

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

ННЦ «Інститут біології та медицини»

Кафедра вірусології

Завідувач кафедри проф. Ірина БУДЗАНІВСЬКА
(звання, ім'я, ПРІЗВИЩЕ)

Протокол №____ засідання кафедри

від “ ____ ” _____ 20__ р.

**РОЗРОБКА ПІДХОДУ ДЛЯ СТАНДАРТИЗАЦІЇ ВАКЦИНИ ПРОТИ
COVID-19 НА ОСНОВІ НАНОЧАСТИНОК**

Кваліфікаційна робота магістра
денної форми навчання

за спеціальністю 091 «Біологія»

Мельник Діани Богданівни
(прізвище, ім'я, по батькові автора роботи)

Науковий керівник від кафедри

доц. каф. вірусології, к.б.н., с.н.с.
(науковий ступінь, вчене звання)

Шевченко О.В.
(прізвище, ініціали)

Робота виконана на базі відділу імунології Інституту Молекулярної Медицини
(MRC WIMM, Human Immunology Unit)

під керівництвом проф. Алана Таунсенда (Alain Townsend)

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ACE2	–	ангіотензин-перетворюючий фермент 2 (Angiotensin Converting Enzyme 2);
AF647	–	флуоресцентний барвник AlexaFluor 647; антитіло, мічене AlexaFluor 647
BCA	–	біцінхонінова кислота (bicinchoninic acid)
Bio	–	біотин (biotin); антитіло, мічене біотином
BSA	–	бичачий сироватковий альбумін (bovine serum albumin)
COVID-19	–	коронавірусна хвороба 2019 (COronaVIrus Disease 2019)
ИH4	–	однодоменне антитіло (нанотіло)
Mab	–	моноклональне антитіло (monoclonal antibody)
MERS	–	близькосхідний респіраторний синдром (Middle East Respiratory Syndrome)
MFI	–	значення інтенсивності флюоресценції (mean fluorescence intensity)
Nab	–	нейтралізуюче антитіло (neutralizing antibody)
NHS	–	N-гідроксосукцинімід (N-hydroxysuccinimide)
PBS	–	фосфатно-буферний розчин (phosphate-buffered saline)
RBD	–	рецептор-зв'язуючий домен (receptor binding domain)
SARS	–	тяжкий гострий респіраторний синдром (Severe Acute Respiratory Syndrome)
SARS-CoV-2	–	тяжкий гострий респіраторний синдром коронавірусу 2 (Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2)
SC003-mi3	–	Streptococcus PYogenes, SpyCatcher003-mi3

SDS-PAGE	–	натрієвий додецилсульфат-поліакриламідний гель (sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis)
SE	–	сукцинімідоловий естер (succinimidyl ester)
ST3	–	SpyTag3
TFP	–	тетрафлуорофеніл (tetrafluorophenyl)
VLP	–	вірусоподібна частинка (virus-like particle)

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	2
ВСТУП	6
РОЗДІЛ 1. Загальна характеристика вірусу та IgG до SARS-CoV-2. Будова та формування мозаїчних частинок.....	8
1.1. SARS-CoV-2: патогенез, проблематика виявлення та епідеміологія.....	8
1.2. Класифікація груп антитіл IgG до SARS-CoV-2 за Барнсом.....	12
1.2.1. Нейтралізуючі антитіла, кодовані сегментом гену V _H 3-53 з короткими петлями CDRH3, які блокують ACE2 та зв'язуються тільки з “up” конформацією рецептор-зв'язуючого домену.....	14
1.2.2. ACE2-блокуючі нейтралізуючі антитіла, які зв'язуються як з конформацією “up” так і з “down”, та можуть зв'язуватись з сусідніми рецептор-зв'язуючими доменами.....	15
1.2.3. Нейтралізуючі антитіла, які зв'язуються поза межами сайту ACE2 та розпізнають як конформацію “up” так і “down”;.....	16
1.2.4. Антитіла, які не блокують ACE2 та зв'язуються тільки з “up” конформацією рецептор-зв'язуючого домену.....	17
1.3. Система SpyTag/SpyCatcher.....	19
1.4. Утворення наноклітки міЗ (nanocage).....	21
1.5. Мозаїчні частинки (склад вірусних RBD).....	22
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи досліджень.....	25
2.1. Матеріали досліджень.....	25
2.2. Методи дослідження.....	25

2.2.1. Фарбування за допомогою Dynabeads	26
2.2.2. Проточна цитометрія	27
2.2.3. Мічення антитіл флуоресцентним барвником AlexaFluor 647	27
2.2.4. Біотинілювання антитіл	28
2.2.5. Кон'югація частинок SC003-mi3 з RBD-ST3	29
2.2.6. Визначення концентрації за допомогою біцинхонінової кислоти	30
2.2.7. SDS-електрофорез в поліакриламідному гелі (SDS-PAGE)	31
2.2.8. Реакція непрямой гемаглютинації	31
2.2.9. Статистична обробка даних	32
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та обговорення	33
3.1. Систематизація та обробка даних	33
3.2. Встановлення специфічності антитіла В38	37
3.3. Підтвердження специфічності антитіл третього шару	41
3.4. Перевірка С102 в якості потенційного специфічного антитіла до RatG13	44
3.5. Перевірка RBD-mi3 на предмет деградації частинок	47
3.6. Перевірка реактивності антитіла М8а-7 відносно WIV1-mi3	50
3.7. Виявлення потенційних специфічних антитіл з існуючого пулу за допомогою реакції непрямой гемаглютинації	53
3.8. Тестування IS-9А як альтернативи S309 в якості специфічного антитіла до групи 1	57
3.9. Кореляція результатів та обговорення	59
ВИСНОВКИ	63
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	64

ВСТУП

Пандемія SARS-CoV-2, що широко розгорнулася по всьому світу, внесла свої корективи в звичне життя кожної людини на Землі. Інфекційне захворювання, викликане даним вірусом, досі є недостатньо дослідженим, що не дає нам змогу оцінити масштаб впливу на людську популяцію.

У результаті коронавірусна хвороба (COVID-19) інфікувала понад 88 мільйонів людей, призвела до смерті понад 1,9 мільйона людей і безпрецедентно вплинула на дослідницьку діяльність у всьому світі. Запровадження обмежень на поїздки та суворі заходи щодо блокування розповсюдження вірусу змусили зачинитись багато установ та лабораторій, що працюють над дослідженнями, не пов'язаними з пандемією. Блокування також ускладнило ланцюжки поставок і уповільнило наукові дослідження та розробки, тоді як дослідницькі благодійні організації зіштовхнулися зі значними фінансовими труднощами, які згодом змінили розподіл та доступність коштів. Довгострокові наслідки пандемії COVID-19 для наукових досліджень та академічної підготовки важко визначити, поточна криза неминуче формуватиме моделі роботи та викладання на роки вперед [1].

У тяжких випадках патофізіологія COVID-19 включає руйнування епітеліальних клітин легень, тромбоз, гіперкоагуляцію та судинний витік, що призводить до сепсису. Ці події призводять до гострого респіраторного дистрес-синдрому (ГРДС) та подальшого фіброзу легень у пацієнтів. Фактори ризику COVID-19 включають серцево-судинні захворювання, гіпертонію та діабет [2].

Висока контагіозність, рівень смертності, швидкість появи нових штамів та наслідки для кожного окремого організму зумовлюють гостру потребу в вакцині, яка зможе охопити не тільки вже існуючі штами, а й забезпечити первинну

імунну відповідь до ймовірних нових варіантів, які, зазвичай, мають досить високий відсоток подібності з іншими сарбековірусами та високий пандемічний потенціал.

Враховуючи кількість нових випадків захворюваності та смертності від нових штамів, актуальність даної теми полягає у доцільності створення та стандартизації нової вакцини проти COVID-19, яка дає змогу попередити збільшення летальних випадків шляхом включення в структуру рецептор-зв'язуючих доменів інших сарбековірусів, що дозволить розширити діапазон імунної відповіді шляхом отримання широкого спектру антитіл до вірусів різного рівня спорідненості.

РОЗДІЛ 1

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ВІРУСУ ТА IgG ДО SARS-CoV-2. БУДОВА ТА ФОРМУВАННЯ МОЗАЇЧНИХ ЧАСТИНОК

1.1. SARS-CoV-2: патогенез, проблематика виявлення та епідеміологія

COVID-19 – хвороба викликана вірусом SARS-CoV-2, який був виявлений в грудні 2019 року в місті Ухань, Китай. Вірус володіє високою контагіозністю і тому досить швидко поширився по всьому світу.

Багато людей один раз у своєму житті стикаються з коронавірусом, який часто викликає такі захворювання, як пневмонія або бронхіт. Коронавіруси – це одноланцюгові РНК-віруси з оболонкою діаметром 120–80 нм і поділяються на чотири групи: альфа-коронавіруси, бета-коронавіруси, гамма-коронавіруси та дельта-коронавіруси. Чотири типи коронавірусу, HCoV-OC43, HCoV-229E, HCoV-NL63 і HCoV-NKUI є менш патогенними і викликають лише легкі респіраторні захворювання. Тим не менш, два типи коронавірусу, коронавірус важкого гострого респіраторного синдрому (SARS-CoV) і коронавірус близькосхідного респіраторного синдрому (MERS-CoV), спричинили дві смертельні епідемії. Крім того, у 2012 році в Саудівській Аравії було зареєстровано ще один спалах гострої респіраторної хвороби, де причиною епідемії було визнано MERS-CoV. За опублікованими даними, смертність становила понад 35%. Було зазначено, що основними джерелами передачі SARS-CoV та MERS-CoV людям були ринкові цивети та верблюди-дромадери [3, 4].

Коронавіруси - це віріони, які мають вірусні оболонки. Діаметр цих частинок віріону становить 120 нм. Структури листа конюшини, такі як глікопротеїни та білки на вірусній поверхні створили в ньому короноподібну структуру. Ці віруси

також відомі як коронавіруси через свою структура у формі корони. Ділянка під назвою нуклеокапсид складається з білків, покритих капсидом у цих вірусах, і розміщується всередині генетичного матеріалу вірусу.

Спалах коронавірусної хвороби 2019, що виник, набув характеру важкої епідемії, що забрала понад 2000 життів по всьому світу в період з грудня 2019 року по лютий 2020 року. Геном SARS-CoV-2 має близько 80% ідентичності з геномом SARS-CoV і приблизно на 96% ідентичний геному коронавірусу кажанів BatCoV RaTG13 [5].

Наразі існує багато досліджень на тему розповсюдження вірусу, проте домінуючим шляхом передачі є повітряно-крапельний. Окремо виділяють також: передача шляхом прямого контакту або через фоміти (теоретичний, через контаміновані предмети, поверхні та ін.), через домашніх тварин (є задокументовані випадки передачі SARS-CoV-2 кішкам, в організмі яких він вдало реплікується, проте випадків передачі вірусу від тварини до людини не було), ймовірна вертикальна передача, окремо вирізняють фекально-оральну передачу в теорії (завдяки локалізації рецепторів ACE2 в тонкій кишці), ймовірні також передача через сексуальні контакти (наразі зустрічався випадок наявності вірусної РНК в спермі, проте інфекційний вірус так і не вдалося виділити) та контактом крові (теоретичний, вірусна ДНК була знайдена у донорів крові без симптомів, проте зразки відкидались і далі не реалізовувались) [6].

