGT
TGCTTGATCGGAGCGGAACATGTGAATAACTCCTACGAGTGCGACATCCCCATCGGAGCCGG
TATATGCGCCTCTTATCAGACACAAACTAACTCACCCAGGAGAGCCCGCAGTGTGGCTTCTC
AAAGCATTATAGCATACACTATGTCTCTTGGTGCCGAAAATTCCGTGGCCTATTCTAACAATT
CAATCGCCATCCCAACCAACTTCACAATTAGCGTGACTACCGAAATACTGCCTGTGAGCATG
ACGAAAACCAGCGTAGACTGCACTATGTATATCTGTGGAGACTCCACTGAGTGCTCCAACCT

TCTCCTGCAGTACGGTAGCTTCTGTACCCAATTGAACCGCGCCCTTACAGGCATCGCTGTTGA
GCAAGATAAGAATACCCAGGAAGTTTTTGCCCAGGTTAAGCAGATATACAAAACACCGCCC
ATTAAGGACTTCGGAGGCTTCAACTTCTCTCAGATACTGCCTGACCCCTCCAAGCCATCAAA
ACGCAGCTTCATTGAGGACCTCTTGTTCAACAAAGTGACTCTGGCTGATGCTGGCTTCATTA
AGCAGTACGGAGATTGCCTGGGAGATATTGCTGCCAGGGACCTCATCTGCGCCCAGAAGTTT
AATGGCCTGACAGTCTTGCCCCCACTTCTGACAGACGAGATGATTGCTCAGTACACATCTGC
CCTCCTCGCTGGCACCATAACATCCGGATGGACATTTGGTGCTGGTGCTGCCCTCCAGATTCC
CTTCGCAATGCAGATGGCGTATCGCTTTAACGGCATCGGTGTCACACAAAACGTGTTGTATG
AGAACCAAAAGCTCATCGCTAACCAGTTTAATTCTGCTATTGGTAAGATTCAGGACAGCCTG
TCATCAACCGCGTCTGCCCTTGGTAAGTTGCAGGACGTGGTGAACCAGAATGCTCAGGCTTT
GAATACTCTGGTGAAGCAACTCTCTTCAAATTTCGGCGCTATCTCTTCTGTGTTGAACGACAT
CCTGAGTCGCCTTGATAAGGTGGAAGCTGAAGTTCAAATTGATAGATTGATTACTGGCAGGC
TCCAGTCTTTGCAGACCTACGTTACACAGCAGCTGATTAGGGCGGCTGAAATTAGAGCTTCC
GCCAATCTGGCTGCAACCAAGATGTCCGAATGCGTCCTGGGTCAGTCAAAGCGCGTTGACTT
TTGTGGTAAAGGCTACCACCTCATGTCATTTCCCCAGTCAGCACCTCACGGAGTAGTGTTCCT
CCACGTCACCTACGTTCCAGCACAGGAAAAGAATTTTACCACTGCGCCGGCAATCTGTCACG
ACGGTAAGGCACACTTCCCCCGCGAGGGCGTATTCGTGTCTAACGGAACTCATTGGTTCGTC
ACACAGAGAAACTTCTATGAGCCTCAGATCATTACCACCGACAATACATTTGTGTCCGGTAA
CTGCGACGTTGTGATTGGAATCGTCAACAACACTGTGTACGATCCACTTCAGCCAGAACTGG
ATAGCTTCAAGGAAGAATTGGACAAATATTTCAAAAATCACACTTCACCCGATGTGGACCTG
GGTGACATTAGTGGTATCAATGCGTCCGTGGTCAATATTCAAAAAGAGATTGACAGGCTCAA
CGAAGTGGCCAAGAACCTGAACGAAAGTCTTATCGATCTGCAAGAATTGGGAAAGTATGAG
CAGTACATCAAGTGGCCGTGGTACATTTGGTTGGGTTTTATCGCCGGTCTGATCGCCATCGTT
ATGGTTACCATTATGCTTTGCTGCATGACGAGCTGTTGCTCCTGTCTGAAGGGATGCTGCTCT
TGCGGATCATGTTGCAGCGGCCGCGATGACGATGATAAGCTCGAGCACCACCACCACCACC
ACTGATTG

