

УДК 60.606

**РАЗРАБОТКА И ПОЛУЧЕНИЕ ДНК-ИММУНОГЕНА НА ОСНОВЕ ГЕНОВ SARS-COV-2****А.А. Рябченкова, Е.Р. Чирак, Е.Л. Чирак, Н.Н. Колмаков, И.В. Духовлинов**

ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Возбудителем COVID-19 является бета-коронавирус SARS-CoV-2, распознанный в качестве патогена посредством секвенирования метагеномной РНК и выделения вируса из образцов жидкости бронхоальвеолярного лаважа пациентов с тяжелой пневмонией (Zhao, 2020).

За последний год был достигнут огромный прогресс в создании эффективных вакцин против SARS-CoV-2. Согласно предварительному проекту ВОЗ по вакцинам, в настоящее время 172 вакцины-кандидата находятся в стадии доклинической разработки, 63 – в стадии клинической разработки, 6 из которых основаны на технологии плазмидной ДНК (Dey, 2021). Эти вакцины могут легко производиться бактериями в больших количествах, их производство достаточно просто масштабируется и менее затратно по сравнению с иными вариантами вакцин (Xu, 2014).

На данный момент высказываются опасения по поводу безопасности и эффективности вакцин, разрабатываемых на основе различных технологических платформ. Важно, чтобы на введение вакцины не возникло аутоиммунной перекрестной реактивности за счет присутствия в активных агентах вакцины участков, гомологичных участкам генома человека (Vojdania, 2020). Кроме того, предпочтительнее использование вакцин, которые также действенны против мутировавших штаммов нового коронавируса.

Разработанные на данный момент вакцины недостаточно эффективны от мутирующих штаммов, поскольку содержат в себе в том числе неконсервативные последовательности S белка (Rodrigues, 2020). В связи с развитием пандемии и необходимостью массовой вакцинации разработка вакцин нового поколения против коронавирусной инфекции COVID-19 является важнейшей задачей медицины и биотехнологии. Поэтому актуальна разработка ДНК-иммуногена, безопасного и активного против мутирующих штаммов SARS-CoV-2.

Целью нашей работы было разработать и получить ДНК-иммуноген на основе плазмидной ДНК, кодирующей иммуногенные фрагменты структурных белков нового  $\beta$ -коронавируса SARS-CoV-2, вызывающего коронавирусную инфекцию 2019 (COVID-19).

Полноразмерная последовательность генома базового дикого типа SARS-CoV-2 была получена с сайта NCBI (NC\_045512.2). Наиболее иммуногенные (клеточный иммунный ответ) фрагменты структурных белков M, S, N, E SARS-CoV-2 выбрали с помощью программы “CD4 T cell immunogenicity prediction” (Dhanda, 2018). Участки белков, содержащие наибольшее количество иммуногенных фрагментов, объединили с помощью полиглициновых линкеров. Выровняли полученную последовательность с помощью BLAST против белков человека, чтобы убедиться в отсутствии сходства. Для экспрессии в эукариотических клетках к гибридной последовательности также добавили транспортный сигнал белка ИГФ человека, последовательность Козака и старт-кодон.

Синтез гибридной последовательности с последующей вставкой в экспрессионный вектор pCMV-3Tag-3a был произведен на коммерческой основе в компании GenScript (США). Полученную плазмиду pCMV-3Tag-3a-CVVV3 нарабатывали в клетках *E.coli* DH5 $\alpha$ . Подлинность плазмиды подтверждали методом ПЦР, рестрикцией по сайтам клонирования BamHI и XhoI и секвенированием по Сэнгеру.

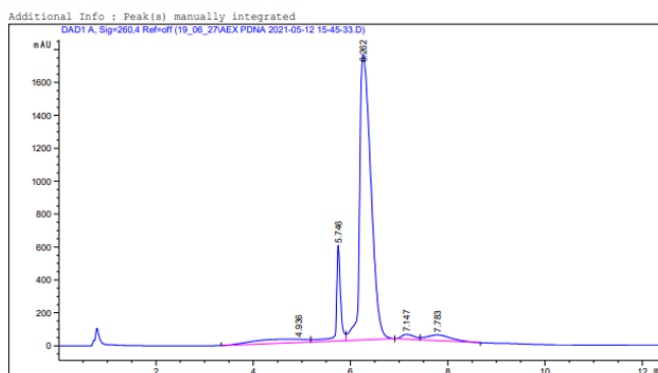
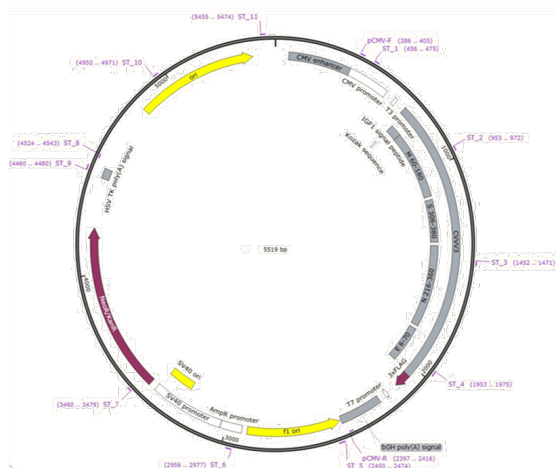
Выделение плазмидной ДНК из биомассы *E.coli* осуществляли методом щелочного лизиса. Осадок ДНК растворяли в воде и обрабатывали РНКазой А. Для последующей хроматографической очистки использовали последовательно анионообменную, гидрофобную и вновь анионообменную хроматографию.