Вірус передається через респіраторні краплинні виділення та аерозолі від людини до людини. Потрапляючи в організм, вірус зв'язується з рецепторами господаря та проникає у клітини господаря шляхом ендоцитозу або злиття мембран. Коронавіруси складаються з чотирьох основних структурних білків, а саме: спайкового білку (S), мембрани (M), оболонки (E) та нуклеокапсидного білка (N). Білок S виступає над вірусною поверхнею і є найважливішим для прикріплення та проникнення в організм господаря. Цей білок складається з двох

функціональних субодиниць (S1 і S2), серед яких S1 відповідає за зв'язування з рецептором клітини господаря, а субодиниця S2 відіграє роль у злитті вірусної та клітинної мембран господаря [7].

Як показано на рис. 1.1, глікопротеїн S нещодавно відкритого SARS-CoV-2 складається з двох субодиниць, S1 і S2, і зазвичай представлений у вигляді мечоподібного шипа. Справжню структуру цього білка, однак, можна спостерігати за допомогою кристалографії. S1 і S2 з'єднані між собою багатоосновним амінокислотним містком, який може бути необхідним для вивчення вірусного націлювання. Вірус зв'язується з клітиною-хазяїном за допомогою S-білка і проникає всередину клітини. Після процесу проникнення починається процес транскрипції, і вірус розмножується доти, доки клітина-хазяїн не буде повністю інфікована та знищена [8].

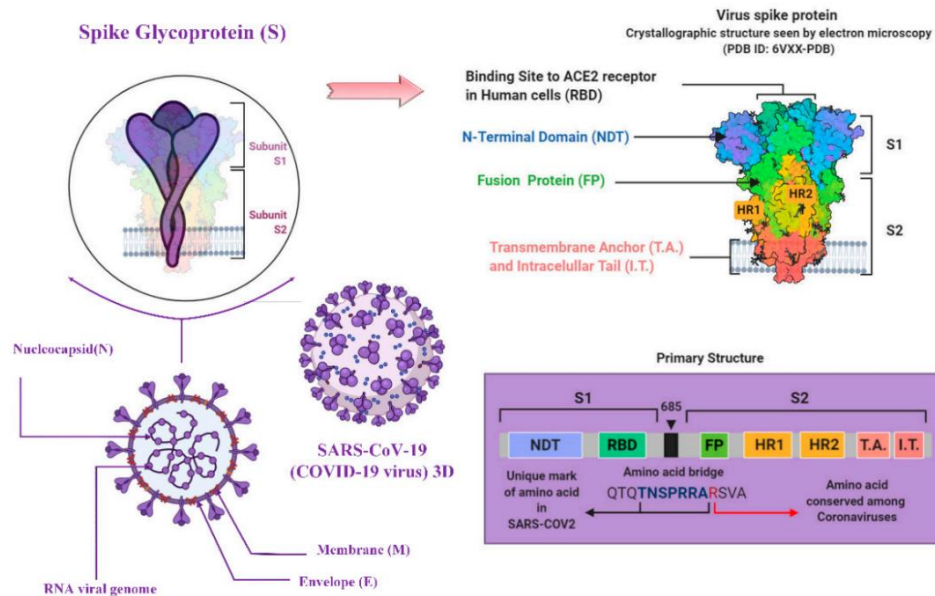


Рис. 1.1. Детальна структура спайкового глікопротеїну SARS-CoV-2 [8]

Коли вірус поширюється через дихальні шляхи, він робить це або за допомогою віріонів, суспендованих на великих краплях, або дрібних аерозолів, видалених з дихальних шляхів пацієнта. Класично краплі вважаються частинками розміром більше 5 мкм, які падають на землю на відстані приблизно

1,5 метра, а аерозолями — це частинки розміром менше 5 мкм, які можуть залишатися у повітрі протягом тривалого часу, хоча цей поділ є досить умовним і важко розрізняється в клінічних умовах [9, 10].

Вірус зв'язується з ACE2 як рецептор клітини-мішені господаря в синергії з трансмембранною сериною протеазою 2 (білок клітинної поверхні) господаря (рис 1.2), яка в основному експресується в епітеліальних клітинах дихальних шляхів та ендотеліальних клітинах судин. Це призводить до злиття мембран та вивільнення вірусного геному в цитоплазму господаря (2). Стадії (3-7) показують етапи вірусної реплікації, що залишилися, що ведуть до складання, дозрівання і вивільнення вірусу [11].

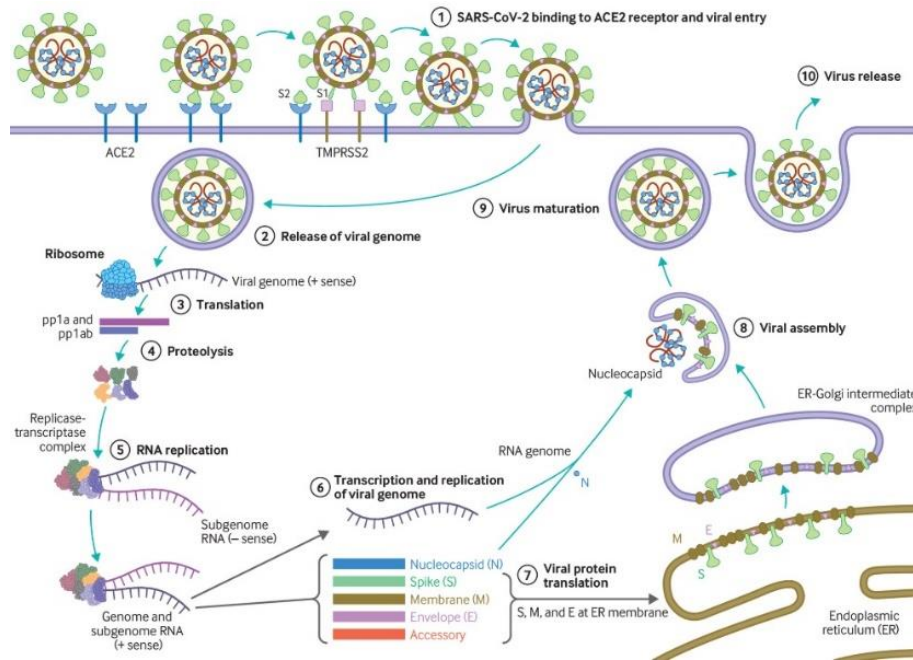


Рис. 1.2. Структура вірусу та реалізація реплікації [11]

Зв'язування білка вірусного спайка (S) з рецептором ангіотензин-перетворюючого ферменту 2 (ACE2) хазяїна є критичним кроком для проникнення в клітину, і, як наслідок, розподіл ACE2 господаря визначає тропізм вірусу. Вірусне навантаження є найвищим у верхніх дихальних шляхах (носоглотка та ротоглотка) на початку захворювання, а потім збільшується у

нижніх дихальних шляхах (мокроти), що свідчить про те, що верхні дихальні шляхи є зазвичай початковою фазою розмноження вірусу з подальшою низхідною інфекцією [12].

Потенціал передачі SARS-CoV-2 зростає ще до розвитку симптомів і є найбільшим саме на початку захворювання, після цього ризик передачі знижується. Передача через 7-10 днів хвороби малоімовірна, особливо для імунокомпетентних пацієнтів із нетяжкою інфекцією. Інфіковані особи з більшою ймовірністю будуть заразними на ранніх стадіях захворювання, коли рівні вірусної РНК у зразках з верхніх дихальних шляхів найвищі. Попередні дані щодо варіанту Omicron свідчать про те, що найбільша ймовірність виділення інфекційного вірусу можуть відбутися трохи пізніше, через три-шість днів після появи симптомів, проте інфекційний вірус Omicron рідко виявляли більше ніж через 10 днів після появи симптомів [13].

1.2. Класифікація груп антитіл IgG до SARS-CoV-2 за Барнсом

Нейтралізуючі антитіла, мішенню яких є рецептор-зв'язуючий домен, демонструють високий терапевтичний потенціал як в тваринних моделях, так і в людини. Наразі багато нейтралізуючих антитіл (NAbs), отриманих від реконвалесцентних донорів, блокують вірусне проникнення шляхом приєднання до ACE2-зв'язуючого сайту на рецептор-зв'язуючому домені. Велика група даних антитіл складається з важких ланцюгів, кодованих сегментом гену V_H3-66 та V_H3-53.

Структурні порівняння дозволяють виділити основні 4 групи антитіл:

- 1) нейтралізуючі антитіла, кодовані сегментом гену V_{H3-53} з короткими петлями CDRH3, які блокують ACE2 та зв'язуються тільки з “up” конформацією рецептор-зв'язуючого домену;
- 2) ACE2-блокуючі нейтралізуючі антитіла, які зв'язуються як з конформацією “up” так і з “down”, та можуть зв'язуватись з сусідніми рецептор-зв'язуючими доменами;
- 3) нейтралізуючі антитіла, які зв'язуються поза межами сайту ACE2 та розпізнають як конформацію “up” так і “down”;
- 4) раніше описані антитіла, які не блокують ACE2 та зв'язуються тільки з “up” конформацією рецептор-зв'язуючого домену [14].

SARS-CoV-2 використовує щільний глікозильований білок спайку (S) для проникнення в клітини господаря. Білок S являє собою тримерний білок злиття класу I, який існує в метастабільній префузійній (prefusion) конформації, яка піддається суттєвим структурним перебудовам для злиття вірусної мембрани з мембраною клітини-господаря. Цей процес запускається, коли субодиниця S1 зв'язується з рецептором клітини господаря. Зв'язування рецептора дестабілізує префузійний тример, що призводить до відщеплення субодиниці S1 та переходу субодиниці S2 в стабільну постфузійну (postfusion) конформацію. Для захоплення рецептора клітини-господаря рецептор-зв'язуючий домен S1 піддається петлеподібним конформаційним рухам, які тимчасово приховують або проявляють детермінанти зв'язування рецептора. Ці два стани називаються конформацією “up” (рис 1.3) та “down”, де “down” – відповідає недоступному до рецептора стану, а “up” – доступному для рецептора стану, який вважається менш стабільним [15].

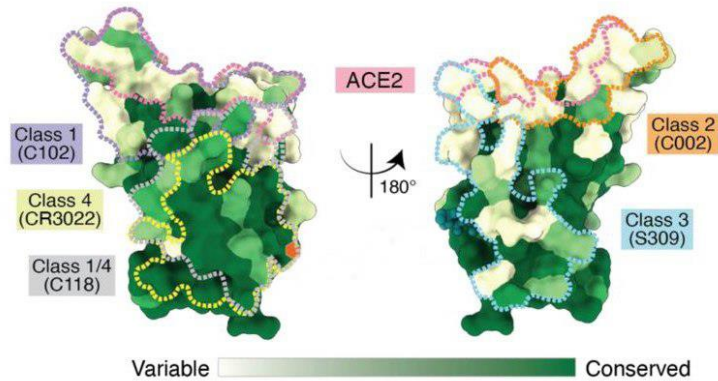


Рис. 1.3. Положення епітопів антитіл різних груп на структурі RBD (конформація “up”). Рожевим кольором виділено сайт приєднання до ACE2, фіолетовим – група 1, оранжевим – група 2, блакитним – група 3, жовтим – група 4, світло-фіолетовим – група 1/4 [16]

1.2.1. Нейтралізуючі антитіла, кодовані сегментом гену V_{H3-53} з короткими петлями CDRH3, які блокують ACE2 та зв’язуються тільки з “up” конформацією рецептор-зв’язуючого домену

Автори порівнюють Fab та Fab-RBD кристалічні структури антитіла C102 з попередньо дослідженим C105, в тому числі в комплексі з S тримером. Обидва антитіла виділені від одного й того ж донора кодується V_{H3-53} та мають короткі CDRH3 (complementarity-determining regions; регіони, що детермінують комплементарність, 11-12 залишків) петлі [17].

