



Получение и характеристика гомодимерной формы RBD S-белка SARS-CoV-2, обладающей повышенной авидностью к специфическим антителам

А.А. Деркаев, Е.И. Рябова, В.В. Прокофьев, И.А. Фаворская, Д.М. Гроусова, И.Б. Есмагамбетов✉, И.В. Должикова, Д.В. Шебляков

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

✉ Есмагамбетов Ильяс Булатович; esmagambetovib@gmail.com

Резюме

Важным параметром, оцениваемым при мониторинге иммунной прослойки у населения и эффективности вакцинации населения, является уровень вируснейтрализующих антител. Разработка подхода к выявлению вируснейтрализующих антител к вирусу SARS-CoV-2 с помощью безопасного, простого и быстрого метода, не требующего использования живых вирусов, имеет большое значение для борьбы с пандемией COVID-19. Для разработки тест-систем для проведения иммуноферментного анализа (ИФА), детектирующих потенциально вируснейтрализующие антитела, необходимо получение высокоочищенного рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка, обладающего высокой авидностью к специфическим антителам. **Цель работы:** получение и характеристика гомодимерной формы RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, а также клеточной линии, продуцирующей рекомбинантный RBD, для создания ИФА тест-системы для выявления потенциально вируснейтрализующих антител. **Материалы и методы:** дизайн генетической конструкции проводили *in silico*. Стабильную клеточную линию получали при помощи трансфекции клеток CHO-S, селекции на антибиотике и отбора оптимального клона. Рекомбинантный RBD очищали с использованием хроматографических методов, получали мономерную и гомодимерную формы RBD. Активность полученных форм анализировали с использованием методов Вестерн-блот, биослойной интерферометрии и непрямого ИФА. Для анализа использовали моноклональные антитела GamXRH19, GamP2C5 и h6g3, а также образцы сывороток крови добровольцев, вакцинированных препаратом Гам-КОВИД-Вак, и невакцинированных добровольцев. **Результаты:** получена клеточная линия CHO-S, стабильно продуцирующая рекомбинантный RBD S-белка вируса SARS-CoV-2. Показано, что при культивировании данной клеточной линии в режиме fed-batch более 7 суток рекомбинантный RBD способен образовывать гомодимеры за счет наличия неспаренных цистеинов. Количественный выход очищенного рекомбинантного RBD из культуральной жидкости составил 30–50 мг/л. Мономерная и гомодимерная формы RBD были разделены при помощи гель-фильтрации и охарактеризованы по способности взаимодействовать со специфическими моноклональными антителами, а также сыворотками крови от вакцинированных добровольцев. Продemonстрировано, что именно гомодимерная форма рекомбинантного RBD обладает повышенной авидностью к моноклональным антителам и антителам в сыворотке крови вакцинированных. **Выводы:** гомодимерная форма рекомбинантного RBD может являться более предпочтительной для анализа уровня антител к рецептор-связывающему домену S-белка вируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова: рекомбинантный белок; коронавирусная инфекция; рецептор-связывающий домен; SARS-CoV-2; avidность

Для цитирования: Деркаев А.А., Рябова Е.И., Прокофьев В.В., Фаворская И.А., Гроусова Д.М., Есмагамбетов И.Б., Должикова И.В., Щебляков Д.В. Получение и характеристика гомодимерной формы RBD S-белка SARS-CoV-2, обладающей повышенной avidностью к специфическим антителам. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):76–89. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-450>

Production and characterisation of a SARS-CoV-2 S-protein RBD homodimer with increased avidity for specific antibodies

A.A. Derkaev, E.I. Ryabova, V.V. Prokofiev, I.A. Favorskaya, D.M. Grousova,
I.B. Esmagambetov✉, I.V. Dolzhikova, D.V. Shcheblyakov

N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, 18 Gamaleya St.,
Moscow 123098, Russian Federation

✉ Ilyas B. Esmagambetov; esmagambetovib@gmail.com

Abstract

Monitoring of the proportion of immune individuals and the effectiveness of vaccination in a population involves evaluation of several important parameters, including the level of virus-neutralising antibodies. In order to combat the COVID-19 pandemic, it is essential to develop approaches to detecting SARS-CoV-2 neutralising antibodies by safe, simple and rapid methods that do not require live viruses. To develop a test system for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that detects potential neutralising antibodies, it is necessary to obtain a highly purified recombinant receptor-binding domain (RBD) of the spike (S) protein with high avidity for specific antibodies. **The aim of the study** was to obtain and characterise a SARS-CoV-2 S-protein RBD homodimer and a recombinant RBD-expressing cell line, as well as to create an ELISA system for detecting potential neutralising antibodies. **Materials and methods:** the genetic construct was designed *in silico*. To generate a stable producer cell line, the authors transfected CHO-S cells, subjected them to antibiotic pressure, and selected the optimal clone. To isolate monomeric and homodimeric RBD forms, the authors purified the recombinant RBD by chromatographic methods. Further, they analysed the activity of the RBD forms by Western blotting, bio-layer interferometry, and indirect ELISA. The analysis involved monoclonal antibodies GamXRH19, GamP2C5, and h6g3, as well as serum samples from volunteers vaccinated with Gam-COVID-Vac (Sputnik V) and unvaccinated ones. **Results:** the authors produced the CHO-S cell line for stable expression of the recombinant SARS-CoV-2 S-protein RBD. The study demonstrated the recombinant RBD's ability to homodimerise after fed-batch cultivation of the cell line for more than 7 days due to the presence of unpaired cysteines. The purified recombinant RBD yield from culture broth was 30–50 mg/L. Monomeric and homodimeric RBD forms were separated using gel-filtration chromatography and characterised by their ability to interact with specific monoclonal antibodies, as well as with serum samples from vaccinated volunteers. The homodimeric recombinant RBD showed increased avidity for both monoclonal and immune sera antibodies. **Conclusions:** the homodimeric recombinant RBD may be more preferable for the analysis of levels of antibodies to the receptor-binding domain of the SARS-CoV-2 S protein.

Key words: recombinant protein; coronavirus infection; receptor-binding domain; SARS-CoV-2; avidity

For citation: Derkaev A.A., Ryabova E.I., Prokofiev V.V., Favorskaya I.A., Grousova D.M., Esmagambetov I.B., Dolzhikova I.V., Shcheblyakov D.V. Production and characterisation of a SARS-CoV-2 S-protein RBD homodimer with increased avidity for specific antibodies. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):76–89. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2022-450>

Введение

Коронавирусная инфекция 2019 (COVID-19) – тяжелое острое респираторное заболевание, впервые зарегистрированное в городе Ухань (Китай) в конце 2019 г.¹; 11 марта 2020 г. была объявлена пандемия². Возбудителем COVID-19 является новый коронавирус SARS-CoV-2, который относится к семейству *Coronaviridae*, роду *Betacoronavirus*. На ноябрь 2022 г. зарегистрировано более 630 млн подтвержденных случаев заболевания COVID-19 и более 6,5 млн летальных исходов по всему миру³. Важную роль в ограничении распространения вируса играют показатели иммунного статуса населения. Для детекции антител в сыворотках крови переболевших или вакцинированных людей применяют различные методы, среди которых – иммуноферментный анализ (ИФА) и реакция нейтрализации.