Определение доли содержания суперспирализованных топоизомеров плазмидной ДНК производили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии в градиенте натрия хлорида (Gen-Pak FAX, NP, АХС 4,6\*100 мм 2,5 мкм, (Waters, США)). Отсутствие РНК проверяли по отсутствию диффузной полосы в области 200–500 пар нуклеотидов в 1 % агарозном геле. Определение содержания бактериальных эндотоксинов проводили с помощью ЛАЛ-теста (Pyrotell) согласно рекомендациям производителя. Определение содержания остаточных белков осуществляли методом твердофазного ИФА с помощью набора Cygnus *E.coli* Host Cell Proteins (Cygnus, № F410, США) согласно инструкции к набору.

Суммарные кроличьи антитела из сывороток крови получали двукратной иммунизацией с интервалом в 2 недели 6 самок кроликов породы Советская Шиншилла внутримышечно (в бедро) 2 мл следующей смеси: плазмидная ДНК – 0,2 мг/мл, полиэтиленимин – 1,2 мг/мл, Sabowax – 2 %, глюкоза – 10 %, бензиловый спирт – 0,3 %. Выделение и очистку антител проводили высаживанием насыщенным раствором сульфата аммония.

Наличие специфических антител к гибриднему белку CVVV3 определяли с помощью Вестерн-блоттинга с использованием белка CVVV3 в качестве антигена (был наработан в культуре эукариотических клеток НЕК293) и антител, выделенных из сыворотки кроликов. Использовали поликлональные антитела Goat Anti-Rabbit IgG conjugate (HRP) (EMD Millipore Corp, USA), специфичные к линейным участкам белковой молекулы. Образовавшиеся в месте локализации исследуемого белка иммунные комплексы проявлялись с помощью тетраметилбензидина (ТМБ). Как отрицательный контроль была использована сыворотка кроликов до иммунизации.

Созданная конструкция (рисунок 1), представляет собой ДНК-иммуноген, кодирующий гибридный белок, состоящий из фрагментов основных белков М, S, N и Е коронавируса SARS-CoV-2. Химерный белок, экспрессирующийся в клетках млекопитающих, содержит 424 аминокислоты, имеет прогнозируемую массу 46,5 кДа и рI 9,61, является стабильным и его период полураспада у млекопитающих составляет около 100 часов (Dukhovlinov, 2020).



**Рис. 1.** Структура плазмиды pCMV-3Tag-3a-CVVV3 с праймерами, необходимыми для секвенирования вектора вместе со вставкой

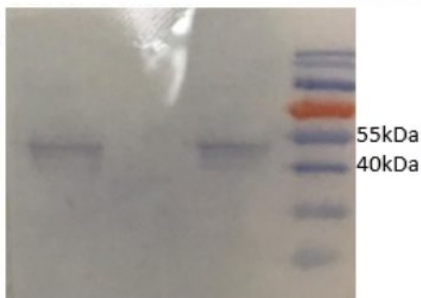
**Рис. 2.** Анализ образца pCMV-3Tag-3A-CVVV3 с помощью ВЭЖХ. Суперспирализованная изоформа – пик на 6,26 мин

В результате лизиса и хроматографической очистки из 1 кг биомассы получили 100 мг ДНК-иммуногена pCMV-3Tag-3a-CVVV3 в растворе с концентрацией 1 мг/мл.

Полученный образец проанализировали согласно ряду критериев, указанных в Государственной Фармакопее РФ (ОФС.1.7.1.0013.18 ДНК-вакцины). Время выхода суперспирализованной изоформы плазмидной ДНК составило 6,26 минут, площадь пика 85,64 % (рисунок 2).

Концентрация эндотоксинов в растворе 1 мг/мл составила менее 25,0 ЕЭ на 1 мл, концентрация остаточных белков штамма-производителя составила менее 100нг на 1 мл. Таким образом, по перечисленным критериям наш ДНК-иммуноген по перечисленным параметрам качества соответствует ГФ РФ.

Из кроличьих сывороток было получено 30 мл суммарных иммуноглобулинов с концентрацией 10 мкг/мл. Антиген CVVV3, наработанный в линии эукариотических клеток НЕК293, специфически связывается с иммуноглобулинами IgG из кроличьих сывороток после иммунизации ДНК-иммуногеном pCMV-3Tag-3A-CVVV3 (рисунок 3).