В ході дослідження C102 Fab взаємодіяло з двома або трьома RBD конформації “up”, не було помічено жодної взаємодії з RBD “down” або сусідніми рецептор-зв’язуючими доменами. Для дослідження використано структуру C102 Fab-RBD з більш високою роздільною здатністю для виведення більш точного

епітопу та паратопу. Розрахунки продемонстрували, що область C102 CDR3 відіграє незначну роль в паратопі, що формує досить великий контраст в порівнянні з більшістю антитіл, в яких область CDR3 вносить рівну або більшу роль ніж CDR1 та CDR2 разом.

Епітопи на RBD для всіх наявних нейтралізуючих антитіл, кодованих V_H3-53 з коротким CDRH3 охоплюють сайт зв'язування ACE2 та демонструють загальні RBD-зв'язуючі взаємодії, продемонстровані епітопом C102.

Отже, нейтралізуючі антитіла групи 1 можуть зв'язуватися тільки з RBD, як це спостерігається в структурі C105-S, IgG цієї групи можуть зшивати сусідні рецептор-зв'язуючі домени в межах одного тримеру для досягнення більш тісної взаємодії за рахунок ефекту авідності [18].

1.2.2. ACE2-блокуючі нейтралізуючі антитіла, які зв'язуються як з конформацією “up” так і з “down”, та можуть зв'язуватись з сусідніми рецептор-зв'язуючими доменами

В межах групи 1 також можна виділити невелику групу антитіл, кодованих V_H3-53, проте зі збільшеною CDRH3 областю (більше ніж 15 залишків). Досліджена структура нейтралізуючого антитіла COVA2-39 зі збільшеним CDRH3 регіоном демонструє інший режим зв'язування на відміну від C102 [19].

Для дослідження молекулярних механізмів зв'язування Nab, кодованих V_H3-53 з довгим CDRH3 регіоном, розглянуто структуру C144 (кодує генні сегменти V_H3-53 і V_L2-14, 25 залишків CDRH3), пов'язаного з S тримером.

Не дивлячись на здатність стабілізованих S тримерів без лігандів приймати конформацію “up” і попереднє моделювання, яке передбачало, що сайт зв'язування C144 буде доступним за цієї ж конформації, структура C144-S

продемонструвала три С144 Fab зв'язані з рецептор-зв'язуючими доменами конформації “down”. Загалом, орієнтація зв'язування відмінна від COVA2-39. Не дивлячись на відмінності, епітопи RBD С144, С102 та COVA2-39 перекриваються з сайтом зв'язування ACE2, що передбачає механізм нейтралізації, що включає пряму конкуренцію з ACE2 [18].

Цікавою особливістю С144, окрім перекриття із сайтом зв'язування ACE2 в конформації “up” RBD, є положення довгого CDRH3 між сусідніми “down” рецептор-зв'язуючими доменами, фіксуючи спайковий глікопротеїн в закритій префузійній конформації, забезпечуючи додатковий механізм нейтралізації, при якому спайковий тример не може відкритися для взаємодії з ACE2 [20].

1.2.3. Нейтралізуючі антитіла, які зв'язуються поза межами сайту ACE2 та розпізнають як конформацію “up” так і “down”;

С135 є потужним нейтралізуючим антитілом, яке показало властивості зв'язування, відмінні від груп 1, 2 і 4 NAb. Щоб оцінити механізм С135-опосередкованої нейтралізації SARS-CoV-2, автори оцінили криоелектронну мікроскопічну структуру комплексу С135-S використовуючи для порівняння незв'язану кристалічну структуру С135. Структура показала, що три С135 Fab пов'язані з S тримером з двома “down” і одним “up” RBD, хоча пов'язана з С135 конформація “up” RBD не моделювалась через складність такого з'єднання. С135 розпізнає глікопептидний епітоп, подібний до перехресно-реактивного нейтралізуючого антитіла S309, фокусуючись на області RBD поблизу гліканду N343 (положення гліканду зображено на рис. 1.4) і не перекриваючись з сайтом зв'язування ангіотензинперетворюючого ферменту 2 [21].

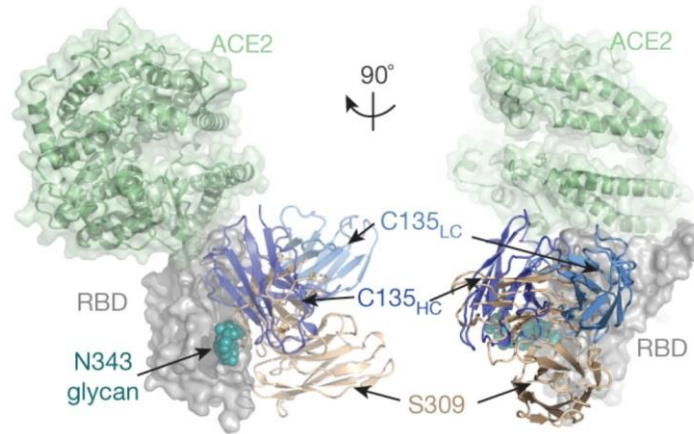


Рис. 1.4. Положення епітопу антитіла C135 відносно глікану N343 [14]

Людські NAbs групи 3 поповнюють репертуар антитіл проти SARS-CoV-2 і, ймовірно, можуть бути ефективно використані в терапевтичних комбінаціях з NAbs групи 1 або 2. Однак при використанні структур для прогнозування наявності у NAbs епітопів, що перекриваються, іноді буває недостатньо вивчити тільки структури Fab-RBD або навіть статичні зображення S-тримера через динамічну природу шипа. На прикладі взаємодії антитіл C135 (група 3) та C199 (група 2) два Fab не можуть вступати в реакцію одночасно з мономером RBD, але і не конкурують між собою при приєднанні до двох сусідніх рецептор-зв'язуючих доменів на S тримері. Таким чином, те, що може здатися епітопами, що не перекриваються на ізольованому RBD, може перекриватися в деяких випадках на тримері шипа, що ускладнює інтерпретацію експериментів [22].

1.2.4. Антитіла, які не блокують ACE2 та зв'язуються тільки з “up” конформацією рецептор-зв'язуючого домену

CR3022, раніше отримане від реконвалесцентного SARS пацієнта, являє собою нейтралізуюче антитіло, націлене на рецептор-зв'язуючий домен SARS-

CoV. Области V-, D- та J-регіонів важкого ланцюга кодуються IGHV5-51, IGHD3-10, IGHJ6. Недавнє дослідження показало, що CR3022 може зв'язуватися з RBD SARS-CoV-2. CR3022 використовує обидва важкі та легкі ланцюги, а також всі шість петель регіонів що детермінують комплементарність (CDR) для взаємодії з RBD.

З 28 залишків в епітопі (залишки, що перекриваються в ході взаємодії антитілом CR3022), 24 (86%) є консервативними між SARS-CoV-2 та SARS-CoV, що і пояснює перехресну реактивність. Тим не менше, не зважаючи на високу збереженість залишків епітопу, CR3022 Fab зв'язується з SARS-CoV з набагато більшою афінністю, ніж з рецептор-зв'язуючим доменом SARS-CoV-2. Різниця в афінності зв'язування CR3022 з рецептор-зв'язуючим доменом SARS-CoV-2 та SARS-CoV, ймовірно, зумовлена наявністю неконсервативних залишків в епітопі. Найбільш істотною відмінністю є додатковий N-глікозилуючий сайт N370 на SARS-CoV (N357 в нумерації SARS-CoV) [23].

SARS-CoV-2 використовує той же рецептор господаря, що і SARS-CoV. На відміну від CR3022, епітоп якого не перекривається із сайтом зв'язування ACE2, більшість відомих антитіл, націлених на RBD SARS, конкурують з ACE2 за зв'язування з рецептор-зв'язуючим доменом. Також і самі епітопи цих антитіл дуже відрізняються від епітопів CR3022. Було показано, що CR3022 може вступати в одночасну дію з іншими антитілами, орієнтованими на RBD, для сукупної нейтралізації SARS-CoV.

Рецептор господаря ACE2 може взаємодіяти з RBD тільки тоді, коли він знаходиться у конформації “up” – інша конформація для ACE2 недоступна. Епітоп CR3022 також доступний лише тоді, коли рецептор-зв'язуючий домен знаходиться у конформації “up”. Однак, навіть коли один RBD SARS-CoV-2 S білка знаходиться в конформації “up”, зв'язування CR3022 з рецептор-зв'язуючим доменом все ще може бути стерично ускладнене. Структурне

вирівнювання комплексу CR3022-SARS-CoV-2 RBD з білком SARS-CoV-2 S демонструє, що варіабельна область CR3022 буде конфліктувати з RBD на сусідньому протомері, якщо останній прийме конформацію “down” [24].

Для того, щоб CR3022 зв'язався з S-білком, необхідно усунути раніше описані зіткнення. Зіткнення з варіабельним доменом CR3022 може бути частково усунуто, якщо цільовий RBD на одному протомері тримера і RBD на сусідньому протомері знаходяться в конформації “up” [25].

1.3. Система SpyTag/SpyCatcher

SpyTag – це короткий пептид, який формує ізопептидний зв'язок при зустрічі зі своїм білковим партнером SpyCatcher. Ця ковалентна пептидна взаємодія є простим і потужним інструментом для біокон'югації та розширення доступних архітектур білків [26].

Система SpyCatcher-SpyTag була розроблена на основі внутрішнього ізопептидного зв'язку домена SpaB2 FbaB, фібрoneктин-зв'язуючого білку і фактору вірулентності *Streptococcus pyogenes*. В цьому домені спонтанно формується внутрішній ізопептидний зв'язок між ϵ -аміном лізину K31 і карбоксилем бокового ланцюга аспарагінової кислоти D117.

Реакція каталізується просторово сусіднім глутаматом E77. Утворений ізопептидний зв'язок надає домену SpaB2 високу стабільність. Домен SpaB2 може бути стабільно розділеним на два компоненти (рис. 1.5): більший за розміром, неповний імуноглобуліноподібний домен (SpyCatcher), що складається з 138 залишків (розміром 15 кДа) і більш короткий пептид (SpyTag) з 13 залишків.

Ці два компонента можуть розпізнавати один одного з високою афінністю і ізопептид може утворювати між SpyCatcher і SpyTag ковалентно зв'язаний

комплекс. В експериментальних умовах, які підходять для досліджень в межах природничих наук, швидкість реакції дозволяє зв'язкам утворюватися з високою ефективністю протягом декількох хвилин. SpyTag, зокрема, еквівалентний за розміром ряду епітопних міток, може бути генетично злитим з рядом білків і здатен реагувати зі SpyCatcher при введенні в N- або C-кінці цільових білків, а також у внутрішні сайти [27].

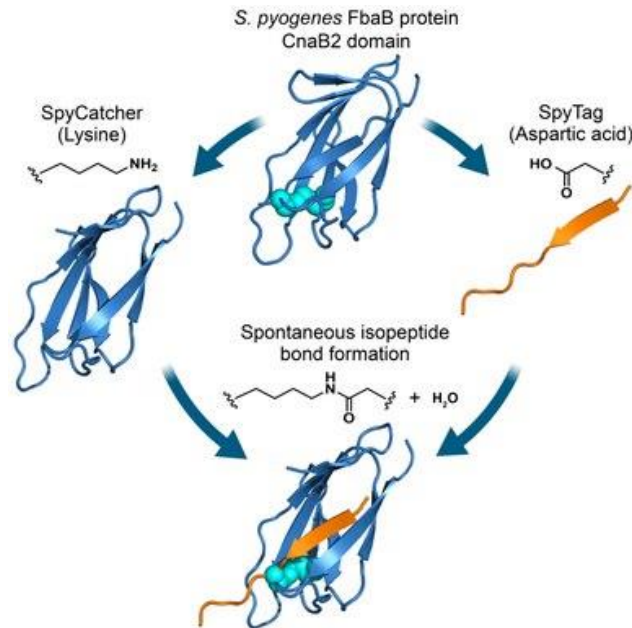


Рис. 1.5. Походження системи SpyTag/SpyCatcher [28]

Реакція протікає з високим виходом продукту просто при перемішуванні та в різних умовах рН, температури та буферу. Зв'язок не руйнується при кип'ятінні або за присутності конкуруючого пептиду.