SARS-CoV-2 имеет четыре основных структурных белка: поверхностный шиповидный (spike) гликопротеин S (S-белок), оболочечный белок E, мембранный белок M и нуклеокапсидный белок N. Антитела, эффективно нейтрализующие вирус SARS-CoV-2, специфичны к поверхностному гликопротеину S. Данный белок играет ключевую роль в жизненном цикле вируса: S-белок взаимодействует с рецептором ангиотензинпревращающего фермента 2 типа (ACE2) на поверхности клетки, что приводит к интернализации вируса. S-белок состоит из двух субъединиц: S1 содержит N-концевой домен (NTD) и рецептор-связывающий домен (RBD), S2 содержит гептадный повтор 1 (HR1) и гептадный повтор 2 (HR2). Антитела, специфичные к различным областям S-белка, имеют разные механизмы ингибирования жизненного цикла вируса SARS-CoV-2. Например, антитела, связывающиеся с NTD, образуют комплекс белок–антитело, предотвращающий конформационные изменения в S-белке и блокирующий слияние мембран и проникновение вируса. Антитела, связывающиеся с RBD S-белка, образуют комплексы, ингибирующие взаимодействие RBD с рецептором ACE2, тем самым предотвращая интернализацию вируса [1]. Было показано, что около 90% антител, нейтрализующих SARS-CoV-2, специфичны к RBD [2].

Таким образом, RBD является важной мишенью при разработке препаратов для профилактики и терапии COVID-19, а также диагностических тест-систем для исследования иммунного ответа к вирусу SARS-CoV-2.

Цель работы – получение и характеристика гомодимерной формы RBD S-белка вируса SARS-CoV-2, а также клеточной линии, продуцирующей рекомбинантный RBD, для создания ИФА тест-системы для выявления потенциально вируснейтрализующих антител.

Материалы и методы

Материалы

Гуманизированное моноклональное антитело GamXRH19 и тяжелоцепочечное моноклональное антитело GamP2C5 являются компонентами препарата ГамКовиМаб (лекарственный препарат для экстренной профилактики и ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, на основе гуманизированных моноклональных антител, раствор для инфузий, находящийся на II фазе клинических исследований⁴), производства филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Гуманизированное моноклональное антитело h6g3 – компонент препарата ГамЭзуМаб (лекарственный препарат для этиотропной терапии и экстренной профилактики лихорадки Эбола, прошедший I фазу клинических исследований⁵), производства филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

В работе были использованы образцы сыворотки крови добровольцев, вакцинированных препаратом Гам-КОВИД-Вак (4 образца), а также образцы сыворотки крови невакцинированных добровольцев в качестве контроля (2 образца). Образцы сывороток крови были получены в рамках исследования уровня вируснейтрализующих антител, проводимого совместно с Департаментом здравоохранения города Москвы.

Исследование было одобрено комитетом по биоэтике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 17 от 03.12.2021). Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации.

¹ Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. WHO. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>

² WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID-19 – 11 March 2020. WHO. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

³ WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. WHO. <https://covid19.who.int/>

⁴ <https://clinline.ru/reestr-klinicheskikh-issledovanij/630-28.10.2022.html>

⁵ <https://clinline.ru/reestr-klinicheskikh-issledovanij/588-21.10.2020.html>

Методы

Дизайн генетической конструкции. Аминокислотную последовательность рецептор-связывающего домена (RBD) поверхностного S-белка вируса SARS-CoV-2 (аминокислотная последовательность из 319–541 аминокислотных остатков (а.о.), UniProtKB: locus SPIKE_SARS2, accession P0DTC2⁶) модифицировали с N-конца сигнальным пептидом щелочной фосфатазы SEAP (MLLLLLLLGLRLQLSLGI) и с C-конца последовательностью глицин-серинового линкера и гистидинового метки (GSNNNNNNNNNN). Модификации *in silico* проводили при помощи программы Geneious Prime⁷. Кодонный состав нуклеотидной последовательности полученного полипептида адаптировали для экспрессии в клетках CHO; синтез нуклеотидной последовательности проведен ЗАО «Евроген» (Россия). Нуклеотидную последовательность клонировали в плазмиду pCEP4 (Invitrogen, США) по сайтам рестрикции *Xba*I (Thermo Fisher Scientific, США) и *Hind*III (Thermo Fisher Scientific, США), получая таким образом плазмиду pCEP-RBD-SARS-CoV-2. Далее плазмиду нарабатывали в препаративных количествах, как описано авторами ранее [3], и очищали при помощи коммерческого набора Plasmid Midiprep 2.0 (ЗАО «Евроген», Россия).

Трансфекция культуры клеток и селекция трансфицированных клонов. Плазмиду CEP-RBD-SARS-CoV-2, подвергали гидролизу по сайту рестрикции *Ahd*I. Линеаризованную плазмиду очищали из рестрикционной смеси при помощи набора Cleanup Standard (ЗАО «Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Культуру клеток CHO-S (Thermo Fisher Scientific, США) трансфицировали линеаризованной плазмидой pCEP-RBD-SARS-CoV-2 с использованием системы CHOgro (Mirus Bio, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки культивировали в 6-луночных культуральных планшетах (Corning, США) при 5% CO₂, 80% влажности, 37 °C. Спустя 24 часа после трансфекции питательную среду заменяли на среду SFM4CHO (Cytiva, США) и добавляли антибиотик гигромицин В (InvivoGen, США) в концентрации 400 мкг/мл. Клетки культивировали в течение 7 сут, после чего концентрацию антибиотика увеличивали до 600 мкг/мл и продолжали культивирование в течение 7 сут; затем увеличивали концентрацию антибиотика до 800 мкг/мл и далее культивировали клетки еще неделю. Питательную среду в лунках заменяли свежей по мере закисления. Изменение pH культуральной жидкости оценивали визуально

при помощи красителя фенолового красного (Sigma Aldrich, США). Периодически оценивали жизнеспособность клеток в лунках с использованием автоматического счетчика клеток TC20 (Bio-Rad, США). Для этого 20 мкл клеточной суспензии смешивали в соотношении 1:1 с 0,4% раствором трипанового синего (Bio-Rad, США). В качестве контролей селекции использовали интактные клетки без добавления антибиотика (контроль условий культивирования) и интактные клетки с добавлением антибиотика (контроль активности антибиотика).

Получение суспензии клонов-продуцентов. Клеточную суспензию после трансфекции и культивирования с антибиотиком гигромицином В высеивали в 96-луночные планшеты (Corning, США) в концентрации 7 клеток/мл (100 мкл суспензии в лунку) в среде SFM4CHO с добавлением 20% кондиционированной культуральной жидкости. Описанным выше способом проводили высевание клеток в десять планшетов. Клетки культивировали при 5% CO₂, 80% влажности, 37 °C в течение 14 сут, затем культуральную жидкость отбирали для анализа продукции рекомбинантного RBD и взамен добавляли свежую питательную среду SFM4CHO. Моноклональность оценивали визуально, под микроскопом, по наличию в лунках единичных фокусов роста клеток. При достижении высокой плотности культуральной суспензии отобранные клоны-продуценты пересеивали в 6-луночные планшеты и культивировали в среде SFM4CHO при 5% CO₂, 80% влажности, 37 °C. При достижении концентрации клеток в лунках 10⁶ клеток/мл суспензию клонов пересеивали в культуральные флаконы площадью 25 см². При достижении концентрации клеток в лунках 10⁶ клеток/мл суспензию клонов пересеивали в культуральные колбы Эрленмейера объемом 125 мл (Corning, США). Количество и выживаемость клеток оценивали при помощи счетчика клеток TC20, как описано в предыдущем подразделе.

