

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ ОЧИСТКИ, БИОХИМИЧЕСКАЯ И ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РЕКОМБИНАНТНОГО ХИМЕРНОГО АНТИГЕНА ДЛЯ ОЦЕНКИ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУНИТЕТА ПРОТИВ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Копать В.В.¹, Рябченкова А.А.¹, Чирак Е.Л.¹, Чирак Е.Р.¹,
Саенко А.И.¹, Кудрявцев И.В.^{2,4}, Трулев А.С.², Савин Т.В.^{3,4},
Зуева Е.В.³, Симбирцев А.С.^{3,4}, Тотолян Арег А.^{3,4}, Духовлинов И.В.¹

¹ ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Диагностика специфического Т-клеточного иммунитета к антигенным детерминантам SARS-CoV-2 у пациентов представляется все более важной задачей ввиду накопления данных о роли Т-клеточного иммунного ответа в протекании коронавирусной инфекции и клиренсе SARS-CoV-2 в случае вторичной инфекции. Ранее нами был разработан рекомбинантный антиген CorD_PS для оценки Т-клеточного противовирусного иммунитета, содержащий консервативные и иммуногенные последовательности структурных белков коронавируса SARS-CoV-2. Был получен его штамм-продуцент *E. coli* CorD_PS со стабильной экспрессией рекомбинантного антигена CorD_PS. Целью настоящей работы является разработка лабораторной технологии получения рекомбинантного антигена CorD_PS, проведение контроля качества полученного химерного белка и изучение его иммунологической активности. Оработку условий культивирования клеток *E. coli* CorD_PS проводили в конических колбах в среде LB-M_Km при 37 °C, затем масштабировали в ферментере объемом 30 л. Экспрессию индуцировали добавлением ИПТГ. Контроль экспрессии осуществляли в лизатах культур в 12% ПААГ в денатурирующих условиях. Полученную биомассу лизировали с помощью ультразву-

Адрес для переписки:

Рябченкова Анастасия Андреевна
ООО «АТГ Сервис Ген»
199178, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О.,
57, корп. 4, лит. Ж, пом. 5-Н, офис 1.2.5.
Тел.: 8 (981) 160-63-15.
E-mail: riabchenkova@service-gene.ru

Address for correspondence:

Anastasia A. Ryabchenkova
ATG Service Gene LLC
57 Maly Ave V. O., Bldg 4, Letter Zh,
Room 5-N, Office 1.2.5
St. Petersburg
199178 Russian Federation
Phone: +7 (981) 160-63-15.
E-mail: riabchenkova@service-gene.ru

Образец цитирования:

В.В. Копать, А.А. Рябченкова, Е.Л. Чирак, Е.Р. Чирак,
А.И. Саенко, И.В. Кудрявцев, А.С. Трулев, Т.В. Савин,
Е.В. Зуева, А.С. Симбирцев, Арег А. Тотолян,
И.В. Духовлинов «Разработка технологии очистки,
биохимическая и иммунологическая характеристика
рекомбинантного химерного антигена для оценки
Т-клеточного иммунитета против коронавирусной
инфекции» // Медицинская иммунология, 2024. Т. 26,
№ 3. С. 591-606. doi: 10.15789/1563-0625-PTD-2942

© Копать В.В. и соавт., 2024

Эта статья распространяется по лицензии
Creative Commons Attribution 4.0

For citation:

V.V. Kopat, A.A. Riabchenkova, E.L. Chirak, E.R. Chirak,
A.I. Saenko, I.V. Kudryavtsev, A.S. Trulioff, T.V. Savin,
E.V. Zuyeva, A.S. Simbirtsev, Areg A. Totolian,
I.V. Dukhovlinov "Purification technology design, biochemical
and immunological characteristics of the recombinant chimeric
antigen for evaluation of T cell immunity against coronavirus
infection", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2024, Vol. 26, no. 3, pp. 591-606.
doi: 10.15789/1563-0625-PTD-2942

© Kopat V.V. et al., 2024

The article can be used under the Creative
Commons Attribution 4.0 License

DOI: 10.15789/1563-0625-PTD-2942

кового дезинтегратора с последующим центрифугированием. Были подобраны составы лизирующего и солюбилизирующего буферов, а также условия рефолдинга рекомбинантного белка. Для очистки растворенного белка использовали последовательно катионообменную (SP-сефароза), гидрофобную (Butyl-сефароза) и эксклюзионную (Sephacryl S-200 HR) хроматографии. Белковые примеси в препарате определяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и электрофореза в 12% ПААГ, остаточные липополисахариды определяли с помощью гель-тромб варианта ЛАЛ-теста, остаточные белки штамма-продуцента — методом иммуноферментного анализа, остаточную ДНК штамма-продуцента — методом связывания с красителем PicoGreen. Контроль специфичности осуществляли методом непрямого иммуноферментного анализа. Оценку продукции цитокинов CD4⁺T-лимфоцитами в ответ на их стимуляцию рекомбинантным антигеном *ex vivo* проводили на проточном цитофлуориметре. Выход биомассы при культивировании *E. coli* CorD_PS в 30 л ферментере составил до 20 г/л за 4 часа индукции 0,1 мМ ИПТГ. Последовательная отмывка телец включения от бактериальных клеточных компонентов и их последующая солюбилизация в буфере, содержащем 8 М мочевины, позволил получить раствор денатурированного антигена с концентрацией 10 мг/мл. Эффективность рефолдинга разведением составила 75%. После трех этапов хроматографической очистки были получены образцы белка с концентрацией 1,2–1,4 мг/мл, чистотой по ВЭЖХ 98,43%, соответствующие ключевым параметрам качества согласно ОФС.1.7.1.0007.15. Рекомбинантный антиген показал специфическое связывание с образцом Первого международного стандарта ВОЗ и образца СОП № 3 анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов человека в установленном диапазоне концентраций. CD4⁺T-лимфоциты эффективно отвечали на обработку рекомбинантным антигеном увеличением продукции IFN γ . Оптимальная концентрация рекомбинантного коронавирусного антигена составила 5 мкг/мл. Разработанный технологический процесс позволяет получать 5–7 грамм антигена коронавирусного рекомбинантного CorD_PS за один цикл культивирования в 30 л ферментационной среды с ключевыми параметрами качества согласно ОФС.1.7.1.0007.15. В результате исследований специфической иммунологической активности рекомбинантного коронавирусного антигена CorD_PS была подтверждена концепция возможности его использования в качестве диагностикума для определения формирования T-клеточного иммунного ответа.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, COVID-19, коронавирусный антиген CorD_PS, хроматография, иммуноферментный анализ, CD4⁺T-клетки, CD8⁺T-клетки, IFN γ , T-клеточный иммунный ответ, диагностикум

PURIFICATION TECHNOLOGY DESIGN, BIOCHEMICAL AND IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE RECOMBINANT CHIMERIC ANTIGEN FOR EVALUATION OF T CELL IMMUNITY AGAINST CORONAVIRUS INFECTION

Kopat V.V.^a, Riabchenkova A.A.^a, Chirak E.L.^a, Chirak E.R.^a,
Saenko A.I.^a, Kudryavtsev I.V.^{b,d}, Trulioff A.S.^b, Savin T.V.^{c,d},
Zuyeva E.V.^c, Simbirtsev A.S.^{c,d}, Totolian Areg A.^{c,d}, Dukhovlinov I.V.^a

^a ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

^d First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Diagnosis of specific T cell immunity to the antigenic determinants of SARS-CoV-2 in patients seems to be an increasingly important task due to accumulation of data about the role of T cell immune response in course of coronavirus infection and clearance of SARS-CoV-2 in case of secondary infection. Previously, we designed the recombinant CorD_PS antigen for evaluation of T cell antiviral immunity, containing conservative and immunogenic sequences of structural proteins of the SARS-CoV-2 coronavirus. *E. coli* CorD_PS producing strain with stable expression of the recombinant CorD_PS antigen was obtained. Aim of the present work is to