Одномолекулярна динамічна силова спектроскопія продемонструвала, що SpyTag не відділяється від SpyCatcher до тих пір, доки сила не перевищить 1нН (наноНьютони), при якій відбувається розрив ковалентних зв'язків [28].

1.4. Утворення наноклітки мі3 (nanocage)

Ікосаедричні білкові структури широко застосовуються в біологічних моделях в якості основи для доставки або упаковки. Автори описують створення такої білкової самозбірної структури з тримерних блоків, що формують так звану наноклітку (nanocage). Основою для структури є KDPG-альдолаза (2-dehydro-3-deoxy-phosphoglucosate, 2-дегідро-3-деокси-фосфоглюконат альдолаза), яка є тримером, виділеним з супертермофільної бактерії *Thermotoga maritima*.

Зображення сконструйованого білка (експресованого в *E. coli*), отримані шляхом електронної мікроскопії, дозволяють ідентифікувати популяцію частинок і3-01 (рис. 1.6), майже ідентичних розрахованій моделі [29].

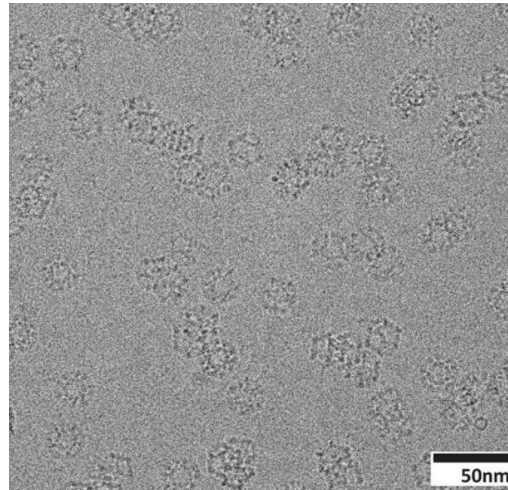


Рис. 1.6. Кріоелектронна мікроскопія популяції частинок і3-01 [29]

Отримані додекаедричні частинки і3-01 піддавали штучним мутаціям, внаслідок чого одержано частинки мі3 з покращеною однорідністю та стабільністю. Автори також описують приєднання SpyCatcher до N-кінця білка.

До С-кінця білка приєднана С-мітка, що забезпечує більш ефективну обробку для використання у вакцинах [30]. Дана конструкція розчинно експресується в *E. coli* після чого частинки очищуються з клітинного лізату за

допомогою афінної хроматографії з наступною ексклюзійною хроматографією [29].

1.5. Мозаїчні частинки (склад вірусних RBD)

Бетакоронавірус SARS-CoV-2 став причиною глобальної пандемії в 2020, інфікуючи мільйони людей та викликаючи захворювання COVID-19. Два інші зоонозні бетакоронавіруси – SARS-CoV та MERS-CoV – також призводили до спалахів в межах останніх 20 років [31]. Усі три віруси підозрювано походять від летючих мишей з можливістю адаптації до проміжного господаря серед тварин перед потраплянням до людини. Життя людини в ареалах летючих мишей демонструє пряму передачу SARS-подібних вірусів з пандемічним потенціалом, зокрема, WIV1 та SHC014 представляють постійну загрозу для людей [32, 33].

Більшість сучасних вакцин-кандидатів проти SARS-CoV-2 включають вірусний S-білок, який являє собою тример, що забезпечує проникнення в клітини господаря після того як один або декілька його рецептор-зв'язуючих доменів переходять в конформацію “up” для зв'язування з ACE2.

Рецептор-зв'язуючі домени таких вірусів як SARS-CoV-2, SARS-CoV, HCoV-NL63, та пов'язаних коронавірусів тварин (WIV1 та SHC014, рис. 1.7) використовують ACE2 як рецептор господаря, в той час як інші коронавіруси використовують такі рецептори як DPP4 (Dipeptidyl peptidase 4, дипептидил пептидаза 4) або сіалова кислота [34, 35]. Відповідно до функції, S-білок є мішенню для нейтралізуючих антитіл, при чому багато з них націлені на RBD.

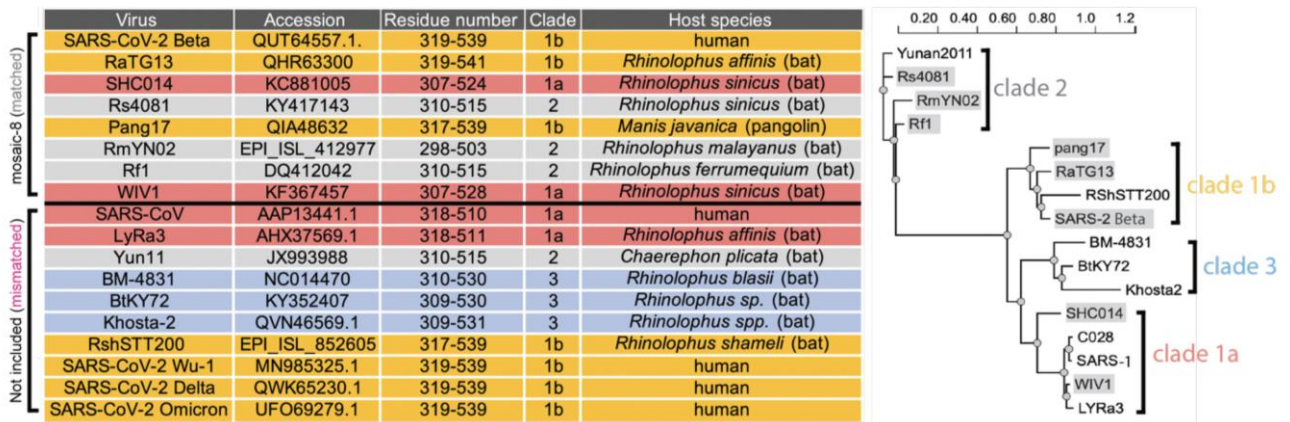


Рис. 1.7. Коронавіруси, з яких отримані RBD [36]

Мультивалентна презентація антигену значно посилює відповідь В-клітин і може забезпечити більш тривалий імунітет ніж моновалентні антигени, тому вакцини-кандидати на основі білка часто включають наночастинку, яка забезпечує мултимеризацію антигену [37].

Система SpyTag-SpyCatcher була використана для підготовки мултимеризованих SARS-CoV-2 RBD або S тримеру які викликали високі титри нейтралізуючих антитіл. Не дивлячись на перспективність захисту від SARS-CoV-2, резервуари коронавірусів серед летючих мишей передбачають майбутню міжвидову передачу, що зумовлює необхідність створення вакцини, що захистить від нових коронавірусів, а також SARS-CoV-2 [38].

Для вибору рецептор-зв'язуючих доменів для відображення на мозаїчних частинках, автори використали результати дослідження використання рецепторів RBD сарбековірусів та клітинного тропізму. З 29 рецептор-зв'язуючих доменів, які були класифіковані за окремими групами (групи: 1, 2, 1/2, 3), ідентифікували різні RBD з SARS-CoV, WIV1 і SHC014 (група 1), SARS-CoV-2 (група 1/2), Rs4081, Yunnan 2011 (Yun11), і Rf1 (група 2), и BM48-31 (група 3), з яких SARS-CoV-2 і SARS-CoV є коронавірусами людини, а інші – вірусами летючих мишей, що походять з Китаю або з Болгарії. Також було включено рецептор-зв'язуючі домени з GX панголіну (група 1/2, описаний як Pang17), RaTG13, вірусу летючих

мишей групи 1/2, найбільш подібного до SARS-CoV-2, RmYN02, вірусу летючих мишей групи 3.

Було обрано 8 з 12 рецептор-зв'язуючих доменів (рис. 1.7) на основі різної ступені ідентичності послідовностей, для створення mosaic-8. Частинки порівнювали з гомотиповими частинками mi3 з рецептор-зв'язуючими доменами тільки SARS-CoV-2 [39].

SpyTag003-RBD були поєднані з SpyCatcher003-mi3 (60 потенційних сайтів кон'югації) для отримання гомотипових та мозаїчних наночастинок. Частинки були очищені за допомогою ексклюзійної хроматографії (SEC) та проаналізовані за допомогою SDS-PAGE, виявивши майже 100% кон'югацію. Репрезентативні RBD були кон'юговані зі SpyCatcher003-mi3 з аналогічною чи ідентичною ефективністю, що свідчить, що мозаїчні частинки містили приблизно еквімолярні суміші різних рецептор-зв'язуючих доменів [40].

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1. Матеріали досліджень

Антитіла різних груп, попередньо виділені і очищені з плазми людини або імунізованих мишей, та мозаїчні VLP різної конструкції. Також для дослідження використовувалися суперпарамагнетні частинки кулястої форми з моношаром стрептавідину, ковалентно сполученого з їх поверхнею, та біотин у чистому вигляді для кон'югації з антитілами.

2.2. Методи дослідження

Серед використаних методів можна виокремити наступні:

- фарбування за допомогою Dynabeads;
- проточна цитометрія;
- маркування антитіл флуоресцентним барвником AlexaFluor647;
- біотинілювання антитіл;
- кон'югація SC003-мі3 частинок з RBD-ST3;
- визначення концентрації за допомогою біцинхонінової кислоти;
- SDS-електрофорез в поліакриламідному гелі (SDS-PAGE);
- реакція непрямой гемаглютинації (РНГА).

2.2.1. Фарбування за допомогою Dynabeads

Попередньо кон'юговані з біотином антитіла додають в надлишку до суперпарамагнетних частинок у співвідношенні близько 2:1 для покриття усіх сайтів зв'язування, наявних на їх поверхні. В ході реакції утворюється стійкий комплекс з даними частинками, за рахунок чого залишок незв'язаних антитіл можна легко вилучити, піддавши отриманий комплекс дії магнітного поля.

Далі зразки вилучають з-під дії магніту, промивають буфером та додають другий шар, який являє собою власне мозаїчні частинки. Мозаїчні частинки являють собою гомотипові 60-мери з рецептор-зв'язуючими доменами на поверхні, пов'язаними з частинкою за допомогою технології SpyTag-SpyCatcher. Надалі суміш знову піддають дії магніту, вилучають незв'язані компоненти та знову промивають буфером.