Культивирование клонов-продуцентов в культуральных колбах. Культивирование клонов-продуцентов в культуральных колбах Эрленмейера осуществляли при 5% CO₂, 80% влажности, 37 °C, при постоянном перемешивании с использованием шейкера-инкубатора Multitron (Infors HT, Швейцария) со скоростью 120 об/мин. Культивирование в колбах объемом 125 мл осуществляли с рабочим объемом клеточной суспензии 25 мл, в колбах объемом 500 мл – с рабочим объемом клеточной суспензии 100 мл и в колбах

⁶ <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P0DTC2/entry>

⁷ <https://www.geneious.com/prime/>

объемом 1000 мл — с рабочим объемом клеточной суспензии 200 мл по мере необходимости масштабирования. Клеточную суспензию пересевали при достижении концентрации клеток $(4-5) \times 10^6$ клеток/мл (как правило, через 2–3 сут культивирования). Количество и выживаемость клеток оценивали при помощи счетчика клеток TC20. При культивировании отобранного клона-продуцента в стадии продукции (режим культивирования с подпиткой, fed-batch), ежедневно к клеточной суспензии добавляли 3 г/л глюкозы («ПанЭко», Россия) и 1 ммоль глутамин («ПанЭко», Россия). Определение концентрации нутриентов (глюкоза, глутамат, глутамин) и метаболитов (лактат и аммоний) проводили при помощи анализатора метаболитов Cedex Bio Analyzer (Roche CustomBiotech, Швейцария). Культивирование в стадии продукции проводили в течение 7–10 сут. Завершение процесса культивирования осуществляли при падении выживаемости клеточной культуры до 70%.

Очистка рекомбинантного RBD из культуральной жидкости. Первичную очистку рекомбинантного RBD из культуральной жидкости осуществляли при помощи металл-хелатной аффинной хроматографии [4]. Хроматографию проводили в режиме связывание-элюция (bind-elute mode) на приборе AKTA Start, Cytiva, с использованием 1 мл колонки HisTrap HP, Cytiva. Элюцию проводили в изократическом режиме при скорости потока один объем колонки в минуту раствором: 20 mM Трис, 500 mM хлорид натрия, 500 mM имидазол, pH 8. Дополнительную очистку, замену буфера и разделение мономерных и димерных форм рекомбинантного RBD осуществляли при помощи гель-фильтрации с использованием колонки XK 26/100 (Cytiva, США), упакованной сорбентом Superdex 200 pg (Cytiva, США) [5, 6], а также концентрирования с использованием Vivaspinn 20 10 000 MWCO (Sartorius Stedim Biotech, Германия).

Определение концентрации и продукции рекомбинантного RBD в культуральной жидкости. Определение концентрации рекомбинантного RBD в культуральной жидкости осуществляли методом биослойной интерферометрии при помощи прибора Octet RED96 (Pall Biotech, США) и сенсоров Ni-NTA Dip and Read Biosensors (Pall Biotech, США) согласно протоколам фирмы-производителя.

Производство целевого белка на разные сутки культивирования контролировали, используя метод электрофореза в полиакриламидном геле [7, 8]. Электрофорез проводили как в невосстанавливающих, так и в восстанавливающих условиях с добавлением β-меркаптоэтанола.

Непрямой иммуноферментный анализ и Вестерн-блот. Непрямой иммуноферментный ана-

лиз (ИФА) и Вестерн-блот проводили, как описано авторами ранее [4–6, 9]. Полученные антигены сорбировали на поверхность ячеек 96-луночных иммунологических планшетов в концентрации 100 нг/луночка в течение 16 ч при 4 °C в карбонатно-калиевом буфере. Далее, после блокировки лунок планшетов раствором сухого обезжиренного молока (Sigma Aldrich, США), вносили моноклональные антитела GamP2C5 и GamXRH19 или образцы сыворотки крови вакцинированных (4 образца) и невакцинированных (2 образца) добровольцев. В качестве отрицательного контроля использовали антитело h6g3, специфичное к гликопротеину GP вируса Эбола.

В качестве вторичных антител применяли антитела NA933 (Amersham ECL HRP-Conjugated Antibodies, Cytiva, США), специфичные к IgG человека и конъюгированные с пероксидазой хрена. Определение концентрации рекомбинантного RBD для анализа проводили спектрофотометрически при длине волны 280 нм с помощью прибора NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Каждый образец антител и сывороток крови, использованных в непрямом ИФА, вносился в трех повторах. Обработку результатов Вестерн-блот проводили при помощи прибора Amersham Imager 600 (GE Healthcare, США). Для обработки результатов непрямого ИФА использовали программное обеспечение Microsoft Excel 2010 (Microsoft, США).

Определение равновесных констант диссоциации антител с рекомбинантным RBD. Определение равновесных констант диссоциации осуществляли с использованием метода биослойной интерферометрии с помощью прибора Octet RED96 (Pall Biotech, США) и сенсоров Anti-Human IgG Fc Capture (AHC) Dip and Read Biosensors (Pall Biotech, США), как описано в работе D. Shcheblyakov с соавт. [7]. Измерения проводили в кинетическом буфере. Связывание антител с сенсорами осуществляли в концентрации 1 мкг/мл. Рекомбинантный RBD вносили в концентрации 100, 50 и 25 нг/мл соответственно. Обсчет результатов проводили в программе ForteBio Data Analysis 10.0 (ForteBio, США). Концентрацию RBD и моноклональных антител определяли спектрофотометрически при длине волны 280 нм с помощью прибора Nanodrop 2000 с последующим учетом уникальных коэффициентов экстинкции для каждого моноклонального антитела. Каждый эксперимент проводили в трех повторах.

Результаты и обсуждение

В настоящее время оценка уровня вируснейтрализующих антител (ВНА) к вирусу SARS-CoV-2 в плазме крови вакцинированных

и переболевших людей является актуальной задачей. Уровень ВНА может служить косвенным показателем защиты организма от инфицирования вирусом SARS-CoV-2 и, как следствие, защиты от заболевания COVID-19 [8]. Вируснейтрализующими являются в основном антитела, специфичные к определенным эпитопам рецептор-связывающего домена RBD гликопротеина S вируса SARS-CoV-2 [9]. Таким образом, о количестве ВНА в организме можно косвенно судить по количеству антител, специфичных к RBD [10].

Самым простым и удобным количественным методом определения уровня антител, специфичных к RBD, является непрямой метод ИФА [11, 12]. ИФА проводится в несколько этапов: сорбция рекомбинантного RBD на 96-луночный планшет; добавление испытуемых образцов сывороток или плазмы крови, а также референсных образцов; внесение конъюгированных вторичных антител. Уровень RBD-специфических антител определяют относительно уровня сигнала оптической плотности при длине волны 450 нм. Такой способ оценки уровня RBD-специфических антител, которые потенциально могут быть вируснейтрализующими, является более быстрым и безопасным, чем прямая реакция нейтрализации *in vitro* с использованием живого или псевдотипированного вируса. Кроме того, данный подход можно применять для изучения специфической активности препаратов для терапии и экстренной профилактики COVID-19. В частности, уровень специфического сигнала к рекомбинантному RBD в непрямом ИФА являлся одним из критериев отбора однодоменных антител [4] при разработке препарата ГамКовиМаб, успешно прошедшего первую фазу клинических исследований.