design a laboratory technology for the production of recombinant antigen CorD_PS, to control the quality of the obtained chimeric protein and to study its immunological activity. Development of the cultivation conditions for *E. coli* CorD_PS cells was carried out in conical flasks in LB-M_Km medium at 37 °C, then scaled in a fermenter with a volume of 30 liters. Expression was induced by the addition of IPTG. Expression was controlled in culture lysates in 12% SDS-PAGE. The resulting biomass was lysed using an ultrasonic disintegrator with followed by centrifugation. The compositions of lysing and solubilizing buffers were selected, as well as conditions for refolding of the recombinant protein. Cation exchange (SP-sepharose), hydrophobic (Butyl-sepharose) and exclusive (Sephacryl S-200 HR) chromatography were used sequentially to purify the dissolved protein. Protein impurities in the preparation were determined by reverse-phase HPLC and electrophoresis in 12% SDS-PAGE, residual lipopolysaccharides were determined using a gel-thrombin variant of the LAL test, residual proteins of the producer strain were determined by enzyme immunoassay, residual DNA of the producer strain was determined by binding with PicoGreen dye. Specificity was controlled by indirect enzyme immunoassay. The evaluation of cytokine production by CD4⁺T lymphocytes in response to their stimulation by recombinant antigen *ex vivo* was performed on a flow cytofluorimeter. The biomass yield during cultivation of *E. coli* CorD_PS in a 30L fermenter was up to 20 g/L for 4 hours of 0.1 mM IPTG induction. Sequential washing of inclusion bodies from bacterial cellular components and their subsequent solubilization in a buffer containing 8 M urea allowed to obtain a solution of denatured antigen with a concentration of 10 mg/mL. The efficiency of refolding by dilution was 75%. After three stages of chromatographic purification, protein samples with a concentration of 1.2-1.4 mg/mL, HPLC purity of 98.43%, corresponding to key quality parameters according to the OFS.1.7.1.0007.15, were obtained. The recombinant antigen showed specific binding to a sample of the First WHO International Standard and sample Company Reference Standard No. 3 of anti-SARS-CoV-2 human immunoglobulins in a specified concentration range. CD4⁺T lymphocytes effectively responded to recombinant antigen treatment by increasing IFN γ production. The optimal concentration of recombinant coronavirus antigen was 5 μ g/mL. The developed technological process makes it possible to obtain 5-7 grams of coronavirus recombinant CorD_PS antigen in one cultivation cycle in 30 liters of fermentation medium with key quality parameters according to the OFS.1.7.1.0007.15. As a result of specific immunological activity studies of the recombinant coronavirus antigen CorD_PS, the concept of its possible use as a diagnostic tool for determining the formation of a T cell immune response was confirmed.

Keywords: SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus antigen Cord_PS, chromatography, enzyme-linked immunosorbent assay, CD4⁺T cells, CD8⁺T cells, IFN γ , T cell immune response, diagnosticum

Введение

Оценка формирования специфического Т-клеточного иммунитета к антигенным детерминантам SARS-CoV-2 может стать вариантом диагностической тест-системы, основанной на определяющей роли Т-клеточного иммунного ответа в протекании коронавирусной инфекции и клиренсе SARS-CoV-2 в случае вторичной инфекции [4, 10, 21]. Для качественной оценки специфической иммунной защиты против коронавирусной инфекции, вызываемой SARS-CoV-2, необходим оптимальный диагностический антиген, который может быть повсеместно использован для оценки формирования Т-клеточной реакции против антигенных детерминант SARS-CoV-2. Разработанный нами в предыдущем исследовании химерный белок [1], содержащий иммуногенные CD4⁺T-клеточные эпитопы S-, E-, M- и N-структурных белков SARS-CoV-2, может использоваться как диагностикум для качественной оценки специфической иммунной защиты против коронавирусной инфекции и/или оценки иммуногенности кандидатных вакцин в их клинических испытаниях.

Фармацевтическая разработка диагностической системы в первую очередь опирается на основной компонент – рекомбинантный антиген. Рекомбинантный коронавирусный антиген CorD_PS представляет собой химерный белок на основе полноразмерного белка нуклеокапсида N SARS-CoV-2, к которому искусственно добавлены консервативные и иммуногенные последовательности структурных белков коронавируса S, M, E. Отобранные для слияния фрагменты структурных белков включают высококонсервативные эпитопы внутри мутированных штаммов, вызывающих наибольшую обеспокоенность: варианты B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.429, B.1.526, B.1.617, B.1.617.1, B.1.617.2, AY.1, B.1.618, C.37, B.1.621 и B.1.1.52, а включенные эпитопы S-белка соответствуют RBD-домену [18]. В предыдущем исследовании нами была показана стабильность штамма-продуцента антигена *E. coli* CorD_PS [1].

С технологической точки зрения субстанция рекомбинантного белка должна соответствовать требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации, являющейся основным нормативным документом, регулирующим качество лекарственных субстанций [2]. Общая

фармакопейная статья ОФС.1.7.1.0007.15 (Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантной ДНК) описывает широкий ряд требований, предъявляемых к белок-содержащим препаратам, касающихся количественных и качественных характеристик. Ключевыми параметрами чистоты целевого белка являются содержание бактериальных эндотоксинов, остаточных белков и ДНК штамма-продуцента. Их количество не должно превышать значений, установленных в нормативной документации. Строгие критерии качества, применяемые к субстанциям лекарственных препаратов на всех этапах производства, обеспечивают их безопасность для пациентов.

Целью настоящего исследования является разработка лабораторной технологии получения очищенной субстанции рекомбинантного антигена CorD_PS с последующим тестированием специфической активности и оценкой продукции цитокинов CD4⁺T-лимфоцитами в ответ на специфическую стимуляцию антигеном *ex vivo*.

Материалы и методы

Бактериальный штамм и экспрессионный вектор

Последовательность гена, кодирующего рекомбинантный коронавиральный антиген CorD_PS, синтезировали и клонировали в вектор pET24a(+) как было показано нами в предыдущем исследовании, с получением вектора pCorD_PS. Для разработки рекомбинантного антигена использовали бактериальный штамм-продуцент *Escherichia coli* CorD_PS, полученный трансформированием вектором pCorD_PS компетентных клеток Rosetta (DE3) с генотипом F⁻ ompT hsdSB(rB⁻mB⁻) gal dcm (DE3) [1].

Культивирование клеток штамма *E. coli* CorD_PS

Анализ экспрессии рекомбинантного коронавирального антигена CorD_PS проводили в колбах с использованием среды LB-M с добавлением канамицина до конечной концентрации 50 мкг/мл (LB-M_Km). В колбы, содержащие 20 мл среды, добавляли по 500 мкл ночной культуры клеток штамма *E. coli* CorD_PS. Культуру инкубировали в течение 2 часов в шейкере-инкубаторе при 37 °C и 180 об/мин, затем при достижении оптической плотности ОП₆₀₀ значения 0,6–0,8 опт. ед. добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ. Образцы для анализа экспрессии отбирали через 4 и 15 часов после добавления ИПТГ. Экспрессию коронавирального рекомбинантного антигена анализировали с помощью электрофореза в денатурирующих условиях в 12% полиакриламидном геле (ПААГ) с окраской кумасси бриллиантовым синим R-250 (Sigma-Aldrich, #27816) [1].

Культивирование штамма *E. coli* CorD_PS в 30-литровом ферментере проводили в среде LB

с канамицином с подпиткой глицерином и добавлением минеральных солей (мясной пептон, дрожжевой экстракт, NaCl, KН₂РO₄, NH₄Cl, MgSO₄, Na₂HPO₄). В колбах выращивали 3 л ночной культуры клеток *E. coli* CorD_PS. Инокулят вносили в ферментер, содержащий 27 литров среды, и инкубировали при 32 °C, рO₂ 35–40%, pH 6,9. При достижении оптической плотности ОП₆₀₀ значения 8 опт. ед, температуру повышали до 37 °C и добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ. В течение всей ферментации проводили почасовой контроль оптической плотности и контроль накопления рекомбинантного коронавирального антигена в виде телец включения с помощью фазово-контрастной микроскопии. Ферментацию завершали при истощении субстрата, которое определяли по резкому увеличению значения показаний кислородного датчика (рO₂). По окончании ферментации клетки из культуральной жидкости сепарировали центрифугированием.

Выделение нерастворимой формы антигена коронавирального рекомбинантного из клеточной биомассы штамма *E. coli* CorD_PS

Для получения фракции телец включения (ТВ) осажденные клетки ресуспендировали в растворе 20 мМ Трис-НСl, 2% Тритон X-100, 0,5 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0 из расчета 15 мл раствора на 1 г клеток. Суспензию клеток гомогенизировали ультразвуковой дезинтеграцией в течение 2 мин на ледяной бане, без допуска перегрева раствора. ТВ осаждали центрифугированием при 14000 g, 10 мин, 4 °C. Отмывка ТВ производилась 3 раза, полученные после осаждения ТВ супернатанты были проанализированы в 12% ПААГ. Осадок ресуспендировали в 20%-ном этаноле из расчета 15 мл раствора на 1 г исходной биомассы, дезинтегрировали и центрифугировали при тех же условиях. Полученный осадок телец включения взвешивали и солибилизировали в растворе 20 мМ Трис-НСl, 8 М мочевины, 40 мМ дитиотреитол (ДТТ), 1 мМ ЭДТА pH 8,0 из расчета 10–20 мл раствора на 1 г ТВ в зависимости от вязкости раствора с получением денатурационной смеси.

Рефолдинг денатурированного белка

Предварительно осуществляли подбор pH, температуры, вспомогательных компонентов для рефолдирующего буфера, оценивая влияние мочевины, ЭДТА, глицерина, NaCl, сахарозы, тритона X-100, твина 20, аргинина, пролина и ДТТ в буферной системе на основе 20 мМ Трис-НСl, pH 9,0 на выходы рекомбинантного антигена методом обращенно-фазовой ВЭЖХ. Денатурационную смесь центрифугировали (10 мин, 20000 g), фильтровали через капсульный фильтр (полиэфирсульфон, диаметр пор 0,22 мкм), рефолдировали разведением в 40 раз раствором 20 мМ Трис-

HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 9,0 и инкубировали 20 ч при 4–8 °С при перемешивании. Конечные концентрации вспомогательных компонентов в рефолдинге составили 200 мМ мочевины, 1 мМ ДТТ. Раствор ренатурированных белков фильтровали через капсульный фильтр (полиэфирсульфон, 0,22 мкм) перед нанесением на хроматографическую колонну.

