

Разработка вакцины против коронавирусной инфекции на базе норовирусной молекулярной платформы

Новиков Д.В., Мохонов В.В., Мохонова Е.В., Лапин В.А., Мелентьев Д.А., Новиков В.В.*
Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной, Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Российская Федерация.
*e-mail: mbre@mail.ru

Резюме: Известно, что белок норовируса VP1 способен самостоятельно собираться в вирусоподобные частицы (ВПЧ), на которые развивается достаточно сильный иммунный ответ. Нами получен рекомбинантный VP1 эпидемического варианта норовируса генотипа GII.4, доминировавшего на территории Нижегородской области в 2018 г. Показана способность VP1 к самосборке, его безопасность и иммуногенность. ВПЧ на основе VP1 норовируса использованы в качестве молекулярной платформы для разработки вакцины против коронавирусной инфекции. Для этого проведена замена части белка VP1, экспонированной на поверхности ВПЧ, на аминокислотную последовательность SARS-CoV-2, кодирующую сайты связывания с рецепторами (RBD). Для увеличения растворимости и корректного фолдинга N-концевая часть рекомбинантной химеры VP1 норовируса с RBD SARS-CoV-2 слита с периплазматическим мальтозосвязывающим белком *E.coli* с включением сайта для специфического гидролиза. Проведена оптимизация экспрессии, растворения и очистки слитого белка VP1 норовируса с RBD SARS-CoV-2. Полученная химерная структура может быть использована в составе вакцины для профилактики COVID-19, применимой для интраназальной вакцинации.

При разработке вакцин применяют разные стратегии, каждая из которых имеет свои преимущества и недостатки. Используется инаktivация цельных вирионов, подбор живых аттенуированных штаммов, иммунизация пептидами, вирусоподобными частицами (ВПЧ) и нуклеиновыми кислотами. Инаktivированные и аттенуированные вакцины являются высокоиммуногенными препаратами. Ограничением является дороговизна производства и возможность репликации вакцинных штаммов, реассортации или рекомбинации генома вакцинных штаммов с диким вирусом. Пептидные вакцины легко конструируются с использованием генетических технологий и нарабатываются в микроорганизмах. Однако их использование ограничено слабой иммуногенностью и сложностями в формировании конформационных детерминант для нейтрализующих

антител. ВПЧ совмещают в себе преимущества описанных выше стратегий. Структурно повторяя вирион, ВПЧ характеризуются высокой иммуногенностью, содержат конформационные детерминанты для нейтрализующих антител и не содержат в своем составе вирусных нуклеиновых кислот. Белковые компоненты ВПЧ достаточно легко нарабатываются и способны к самосборке в вирусоподобные частицы. Более того, ВПЧ могут выступать в качестве вектора для индукции иммунного ответа на искусственно встроенные в них антигены. Это свойство используется для создания универсальных платформ, позволяющих получать мультивалентные вакцины, содержащие различные антигенные детерминанты.

Нами в качестве платформы для конструирования вакцин использованы вирусоподобные частицы норовируса. Основным белком капсида норовирусов является VP1, мономеры которого димеризуются при экспрессии в клетках прокариот или эукариот, а димеры VP1 самостоятельно собираются в ВПЧ, практически неотличимые от нативных вирионов. С использованием нуклеотидной последовательности эпидемического варианта норовируса генотипа GII.4, доминировавшего на территории Нижегородской области в 2018 г, была создана генетическая конструкция, кодирующая рекомбинантный VP1, сконструированы штаммы *E. coli* Rosetta 2 (DE3) и Rosetta 2/43 (DE3) AhpC, ΔSlyD/X, ΔTrxB, ΔGor – продуценты рекомбинантного белка. Получен чистый препарат VP1, показана его способность к самосборке, безопасность и иммуногенность на лабораторных животных.