pcDNA3-RBD-CRM197

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCACCATGAAGACCATCATCGC
CCTGAGCTACATCTTCTGCCTGGTGTTCGCCACTAATCTTTGTCCGTTCGGTGAGGTTTTTAA
CGCGACAAGGTTCGCTAGTGTATATGCTTGGAACCGAAAGAGAATCTCCAATTGCGTAGCTG
ATTACTCCGTTCTCTATAACAGTGCGTCCTTTTCAACCTTTAAGTGTTACGGCGTTTCTCCAA
CGAAGCTGAATGATCTCTGTTTTACGAACGTGTATGCTGACTCTTTCGTTATACGGGGGGAC
GAAGTGAGACAGATAGCACCAGGTCAGACTGGGAAGATAGCGGATTACAACTATAAGTTGC
CCGATGATTTTACGGGGTGCGTAATCGCATGGAACTCAAACAACCTCGACTCCAAAGTAGGT
GGTAATTATAATTACTTGTATCGCCTGTTTCGAAAGAGCAATTTGAAGCCTTTTGAGCGGGA
TATTTCAACCGAAATTTACCAAGCAGGCAGTACGCCATGTAACGGAGTAGAGGGATTTAATT
GCTACTTTCCTCTTCAATCTTATGGCTTTCAACCAACAAACGGAGTGGGGTATCAACCTTATA
GAGTGGTAGTATTGTCCTTTGAGCTCCTCCACGCCCCGGCTACAGTTTGTGGGCCCAAAAAG
GGATCACGGGTCTTCGCAGAAGACCTGGCTGCCATGGGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTTC
TAAATCTTTTGTGATGGAAAACTTTTCTTCGTACCACGGGACTAAACCTGGTTATGTAGATAC
CATTCAAAAAGGTATACAAAAGCCAAAATCTGGTACACAAGGAAATTATGACGATGATTGG
AAAGAGTTTTATAGTACCGACAATAAATACGACGCTGCGGGATACTCTGTAGATAATGAAA
ACCCGCTCTCTGGAAAAGCTGGAGGCGTGGTCAAAGTGACGTATCCAGGACTGACGAAGGT
TCTCGCACTAAAAGTGGATAATGCCGAAACTATTAAGAAAAAATTAGGTTTAAGTCTCACTG
GACCGTTGATGGAACAAGTCGGAACGGAAAAGTTTATCAAAAGGTTCGGTGATGGTGCTTC
GCGTGTAGTGCTCAGCCTTCCCTTCGCTGAGGGGAGTTCTAGCGTTGAATATATTAATAACT
GGGAACAGGCGAAAGCGTTAAGCGTAGAACTTGAGATTAATTTTGAAACCCGTGGAAAACG
TGGCCAAGATGCGATGTATGAGTATATGGCTCAAGCCTGTGCAGGAAATCGTGTCAGGCGAT
CAGTAGGTAGCTCATTGTCATGCATAAATCTTGATTGGGATGTCATAAGGGATAAAACTAAG
ACAAAGATAGAGTCTTTGAAAGAGCATGGCCCTATCAAAAATAAAATGAGCGAAAGTCCCA
ATAAAACAGTATCTGAGGAAAAAGCTAAACAATACCTAGAAGAATTTCATCAAACGGCATT
AGAGCATCCTGAATTGTCAGAACTTAAAACCGTTACTGGGACCAATTCCGTATTCGCTGGGG
CTAACTATGCGGCGTGGGCAGTAAACGTTGGGCCAGTTATCGAAAGCGAAACAGCTGATAA
TTTGGAAAAGACAACTGGTGCTCTTTCGATACTTCCTGGTATCGGTAGCGTAATGGGCATTG
CAGACGGTGCCGTTCACCCCAATACAGAAGAGATAGTGGCACAATCAATAGCTTTATCGTCT