Ключевым компонентом для разработки метода определения RBD-специфических антител в реакции непрямого ИФА является очищенный препарат рекомбинантного RBD. Следовательно, для получения производственных серий ИФА тест-систем необходимо разработать технологию получения рекомбинантного RBD, имеющего высокую степень чистоты и, главное, обладающего специфической активностью. В данной работе нами была разработана технология получения гомодимерной формы рекомбинантного RBD, обладающей большей авидностью к специфическим антителам и, как следствие, большими уровнями сигнала по сравнению с мономерной формой в реакции непрямого ИФА.

Получение клеточной линии, стабильно продуцирующей рекомбинантный RBD

При получении клеточной линии, стабильно продуцирующей рекомбинантный RBD, основ-

ными параметрами являются выход целевого продукта и его качество. Поскольку RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 имеет четыре сайта гликозилирования, из которых два сайта О-гликозилирования [13] и два сайта N-гликозилирования [14, 15], а также несколько дисульфидных связей [14], необходимо было использовать клеточную линию, способную обеспечивать данные модификации белка. Учитывая это, нами была выбрана культура клеток CHO-S, позволяющая достигать высокий уровень экспрессии трансгена, а также обеспечивать гликозилирование и образование дисульфидных связей [16]. В качестве экспрессирующего вектора была использована плазмида pCEP4, обеспечивающая высокий уровень экспрессии трансгена под контролем CMV-промотора, а также обладающая возможностью селекции клона-продуцента на антибиотике гигромицин В.

Аминокислотную последовательность RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 (319–541 а.о.) модифицировали *in silico* с N-конца сигнальным пептидом щелочной фосфатазы SEAP и с C-конца последовательностью глицин-серинового линкера и гистидиновой метки для секреции белка в культуральную жидкость и возможности очистки с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии соответственно. Схема конструкции представлена на рисунке 1. Аминокислотная и нуклеотидная последовательности полученной конструкции представлены на рисунке 2.

Далее нуклеотидную последовательность, кодирующую созданную *in silico* конструкцию, синтезировали и клонировали в вектор pCEP4, получая таким образом вектор pCEP-RBD-SARS-CoV-2. Схематичное изображение плазмиды pCEP-RBD-SARS-CoV-2 представлено на рисунке 3.

Далее проводили трансфекцию клеток CHO-S полученным вектором, селекцию и отбор трансфицированных клонов. Изучение продукции рекомбинантного RBD в культуральную жидкость отдельными клонами оценивали методом биослойной интерферометрии, позволяющим определять концентрацию белков, содержащих гистидиновую метку. В результате был отобран оптимальный клон-продуцент, обеспечивающий выход рекомбинантного белка RBD около 30–50 мг/л культуральной жидкости. В процессе культивирования было обнаружено, что при длительном культивировании (более 7 сут) отобранного клона-продуцента в культуральных колбах в режиме fed-batch с добавлением глюкозы и глутамина постепенно происходит накопление гомодимерных форм рекомбинантного RBD, которые впоследствии можно выделить при помощи металл-хелатной аффинной хроматографии (рис. 4).



Рис. 1. Схематическое изображение генетической конструкции, экспрессирующей рецептор-связывающий домен вируса SARS-CoV-2. SP – сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию белка в культуральную жидкость; RBD – рецептор-связывающий домен S-белка вируса SARS-CoV-2; His-tag – гистиридиновая метка, обеспечивающая очистку белка аффинной хроматографией.

Fig. 1. Schematic representation of the RBD-expressing genetic construct. SP—signal peptide enabling protein secretion to culture broth; RBD—SARS-CoV-2 S-protein receptor-binding domain; His-tag—histidine tag for protein purification by affinity chromatography.

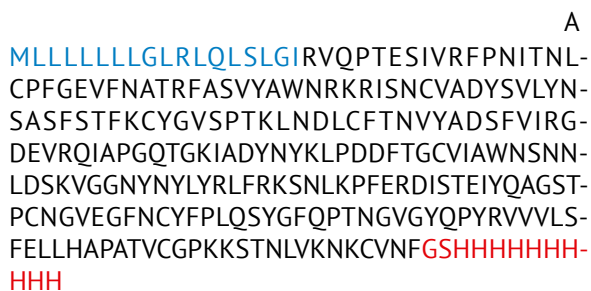


Рис. 2. Аминокислотная (А) и нуклеотидная (В) последовательности разработанной генетической конструкции. Синим цветом обозначена последовательность SP, красным цветом — последовательность His-tag.

Fig. 2. Amino acid (A) and nucleotide (B) sequences of the developed genetic construct. The signal peptide sequence is shown in blue; the His-tag sequence, in red.

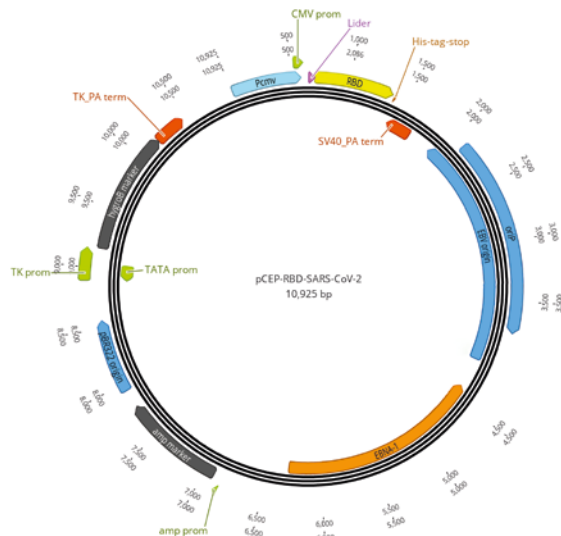


Рис. 3. Схематическое изображение плазмиды рСЕР-RBD-SARS-CoV-2.

Fig. 3. Schematic representation of the pCEP-RBD-SARS-CoV-2 plasmid.

На 7 сут культивирования происходит образование и накопление гомодимерных форм RBD с молекулярной массой около 60 кДа (рис. 4, дорожка 5). Подвижность мономера RBD на электрофореграмме около 30 кДа (рис. 4, дорожки 1–4) может быть объяснена гликозилированием RBD. По всей видимости, данное явление связано с тем, что в аминокислотной последовательности RBD (319–541 а.о.) присутствует неспаренный остаток цистеина, вакантный для образования S–S связи и, таким образом, способный инициировать образование гомодимера из двух молекул RBD. Результаты электрофореза в невозстанавливающих условиях показали, что в образце очищенного рекомбинантного RBD на 7 сут культивирования отчетливо выявляется гомодимерная форма с молекулярной массой около 60 кДа (рис. 4, дорожка 5), а при электрофорезе в восстанавливающих условиях детектируется преимущественно мономерная форма этого образца RBD (рис. 4, дорожка 11). Данные, полученные при проведении электрофореза, подтверждают гипотезу образования димера RBD за счет дисульфидных связей неспаренных цистеинов, так как при восстановлении β-меркаптоэтанолом данная связь разрушается и в образце наблюдается преимущественно мономерная форма.