Останнім етапом є додавання антитіл з флуоресцентною міткою, що, після фіксування усього комплексу в розчині, дозволяє оцінити присутність кожного компоненту за результатами інтенсивності флуоресценції. Таким чином, утворюється комплекс з 3-ох компонентів, який складається з біотинільованих антитіл, мозаїчних частинок з 60-ма рецептор-зв'язуючими доменами (близько 7-8 RBD кожного з восьми вірусів) та антитілами, маркованими флуоресцентним барвником. Сам комплекс слугує для демонстрації специфічності антитіл, доданих в першому шарі, за рахунок інтенсивності флуоресценції комплексу. Дослідження проводяться на мозаїчних гомотипових частинках, на кожній з яких представлений певний з восьми сарбековірусів. Із усієї суміші рецептор-зв'язуючих доменів, що представлені на частинці, вступати в реакцію преципітації повинні тільки ті домени, до яких є специфічними антитіла, обрані в 1-му та 3-му шарі, тоді як усі неспецифічні компоненти вилучаються в процесі промивання зразків після додавання кожного шару. Кожне антитіло тестується

по відношенню до кожної гомотипової частинки для визначення специфічності та виключення крос-реактивності антитіл відносно інших RBD. Даний метод в контексті мозаїчної частинки дозволяє продемонструвати, що усі вісім рецептор-зв'язуючих доменів присутні в преципітаті [авторський метод, з модифікаціями].

2.2.2. Проточна цитометрія

Усі отримані зразки після фарбування Dynabeads належним чином фіксують, використовуючи тільки певні типи фіксаторів. В даному випадку використовувався фіксатор з наступним складом – PBS/0.1% BSA/0.02 azide/1% формаліну.

Оскільки флуоресцентний барвник, що використовується в 3-му шарі описаного вище комплексу, детектується на довжині хвилі 647 нм, що є червоним спектром, то проточний цитометр налаштовують для інструментального розпізнавання тільки необхідного діапазону світла.

Для досліджень використовувався проточний цитометр Attune NxT (ThermoFisher Scientific, США).

Після проведення усіх підготовчих маніпуляцій, проводять аналіз зразків за попередньо створеним шаблоном, отримані дані зберігають у форматі FCS (для отримання повних файлів аналізу) та PDF (для отримання графіків та значень) [41].

2.2.3. Мічення антитіл флуоресцентним барвником AlexaFluor 647

Для мічення антитіл використовувався набір Alexa Fluor™ 647 Protein Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific, США), який дозволяє маркувати 1 мг IgG за одну

реакцію згідно інструкції виробника. Кожен барвник містить або сукцинімідоловий естер (SE), або фрагмент тетрафторфенілового естеру (TFP), які реагують з первинними амінами білків для формування стійкої взаємодії білок-барвник.

До попередньо підготовлених та очищених розчинів білку у відповідному буфері додають розчин 1М NaHCO₃ (бікарбонату натрію) у визначених виробником кількостях для отримання лужного рН в межах близько 8.3, що збільшує ефективність реакції. Отриману суміш додають до наданої в комплекті пробірки з невеликою магнітною частинкою та флуоресцентним барвником та інкубують при кімнатній температурі за постійного перемішування під дією магнітної мішалки. Після інкубування протягом години суміш набуває світло- або темно-синього кольору (залежно від початкової концентрації самого антитіла). Надалі суміш фільтрують через знесолювальні колонки, збирають зразок у пробірку, визначають його концентрацію шляхом спектрофотометрії (вимірюють абсорбцію при довжині хвилі 280 нм) та зберігають при 4°C в темному місці [42].

2.2.4. Біотинілювання антитіл

Для біотинілювання антитіл використовували набір сульфо-NHS-біотину Thermo Scientific™ EZ-Link™ Sulfo-NHS-Biotin, No-Weigh™ Format (Thermo Fisher Scientific, США) згідно інструкцій виробника.

Перед підготовкою усіх необхідних складових для аналізу розраховують кількість біотину, що дозволить забезпечити ефективне біотинілювання антитіл: для 1 мл IgG концентрацією 2 мг/мл необхідно приблизно 26.6 мкл чистого біотину. Згідно цього розховують кількість реагенту, необхідного для кожного

окремого випадку. Попередньо розраховану кількість біотину додають до пробірки, що вже містить антитіла у певній концентрації, та інкубують при кімнатній температурі, після чого фільтрують незв'язаний біотин через знесольовальні колонки. Концентрацію отриманого зразка визначають методом спектрофотометрії (вимірювання абсорбції при довжині хвилі 280 нм) з подальшим зберіганням при 4°C.

Важливим моментом у виконанні аналізу є урівноваження температури пробірки з сухим реактивом до кімнатної температури. Усі білки повинні знаходитися в PBS, усі невідповідні буфери повинні бути замінені, оскільки це має прямий вплив на точність зв'язування молекул чистого біотину з антитілами [43].

2.2.5. Кон'югація частинок SC003-mi3 з RBD-ST3

Кон'югація частинок SC003-mi3 з RBD-ST3 – необхідний етап для утворення цілої функціонуючої наночастинки. Мозаїчні вірусоподібні частинки SpyVLP, які і є, фактично, основою для вакцини, штучно поєднуються з SpyCatcher, після чого проводиться їх кон'югація з RBD-ST3, створених в умовах комерційного виробництва. В основі взаємодії - система SpyTag-SpyCatcher, пов'язана ізопептидним зв'язком [44].

Для безпосередньо процесу кон'югації в пробірку спочатку додають PBS (рН 7.4) в попередньо розрахованій необхідній кількості, потім додають RBD-ST3, а в останню чергу додають частинки SC003-mi3, які одразу ж починають формувати комплекси RBD-mi3. Задля отримання максимальної кількості таких комплексів кон'югацію проводять протягом 24 годин за кімнатної температури. Надалі відбирають близько 2-5 мкл суміші для перевірки якості кон'югації

шляхом SDS-електрофорезу в поліакриламідному гелі. Зразки фільтрують 2-3 рази, використовуючи 50К фільтри, потім збирають отриманий зразок, аналогічно відбирають 2-5 мкл суміші для наступної перевірки точності промивання в тому ж гелі. Останнім етапом є визначення концентрації за допомогою біцинхонінової кислоти (див. методику нижче), аліквотування та замороження зразків при -80°C для уникнення деградації [38].

2.2.6. Визначення концентрації за допомогою біцинхонінової кислоти

Біцинхонінова кислота (BCA), що є основою даного методу, використовується для колориметричного та кількісного визначення загального білку. Метод об'єднує в собі відновлення Cu^{+2} до Cu^{+1} білком в лужному середовищі (біуретова реакція) з високочутливим колориметричним визначенням присутності катіону міді (Cu^{+1}) за допомогою біцинхонінової кислоти. Продукт реакції фіолетового кольору утворюється внаслідок хелатування двох молекул BCA з одним іоном міді. Комплекс характеризується значною абсорбцією світла при довжині хвилі 562 нм, яка має фактично лінійну залежність в усьому робочому діапазоні (до концентрації 2000 мкг/мл).

В якості стандартного контролю використовують BSA (бичачий сироватковий альбумін) із серійними розведеннями від 2000 мкл/мл до 0 (PBS, рН 7.4), на основі чого будується стандартна крива. Базуючись на стандартній калібрувальній кривій, надалі визначають концентрацію досліджуваних білків.

Визначення концентрації за допомогою біцинхонінової кислоти проводиться для визначення концентрації кон'югованих частинок RBD-mi3. Усі

визначення проводили згідно інструкцій виробника з використанням набору Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США) [45].

2.2.7. SDS-електрофорез в поліакриламідному гелі (SDS-PAGE)

SDS-електрофорез в поліакриламідному гелі – класична електрофоретична система, яка використовується для розділення білків масою 5-250 кДа. Аналіз можна проводити у двох модифікаціях: “reduced” та “non-reduced”, кожна з яких знайшла свою галузь використання. “Non-reduced” використовується для перевірки чистоти та стабільності рекомбінантних моноклональних антитіл, в той час як “reduced” - для загальної оцінки молекул IgG.

Отримані зразки до та після фільтрування змішували із відповідним буфером (SLB 3x для “reduced” умов та SLB 2x для “non-reduced”), електрофорез проводили у модифікації “reduced” для загальної оцінки чистоти суміші. В гелі отримують 2 групи зразків: до фільтрування та після [38, 46].

2.2.8. Реакція непрямой гемаглютинації

Реакція аглютинації червоних кров'яних тілець (еритроцитів), яка є в основі тесту на гемаглютинацію – біологічний феномен, що зумовлює “злипання” еритроцитів між собою за рахунок присутності на їх поверхні антитіл. Використовуючи цю концепцію, було розроблено тест на гемаглютинацію, що дозволяє визначити наявність антитіл до RBD спайкового білку SARS-CoV-2, оскільки саме він відповідає за зв'язування вірусу з ACE2 рецептором.

Щоб пов'язати рецептор-зв'язуючий домен SARS-CoV-2 з еритроцитами, використовують однодоменне антитіло (нанотіло) ІН4, яке володіє специфічністю до консервативного епітопу на глікофорині А. Для виявлення антитіл RBD спайкового білка поєднують з ІН4 задля утворення суцільного білка ІН4-RBD-6Н за допомогою короткого лінкера (GSG)₂.

Для тесту підходить як капілярна кров, отримана шляхом пробиття шкіри пальця скарифікатором, так і венозна кров або чиста плазма. Як джерело RBC, 1 мл отриманої цільної крові розбавляють у співвідношення 1:40 (40% - усереднений показник нормального рівня гематокриту у людини), що приблизно дорівнює 1% наявності еритроцитів в суміші.

Принцип тесту досить простий – в першу чергу в лунки мікропланшету додають плазму людини, далі – еритроцити і в кінці – ІН4-RBD реагент, який забезпечує зв'язування за наявності специфічних антитіл. Усі складові додаються у однаковому співвідношенні 1:1:1, далі мікропланшет з усіма внесеними реагентами інкубується протягом однієї години за кімнатної температури. Після інкубування, мікропланшет нахиляють і чекають до 1 хв, після чого проводять інтерпретацію результатів [47, 48].

2.2.9. Статистична обробка даних

За усталеною практикою дослідження проводилися у двох біологічних повторах з не менш, ніж трьома технічними повторами у кожному. Для демонстрації результатів обирались повтори з найбільшими різницями між отриманими значеннями відповідних зразків.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Систематизація та обробка даних

Метою була розробка вакцини проти COVID-19, яка б охоплювала споріднені сарбековіруси, які володіють найбільшою схожістю до людських коронавірусів типу SARS/MERS або проявляють найбільший пандемічний потенціал. Для розробки використовуються мозаїчні наночастинки Mosaic-8b, до яких системою SpyTag/SpyCatcher пов'язують RBD восьми обраних сарбековірусів. Мозаїчна структура виконує роль мультимеризації присутніх антигенів, проте ускладнює методи презентації їх наявності на даній моделі, в рамках чого основною задачею було розробити метод стандартизації, який дозволив би продемонструвати наявність усіх RBD на мозаїчній наночастинці. Для цього було розроблено метод, який на основі специфічної взаємодії антиген-антитіло дозволяє продемонструвати наявність того, чи іншого рецептор-зв'язуючого домену в ході реакції зі специфічним антитілом. Тому, основними задачами для отримання повноцінного методу стандартизації були:

- з існуючого пулу антитіл відібрати потенційні специфічні антитіла за відсутності супутньої перехресної активності;
- довести їх специфічність методом фарбування за допомогою суперпарамагнетних частинок Dynabeads;
- дослідити супутню взаємодію (конкурентна взаємодія, тощо);
- довести стійкість шаблону активності в межах різних партій кон'югованих наночастинок та маркованих антитіл.

Для дослідження були відібрані моноклональні антитіла різних груп, що досліджувались переважно методом фарбування за допомогою Dynabead. Метод отримав назву “фарбування”, оскільки для його виконання використовується флуоресцентний барвник, який “зафарбовує” комплекс, забезпечуючи різну інтенсивність флуоресценції в залежності від самого антитіла та його властивостей. Загальна модель утворюваного комплексу відображена на рис.3.1.