TTAATGGTTGCTCAAGCTATTCCATTGGTAGGAGAGCTAGTTGATATTGGTTTCGCTGCATAT
AATTTTGTAGAGAGTATTATCAATTTATTTCAAGTAGTTCATAATTCGTATAATCGTCCCGCG
TATTCTCCGGGGCATAAAACGCAACCATTTCTTCATGACGGGTATGCTGTCAGTTGGAACAC
TGTTGAAGATTCGATAATCCGAACTGGTTTTCAAGGGGAGAGTGGGCACGACATAAAAATT
ACTGCTGAAAATACCCCGCTTCCAATCGCGGGTGTCCTACTACCGACTATTCCTGGAAAGCT
GGACGTTAATAAGTCCAAGACTCATATTTCCGTAAATGGTCGGAAAATAAGGATGCGTTGCA
GAGCTATAGACGGTGATGTAACTTTTTGTCGCCCTAAATCTCCTGTTTATGTTGGTAATGGTG
TGCATGCGAATCTTCACGTGGCATTTCACAGAAGCAGCTCGGAGAAAATTCATTCTAATGAA
ATTTCGTCGGATTCCATAGGCGTTCTTGGGTACCAGAAAACAGTAGATCACACCAAGGTTAA
TTCTAAGCTATCGCTATTTTTTGAAATCAAAAGCAGCGGCCGCGATGACGATGATAAGCTCG
AGCACCACCACCACCACCACTGATTGTCG

pcDNA3-SARS-CoV-2-S-RBD-8his

TAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGCCACCATGAAGACCATCATCGC
CCTGAGCTACATCTTCTGCCTGGTGTTCGCCACTAATCTTTGTCCGTTCGGTGAGGTTTTTAA
CGCGACAAGGTTCGCTAGTGTATATGCTTGGAACCGAAAGAGAATCTCCAATTGCGTAGCTG
ATTACTCCGTTCTCTATAACAGTGCGTCCTTTTCAACCTTTAAGTGTTACGGCGTTTCTCCAA
CGAAGCTGAATGATCTCTGTTTTACGAACGTGTATGCTGACTCTTTCGTTATACGGGGGGAC
GAAGTGAGACAGATAGCACCAGGTCAGACTGGGAAGATAGCGGATTACAACTATAAGTTGC
CCGATGATTTTACGGGGTGCGTAATCGCATGGAACTCAAACAACCTCGACTCCAAAGTAGGT
GGTAATTATAATTACTTGTATCGCCTGTTTCGAAAGAGCAATTTGAAGCCTTTTGAGCGGGA
TATTTCAACCGAAATTTACCAAGCAGGCAGTACGCCATGTAACGGAGTAGAGGGATTTAATT
GCTACTTTCCTCTTCAATCTTATGGCTTTCAACCAACAAACGGAGTGGGGTATCAACCTTATA
GAGTGGTAGTATTGTCCTTTGAGCTCCTCCACGCCCCGGCTACAGTTTGTGGGCCCAAAAAG
GGATCCGGTCACCATCACCACCACCATCATCATTGATAACTCGAG

ДОДАТОК Б

НУКЛЕОТИДНІ І АМІНОКИСЛОТНІ ПОСЛІДОВНОСТІ* ОДЕРЖАНИХ РЕКОМБІНАНТНИХ ПРОТЕЇНІВ SARS-COV-2 ТА ЇХ КОН'ЮГАТІВ

(за результатами секвенування)

Примітка: * – наведено С-кінцеві послідовності рекомбінантних протеїнів RBD, RBD–CRM197, RBD–eGFP.

RBD

> - 794 nucleotides
Translation in forward direction:

DNA: taataggggatttgtgagccggatagcaattccccctcctagaaattaatttggttaactt
+3fr: IleGlyAspLeuOp*AlaGlyAm*GlnPheProSerAm*LysLeuIleTrpLeuThrAm*

DNA: aggaagagaataataccatgacaaattctgtggtcattccggttgaggtttttaaacgcg
+3fr: GluGluAsnAsnThrMetThrAsnSerValValIleProValGluValPheLysArgAsp

DNA: acaagggtttcggctagttgtattatgcttgggaagccgaaagaagaatctcccaattgc
+3fr: LysGlyPheGlyAm*LeuTyrTyrAlaTrpGluAlaGluArgArgIleSerGlnLeuArg

DNA: gtaggctgatttactcccggttctctataacagtgcgtaacataaaacaaaccatttaag
+3fr: ArgLeuIleTyrSerArgPheSerIleThrValArgAsnIleLysGlnThrIleOc*Val