**Рис. 3.** Проверка экспрессии гибридного белка методом Вестерн-блоттинга. Образец рекомбинантного белка CVVV3, наработанный в культуре клеток НЕК293, нанесен в двух нагрузках. Source: Составлено авторами

В ходе работы был разработан и очищен ДНК-иммуноген для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих, содержащий иммуногенные участки структурных белков М, S, N, Е β-коронавируса SARS-CoV-2.

Также была подтверждена экспрессия закодированного в нём рекомбинантного белка CVVV3 в клетках млекопитающих. Метод Вестерн-блоттинга позволил оценить формирование гуморального иммунного ответа на антиген CVVV3 и предварительно оценить его использование для разработки метода, аналогичного иммунофлуоресцентному анализу (He, 2004).

Кролики были двукратно иммунизированы рCMV-3Tag-3a-CVVV3 с адьювантным комплексом ПЭИ-Sabowax, поскольку существуют трудности в достижении достаточной иммуногенности ДНК-вакцин (Lee, 2018). В данном случае повышение иммуногенности ДНК-иммуногена требует добавления в состав вакцины иного адьюванта, поскольку адьювантный комплекс ПЭИ-Sabowax не зарегистрирован, либо изменения способа введения на внутрикожный с

использованием систем доставки. Также возможен вариант интраназальной иммунизации с добавлением адьюванта.

Разработанная технология получения ДНК-иммуногена приводит к выходу 0,1 мг/г – достаточно низкий выход по сравнению с литературными данными (Williams, 2010), однако данный фактор зависит большей частью от процесса ферментации и производственных мощностей. Для наработки большего количества ДНК-иммуногена процесс ферментации будет усовершенствован.

Разработана схожая ДНК-вакцина ZyCoV-D, кодирующая фрагменты S-белка SARS-CoV-2. ДНК-вакцина-кандидат индуцирует в том числе нейтрализующие антитела и обеспечивает ответ Th-1, о чем свидетельствуют повышенные уровни IFN-γ (Momin, 2021). Дизайн нашего ДНК-иммуногена позволяет прогнозировать схожие данные исследований иммуногенности и безопасности.

Мы разработали ДНК-иммуноген рCMV-3Tag-3a-CVVV3, кодирующий гибридный белок, содержащий иммуногенные участки структурных белков М, S, N, Е β-коронавируса SARS-CoV-2, для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих. Данный ДНК-иммуноген рассматривается как перспективная кандидатная вакцина против SARS-CoV-2. Методом Вестерн-блоттинга подтверждена экспрессия гибридного белка CVVV3 в клетках млекопитающих. Усиление иммуногенных свойств ДНК-иммуногена рCMV-3Tag-3a-CVVV3 возможно изменением способа введения на интраназальный или внутрикожный. Созданный ДНК-иммуноген отвечает критериям кандидатной вакцины против COVID-19 нового поколения и в дальнейшей работе будет изучена иммуногенность и протективность.

### Литература

- Dey, A. (2021) Immunogenic potential of DNA vaccine candidate, ZyCoV-D against SARS-CoV-2 in animal models. *Vaccine*, 39(30), 4108–4116.
- Dhanda, S.K. (2018) Prediction of HLA CD4 immunogenicity in human populations. *Front. Immunol.*, 9, 1369.
- Dukhovlinov, I.V., Chirak, E.L., Kolmakov, N.N., Fedorova, E.A. and Alekseev, A.V., (2020) Pat. of the Russian Federation № 2747762, PCT/RU2020/000257 appl. 5.04.2020
- He, Q. (2004) Development of a Western Blot Assay for Detection of Antibodies against Coronavirus Causing Severe Acute Respiratory Syndrome. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 11(2), 417–422.
- Lee, J. (2018) Engineering DNA vaccines against infectious diseases. *Acta Biomater.*, 80, 31–47.
- Momin, T. (2021) Safety and Immunogenicity of a DNA SARS-CoV-2 vaccine (ZyCoV-D): Results of an open-label, non-randomized phase I part of phase I/II clinical study by intradermal route in healthy subjects in India. *EClinicalMedicine*, 38.
- Rodrigues, João P.G.L.M. (2020) Insights on cross-species transmission of SARS-CoV-2 from structural modeling. *PLoS Comput Biol.*, 16(12).
- Vojdania, A., Kharrazianb, D. (2020) Potential antigenic cross-reactivity between SARS-CoV-2 and human tissue with a possible link to an increase in autoimmune diseases. *Clinical Immunology*, 217, 1–2.
- Williams, J.A. (2010) Generic plasmid DNA production platform incorporating low metabolic burden seed-stock and fed-batch fermentation processes. *Biotechnol Bioeng.*, 103(6), 1129–1143.
- Zhao, J. (2020) Antibody responses to SARS-CoV-2 in patients of novel Coronavirus disease 2019. *Clin. Infect. Dis.*, 71(16), 2027–2034.