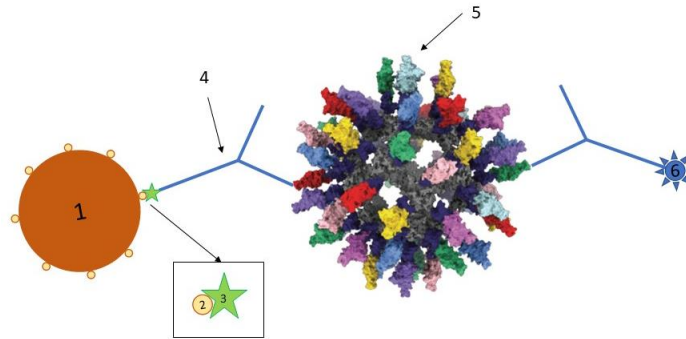


Рис. 3.1. Схематичне зображення комплексу, що утворюється в результаті фарбування за допомогою Dynabead (не в масштабі): 1 – власне суперпарамагнітна частина Dynabead, 2 – моношар стрептавідину на поверхні суперпарамагнетної частинки, 3 – біотин, кон’югований з антитілом, 4 – антитіло, 5 – модель наночастинки RBD-mi3, 6 – флуоресцентна мітка AlexaFluor 647

В основі даного методу полягає одночасно дві особливості Dynabeads. Першою є їхня суперпарамагнетна природа, що дозволяє ізолювати їх з гетерогенного розчину за допомогою звичайного магніту, розташованого поряд з мікропробіркою типу «Епандорф», а друга особливість полягає у наявності поверхневого моношару стрептавідину, який має здатність утворювати дуже стійкий зв’язок з біотином. З одного боку біотинільоване антитіло, яке вже попередньо зв’язалося з суперпарамагнетною частинкою, специфічно з’єднується з рецептор-зв’язуючими доменами на поверхні мозаїчної частинки, а з іншого боку при аналогічній взаємодії до комплексу антитіло-наночастинка

специфічно приєднується інше антитіло, поєднане із флуоресцентним барвником.

Мета – утворення стійкого комплексу, де центральною складовою є мозаїчна частинка, та антитіла з відповідними мітками та суперпарамагнетними частинками, що кріпляться до неї та дозволяють детектувати інтенсивність флуоресценції. Інтенсивність флуоресценції, в свою чергу, дає певну оцінку специфічності та кількості антитіла за рахунок різниці значень відносно позитивних контролів.

Сама по собі мозаїчна частинка за розміром сягає близько 20 нм, що робить неможливою її ідентифікації звичайними способами. Задля збільшення розміру комплексу та можливості його визначення використовуються Dynabeads з стрептавідином, що зв'язуються з біотином антитіла. Внаслідок такої реакції, розмір комплексу збільшується до 2,8 мкм, що є близьким до розміру людського тромбоциту та дозволяє детектувати комплекс за допомогою проточної цитометрії, а особливості суперпарамагнетних частинок дозволяють легко відділяти незв'язані антитіла з суміші, використовуючи магніт (рис 3.2).

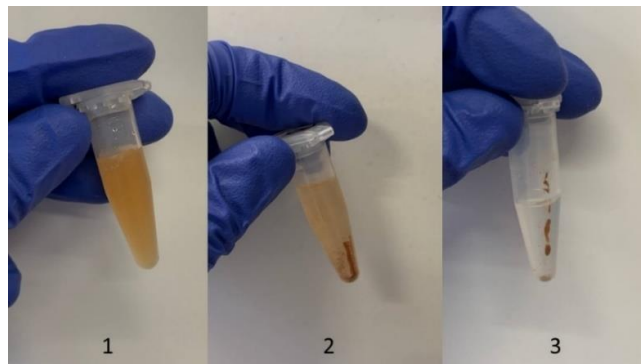


Рис. 3.2. Реакція суперпарамагнетних частинок на дію магніту: 1 – суміш до дії магніту, 2 – напівпрозора суміш після дії магніту протягом 30 секунд, 3 – суміш після дії магніту протягом 1 хвилини

Усі отримані зразки після фарбування аналізувалися апаратом проточної цитометрії, отримані дані оцінювали та систематизували в формі таблиці наступного зразку (за порядком стовпців), де:

- N – порядковий номер зразку, які подекуди розбиті на групи A (дослідна) і B (контрольна, в якості контролю – універсальне антитіло, здатне зв'язатися з усіма наявними RBD на поверхні мозаїчної частинки);
- 1-й шар (bio) – антитіло, мічене біотином, що використовувалось в основі взаємодії з парамагнетними частинками, які повинні збільшити розмір комплексу для можливості його детекції апаратом проточної цитометрії;
- 2-ий шар – власне мозаїчна частинка, на поверхні якої знаходяться RBD одного з восьми сарбековірусів, що будуть представлені на модельній частинці вакцини;
- Група (clade) – приналежність RBD-mi3 до однієї з груп спорідненості, яких загалом в експерименті є 3: 1b (3 RBD-mi3), 1a (2 RBD-mi3) та 2 (3 RBD-mi3);
- 3-й шар (AF647) – антитіло, мічене флуоресцентною міткою, яке дозволяє оцінити специфічність та кількість антитіл за рахунок отриманого кількісного значення при проточній цитометрії: чим більшим є це значення, тим більша кількість антитіл присутня на поверхні наночастинки, і тим «яскравішим» є кожен комплекс для прибору (вищий рівень сигналу флуоресценції);
- +/- - очікувана реактивність комплексу на основі уже існуючих даних;
- MFI (Mean Fluorescence Intensity) – середнє значення інтенсивності флуоресценції, яке детектується проточним цитометром. Аналіз є напівкількісним, тому за усталеною практикою дослідження для перевірки зміни активності та стійкості взаємодії в межах різних днів (тижнів)

проводились у двох біологічних повторях з не менш, ніж трьома технічними повторами у кожному.

Інтерпретація отриманих результатів здійснювалась із врахуванням того, що аналіз є напівкількісним. Точні межі позитивних та негативних зразків для усіх антитіл встановити важко, тому результати усіх наступних експериментів оцінювались наступним чином: повністю негативні зразки - ймовірне значення MFI в межах від 300 до 600 одиниць; зразки з певним фоновим зв'язуванням, яке в більшості залежить від властивостей самого антитіла і може коливатися в межах 2-5 тисяч; чітко позитивними вважались зразки із значенням MFI в діапазоні від 40-60 і більше. При оцінці будь-якого експерименту важливо враховувати значення позитивних контролів та відштовхуватись від їх меж.

3.2. Встановлення специфічності антитіла B38

Основною метою даного експерименту було виявити специфічність антитіла B38 та виключити його перехресну реактивність з іншими RBD, наявними на мозаїчній моделі. Аналіз проводився методом фарбування за допомогою Dynabead, а в якості 1-го, 2-го та 3-го шару використовувались (B38/EY6A)-bio, 8 різних RBD-mi3 та (M8a-11/S309)-AF647, відповідно.

Надалі зразки фіксувались буфером PBS/0.1% BSA/0.02 азиду та 1% формаліну, аналізувались за допомогою апарату проточної цитометрії, в результаті чого отримали результати, наведені у табл. 3.1.

Таблиця 3.1

Визначення специфічності В38 за допомогою фарбування Dynabead

N	1-й шар (bio)	2-й шар	Група (clade)	3й шар (AF647)	+/-	MFI (1)	MFI (2)
A1	B38	mi3-Beta	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	348	326
A2	B38	mi3-Beta	1b	S309 (non-Clade 2)	+	46483	44039
A3	B38	mi3-Pang17	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	489	474
A4	B38	mi3-Pang17	1b	S309 (non-Clade 2)	-	1237	1674
A5	B38	mi3-RTG13	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	348	313
A6	B38	mi3-RTG13	1b	S309 (non-Clade 2)	-	1295	2232
A7	B38	mi3-SHC014	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	377	315
A8	B38	mi3-SHC014	1a	S309 (non-Clade 2)	-	1047	1468
A9	B38	mi3-WIV1	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	352	328
A10	B38	mi3-WIV1	1a	S309 (non-Clade 2)	-	1320	3735
A11	B38	mi3-Rs4081	2	M8a-11 (Clade 2)	-	1538	4777
A12	B38	mi3-Rs4081	2	S309 (non-Clade 2)	-	421	318
A13	B38	mi3-RmYN02	2	M8a-11 (Clade 2)	-	2623	9733
A14	B38	mi3-RmYN02	2	S309 (non-Clade 2)	-	386	322
A15	B38	mi3-Rf1	2	M8a-11 (Clade 2)	-	757	1582
A16	B38	mi3-Rf1	2	S309 (non-Clade 2)	-	380	335
B1	EY-6A	mi3-Beta	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	357	333
B2	EY-6A	mi3-Beta	1b	S309 (non-Clade 2)	+	54811	45946
B3	EY-6A	mi3-Pang17	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	884	446
B4	EY-6A	mi3-Pang17	1b	S309 (non-Clade 2)	+	50914	41478
B5	EY-6A	mi3-RTG13	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	348	736
B6	EY-6A	mi3-RTG13	1b	S309 (non-Clade 2)	+	63756	59500
B7	EY-6A	mi3-SHC014	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	817	673
B8	EY-6A	mi3-SHC014	1a	S309 (non-Clade 2)	+	51234	45001
B9	EY-6A	mi3-WIV1	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	645	384

N	1-й шар (bio)	2-й шар	Група (clade)	3й шар (AF647)	+/-	MFI (1)	MFI (2)
B10	EY-6A	mi3-WIV1	1a	S309 (non-Clade 2)	+	56026	45005
B11	EY-6A	mi3-Rs4081	2	M8a-11 (Clade 2)	+	79286	68352
B12	EY-6A	mi3-Rs4081	2	S309 (non-Clade 2)	-	922	627
B13	EY-6A	mi3-RmYN02	2	M8a-11 (Clade 2)	+	61839	61872
B14	EY-6A	mi3-RmYN02	2	S309 (non-Clade 2)	-	922	536
B15	EY-6A	mi3-Rf1	2	M8a-11 (Clade 2)	+	36702	45956
B16	EY-6A	mi3-Rf1	2	S309 (non-Clade 2)	-	1481	572
C	N/A	N/A	N/A	N/A	-	331	409

Як попередньо зазначено, в першому шарі нанесені антитіла B38 та EY6A, мічені біотином та ковалентно зв'язані з Dynabeads. В другому шарі – 8 гомотипових наночастинок різного складу RBD, а в третьому – антитіла M8a-11 та S309 зі флуоресцентним барвником. Усі зразки дублюються – на кожен зразок з RBD-mi3 припадає копія з іншим антитілом в 3-му шарі, одне з яких є очікувано позитивним, а інше – очікувано негативним, враховуючи його особливості. Конкретно в даному випадку (табл. 3.1) для усіх зразків групи 1 антитіло S309 є очікувано позитивним, оскільки володіє активністю щодо усієї групи 1. Відповідно, M8a11 для усієї групи 1 є очікувано негативним, оскільки не володіє активністю щодо вказаної групи. Антитіло EY-6A є досить сильним і ефективно зв'язується із усіма RBD, що дозволяє його використовувати для порівняння та визначення верхньої межі зв'язування для антитіл, що перевіряються.