DNA: tgttacggcgtttctcccaacgaagctgaatgatctctgttttacgaacgtgtatgctga
+3fr: LeuArgArgPheSerGlnArgSerOp*MetIleSerValLeuArgThrCysMetLeuThr

DNA: ctctattcgttatacgggggacgaagtgagacagatagcaccaggtcagactgggaaga
+3fr: LeuPheValIleArgGlyAspGluValArgGlnIleAlaProGlyGlnThrGlyLysIle

DNA: tagcggattacaactataagttgcccgatgattttacggggtgcgtaatcgcatggaact
+3fr: AlaAspTyrAsnTyrLysLeuProAspAspPheThrGlyCysValIleAlaTrpAsnSer

DNA: caaacaacctcgactccaaagtaggtggtaattataattacttgtatcgcctgtttcgaa
+3fr: AsnAsnLeuAspSerLysValGlyGlyAsnTyrAsnTyrLeuTyrArgLeuPheArgLys

DNA: agagcaatttgaagccttttgagcgggatatttcaaccgaaatttaccaagcaggcagta
+3fr: SerAsnLeuLysProPheGluArgAspIleSerThrGluIleTyrGlnAlaGlySerThr

DNA: cgccatgtaacggagtagagggatttaattgctactttcctcttcaatcttatggctttc
+3fr: ProCysAsnGlyValGluGlyPheAsnCysTyrPheProLeuGlnSerTyrGlyPheGln

DNA: aaccaacaaacggagtggggtatcaaccttatagagtggtagtattgtcctttgagctcc
+3fr: ProThrAsnGlyValGlyTyrGlnProTyrArgValValValLeuSerPheGluLeuLeu

DNA: tccacgccccggctacagtttgtgggcccaaaaagtgcggccgcgatgacgatgataagc
+3fr: HisAlaProAlaThrValCysGlyProLysLysCysGlyArgAspAspAspAspLysLeu

DNA: tcgagcaccaccaccaccaccactgagatccggctgctaacaaagccccgaaatggaaag
+3fr: GluHisHisHisHisHisHisOp*AspProAlaAlaAsnLysAlaProLysTrpLysGly

DNA: ggccgtttggggtt
+3fr: ProPheGlyVal

RBD–CRM197

> - 751 nucleotides
Translation in forward direction:

DNA: tatcccggaaaagagggatagtgggcaccatccatagctcaatcattctgatggttgctc
+1fr: TyrProGlyLysGluGlyAm*TrpAlaProSerIleAlaGlnSerPheOp*TrpLeuLeu

DNA: aaaggcctatccatttggttaaggagaagctagttgaataactggttcgctgcataataa
+1fr: LysGlyLeuSerIleTrpLeuArgArgSerAm*LeuAsnAsnTrpPheAlaAlaOc*Oc*

DNA: attttgttagagagtatatcaaattatttcaaagtaagttccataattcgtataatccgt
+1fr: IleLeuLeuGluSerIleSerAsnTyrPheLysValSerSerIleIleArgIleIleArg

DNA: ccccgcgtattctccgggggcataaaagcgcaaccatttcttcacgacggggtatgctgt
+1fr: ProArgValPheSerGlyGlyIleLysAlaGlnProPheLeuHisAspGlyValCysCys

DNA: cagttggaacactgttgaagatttcggtaatccgaactggttttcaaggggagagtgggc
+1fr: GlnLeuGluHisCysOp*ArgPheArgOc*SerGluLeuValPheLysGlyArgValGly

DNA: acgacataaaattactgctgaaaataccccgcttccaatcgcgggtgtcctactaccgac
+1fr: ThrThrOc*AsnTyrCysOp*LysTyrProAlaSerAsnArgGlyCysProThrThrAsp

DNA: tattcctggaaagctggacgttaataagtccaagactcatatttccgtaaatggtcggaa
+1fr: TyrSerTrpLysAlaGlyArgOc*Oc*ValGlnAspSerTyrPheArgLysTrpSerGlu

DNA: aataaggatgcgttgcagagctatagacggtgatgtaactttctgtcgccctaaatctcc
+1fr: AsnLysAspAlaLeuGlnSerTyrArgArgOp*CysAsnPheLeuSerProOc*IleSer