Хроматографическая очистка антигена корона-вирусного рекомбинантного

Хроматографическую очистку проводили с использованием хроматографа АКТА Purifier 100 (GE Healthcare, США). Для рекомбинантного коронавируса антигена расчетная молекулярная масса составила 53 кДа, изоэлектрическая точка 9,56 [1].

Для обогащения по целевому белку на первой стадии хроматографической очистки использовали катионообменную хроматографию и колонну HiTrap SP FF 5 мл (Cytiva, США). Поглощение детектировали при длине волны 280 нм. Буфер А: 20 мМ Трис-HCl, pH 9,0, Буфер В: 20 мМ Трис-HCl, 0,5М NaCl, pH 9,0. Перед нанесением на колонну раствора с рефолдированным белком, колонну предварительно уравнивали 10 объемами (CV) буфера В при скорости потока 5 мл/мин, затем промывали 5 CV буфера А. Не связавшуюся с сорбентом фракцию отбирали для количественного определения целевого белка. Далее колонну промывали 5 CV буфера А. Элюцию антигена осуществляли линейным градиентом 0-100% буфера В за 10 CV при скорости потока 5 мл/мин.

На второй стадии хроматографической очистки использовали гидрофобную хроматографию и колонну HiTrap Butyl FF 16/10 20мл (Cytiva, США). К раствору белка, полученному после первого этапа очистки, добавляли сульфат аммония до конечной концентрации 1М. Буфер А: 20 мМ Трис-HCl, 1,2 М сульфата аммония, pH 9,0, Буфер В: 20 мМ Трис-HCl, pH 9,0. Колонну уравнивали 10 CV буфера А при скорости потока 8 мл/мин, затем наносили образец. Не связавшуюся с сорбентом фракцию проверяли на содержание целевого белка. После нанесения образца колонну промывали 5 CV буфера А. Элюцию антигена осуществляли линейным градиентом 0-100% буфера В за 10 CV при скорости потока 8 мл/мин.

На финальной стадии хроматографической очистки очищенный рекомбинантный корона-вирусный антиген отделяли от остаточных белков, агрегатов и вспомогательных веществ с помощью эксклюзионной колонны HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (Cytiva, США). Для этого колонну уравнивали буфером А: 20мМ Трис-HCl, pH 7,4, 0,15М NaCl, 1% твин 20 при скоро-

сти потока 1 мл/мин. Образец, полученный после второй стадии хроматографической очистки и последующего концентрирования до 10 мг/мл с помощью Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter 30 kDa MWCO Millipore (Sigma-Aldrich, США), наносили при скорости потока 0,8 мл/мин в объеме не более 4% от объема сорбента колонны. Элюирование осуществляли 1 CV буфера А. Количество антигена и чистоту во всех отобранных фракциях определяли методами обращенно-фазовой ВЭЖХ и электрофорезом в 12% ПААГ.

Измерение концентрации белка

Концентрацию белка в растворах определяли колориметрическим методом с использованием набора для анализа ВСА (Pierce, Германия) согласно протоколу производителя, методом обращенно-фазовой ВЭЖХ и спектрофотометрическим методом при длине волны 280 нм (теоретическая оптическая плотность белка с концентрацией 1 мг/мл составляет 1,02 опт. ед.).

Обращенно-фазовая ВЭЖХ

Для количественного определения содержания рекомбинантного белка и его чистоты применяли метод обращенно-фазовой ВЭЖХ с использованием хроматографа Agilent 1100 и аналитической колонки Jupiter 300 C18, 5 мкм, 300Å, 4,6 × 250 мм (Phenomenex, США). Элюирование проводили линейным градиентом 10-90% буфера В за 30 мин, скорость потока: 1 мл/мин, где буфер А — 0,1%-ная трифторуксусная кислота (ТФУ) в воде, буфер В — 0,1% ТФУ в ацетонитриле, температура колонки 50 °С. Поглощение детектировали при длине волны 214 нм. Время удержания основного пика рекомбинантного антигена составило 14±0,2 мин.

Определение содержания бактериальных эндотоксинов в конечном растворе субстанции белка

Полуколичественное определение содержания бактериальных эндотоксинов проводили с помощью геле-тромб варианта ЛАЛ-теста (Pyrotell Multi-test 0,03 EU/мл, США) согласно инструкции производителя.

Определение содержания остаточных белков штамма-продуцента в конечном растворе субстанции белка

Определение содержания остаточных белков *E. coli* в растворе очищенного белка осуществляли методом твердофазного ИФА с помощью набора *E. coli* HCP ELISA Kit (Cugnus, США) согласно инструкции производителя.

Определение содержания остаточной ДНК штамма-продуцента в конечном растворе субстанции белка

Определение содержания остаточной ДНК *E. coli* в растворе очищенного белка осуществляли с помощью набора *E. coli* Host Cell DNA Detection

Kit in Wells (Cygnum, США) согласно инструкции производителя.

Контроль специфичности связывания рекомбинантного коронавирусного антигена с Первым международным стандартом ВОЗ анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов человека

Проверку специфической активности антигена осуществляли методом непрямого иммуноферментного анализа с применением Первого международного стандарта ВОЗ анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов человека NIBSC code: 20/136 (MC). В основе проведения анализа лежит взаимодействие образца MC, содержащего анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулины человека в единицах концентрации BAU/мл (Binding Antibody Units — Единицы Связывающих Антител), с сорбированным в лунках полистиролового планшета рекомбинантным коронавирусным антигеном и последующим образованием иммунного комплекса с конъюгатом моноклональных антител к тяжелой цепи иммуноглобулинов человека IgG-класса с пероксидазой хрена.

Для проверки специфической активности антигена на твердую фазу 96-луночного микропланшета иммобилизовали антиген в объеме 100 мкл в концентрации 2,5 мкг/мл в 0,067 М фосфатном буфере, планшет инкубировали в течение ночи при 40 °С. При добавлении в лунки планшета проб MC с последующей инкубацией происходило связывание антител MC с белками препарата антигена и образование в лунке иммобилизованного комплекса. MC разводили в 5 раз 1% БСА в 0,01 М фосфатносолевом буфере с 0,1%-ным твином 20 (общее разведение 1:100, что составляло концентрацию 10 BAU/мл), далее проводили двукратные разведения и вносили в лунки планшета по 100 мкл. После отмывки от несвязанных веществ в лунки добавляли конъюгат специфичных к IgG человека моноклональных антител с пероксидазой хрена. После инкубации с субстратом реакцию останавливали добавлением 0,1М H₂SO₄. Измерение оптической плотности производили при длине волны 450 нм.

Помимо оценки связывания антител международного стандарта с иммобилизованным антигеном CorD_PS, с помощью данного метода проводили оценку связывания антител образца пулированной сыворотки переболевших COVID-19 людей, предоставленного Санкт-Петербургским научно-исследовательским институтом эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (образец СОП № 3).

Оценка продукции цитокинов CD4⁺Т-лимфоцитами в ответ на специфическую стимуляцию ex vivo с помощью проточной цитометрии

Исследование проводилось в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ме-

дицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» (WMA Declaration of Helsinki — Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects, 2013). В установленном порядке пациенты подписывали информированное согласие и согласие на обработку персональных данных, после чего производился забор крови.

Анализ уровня продукции цитокинов проводили по общепринятой методике, как это было описано ранее [19]. Из гепаринизированной периферической крови выделяли фракцию мононуклеарных клеток, которые в полной культуральной среде (приготовленной на основе RPMI-1640 (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, ООО «БиолоТ», Россия), 50 мкг/мл гентамицина (ООО «БиолоТ», Россия) и 2 мМ L-глутамин (ООО «БиолоТ», Россия) вносили по 200 мкл клеточной суспензии ($1-2 \times 10^7$ клеток в мл) в лунки 96-луночного планшета. В качестве «положительного» контроля протекания реакции использовали SEB (*Staphylococcus Enterotoxin B*) в конечной концентрации 1 мкг/мл. «Биологическим» контролем служило внесение PPD (purified protein derivative) в финальной концентрации 5 мкг/мл. Для стимуляции клеток использовали изучаемый антиген (пер) в финальной концентрации 25, 5 и 1 мкг/мл. Для блокады секреции цитокинов клетками во все образцы вносили блокатор аппарата Гольджи брэфелдин-А в конечной концентрации 10 мкг/мл. Далее образцы инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 18 часов. По завершении инкубации проводили окраску на поверхностные антигены, с использованием антител CD45RA-ECD, CD4-PC7, CD3-APC-Cy7 (все антитела производства Biolegend Inc., США), а также красителем Zombie Aqua (производства Biolegend Inc., США), позволяющим исключить из анализа погибшие клетки. Для фиксации и пермеабиллизации клеток использовали набор IntraPrep Permeabilization Reagent (Beckman Coulter Inc., США). Для выявления клеток, накопивших IFN γ , применяли антитела против IFN γ -FITC (Beckman Coulter Inc., США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios (Beckman Coulter Inc., США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. В каждом из образцов оценивали относительное содержание IFN γ ⁺ клеток с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻, результаты выражали в виде % IFN γ ⁺ лимфоцитов от общего числа Т-хелперов памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻).