У випадку взаємодії антитіла B38 помітний чітко позитивний зразок A2 (B38/Beta-mi3/S309) зі значенням приблизно 40 тисяч, яке є ідентичним відповідному позитивному зразку. Це свідчить про те, що антитіло B38, перебуваючи в першому шарі, ефективно зв'язується з частинками Beta-mi3. Утворені пари антитіло-наночастинок, в свою чергу, були успішно

ідентифіковані антитілом S309, яке є специфічним до усіх антитіл групи 1. В інших зразках спостерігається або відсутність активності взагалі (значення в межах 300-400) або ж незначна активність (1-2,6 тисячі порівняно з відповідними позитивними контролями в межах 36-79 тисяч). Отже, як і очікувалось, В38 демонструє специфічність до Beta за відсутності будь-якої перехресної реактивності, проте при цьому помітне незначне фонове зв'язування зі зразками A10, A11 та A13 (рис 3.3).

Надалі проводився повторний експеримент з метою підтвердження сталості визначеного шаблону активності. В результаті повтору помітний позитивний зразок A2 (аналогічно до результатів попереднього експерименту), проте в зразках A10, A11 та A13 збільшилось фонове зв'язування. Порівнюючи ці дані з відповідними позитивними контролями (B10, B11 та B13), спостерігалися значення у діапазоні 45-68 тисяч, що в середньому в 4-7 разів перевищувало показники фонового зв'язування. На основі такого порівняння цими даними можна знехтувати, особливо беручи до уваги факт, що аналіз є напівкількісним.

У графічному вигляді отримані результати наведені на рис. 3.3.

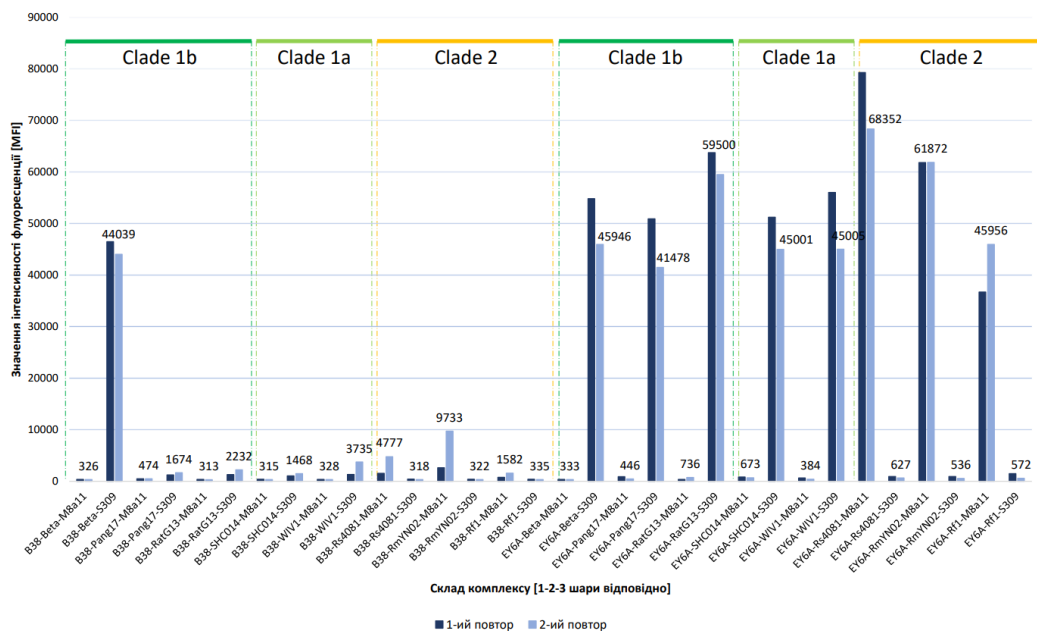


Рис. 3.3. Активність антитіла В38 (зліва) та відповідні позитивні контролі (справа)

У підсумок можна зазначити високий рівень подібності результатів в межах двох незалежних повторів, що підтверджує специфічність В38 до Beta-mi3 частинок без супутньої перехресної реактивності.

3.3. Підтвердження специфічності антитіл третього шару

Підтвердивши специфічність певних антитіл в якості 1-го шару, також потрібно підтвердити аналогічну реактивність антитіл 3-го шару (табл. 3.2). В якості шарів реакції включені EY-6A (як перший шар реакції), В38, С102, М8а-7 та S309 (як третій шар) для демонстрації того, що специфічні антитіла реагують тільки зі специфічними частинками: В38 – Beta, С102 – RatG13, М8а-7 – WIV1, S309 – з усією групою 1, М8а-11 – з усією групою 2. Для зразків 17-20, де другим шаром виступає частинка WIV1-mi3, EY6A-bio (група 4) замінені на S309-bio (група 3) для уникнення конкуренції з EY6A-M8a7, яка спостерігалась в попередніх експериментах, не описаних в даній роботі. Оскільки для інших частинок очікується відсутність реактивності з М8а-7, аналогічна заміна для інших зразків не була потрібна.

Таблиця 3.2

Визначення специфічності антитіл третього шару за допомогою фарбування Dynabead

N	1й шар (bio)	2-й шар	Група (clade)	3й шар (AF647)	+/-	MFI (1)	MFI (2)
1	EY-6A	mi3-Beta	1b	В38 (Beta)	+	53582	47566

N	1й шаг (bio)	2-й шаг	Группа (clade)	3й шаг (AF647)	+/-	MFI (1)	MFI (2)
2	EY-6A	mi3-Beta	1b	C102 (RatG13)	-	2561	2428
3	EY-6A	mi3-Beta	1b	M8a-7 (WIV-1)	-	564	555
4	EY-6A	mi3-Beta	1b	S309 (non-Clade 2)	+	65256	57523
5	EY-6A	mi3-Pang17	1b	B38 (Beta)	-	860	710
6	EY-6A	mi3-Pang17	1b	C102 (RatG13)	-	860	862
7	EY-6A	mi3-Pang17	1b	M8a-7 (WIV-1)	-	634	558
8	EY-6A	mi3-Pang17	1b	S309 (non-Clade 2)	+	46312	45641
9	EY-6A	mi3-RTG13	1b	B38 (Beta)	-	534	640
10	EY-6A	mi3-RTG13	1b	C102 (RatG13)	+	46470	45360
11	EY-6A	mi3-RTG13	1b	M8a-7 (WIV-1)	-	580	1014
12	EY-6A	mi3-RTG13	1b	S309 (non-Clade 2)	+	47999	49512
13	EY-6A	mi3-SHC014	1a	B38 (Beta)	-	584	755
14	EY-6A	mi3-SHC014	1a	C102 (RatG13)	-	674	667
15	EY-6A	mi3-SHC014	1a	M8a-7 (WIV-1)	-	592	507
16	EY-6A	mi3-SHC014	1a	S309 (non-Clade 2)	+	37690	37331
17	S309	mi3-WIV1	1a	B38 (Beta)	-	356	400
18	S309	mi3-WIV1	1a	C102 (RatG13)	-	461	461
19	S309	mi3-WIV1	1a	M8a-7 (WIV-1)	+	74394	59259
20	S309	mi3-WIV1	1a	EY6A (Universal)	+	25424	13610
21	EY-6A	mi3-Rs4081	2	B38 (Beta)	-	1576	458
22	EY-6A	mi3-Rs4081	2	C102 (RatG13)	-	1257	493
23	EY-6A	mi3-Rs4081	2	M8a-7 (WIV-1)	-	658	419
24	EY-6A	mi3-Rs4081	2	M8a-11 (Clade 2)	+	68042	35710
25	EY-6A	mi3-RmYN02	2	B38 (Beta)	-	766	550
26	EY-6A	mi3-RmYN02	2	C102 (RatG13)	-	566	495
27	EY-6A	mi3-RmYN02	2	M8a-7 (WIV-1)	-	517	508
28	EY-6A	mi3-RmYN02	2	M8a-11 (Clade 2)	+	57289	42609
29	EY-6A	mi3-Rf1	2	B38 (Beta)	-	913	566
30	EY-6A	mi3-Rf1	2	C102 (RatG13)	-	775	624
31	EY-6A	mi3-Rf1	2	M8a-7 (WIV-1)	-	485	441
32	EY-6A	mi3-Rf1	2	M8a-11 (Clade 2)	+	38474	21365

N	1й шар (bio)	2-й шар	Група (clade)	3й шар (AF647)	+/-	MFI (1)	MFI (2)
C	N/A	N/A	N/A	N/A	-	301	299

Для кращої оцінки відмінностей в межах двох повторів, на рис 3.4 графічно відображені основні отримані дані.

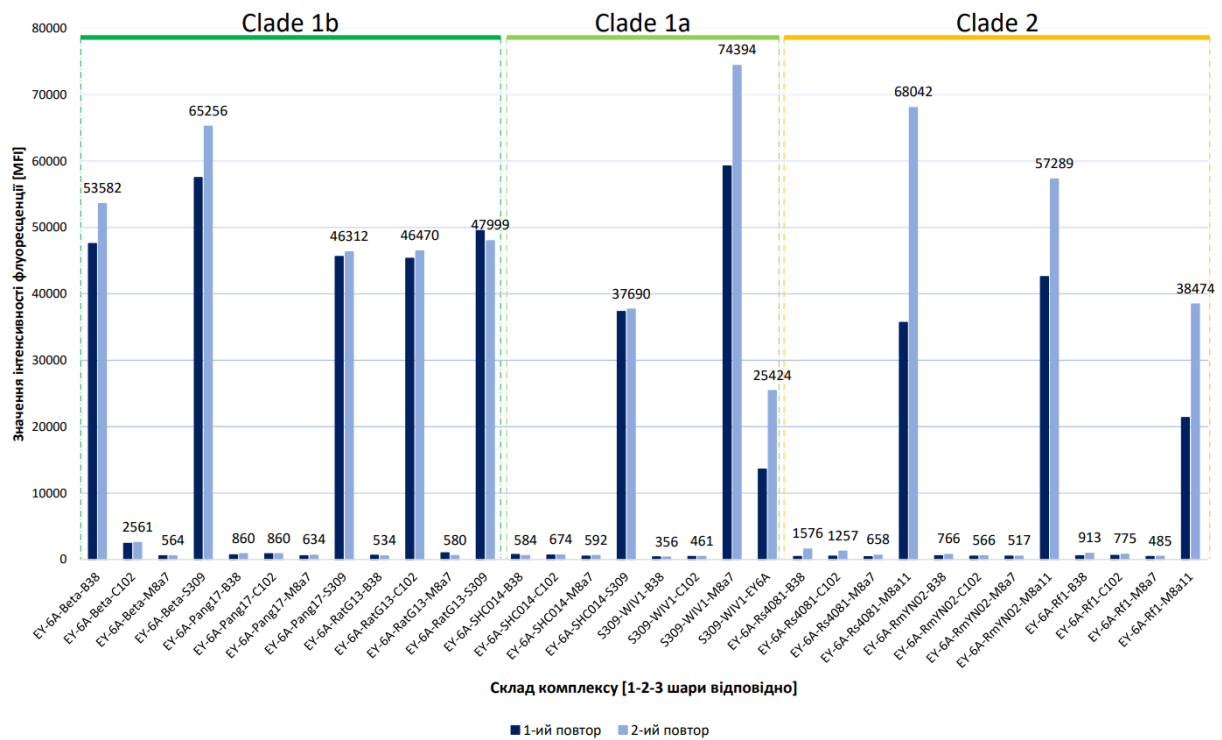


Рис. 3.4. Активність антитіл B38, C102, M8a7 у третьому шарі та відповідні позитивні контролі (S309/M8a11)

Позитивні зразки 4, 8, 12, 16 та 20 продемонстрували приналежність рецептор-зв'язуючих доменів на поверхні наночастинок до групи 1 за рахунок антитіла S309. В той же час, спостерігалася реактивність в зразках 1, 10 та 19, що характерно для відповідних потенційних специфічних антитіл. Щодо групи 2, спостерігалася реактивність зі зразками 24, 28 та 32, що характерно для M8a11 як позитивного контролю до RBD цієї групи.