DNA: tgtttatgttggtatggtgtgcatgcgaatcttcacgtggcatttcacagaagcagctcg
+1fr: CysLeuCysTrpTyrGlyValHisAlaAsnLeuHisValAlaPheHisArgSerSerSer

DNA: gagaaaattcattctaatgaaatttcatcggattccataggcgttcttgggtaccagaaa
+1fr: GluLysIleHisSerAsnGluIleSerSerAspSerIleGlyValLeuGlyTyrGlnLys

DNA: acagtagatcacaccaaggttaattctaagctatcgctatttttgaaatcaagagctgc
+1fr: ThrValAspHisThrLysValAsnSerLysLeuSerLeuPhePheGluIleLysSerCys

DNA: ggccgcgatgacgatgataagctcgagcaccaccaccaccaccactgagatccggctgct
+1fr: GlyArgAspAspAspAspLysLeuGluHisHisHisHisHisHisOp*AspProAlaAla

DNA: aacaaagcccgaaaggaagttgaagggtgct
+1fr: AsnLysAlaArgLysGluValGluGlyCys

RBD–EGFP

```
> - 763 nucleotides
Translation in forward direction:

DNA:  tatcgttccacagtcagcgcgtctgcgaagttcgaaggccgatgccaccctaccgccagg
+2fr:  IleValProGlnSerAlaArgLeuArgSerSerLysAlaAspAlaThrLeuProProGly


DNA:  ctgaccttgaaagtccatctgcagcacggcaaagctgcccgtgcctgaccccacccctcgt
+2fr:  Op*ProOp*LysSerIleCysSerThrAlaLysLeuProValProAspProThrLeuVal


DNA:  gaccatcctgactacgggcggtgcagtgctcagcccgctaccccgaccacatgaagcagc
+2fr:  ThrIleLeuThrThrGlyGlyAlaValLeuSerProLeuProArgProHisGluAlaAla


DNA:  acgacttcttcaagtccggccatgcccgaaggctacgtccaggagcgcaccatcttcttc
+2fr:  ArgLeuLeuGlnValArgProCysProLysAlaThrSerArgSerAlaProSerSerSer


DNA:  aaggacgacggcaactacaagaccccgcgccgaggtgaagttcgagggcgacaccctggt
+2fr:  ArgThrThrAlaThrThrArgProArgAlaGluValLysPheGluGlyAspThrLeuVal


DNA:  gaaccgcatcgagctgaagggcatcgacttcaaggaggacggcaacatcctggggcacaa
+2fr:  AsnArgIleGluLeuLysGlyIleAspPheLysGluAspGlyAsnIleLeuGlyHisLys


DNA:  gctggagtacaactacaacagccacaacgtctatatcatggccgacaagcagaagaacgg
+2fr:  LeuGluTyrAsnTyrAsnSerHisAsnValTyrIleMetAlaAspLysGlnLysAsnGly


DNA:  catcaaggtgaacttcaagatccgccacaacatcgaggacggcagcgtgcagctcgccga
+2fr:  IleLysValAsnPheLysIleArgHisAsnIleGluAspGlySerValGlnLeuAlaAsp


DNA:  ccactaccagcagaacacccccatcggcgacggccccgtgctgctgcccgacaaccacta
+2fr:  HisTyrGlnGlnAsnThrProIleGlyAspGlyProValLeuLeuProAspAsnHisTyr


DNA:  cctgagcacccagtccgccctgagcaaagaccccaacgagaagcgcgatcacatggtcct
+2fr:  LeuSerThrGlnSerAlaLeuSerLysAspProAsnGluLysArgAspHisMetValLeu


DNA:  gctggagttcgtgaccgccgccgggatcactctcggcatggacgagctgtacaaagacgt
+2fr:  LeuGluPheValThrAlaAlaGlyIleThrLeuGlyMetAspGluLeuTyrLysAspVal


DNA:  ctgggacctgcaggcatgcaagcttgcggccgcactcgagcaccaccaccaccaccactg
+2fr:  TrpAspLeuGlnAlaCysLysLeuAlaAlaAlaLeuGluHisHisHisHisHisHisOp*


DNA:  agatccggctgctaacaaagcccgaaagaatgccagtggccgc
+2fr:  AspProAlaAlaAsnLysAlaArgLysAsnAlaSerGlyArg
```