Результаты

Культивирование клеток *E. coli* CorD_PS в колбах с подбором оптимальных параметров экспрессии и наработкой аналитических количеств антигена производили в среде LB-M_Km при 37 °С, скорости перемешивания 180 об/мин, индукции экспрессии 0,1 мМ ИПТГ, pH 7,0. Выход биомассы в данных условиях составлял до 7 г/л за 15 часов индукции. При таких условиях эффективность экспрессии составляла до 30% от общего белка, оценка производилась денситометрически (Syngene Bio Imaging Systems, GB). Электрофорез лизатов культур в 12% ПААГ в денатурирующих условиях показал, что накопление белка в культуре присутствовало через 4 и 15 часов, молекулярная масса рекомбинантного антигена соответствовала ожидаемым 53 кДа. Экспрессия белка до добавления ИПТГ в культуру отсутствовала (рис. 1, 1-3).

Для культивирования *E. coli* CorD_PS в ферментере объемом 30 л состав культуральной среды был дополнен подпиткой глицерином и добавлением минеральных солей (мясной пептон, дрожжевой экстракт, NaCl, KH_2PO_4 , NH_4Cl , MgSO_4 , Na_2HPO_4). Инкубация происходила при 32 °С, pO_2 35-40%, pH 6,9. При достижении оптической плотности OP_{600} значения 8 опт. ед., температуру

повышали до 37 °С и добавляли ИПТГ до конечной концентрации 0,1 мМ. Эффективнее всего антиген CorD_PS экспрессировался в течение 4 ч при поддержании постоянного pH, pO_2 . Ферментацию завершали при истощении субстрата, которое определяли по резкому увеличению показаний pO_2 . При таких условиях концентрация биомассы составила 20 г/л, содержание белка в ней составляло порядка 30% общего белка.

При анализе растворимости рекомбинантного антигена было показано, что он находится в нерастворимой фракции ТВ. Последовательные 3 стадии отмывок ТВ раствором 20 мМ Трис-НСl, 2% Тритон X-100, 0,5 М NaCl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0 позволили очистить ТВ от части балластных компонентов дезинтегрированных клеток *E. coli*. Раствор 20 мМ Трис-НСl, 8 М мочевины, 40 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА pH 8,0, добавленный из расчета 20 мл на 1 г ТВ полностью растворял тельца включения (рис. 1, 4-8). Раствор солюбилизованных ТВ имел концентрацию рекомбинантного коронавирусного антигена ~ 10 мг/мл.

Подбор вспомогательных компонентов рефолдирующего буфера осуществляли в два этапа после определения значения оптимального pH 9,0. На первом этапе выбирали оптимальную концентрацию аддитива (вспомогательного ком-

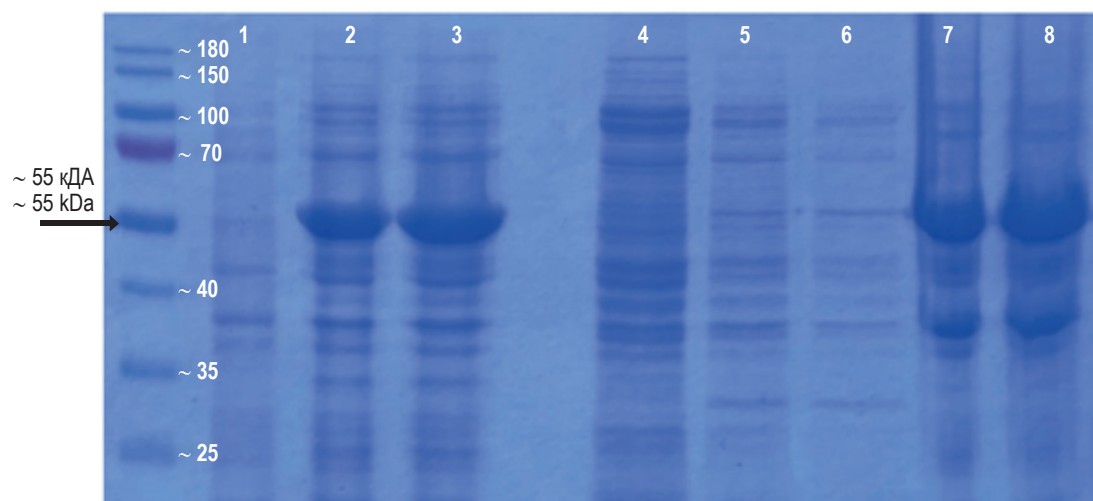


Рисунок 1. Электрофореграмма экспрессии CorD_PS через 4 ч и 15 ч после индукции 0,1 мМ ИПТГ в колбах; отмывка и солюбилизация ТВ CorD_PS

Примечание. 1. pCorD_PS до индукции; 2. CorD_PS, индукция 4 ч; 3. CorD_PS, индукция 15 ч; 4. CorD_PS отмывка ТВ, супернатант 1; 5. CorD_PS отмывка ТВ, супернатант 2; 6. CorD_PS отмывка ТВ, супернатант 3; 7. Солюбилизованные ТВ, 3 мкл; 8. Солюбилизованные ТВ, 5 мкл; Маркер молекулярного веса белков PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Scientific, кат. ном. 26616).

Figure 1. Electrophoregram of CorD_PS expression at 4 h and 15 h after 0.1mM IPTG induction in flasks; washing and solubilization of IB CorD_PS

Note. 1. pCorD_PS before induction; 2. CorD_PS, induction 4 h; 3. CorD_PS, induction 15 h; 4. CorD_PS washing IB, supernatant 1; 5. CorD_PS washing IB, supernatant 2; 6. CorD_PS washing IB, supernatant 3; 7. Solubilized IB, 3 mcl; 8. Solubilized IB, 5 mcl; PageRuler™ proteins Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa (Thermo Scientific, cat. nom. 26616).

понента), на втором этапе — оценивали взаимное влияние компонентов (табл. 1, 2).

В результате солюбилизованный коронавирусный антиген рефолдировали разведением в 40 раз до конечной концентрации компонентов рефолдирующего буфера 200 мМ мочевины, 1 мМ ДТТ. Эффективность рефолдинга была оценена методом обращенно-фазовой ВЭЖХ и составила 75%.

В ходе ионообменной хроматографии на хроматографическую колонну HiTrap SP FF 5 мл нанесли 1600 мл рефолдирующей смеси (300 мг) с концентрацией целевого антигена около 0,188 мг/мл. Элюирование целевого белка происходило при кондуктивности 12 мСм/см. В ходе первой стадии хроматографической очистки было получено 37 мл целевой фракции белка с концентрацией с 7,05 мг/мл. Выход целевого белка на первой стадии хроматографической очистки составил 87%. Чистота элюата, проанализированная с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ и

электрофореза в 12% ПААГ в денатурирующих условиях, составила 85%.

В ходе гидрофобной хроматографии на колонну HiTrap Butyl FF 16/10 20 мл нанесли 40 мл полученного в ходе первой стадии хроматографической очистки элюата. Элюирование целевого белка происходило при кондуктивности 28 мСм/см. Было получено 120 мл целевой фракции антигена, концентрация элюированного белка составила 1,86 мг/мл, выход целевого белка на первой стадии хроматографической очистки составил 86%. Чистота элюата составила 93%.

На финальном этапе очистки и смены буфера путем эксклюзионной хроматографии на колонну HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR внесли 5 мл сконцентрированной до 10 мг/мл фракции антигена, полученной с помощью гидрофобной хроматографии. Концентрация элюированного белка составила 1,4 мг/мл, выход целевого белка составил 95%. Данные по выходам антигена представлены в таблице 3. Чистота белка, оцененная с помощью ВЭЖХ, составила 98,43% (рис. 2).