Очистка и разделение мономерных и гомодимерных форм рекомбинантного RBD

Отобранный клон-продуцент культивировали в культуральных колбах Эрленмейера объемом 1000 мл в рабочем объеме 200 мл в течение 7 сут,

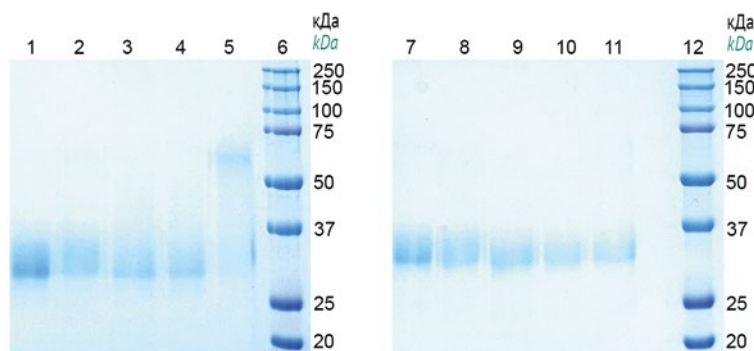


Рис. 4. Электрофореграмма образцов рекомбинантного RBD, очищенных металл-хелатной аффинной хроматографией в разные сутки культивирования. Электрофорез проводили в невосстанавливающих (дорожки 1–5) и в восстанавливающих условиях (дорожки 7–11). Дорожки на электрофореграмме: образец, очищенный на 3 сут культивирования, – дорожки 1, 7; образец, очищенный на 6 сут – дорожки 2, 8; образец, очищенный на 4 сут, – дорожки 3, 9; образец, очищенный на 5 сут, – дорожки 4, 10; образец, очищенный на 7 сут – дорожки 5, 11; маркер молекулярной массы (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, США) – дорожки 6, 12.

Fig. 4. Electropherogram of recombinant RBD samples purified by metal-chelate affinity chromatography on different days of cultivation. Electrophoresis was performed under non-reducing (lanes 1–5) and reducing conditions (lanes 7–11). Electropherogram lanes represent samples purified on cultivation day 3 (lanes 1, 7), day 4 (lanes 3, 9), day 5 (lanes 4, 10), day 6 (lanes 2, 8), and day 7 (lanes 5, 11); lanes 6 and 12 show the molecular weight marker (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, USA).

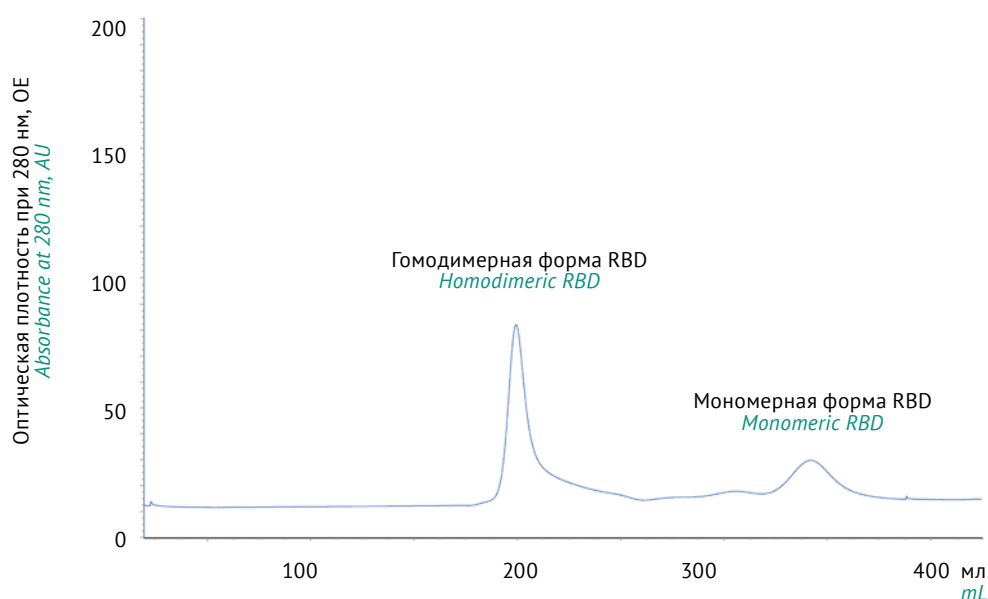


Рис. 5. Хроматограмма рекомбинантного RBD. Хроматографическую очистку проводили с помощью гель-фильтрации с использованием колонки XK 26/100, упакованной сорбентом Superdex 200 pg.

Fig. 5. Chromatogram of the recombinant RBD purified by gel-filtration chromatography using an XK 26/100 column packed with Superdex 200 prep-grade resin.

после чего культуральную жидкость отделяли от клеток и очищали при помощи металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием колонки HisTrap HP. При хроматографировании культуральную жидкость наносили частями по 30–40 мл; при этом с одного нанесения на колонку получали около 1 мг целевого белка RBD.

Собранные фракции, содержащие RBD, объединяли, концентрировали до объема 10 мл с использованием центрифужных концентраторов и далее проводили гель-фильтрацию. В результате гель-фильтрации происходило разделение мономерной и гомодимерной форм рекомбинантного RBD (рис. 5).

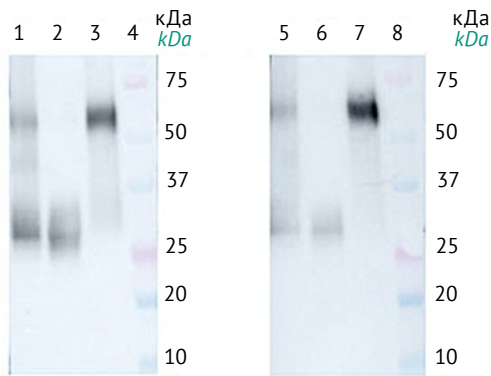


Рис. 6. Результаты вестерн-блот анализа различных фракций рекомбинантного RBD с использованием специфических моноклональных антител GamP2C5 (дорожки 1–3) и GamXRH19 (дорожки 5–7): дорожки 1, 5 – рекомбинантный RBD до гель-фильтрации; дорожки 2, 6 – мономерный рекомбинантный RBD; дорожки 3, 7 – гомодимерный рекомбинантный RBD; дорожки 4, 8 – маркер молекулярной массы (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, США).

Fig. 6. Western blots of recombinant RBD fractions, obtained with specific monoclonal antibodies GamP2C5 (lanes 1–3) and GamXRH19 (lanes 5–7); lanes 1 and 5—recombinant RBD before gel-filtration chromatography, lanes 2 and 6—monomeric recombinant RBD, lanes 3 and 7—homodimeric recombinant RBD, lanes 4 and 8—molecular weight marker (Precision Plus Protein Dual Color Standards, Bio-Rad, USA).

Таким образом, в результате гель-фильтрации получили фракции, содержащие преимущественно гомодимерную форму RBD (первый пик) и преимущественно мономерную форму (второй пик). Далее полученные фракции анализировали по взаимодействию со специфическими антителами с использованием методов Вестерн-блот, биослойной интерферометрии и непрямого ИФА, а также с сыворотками крови от вакцинированных Гам-КОВИД-Вак с помощью метода непрямого ИФА.

Изучение взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD со специфическими антителами методом Вестерн-блот

Разделенные при помощи гель-фильтрации фракции с гомодимерной и мономерной формами рекомбинантного RBD исследовали с помощью Вестерн-блот анализа на способность

связываться со специфическими моноклональными антителами (рис. 6). В качестве специфических моноклональных антител использовали антитела GamP2C5 и GamXRH19, являющиеся компонентами препарата ГамКовиМаб, предназначенного для терапии заболевания COVID-19. В качестве контроля использовали образец рекомбинантного RBD до разделения с помощью гель-фильтрации.