Структурно VP1 разделяется на домен S, формирующий оболочку вириона, и выступающие Р домены, содержащие сайты связывания с лигандами. Известно, что замена Р части белка VP1 на чужеродные последовательности, позволяет экспонировать интересующий антиген на поверхности ВПЧ [1]. Такие ВПЧ, способны вызывать сильный иммунный ответ на экспонированный антиген. Основанные на VP1 ВПЧ норовируса могут быть использованы в качестве молекулярной платформы для презентации различных антигенов и создания мультивалентных вакцин, включая SARS-CoV-2 [2]. В связи с этим мы использовали ВПЧ норовируса в качестве платформы для разработки интразальной вакцины для профилактики SARS-CoV-2. Известно, нейтрализующие антитела, предотвращающие инфицирование клеток хозяина, образуются на домен RBD белка Spike SARS-CoV-2 отвечающий за связывание с рецепторами Neuropilin-1 и ACE2 [3, 4]. Имеющиеся наработки были использованы нами для дизайна генетической конструкции, кодирующей химерный белок, состоящий из S части VP1 норовируса, слитой с RBD SARS-CoV-2.

На основе нуклеотидной последовательности SAR-CoV-2 (GenBank № MT188341) были подобраны олигонуклеотиды, фланкирующие регион, кодирующий сайты связывания с Neuropilin-1 и ACE2. Методом ОТ-ПЦР был синтезирован фрагмент кДНК, кодирующий RDB изолята SAR-CoV-2, циркулирующего на территории Нижнего Новгорода. Полученную кДНК использовали для получения двух генетических конструкций. Первая предназначена для получения в *E. coli* рекомбинантного белка RBD SARS-CoV-2, который применим в качестве антигена в иммуноферментном анализе. Вторая конструкция представляет собой химеру между отвечающим за самосборку норовирусной частицы S доменом VP1 и RBD SARS-CoV-2. Данная генетическая конструкция предназначена для получения рекомбинантного белка, способного формировать вирусоподобные частицы, презентующие на своей поверхности RBD SARS-CoV-2. Были получены штаммы *E. coli* - продуценты рекомбинантных RBD SARS-CoV-2 и химеры VP1 норовируса с RBD SARS-CoV-2. Для увеличения растворимости и корректного фолдинга полученных белков N-концевые части рекомбинантного RBD SARS-CoV-2 и химеры VP1 норовируса с RBD SARS-CoV-2 были слиты с периплазматическим мальтозосвязывающим белком (*MalE*) *E. coli* (штамм K-12). Между *MalE* и целевым белком включен сайт для специфичного гидролиза протеазой TEV. Полученные штаммы использованы для наработки рекомбинантных белков. Проведена оптимизация экспрессии, растворения и очистки рекомбинантного RBD SARS-CoV-2 и химеры VP1 норовируса с RBD SARS-CoV-2. Первый использован в качестве антигена для выявления антител в крови переболевших COVID-19. Установлено, что рекомбинантный RBD распознается антителами, присутствующими в сыворотке крови переболевших SARS-CoV-2. На лабораторных животных проводятся испытания безопасности и иммуногенности химерного VP1 норовируса и RBD SARS-CoV-2, который потенциально может быть использован не только для внутримышечного, подкожного, но и для интраназального применения. Вероятной сферой использования такого препарата является профилактика инфицирования детей коронавирусом. Кроме того, разработка может быть эффективна для вакцинации пожилых лиц.

Список литературы

1. M. Xia, et al. Bioengineered Norovirus S₆₀ Nanoparticles as a Multifunctional Vaccine Platform. ACS Nano. 2018 Nov 27;12(11):10665-10682. doi: 10.1021/acsnano.8b02776. Epub 2018 Sep 25.
2. Y. Wang, et al. SARS-CoV-2 S1 is superior to the RBD as a COVID-19 subunit vaccine antigen. J Med Virol. 2020; 1–7. <https://doi.org/10.1002/jmv.26320>.

3. L. Cantuti-Castelvetri, et al. Neuropilin-1 facilitates SARS-CoV-2 cell entry and infectivity. *Science* 13 Nov 2020: Vol. 370, Issue 6518, pp. 856-860. DOI: 10.1126/science.abd2985.
4. J. L. Daly, et al. Neuropilin-1 is a host factor for SARS-CoV-2 infection. *Science* 13 Nov 2020: Vol. 370, Issue 6518, pp. 861-865. DOI: 10.1126/science.abd3072.