ТАБЛИЦА 1. ИССЛЕДУЕМЫЕ ДИАПАЗОНЫ КОНЦЕНТРАЦИИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ КОМПОНЕНТОВ РЕФОЛДИРУЮЩЕГО БУФЕРА

TABLE 1. STUDIED CONCENTRATION RANGES OF THE REFOLDING BUFFER SUPPLEMENTARY COMPONENTS

Аdditивы Additives	Диапазон исследуемых концентраций Concentration ranges	Функция Function	Выбранная концентрация аддитива Selected additive concentration	Выход, % Yield, %
Мочевина Urea	0,1-2,0 М	Хаотроп Chaotrope	0,2 М	70%
ЭДТА EDTA	1-5 мМ	Хелатор Chelator	1 мМ	65%
Глицерин Glycerol	5-50%	Стабилизатор Stabilizer	5%	67%
NaCl	50 мМ-1 М	Стабилизатор Stabilizer	150 мМ	65%
Сахароза Sucrose	1-10%	Стабилизатор Stabilizer	3%	67%
Трис Tris	10 мМ-1 М	Буферная система Buffer system	20 мМ	62%
Тритон X-100 Triton X-100	0,1-1,0%	Неионный детергент Nonionic detergent	0,1%	64%
Твин 20 Tween 20	0,1-1,0%	Неионный детергент Nonionic detergent	1%	67%
Аргинин Arginine	0,2-1,0 М	Стабилизатор Stabilizer	1 М	36%
Глицин Glycine	0,2-1,0 М	Стабилизатор Stabilizer	—	—
Пролин Proline	0,2-1,0 М	Стабилизатор Stabilizer	—	—
ДТТ DTT	1-40 мМ	Восстанавливающий агент Reducing agent	1 мМ	65%

ТАБЛИЦА 2. ОЦЕНКА КОМПЛЕКСНОГО ВЛИЯНИЯ ОТОБРАННЫХ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ РЕФОЛДИРУЮЩЕГО БУФЕРА НА ВЫХОДЫ РЕФОЛДИНГА АНТИГЕНА CorD_PS

TABLE 2. ASSESSMENT OF THE COMPLEX EFFECT OF THE SELECTED REFOLDING BUFFER SUPPLEMENTARY COMPONENTS ON THE CorD_PS ANTIGEN REFOLDING YIELDS

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Мочевина Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	–
ЭДТА EDTA	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Глицерин Glycerol	–	–	–	–	+	–	–	–	–
NaCl	–	–	–	+	–	–	–	–	–
Сахароза Sucrose	–	–	+	–	–	–	–	–	–
Тритон X-100 Triton X-100	–	+	–	–	–	–	–	–	–
Твин 20 Tween 20	+	–	–	–	–	–	–	–	–
ДТТ DTT	+	+	+	+	+	+	–	+	+
Выход, % Yield, %	73%	69%	71%	70%	72%	75%	72%	71%	64%

Конечный белок был проверен на ряд примесей рекомбинантных белков, указанных в Государственной фармакопее РФ XIV [2]. Содержание липополисахаридов в образцах не превышало 800 ЕЭ/мг белка. Содержание ДНК штамма-продуцента в образцах не превышало 200 нг/мг белка. Содержание белков штамма-продуцента не превышало 10 мкг/мг белка.

Описанный процесс позволяет получать 5–7 грамм антигена коронавируса рекомбинантного CorD_PS чистотой более 95%, соответствующего необходимым параметрам качества,

за один цикл культивирования в 30 л ферментационной среды.

Контроль специфичности рекомбинантного коронавируса антигена осуществляли относительно МС, содержащего анти-SARS-CoV-2 IgG-антитела человека к белкам коронавируса SARS-CoV-2 в единицах концентрации ВАУ/мл, а также относительно образца СОП № 3, предоставленного НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера. Учет результатов испытания проводили при условии, что значения ОП в лунках МС не должны быть меньше 0,25 опт. ед. Результаты анализа представлены в таблице 4.

ТАБЛИЦА 3. ПАРАМЕТРЫ ЧИСТОТЫ ФРАКЦИИ АНТИГЕНА CorD_PS НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ ВЫСОКООЧИЩЕННОГО ПРЕПАРАТА

TABLE 3. PURITY PARAMETERS OF THE CorD_PS ANTIGEN FRACTION AT VARIOUS STAGES OF THE PROCESS OF OBTAINING A HIGHLY PURIFIED SUBSTANCE

Стадия очистки Purification stage	Концентрация антигена, мг/мл Antigen concentration, mg/mL	Количество, мг Amount, mg	Выход, % Yield, %	Чистота, % Purity, %	Эндотоксины, ЕЭ/мг Endotoxins, EU/mg
Тельца включения Inclusion bodies	10	400	–	40%	–
Рефолдинг Refolding	0,188	300	75%	–	–
SP sepharose	7,05	260	87%	85%	> 1000
Butyl sepharose	1,86	223	86%	93%	< 800
Sephacryl	1,4	50	95%	98,43%	< 800

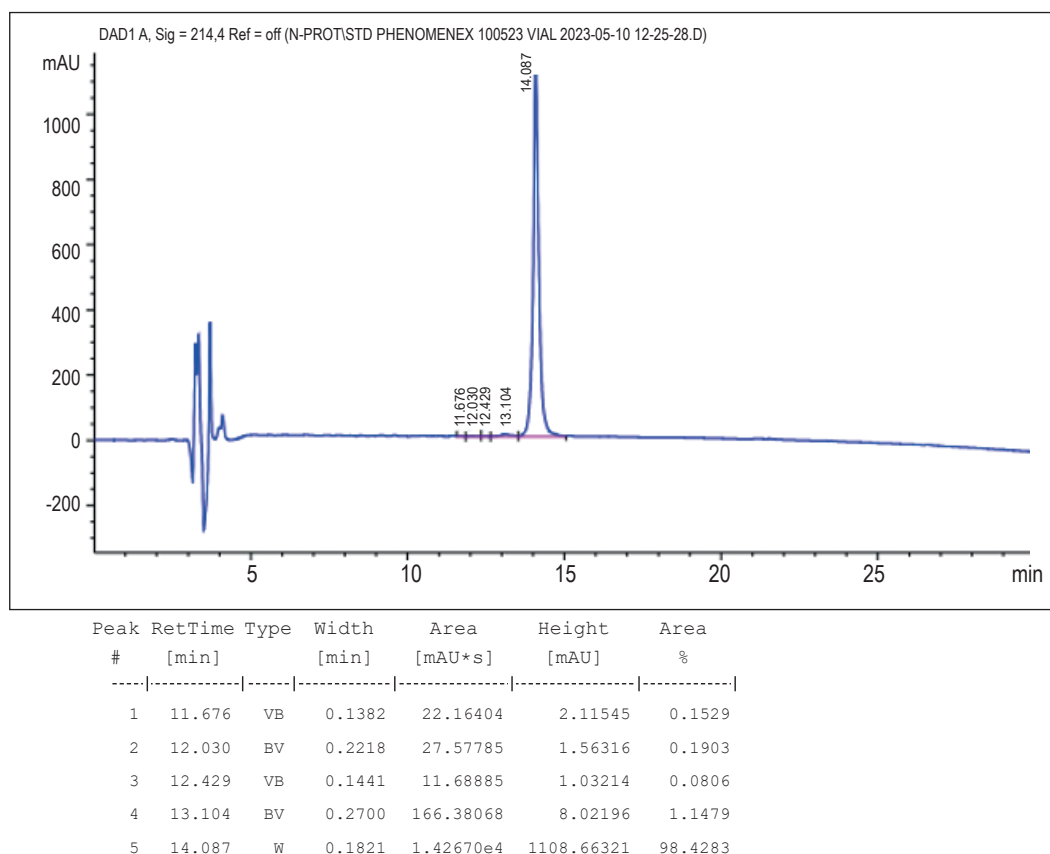


Рисунок 2. ВЭЖХ-анализ образца антигена коронавирусного рекомбинантного CorD_PS на хроматографе Agilent 1100 с использованием аналитической колонки Jupiter C18, 5 мкм, 300 А°, 4,6 × 250 мм (Phenomenex, США)

Figure 2. HPLC-analysis of the coronavirus recombinant CorD_PS antigen sample using Agilent 1100 chromatograph with a Jupiter C18. 5 μ m, 300 A°, 4.6 $\times$ 250 mm analytical column (Phenomenex, USA)

В результате была показана корреляция между оптическими плотностями СОП № 3 и Международного стандарта (рис. 3). Коэффициент регрессии $R^2 = 0,9796$.

Таким образом, была подтверждена специфичность рекомбинантного коронавирусного антигена CorD_PS в отношении анти-SARS-

CoV-2 IgG-антител человека к белкам коронавируса SARS-CoV-2.