Результаты, полученные с помощью Вестерн-блот анализа, показали, что и мономерная, и гомодимерная формы рекомбинантного RBD взаимодействуют со специфическими антителами. Полученные данные свидетельствуют о том, что и мономерная, и гомодимерная формы рекомбинантного RBD являются функционально активными молекулами, способными связываться со специфическими антителами, и не являются посторонними примесями.

Таблица 1. Данные определения равновесных констант диссоциации (K_D)
Table 1. Data on the determination of equilibrium dissociation constants (K_D)

Форма рекомбинантного RBD <i>Recombinant RBD form</i>	K_D моноклональных антител GamP2C5 <i>GamP2C5 monoclonal antibody K_D</i>	K_D моноклональных антител GamXRH19 <i>GamXRH19 monoclonal antibody K_D</i>
Мономерная форма RBD <i>Monomeric RBD</i>	$(1,60 \pm 0,25) \times 10^{-8}$ М	$(1,20 \pm 0,58) \times 10^{-8}$ М
Гомодимерная форма RBD <i>Homodimeric RBD</i>	$(2,10 \pm 0,45) \times 10^{-8}$ М	$(3,20 \pm 0,45) \times 10^{-8}$ М
Исходный образец RBD до гель-фильтрации (смесь мономерной и гомодимерной форм RBD) <i>Initial RBD sample before gel filtration (mix of monomeric and homodimeric forms)</i>	$(1,80 \pm 0,79) \times 10^{-8}$ М	$(1,80 \pm 0,30) \times 10^{-8}$ М

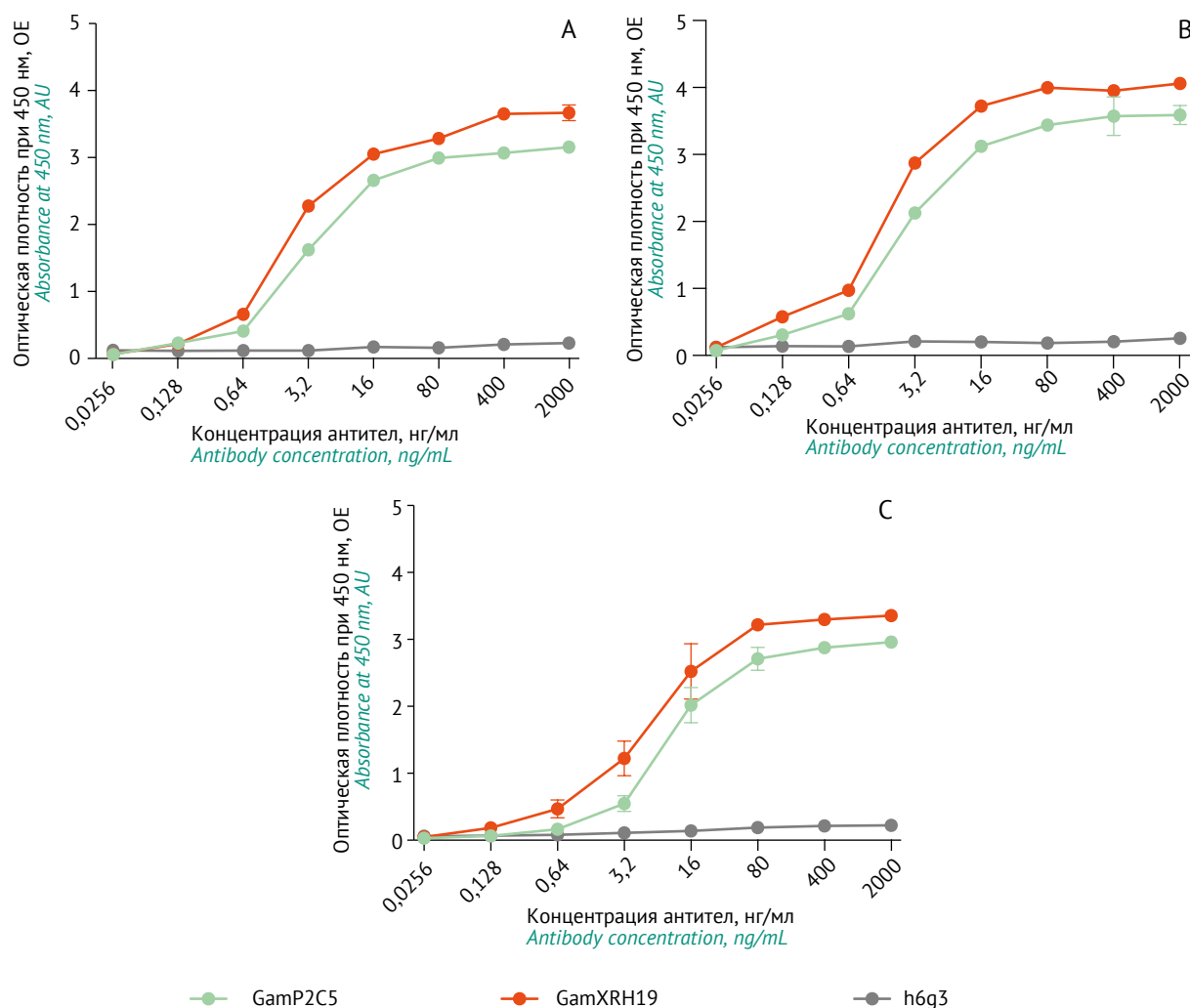


Рис. 7. Результаты изучения взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD (А – смеси мономерной и гомодимерной форм RBD, В – мономерной формы RBD, С – гомодимерной формы RBD) со специфическими моноклональными антителами GamP2C5 и GamXRH19 методом иммуноферментного анализа. В легенде представлены обозначения использованных антител: GamP2C5 – тяжелопепочное моноклональное антитело, компонент препарата ГамКовиМаб; GamXRH19 – гуманизированное моноклональное антитело, компонент препарата ГамКовиМаб; h6g3 – гуманизированное моноклональное антитело, компонент препарата ГамЭзуМаб (отрицательный контроль).

Fig. 7. ELISA analysis of interactions between the obtained recombinant RBD forms (A—monomeric and homodimeric RBD mix, B—monomeric RBD, C—homodimeric RBD) and specific monoclonal antibodies (GamP2C5 and GamXRH19). The legend shows the antibodies used: GamP2C5 is a heavy chain monoclonal antibody, a component of GamCoviMab; GamXRH19 is a humanised monoclonal antibody, a component of GamCoviMab; and h6g3 is a humanised monoclonal antibody, a component of GamEzuMab (negative control).

Изучение взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD со специфическими антителами методом биослойной интерферометрии

Количественную оценку взаимодействия гомодимерной и мономерной форм рекомбинантного RBD со специфическими антителами GamP2C5 и GamXRH19 изучали при помощи определения равновесных констант диссоциации (K_D) методом биослойной интерферометрии с использованием прибора Octet RED96 и сенсоров Anti-Human Fc Capture. Полученные в результате данные представлены в таблице 1.

Установлено, что гомодимерная форма RBD обладает повышенным сродством к моноклональным антителам, что может быть следствием наличия большего количества эпитопов в одной молекуле для связывания с паратопами моноклональных антител. Так, антитела GamP2C5 и GamXRH19 имеют по два паратопа в каждой молекуле, которые предположительно могут одновременно взаимодействовать с двумя эпитопами в молекуле гомодимерного рекомбинантного RBD и таким образом увеличивать avidность антител.