Оценка продукции цитокинов CD4⁺T-лимфоцитами в ответ на специфическую стимуляцию *ex vivo* с помощью проточной цитометрии

На рисунке 4 приведены результаты изучения продукции IFN γ Т-лимфоцитами перифериче-

ТАБЛИЦА 4. ЗНАЧЕНИЯ ОП (450 нм) 2-КРАТНЫХ РАЗВЕДЕНИЙ ОБРАЗЦА СОП № 3 И МЕЖДУНАРОДНОГО СТАНДАРТА

TABLE 4. OBTAINED VALUES OF OD (450 nm) OF THE SAMPLE SOP No. 3 AND THE INTERNATIONAL STANDARD

	ОП МС OD IS	ОП СОП № 3 OD SOP No. 3
A	3,0743	2,1852
B	2,0223	1,4554
C	1,0166	1,0028
D	0,5097	0,6551
E	0,2211	0,3667
F	0,1154	0,2100
G	0,0630	0,1141
H	0,0349	0,0632

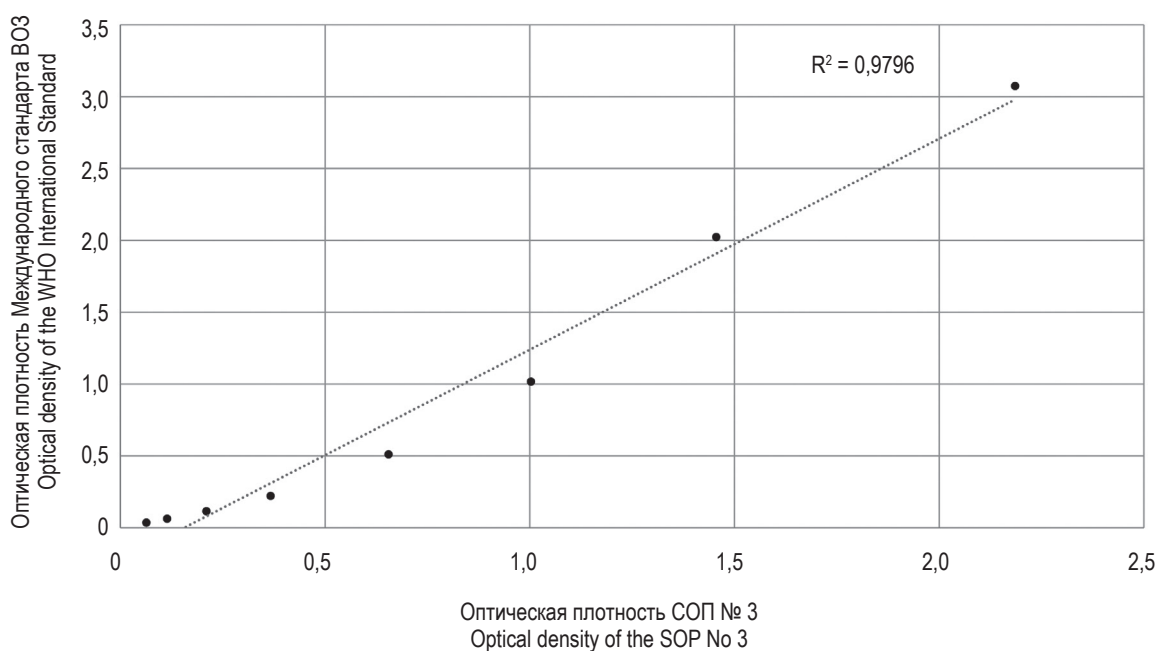


Рисунок 3. График корреляции между значениями оптической плотности ОП (450 нм) 2-кратных разведений образца СОП № 3 и Международного стандарта

Figure 3. Correlation graph between the optical density values OD (450 nm) of 2-fold dilutions of the sample SOP No. 3 and the International Standard

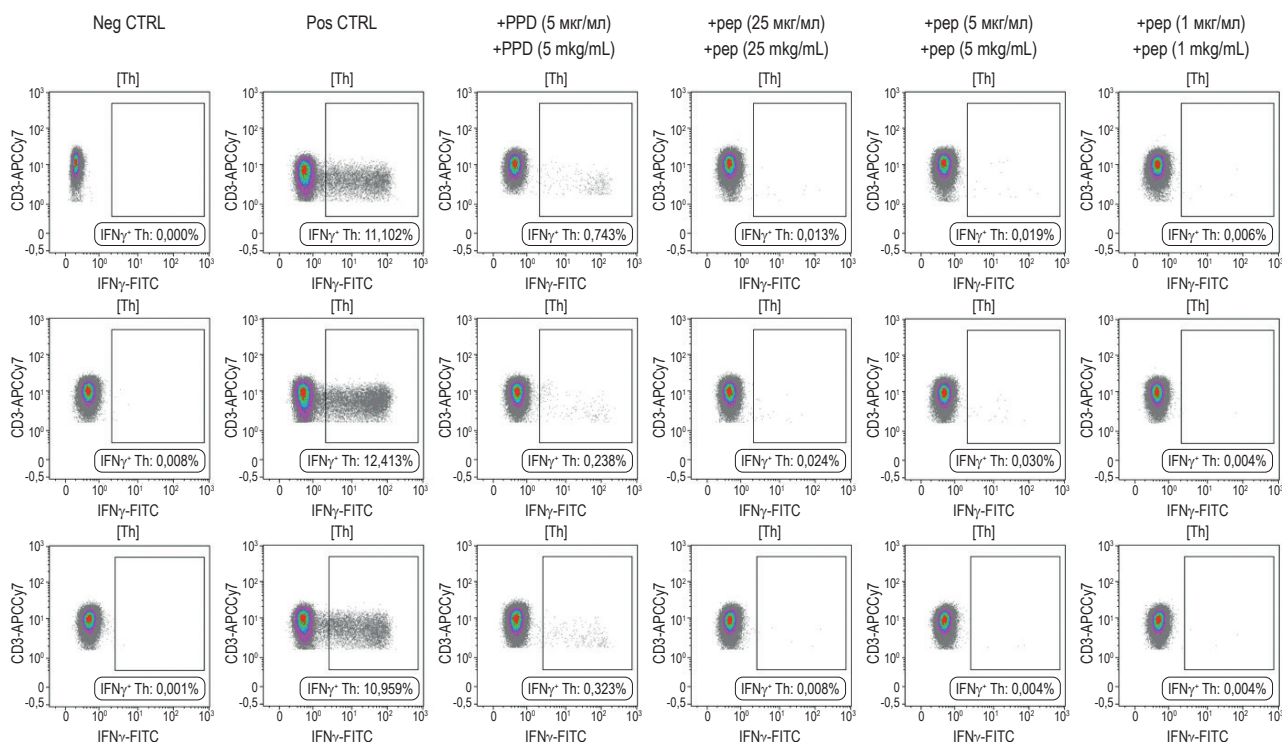


Рисунок 4. Результаты изучения продукции IFNγ лимфоцитами Т-хелперами периферической крови добровольцев ex vivo методом проточной цитометрии

Figure 4. Results of ex vivo studying IFNγ production by T helper lymphocytes from volunteers' peripheral blood by flow cytometry

ской крови добровольцев в культуре при стимуляции различными антигенами.

Слева направо — спонтанная продукция $IFN\gamma$ (отрицательный контроль); положительный контроль (стимуляция SEB, 5 мкг/мл), биологический контроль (стимуляция антигенами *Mycobacterium tuberculosis*, PPD, 5 мкг/мл), стимуляция рекомбинантным коронавирусным антигеном (финальная концентрация пер — 25, 5 и 1 мкг/мл). По оси абсцисс — уровень экспрессии $IFN\gamma$, по оси ординат — уровень экспрессии CD3; область « $IFN\gamma^+$ Th» содержит $CD4^+$ Т-лимфоциты, которые ответили продукцией $IFN\gamma$ на стимуляцию в условиях *in vitro*. Результаты приведены в виде % $IFN\gamma^+$ клеток от общей популяции Т-хелперов памяти с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^-$. Первый и второй ряды гистограмм — добровольцы, перенесшие COVID-19; третий ряд гистограмм — доброволец, не болевший COVID-19.

Было показано, что подобранные нами условия *in vitro*, в которых осуществлялась инкубация клеток, не сопровождалась спонтанной активацией клеток (гистограммы негативного контроля на рисунке 4). Более того, подобранные условия были весьма физиологичными, так как в пробах «позитивного» контроля имело место увеличение продукции $IFN\gamma$ $CD4^+$ Т-лимфоцитами, а также $CD4^+$ Т-клетки эффективно отвечали на стимуляцию антигенами *Mycobacterium tuberculosis*, что указывает на высокую эффективность нашей тест-системы для *in vitro* определения антиген-специфических Т-клеток. Далее нами было показано, что то у здорового оказался % маленький и везде одинаковый, а у болевших большой, и максимальный от 5 мкг.

Обсуждение

Таким образом, оптимальной концентрацией препарата рекомбинантного коронавирусного антигена является 5 мкг/мл.

При оценке динамики иммунного ответа, сформированного против новой коронавирусной инфекции, большая часть усилий ученых была направлена на изучение роли антител, вырабатываемых после естественной инфекции или вакцинации, без учета оценки влияния клеточного иммунного ответа, который, как было показано, определяет течение инфекции SARS-CoV-2 [3, 14, 24]. Циркулирующие Т-клетки, специфичные к SARS-CoV-2, были обнаружены у выздоравливающих лиц с бессимптомной и легкой формой COVID-19, серонегативных по антителам, что позволяет предположить, что в отсутствие антител сильный и широко специфичный Т-клеточный ответ может быть достаточным для обеспечения иммунной защиты от SARS-CoV-2 [11]. Формирование Т-клеточной иммунологической памя-

ти после заражения и/или вакцинации и последующая реакция распознавания при повторной встрече с антигеном могут использоваться в разработке диагностической тест-системы для качественного определения Т-клеточного иммунного ответа.

Мы разработали рекомбинантный коронавирусный антиген на основе полноразмерного белка нуклеокапсида SARS-CoV-2, дополнительно содержащего Т-клеточные антигенные детерминанты структурных белков (S, E, M), который может быть использован в качестве эффективного инструмента для определения Т-клеточных реакций у пациентов с COVID-19 с различной степенью тяжести заболевания и/или оценки иммуногенности кандидатных вакцин в их клинических испытаниях [1]. В текущей работе мы представили методики получения очищенного препарата антигена и контроля его специфической активности методом оценки продукции цитокинов $CD4^+$ Т-лимфоцитами с помощью проточной цитометрии в ответ на специфическую стимуляцию *ex vivo*. Получение высокоочищенного белка включает в себя сверхэкспрессию гена, кодируемого плазмидой pCorD_PS в *E. coli*, отмывку и солиubilизацию телец включения, рефолдинг денатурированного белка и очистку препарата антигена с помощью последовательных стадий ионообменной, гидрофобной и эксклюзионной хроматографии.

Разработка условий культивирования штамма *E. coli CorD_PS* заключалась в подготовке двух стадий: подбор подходящего состава среды для микробиологического биосинтеза и условий микробиологического биосинтеза для экспрессии рекомбинантного белка и получения оптимальных выходов. Подбор штамма, экспрессионного вектора и параметров культивирования определили получение высоких выходов рекомбинантного белка в *E. coli*.

В большинстве случаев экспрессия рекомбинантных белков в *E. coli* приводит к образованию нерастворимых агрегатов, известных как ТВ [9, 13, 20]. Процент рефолдированных биоактивных белков из ТВ *E. coli*, как правило, очень низок и вносит вклад в основные затраты на производство рекомбинантных белков [8]. Тем не менее в нерастворимой фракции накапливается большее количество белка, который также устойчив к расщеплению протеазами за счет депонирования в ТВ. Если для белка удастся разработать подходящие высокопроизводительные процедуры рефолдинга и хроматографической очистки, образование ТВ будет выгодным в производстве рекомбинантного белка [5, 22, 23]. Стратегия, используемая для извлечения биоактивного белка из ТВ, в основном заключается в последовательных этапах: выделение ТВ из клетки *E. coli* и от-

мывка; солюбилизация агрегатов ТВ; рефолдинг и очистка рефолдированных белков с помощью различных хроматографических методов [6]. Денатурация и рефолдинг являются критическими этапами, оптимизация которых часто требуется для обеспечения правильной ренатурации белка, депонированного в тельцах включения, и оптимальных выходов [25].

ТВ, содержащие CorD_PS, солюбилизировали с использованием хаотропного реагента — 8 М мочевины. Мочевина разрушает гидрофобные взаимодействия образующихся агрегатов, но не дестабилизирует общую белковую структуру, влияя на структуру воды, окружающую белковые молекулы. Белок разворачивается за счет снижения диэлектрической проницаемости постоянной среды [15]. При денатурации и сворачивании белка в присутствии мочевины часто происходит карбамирование аминокрупп [7, 17, 27], это связано с тем, что образованный в процессе разложения мочевины цианат [12] реагирует с аминокгруппами белка с образованием стабильного карбамированного продукта [26, 28]. Разложение мочевины ускоряется при щелочном pH и при повышении температуры. Таким образом, рекомендуется готовить свежие растворы мочевины из сверхчистого (> 99%) твердого реагента и выполнять этапы рефолдинга/диализа при низкой температуре (4 °C) [12, 26], чтобы уменьшить образование цианата. Буферные растворы, содержащие первичные амины, такие как Трис, глицин или бикарбонат аммония, обеспечивают возможность удаления образующегося цианата [16, 27]. Буфер для денатурации рекомбинантного коронавируса антигена также содержал 40 мМ ДТТ для восстановления дисульфидных связей, тогда как в буфере для рефолдинга концентрация ДТТ резко снижалась, что способствовало спонтанному их образованию [15]. Хелатирующий агент ЭДТА использовался для предотвращения катализируемого металлами окисления воздухом цистеинов нецелевых белков.

Процесс рефолдинга — важный этап для получения высоких выходов белка, так как солюбилизованный белок агрегирует во время процесса сворачивания. Агрегация белков — реакция нулевого порядка, в то время как рефолдинг является реакцией первого порядка. Так, скорость агрегации выше, чем скорость фолдинга при высокой исходной концентрации белка. Эффективность процесса рефолдинга выше при низкой конечной концентрации белка во время рефолдинга. Из-за этой кинетической конкуренции обычно используют концентрации белка порядка 10–15 мкг/мл в рефолдирующей смеси. Однако в нашем случае оптимальной оказалась концентрация антигена CorD_PS 250 мкг/мл. Рефолдинг разбавлением позволил снизить остаточную концентрацию мо-

чевины до 0,2М, данная концентрация увеличивала растворимость белка и предотвращала его агрегацию.

Для подавления процессов агрегации и увеличения выхода белка мы пробовали использовать аминокислоты глицин, пролин и L-аргинин, которые за счет подавления агрегации промежуточных продуктов сворачивания могут увеличивать выход целевого белка. Однако при их использовании нам не удавалось достичь высоких выходов белка. При очистке от аргинина рекомбинантный антиген выпадал в осадок, вероятно, из-за неполного рефолдинга рекомбинантной молекулы. Также добавление поверхностно-активного вещества Triton-X100 отрицательно влияло на выход рефолдинга.

Изучение специфической активности созданного химерного антигена исследовано в тесте активации Т-лимфоцитов, оцененного по способности продуцировать интерферон-гамма при анализе методом цитофлюориметрии. Оказалось, что CD4⁺Т-лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ (Т-хелперы памяти), выделенные у добровольцев, перенесших COVID-19, ответили продукцией IFN γ на стимуляцию химерным антигеном в условиях *in vitro*. При этом лимфоциты добровольцев, не болевших COVID-19, не отвечали при тех же условиях постановки опыта. Продукция IFN γ Т-хелперами памяти (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺) из фракции мононуклеарных клеток периферической крови в ответ на специфическую стимуляцию антигеном CorD_PS *ex vivo* в концентрациях 25, 5 и 1 мкг/мл показала высокую эффективность нашей тест-системы для *in vitro* определения антиген-специфических Т-клеток. Данные свидетельствуют, что диагностикум может оценивать формирование ответа Th1-клеток, о чем свидетельствуют повышенные уровни IFN γ . Важность ответов Th1-клеток для долгосрочной защиты от COVID-19 была ранее подчеркнута исследованием лиц с бессимптомным и легким течением COVID-19 в анамнезе [24].

Безусловно, разработанный комбинированный антиген имеет ряд эпитопов не только для взаимодействия с Т-клеточным рецептором, но и для связывания антител. Во всяком случае это касается значительного участка, представленного N-белком. Действительно, оказалось, что разработанный антиген взаимодействует с антителами при оценке с помощью непрямого ИФА с использованием Первого международного стандарта ВОЗ анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов (First WHO International Standard for anti-SARS-CoV-2 Immunoglobulin), представляющего собой стандартизированный препарат пулированных образцов сыворотки крови людей, переболевших COVID-19, содержащий антитела

к различным эпитопам структурных белков коронавируса SARS-CoV-2 в высоком титре. Титрование Международного стандарта в интервале от 5 до 0,078 БАУ/мл показало абсолютную линейную зависимость между концентрацией антител и уровнем иммуноферментной реакции ($r = 0,9999$) с белковым химерным антигеном.

Выводы

1. Разработанный протокол хроматографической очистки рекомбинантного коронавирусного антигена из рефолдирующей смеси для получения субстанции антигена с необходимыми параметрами качества включает три этапа: ионообменная, гидрофобная и эксклюзионная

хроматографии. Описанный процесс позволяет получать 5-7 грамм антигена коронавирусного рекомбинантного CorD_PS чистотой более 95%, остаточными ЛПС менее 800 ЕЭ/мг, ДНК штамма-продуцента — не более 200,0 нг/мг белка, БШП — не более 10 мкг/мг белка (не более 1% от содержания белка) за один цикл культивирования в 30 л ферментационной среды.

2. В результате исследований специфической иммунологической активности рекомбинантного коронавирусного антигена CorD_PS была подтверждена концепция возможности его использования в качестве диагностикума для определения формирования Т-клеточного иммунного ответа.