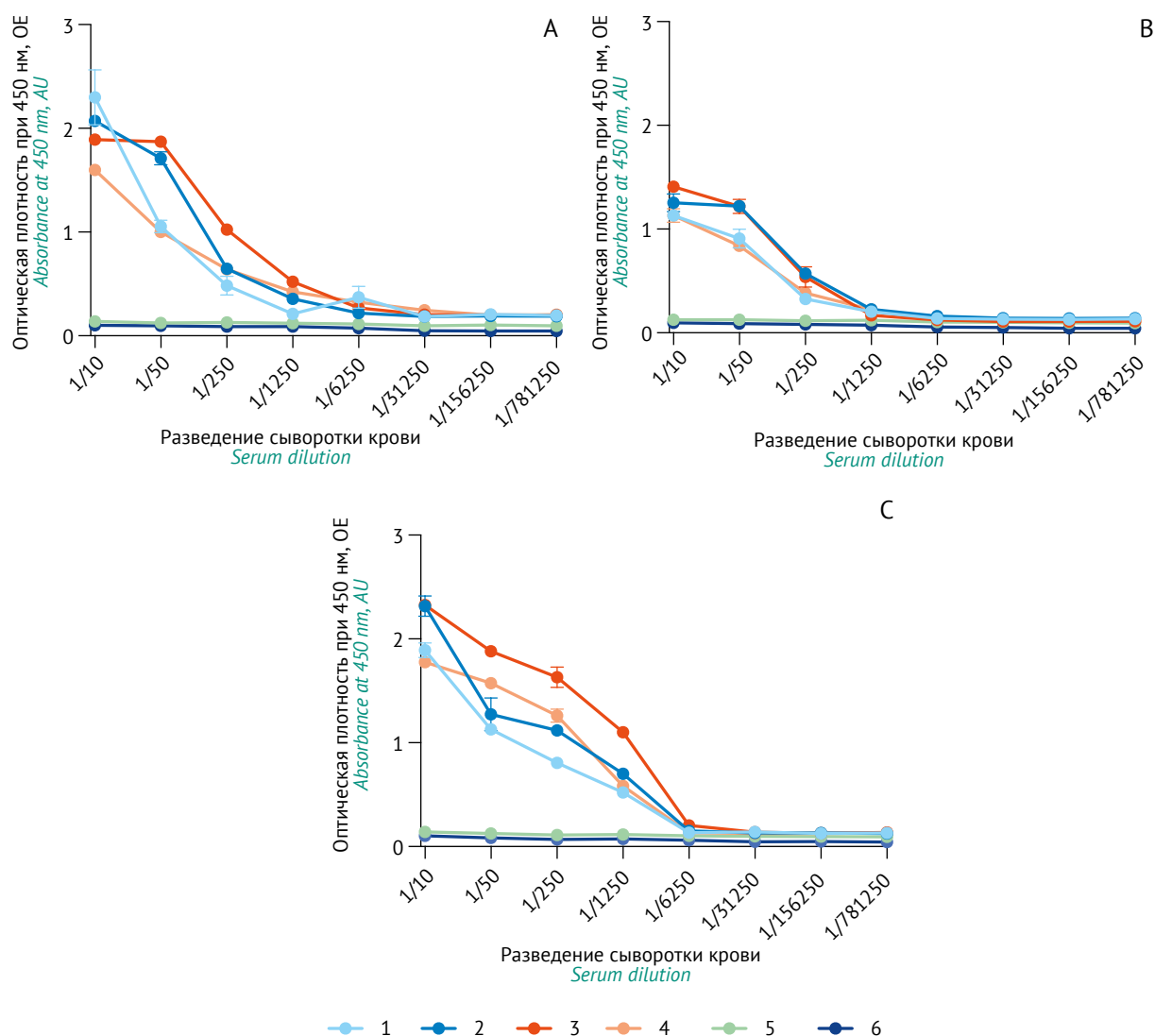


Рис. 8. Результаты изучения взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD (А – смеси мономерной и гомодимерной форм RBD, В – мономерной формы RBD, С – гомодимерной формы RBD) с иммунными сыворотками крови от людей, вакцинированных Гам-КОВИД-Вак, методом иммуноферментного анализа. В легенде представлены обозначения использованных образцов сыворотки крови: 1, 2, 3, 4 – образцы сывороток крови вакцинированных добровольцев; 5, 6 – образцы сывороток крови невакцинированных добровольцев (отрицательный контроль).

Fig. 8. ELISA analysis of interactions between the obtained recombinant RBD forms (A—monomeric and homodimeric RBD mix, B—monomeric RBD, C—homodimeric RBD) and immune sera from vaccinated volunteers. The legend shows the serum samples used: 1, 2, 3, 4—sera of volunteers vaccinated with Gam-COVID-Vac; 5, 6—sera of non-vaccinated volunteers (negative control).

Изучение взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD со специфическими антителами и иммунными сыворотками крови в реакции непрямого ИФА

Проводили анализ взаимодействия полученных форм рекомбинантного RBD (мономерной формы RBD; гомодимерной формы RBD; исходного образца RBD до гель-фильтрации – смеси мономерной и гомодимерной форм RBD) с моноклональными антителами GamP2C5 и GamXRH19 или образцами сыворотки крови вакцинированных лиц. В качестве отрицательных контролей

использовали антитело h6g3, специфичное к гликопротеину GP вируса Эбола, а также сыворотку крови невакцинированных добровольцев. Результаты представлены на рисунках 7 и 8.

Полученные в ИФА данные коррелируют с результатами предыдущих исследований. Показано, что уровень специфического сигнала (оптическая плотность при 450 нм) и значения титров как специфических моноклональных антител, так и иммунных сывороток крови наиболее высокие в случае использования гомодимерной формы рекомбинантного RBD, ниже

в случае использования исходного образца RBD (смесь неразделенных мономерной и гомодимерной форм RBD) и самые низкие при использовании мономерной формы RBD. Полученные данные также подтверждают, что гомодимерная форма RBD обладает большей avidностью к специфическим моноклональным антителам и специфическим антителам в сыворотке крови вакцинированных добровольцев. Представленные результаты позволяют утверждать, что гомодимерная форма RBD более предпочтительна для создания ИФА тест-систем для оценки специфической активности препаратов моноклональных антител, а также оценки уровня RBD-специфичных антител (потенциально вируснейтрализующих) в сыворотке крови вакцинированных и переболевших людей.

Выводы

1. Получена клеточная линия, стабильно продуцирующая рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2.

Литература/References

1. Yang Y, Du L. SARS-CoV-2 spike protein: a key target for eliciting persistent neutralizing antibodies. *Signal Transduct Target Ther.* 2021;6(1):95. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00523-5>
2. Piccoli L, Park Y-J, Tortorici MA, Czudnochowski N, Walls AC, Beltramello M, et al. Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell.* 2020;183(4):1024–42.e21. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.037>
3. Рябова ЕИ, Деркаев АА, Есмагамбетов ИБ, Щебляков ДВ, Довгий МА, Бырихина ДВ и др. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2021;21(4):266–78. Ryabova EI, Derkaev AA, Esmagambetov IB, Shcheblyakov DV, Dovgiy MA, Byrikhina DV, et al. Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale. *BIOpreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment.* 2021;21(4):266–78 (In Russ). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>
4. Favorskaya IA, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Dolzhikova IV, Alekseeva IA, Korobkova AI, et al. Single-domain antibodies efficiently neutralize SARS-CoV-2 variants of concern. *Front Immunol.* 2022;13:822159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822159>
5. Есмагамбетов ИБ, Щебляков ДВ, Егорова ДА, Воронина ОЛ, Деркаев АА, Воронина ДВ и др. Наноклетка – потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола. *Acta Naturae.* 2021;13(4):53–63. Esmagambetov IB, Shcheblyakov DV, Egorova DA, Voronina OL, Derkaev AA, Voronina DV, et al. Nanobodies are potential therapeutic agents for the Ebola virus infection. *Acta Naturae.* 2021;13(4):53–63. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11487>
6. Воронина ДВ, Щебляков ДВ, Есмагамбетов ИБ, Деркаев АА, Попова О, Щербинин ДН. Получение нейтрализующих наноклеток к стеблевому домену гемагглютинаина вируса гриппа типа А. *Acta Naturae.* 2021;13(4):33–41. Voronina DV, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Derkaev AA, Popova O, Shcherbinin DN. Development of neutralizing nanobodies to the hemagglutinin stem domain of influenza A viruses. *Acta Naturae.* 2021;13(4):33–41. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11495>
7. Pang NY-L, Pang AS-R, Chow VT, Wang D-Y. Understanding neutralising antibodies against SARS-CoV-2 and their implications in clinical practice. *Mil Med Res.* 2021;8(1):47. <https://doi.org/10.1186/s40779-021-00342-3>
8. Shcheblyakov D, Esmagambetov I, Simakin P, Kostina L, Kozlov A, Tsibezov V, et al. Development and characterization of two GP-specific monoclonal antibodies, which synergistically protect non-human primates against Ebola lethal infection. *Antiviral Res.* 2019;172:104617. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104617>
9. Dogan M, Kozhaya L, Placek L, Gunter C, Yigit M, Hardy R, et al. SARS-CoV-2 specific antibody and neutralization assays reveal the wide range of the humoral immune response to virus. *Commun Biol.* 2021;4(1):129. <https://doi.org/10.1038/s42003-021-01649-6>

10. Takheaw N, Liwsrisakun C, Chaiwong W, Laopajon W, Pata S, Inchai J, et al. Correlation analysis of anti-SARS-CoV-2 RBD IgG and neutralizing antibody against SARS-CoV-2 Omicron variants after vaccination. *Diagnostics*. 2022;12(6):1315. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12061315>
11. Luo S, Xu J, Cho CY, Zhu S, Whittaker KC, Wang X, et al. Quantitative detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies using indirect ELISA. *Lab Med*. 2022;53(3):225–34. <https://doi.org/10.1093/labmed/lmab085>
12. Mehdi F, Chattopadhyay S, Thiruvengadam R, Yadav S, Kumar M, Sinha SK, et al. Development of a fast SARS-CoV-2 IgG ELISA, based on receptor-binding domain, and its comparative evaluation using temporally segregated samples from RT-PCR positive individuals. *Front Microbiol*. 2021;11:618097. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618097>
13. Shajahan A, Supekar NT, Gleinich AS, Azadi P. Deducing the N- and O-glycosylation profile of the spike protein of novel coronavirus SARS-CoV-2. *Glycobiology*. 2020;30(12):981–8. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa042>
14. Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veersler D. Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281–92.e6. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.058>
15. Watanabe Y, Allen JD, Wrapp D, McLellan JS, Crispin M. Site-specific glycan analysis of the SARS-CoV-2 spike. *Science*. 2020;369(6501):330–3. <https://doi.org/10.1126/science.abb9983>
16. Kim JY, Kim Y-G, Lee GM. CHO cells in biotechnology for production of recombinant proteins: current state and further potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;93(3):917–30. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3758-5>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE (внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку рукописи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией, согласны нести ответственность за все аспекты работы). **А.А. Деркаев, Е.И. Рябова, В.В. Прокофьев, И.А. Фаворская** — сбор, анализ, интерпретация результатов работы; **Д.М. Гроусова, И.В. Должикова** — написание текста рукописи и критический пересмотр его содержания; **И.Б. Есмагамбетов** — существенный вклад в концепцию и дизайн работы, написание текста и критический пересмотр его содержания; **Д.В. Шебляков** — существенный вклад в концепцию и дизайн работы, написание текста и критический пересмотр его содержания.

Соответствие принципам этики. Исследование было одобрено комитетом по биоэтике ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, протокол № 17 от 03.12.2021. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации.

Благодарности. Работа выполнена в рамках гранта № 01-04-413 от 28.04.2020. Департамента здравоохранения города Москвы «Создание тест-системы для оценки активности плазмы крови «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) criteria for authorship (all the authors made significant contributions to the conception, research, and drafting of the manuscript; they read and approved the final version before publication and agreed to be accountable for all aspects of the work). **A.A. Derkaev, E.I. Ryabova, V.V. Prokofiev, I.A. Favorskaya** collected, analysed, and interpreted the study results. **D.M. Grousova, I.V. Dolzhikova** drafted and critically revised the manuscript. **I.B. Esmagambetov** made a significant contribution to conception and design of the study, drafted and critically revised the manuscript. **D.V. Shchablyakov** made a significant contribution to conception and design of the study, drafted and critically revised the manuscript, and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved by the bioethics committee of the N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology under meeting minutes No. 17 of 03.12.2021. The study was performed in accordance with the requirements of the Helsinki Declaration.

Acknowledgements. The study was supported by grant No. 01-04-413 “Development of the SARS-CoV-2-RBD-ELISA-Gamaleya test system for plasma activity assessment” of 28.04.2020 by the Moscow Department of Health.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Деркаев Артем Алексеевич.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3776-3856>
derkaev.a@yandex.ru

Рябова Екатерина Игоревна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>
ryabovaei96@gmail.com

Прокофьев Владимир Владимирович.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>
vladimir.prokofev2609@gmail.com

Artem A. Derkaev.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3776-3856>
derkaev.a@yandex.ru

Ekaterina I. Ryabova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>
ryabovaei96@gmail.com

Vladimir V. Prokofiev.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>
vladimir.prokofev2609@gmail.com

Фаворская Ирина Алексеевна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0639-8390>

irina.favorskaya@gmail.com

Гроусова Дарья Михайловна.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3299-4818>

dgrousova@gmail.com

Есмагамбетов Ильяс Булатович, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

esmagambetovib@gmail.com

Должикова Инна Вадимовна, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>

dolzhikova@gamaleya.org

Щебляков Дмитрий Викторович, канд. биол. наук.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

sdmitryv@yahoo.com

Irina A. Favorskaya, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0639-8390>

irina.favorskaya@gmail.com

Daria M. Grousova.

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3299-4818>

dgrousova@gmail.com

Ilias B. Esmagambetov, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

esmagambetovib@gmail.com

Inna V. Dolzhikova, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2548-6142>

dolzhikova@gamaleya.org

Dmitry V. Shcheblyakov, Cand. Sci. (Biol.).

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

sdmitryv@yahoo.com

Поступила 11.08.2022

После доработки 21.11.2022

Принята к публикации 07.12.2022

Online first 31.12.2022

Received 11 August 2022

Revised 21 November 2022

Accepted 7 December 2022

Online first 31 December 2022