Список литературы / References

1. Копать В.В., Рябченкова А.А., Чирак Е.Л., Чирак Е.Р., Саенко А.И., Колмаков Н.Н., Симбирцев А.С., Духовлинов И.В., Тотолян А.А. Разработка структуры и штамма-продуцента *E. coli* для антигена, содержащего последовательности белков N, S, M, E коронавируса SARS-CoV-2 // Инфекция и иммунитет, 2023. Т. 13, № 4, С. 653-662. [Kopat V.V., Riabchenkova A.A., Chirak E.L., Chirak E.R., Saenko A.I., Kolmakov N.N., Simbirtsev A.S., Dukhovlinov I.V., Totolian A.A. Designing structure and *E. coli* strain-producer bearing SARS-CoV-2 N, S, M, E protein-related sequence antigen. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2023, Vol. 13, no. 4, pp. 653-662. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-DSA-15624.
2. ОФС. 1.7.1.0007.15. Лекарственные средства, получаемые методами рекомбинантных ДНК. Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII изд. 2016. С. 521-541. [OFS. 1.7.1.0007.15. Medicines obtained by recombinant DNA methods. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. 13th ed., 2016, pp. 521-541].
3. Bertoletti A., le Bert N., Qui M., Tan A.T. SARS-CoV-2-specific T cells in infection and vaccination. *Cell. Mol. Immunol.*, 2021, Vol. 18, no. 10, pp. 2307-2312.
4. Bertoletti A., le Bert N., Tan A.T. SARS-CoV-2-specific T cells in the changing landscape of the COVID-19 pandemic. *Immunity*, 2022, Vol. 55, no. 10, pp. 1764-1778.
5. Burgess R.R. Refolding solubilized inclusion body proteins. *Methods Enzymol.*, 2009, Vol. 463, pp. 259-282.
6. Clark E.D.B. Protein refolding for industrial processes. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, Vol. 12, no. 2, pp. 202-207.
7. Čejka J., Vodrázka Z., Salák J. Carbamylation of globin in electrophoresis and chromatography in the presence of urea. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, Vol. 154, no. 3, pp. 589-591.
8. Datar R.V., Cartwright T., Rosen C.G. Process economics of animal cell and bacterial fermentations: a case study analysis of tissue plasminogen activator. *Biotechnology*, 1993, Vol. 11, no. 3, pp. 349-357.
9. Fahnert B., Lilie H., Neubauer P. Inclusion bodies: formation and utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, 2004, Vol. 89, pp. 93-142.
10. Fallet B., Foglierini M., Porret R., Alcaraz-Serna A., Sauvage C., Jenelten R., Caplanusi T., Gilliet M., Perez L., Fenwick C., Genolet R., Harari A., Bobisse S., Gottardo R., Pantaleo G., Muller Y.D. Intradermal skin test with mRNA vaccines as a surrogate marker of T cell immunity in immunocompromised patients. *J. Infect.*, 2023, Vol. 87, no. 2, pp. 111-119.
11. GeurtsvanKessel C.H., Geers D., Schmitz K.S., Mykityn A.Z., Lamers M.M., Bogers S., Scherbeijn S., Gommers L., Sablerolles R.S.G., Nieuwkoop N.N., Rijsbergen L.C., van Dijk L.L.A., de Wilde J., Alblas K., Breugem T.I., Rijnders B.J.A., de Jager H., Weiskopf D., van der Kuy P.H.M., Sette A., de Vries R.D. Divergent SARS-CoV-2 Omicron-reactive T and B cell responses in COVID-19 vaccine recipients. *Sci. Immunol.*, 2022, Vol. 7, no. 69, eabo2202. doi: 10.1126/sciimmunol.abo2202.
12. Hagel P., Gerding J.J., Fieggen W., Bloemendal H. Cyanate formation in solutions of urea: I. Calculation of cyanate concentrations at different temperature and pH. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, Vol. 243, no. 3, pp. 366-373.
13. Hartley D.L., Kane J.F. Properties of inclusion bodies from recombinant *Escherichia coli*. *Biochem. Soc. Trans.*, 1988, Vol. 16, no. 2, pp. 101-102.
14. Kalimuddin S., Tham C.Y.L., Qui M., de Alwis R., Sim J.X.Y., Lim J.M.E., Tan H.C., Syenina A., Zhang S.L., le Bert N., Tan A.T., Leong Y.S., Yee J.X., Ong E.Z., Ooi E.E., Bertoletti A., Low J.G. Early T cell and binding antibody responses are associated with COVID-19 RNA vaccine efficacy onset. *Med*, 2021, Vol. 2, no. 6, pp. 682-688.

15. Laslo A.C., Ganea E., Obinger C. Refolding of hexameric porcine leucine aminopeptidase using a cationic detergent and dextrin-10 as artificial chaperones. *J. Biotechnol.*, 2009, Vol. 140, no. 3-4, pp. 162-168.
16. Lin M.F., Williams C., Murray M.V., Conn G., Ropp P.A. Ion chromatographic quantification of cyanate in urea solutions: estimation of the efficiency of cyanate scavengers for use in recombinant protein manufacturing. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2004, Vol. 803, no. 2, pp. 353-362.
17. Lippincott J., Apostol I. Carbamylation of cysteine: a potential artifact in peptide mapping of hemoglobins in the presence of urea. *Analyt. Biochem.*, 1999, Vol. 267, no. 1, pp. 57-64.
18. Liu L., Wang P., Nair M.S., Yu J., Rapp M., Wang Q., Luo Y., Chan J.F., Sahi V., Figueroa A., Guo X.V., Cerutti G., Bimela J., Gorman J., Zhou T., Chen Z., Yuen K.Y., Kwong P.D., Sodroski J.G., Yin M.T., Ho D.D. Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, 2020, Vol. 584, no. 7821, pp. 450-456.
19. Matyushenko V., Isakova-Sivak I., Kudryavtsev I., Goshina A., Chistyakova A., Stepanova E., Prokopenko P., Sychev I., Rudenko L. Detection of IFN γ -secreting CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells in COVID-19 convalescents after stimulation of peripheral blood mononuclear cells with live SARS-CoV-2. *Viruses*, 2021, Vol. 13, no. 8, 1490. doi: 10.3390/v13081490.
20. Mitraki A., Fane B., Haase-Pettingell C., Sturtevant J., King J. Global suppression of protein folding defects and inclusion body formation. *Science*, 1991, Vol. 253, no. 5015, pp. 54-58.
21. Moga E., Lynton-Pons E., Domingo P. The robustness of cellular immunity determines the fate of SARS-CoV-2 infection. *Front. Immunol.*, 2022, Vol. 13, 904686. doi: 10.3389/fimmu.2022.904686.
22. Patra A.K., Mukhopadhyay R., Mukhija R., Krishnan A., Garg L.C., Panda A.K. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. *Protein Expr. Purif.*, 2000, Vol. 18, no. 2, pp. 182-192.
23. Rudolph R., Lilie H. *In vitro* folding of inclusion body proteins. *FASEB J.*, 1996, Vol. 10, no. 1, pp. 49-56.
24. Sekine T., Perez-Potti A., Rivera-Ballesteros O., Strålin K., Gorin J.B., Olsson A., Llewellyn-Lacey S., Kamal H., Bogdanovic G., Muschiol S., Wullimann D.J., Kammann T., Emgård J., Parrot T., Folkesson E., Karolinska COVID-19 Study Group, Rooyackers O., Eriksson L.I., Henter J.I., Sönnnerborg A., Buggert M. Robust T cell immunity in convalescent individuals with asymptomatic or mild COVID-19. *Cell*, 2020, Vol. 183, no. 1, pp. 158-168.
25. Singh S.M., Panda A.K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, Vol. 99, no. 4, pp. 303-310.
26. Stark G.R. Reactions of cyanate with functional groups of proteins. III. Reactions with amino and carboxyl groups. *Biochemistry*, 1965, Vol. 4, no. 6, pp. 1030-1036.
27. Sun S., Zhou J.Y., Yang W., Zhang H. Inhibition of protein carbamylation in urea solution using ammonium-containing buffers. *Analyt. Biochem.*, 2014, Vol. 446, pp. 76-81.
28. Volkin D.B., Mach H., Middaugh C.R. Degradative covalent reactions important to protein stability. *Mol. Biotechnol.*, 1997, Vol. 8, pp. 105-122.

Авторы:

Копать В.В. — директор по развитию ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Рябченкова А.А. — научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Чирак Е.Л. — научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Чирак Е.Р. — научный сотрудник ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Саенко А.И. — главный технолог ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., заведующий лабораторией клеточной иммунологии отдела иммунологии ФГБНУ Институт экспериментальной медицины; доцент кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Трулев А.С. — к.б.н., научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Kopat V.V., Development Director, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Riabchenkova A.A., Research Associate, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Chirak E.L., Research Associate, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Chirak E.R., Research Associate, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Saenko A.I., Chief Process Engineer, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Cellular Immunology, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Trulioff A.S., PhD (Biology), Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Савин Т.В. — иммунолог ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; научный сотрудник кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Savin T.V., Immunologist, Saint Petersburg Pasteur Institute; Research Associate, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Зуева Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», Санкт-Петербург, Россия

Zueva E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Симбирцев А.С. — д.м.н., член-корр. РАН, профессор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Professor, Saint Petersburg Pasteur Institute; Professor, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Тотолян Арег А. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии, директор ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера»; заведующий кафедрой иммунологии ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Molecular Immunology, Director of Saint Petersburg Pasteur Institute; Head, Department of Immunology, First St. Petersburg State I. Pavlov Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Духовлинов И.В. — к.б.н., директор по науке ООО «АТГ Сервис Ген», Санкт-Петербург, Россия

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Director of Research, ATG Service Gene LLC, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 26.12.2023
Принята к печати 20.02.2024

Received 26.12.2023
Accepted 20.02.2024