З результатів очевидно, що було отримано очікуваний шаблон реактивності. Однак були отримані значно нижчі значення, особливо в групі 2, хоча біотинільовані та мічені флуоресцентним барвником антитіла є досить стабільними при зберіганні в межах 4°C. Беручи до уваги результати попереднього експерименту, відмічені ще більш низькі значення для позитивних зразків, що може свідчити про деградацію наночастинок.

3.4. Перевірка C102 в якості потенційного специфічного антитіла до RatG13

Аналогічну перевірку до B38 проводили відносно C102 в ролі антитіл першого шару. Очікувалося, що антитіло C102 в першому шарі повинно реагувати виключно з RatG13 без жодних ознак перехресної реактивності (табл 3.3, рис. 3.5).

Таблиця 3.3

Результати фарбування Dynabead щодо специфічності антитіла C102

N	1й шар (bio)	2-й шар	Група (clade)	3й шар (AF647)	+/-	MFI (1)	MFI (2)
A1	C102	mi3-Beta	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	350	383
A2	C102	mi3-Beta	1b	S309 (non-Clade 2)	-	74020	61609
A3	C102	mi3-Pang17	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	332	391
A4	C102	mi3-Pang17	1b	S309 (non-Clade 2)	-	5238	16499
A5	C102	mi3-RTG13	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	355	388
A6	C102	mi3-RTG13	1b	S309 (non-Clade 2)	+	19146	13579
A7	C102	mi3-SHC014	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	320	371

N	1й шаг (bio)	2-й шаг	Группа (clade)	3й шаг (AF647)	+/-	MFI (1)	MFI (2)
A8	C102	mi3-SHC014	1a	S309 (non-Clade 2)	-	359	378
A9	C102	mi3-WIV1	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	317	354
A10	C102	mi3-WIV1	1a	S309 (non-Clade 2)	-	366	374
A11	C102	mi3-Rs4081	2	M8a-11 (Clade 2)	-	327	350
A12	C102	mi3-Rs4081	2	S309 (non-Clade 2)	-	344	368
A13	C102	mi3-RmYN02	2	M8a-11 (Clade 2)	-	326	347
A14	C102	mi3-RmYN02	2	S309 (non-Clade 2)	-	371	371
A15	C102	mi3-Rf1	2	M8a-11 (Clade 2)	-	319	355
A16	C102	mi3-Rf1	2	S309 (non-Clade 2)	-	353	367
B1	EY-6A	mi3-Beta	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	357	391
B2	EY-6A	mi3-Beta	1b	S309 (non-Clade 2)	+	72576	74950
B3	EY-6A	mi3-Pang17	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	376	517
B4	EY-6A	mi3-Pang17	1b	S309 (non-Clade 2)	+	49731	57853
B5	EY-6A	mi3-RTG13	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	370	423
B6	EY-6A	mi3-RTG13	1b	S309 (non-Clade 2)	+	33350	32421
B7	EY-6A	mi3-SHC014	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	492	666
B8	EY-6A	mi3-SHC014	1a	S309 (non-Clade 2)	+	19134	49478
B9	EY-6A	mi3-WIV1	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	375	386
B10	EY-6A	mi3-WIV1	1a	S309 (non-Clade 2)	+	8606	6578
B11	EY-6A	mi3-Rs4081	2	M8a-11 (Clade 2)	+	30475	39132
B12	EY-6A	mi3-Rs4081	2	S309 (non-Clade 2)	-	460	397
B13	EY-6A	mi3-RmYN02	2	M8a-11 (Clade 2)	+	8983	13630
B14	EY-6A	mi3-RmYN02	2	S309 (non-Clade 2)	-	381	405
B15	EY-6A	mi3-Rf1	2	M8a-11 (Clade 2)	+	991	1594
B16	EY-6A	mi3-Rf1	2	S309 (non-Clade 2)	-	384	395
C	N/A	N/A	N/A	N/A	-	301	364

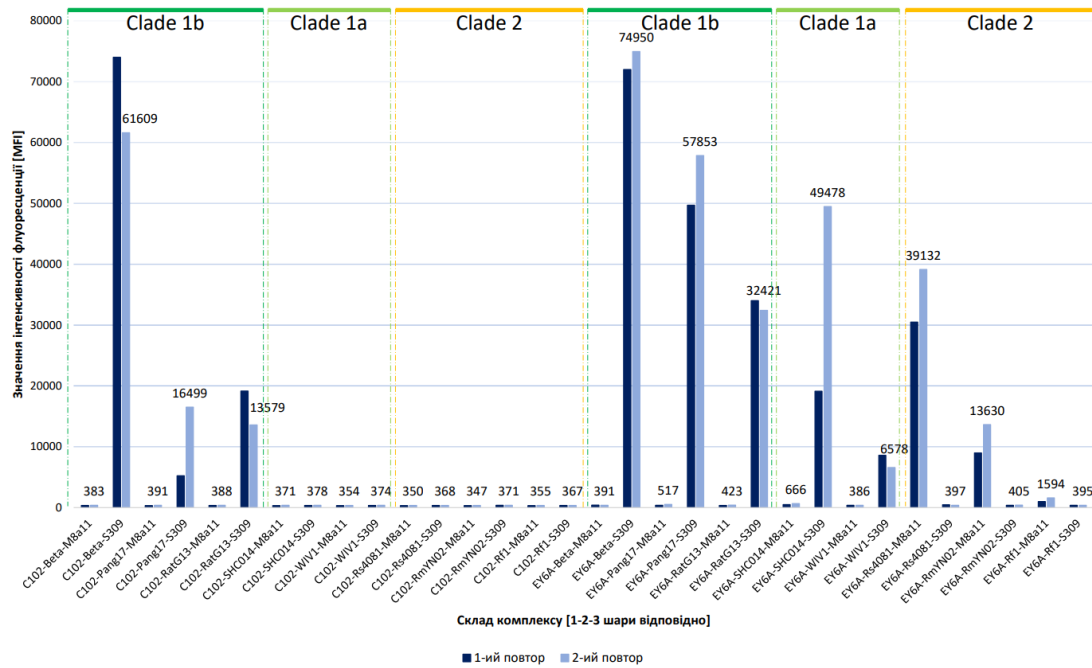


Рис. 3.5. Активність антитіла С102 (зліва) та відповідні позитивні контролі (справа)

За даними проточної цитометрії можна зробити попередній висновок щодо неспецифічності антитіла С102, оскільки спостерігається неочікувана реактивність на Beta-mi3, Pang17-mi3 та RatG13-mi3.

Є помітним високопозитивний зразок А2 (табл. 3.3), значення якого були досить близькими до значень позитивного контролю. Окрім А2, відмічена також певна перехресна реактивність в зразках А4 та А6, що є досить неочікуваним результатом. Дана активність може свідчити про наявність реактивності антитіла С102 відносно усієї групи 1b, хоча така реактивність і не була достатньо сильною.

Як видно з рис. 3.5, також спостерігалось зниження показників для позитивних контролів порівняно з результатами двох попередніх експериментів. Це може свідчити про деградацію кон'югованих RBD-mi3 частинок та зумовлює необхідність їх перевірки.

3.5. Перевірка RBD-mi3 на предмет деградації частинок

Перевірка на деградацію полягала у проведенні SDS-електрофорезу в поліакриламідному гелі, який дозволив би оцінити стан частинок на момент проведення експерименту. Електрофорез проводився у модифікації “reduced”, що дозволяє перевірити загальний стан білків (рис. 3.6-3.8).

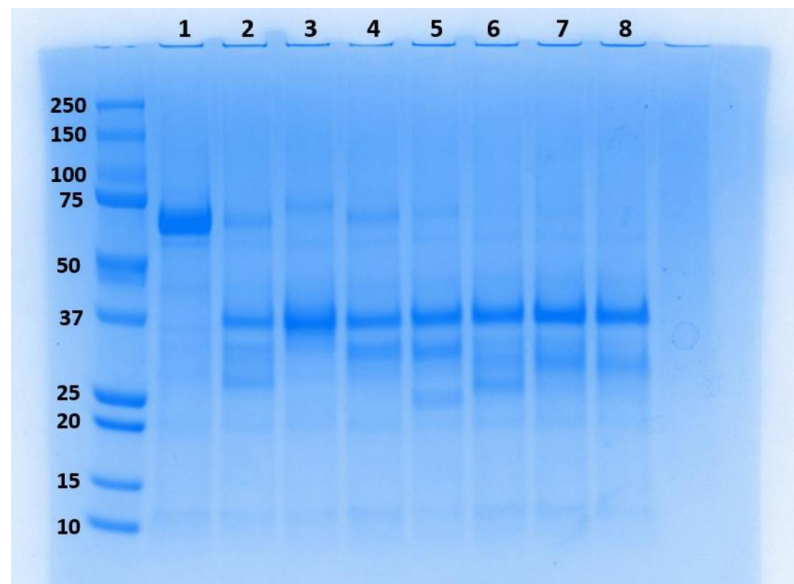


Рис. 3.6. Перевірка частинок на предмет деградації методом SDS-PAGE: 1 - Beta, 2 - Pang17, 3 - RatG13, 4 - SHC014, 5 - WIV1, 6 - Rs4081, 7 - RmYN02, 8 - Rf1

Як було описано раніше, в нормі частинки повинні утворювати в гелі одну смугу в межах 50-75 кДа. На гелі (рис. 3.6) спостерігаємо одну чітку смугу очікуваного розміру у зразку 1, та декілька смуг у треках з іншими зразками, найяскравіша з яких була в межах 37 кДа, а решта - в діапазоні 25-37 кДа, що відповідає самостійним RBD. Основною ймовірною причиною деградації частинок міг стати температурний режим, тому надалі усі нові RBD-mi3 аліквотувались та зберігались при -80°C .

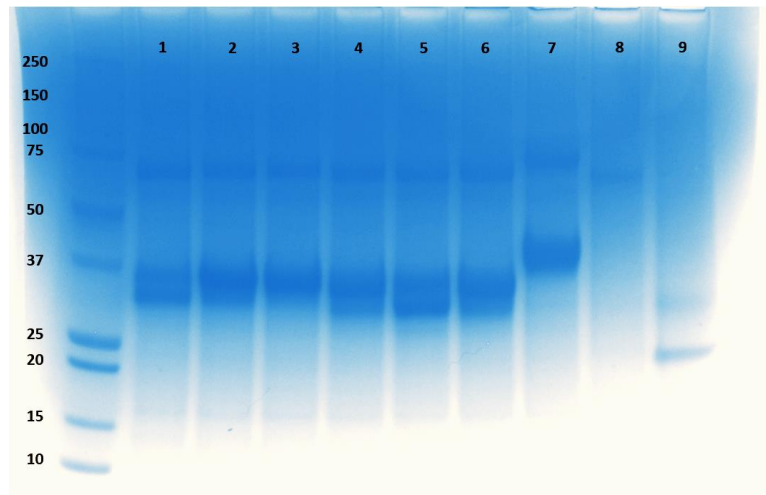


Рис. 3.7. Порівняння нових кон'югованих частинок RBD-mi3 до фільтрування (треки 1-7) та двох різних партій Beta-mi3 на деградацію (8-9) методом SDS-PAGE: 1 - Pang17, 2 - SHC014, 3 - WIV1, 4 - RmYN02, 5 - Rs4081, 6 - Rf1, 7 - RatG13, 8 - Beta (03.22, недеградовані), 9 - Beta (04.22, деградовані)

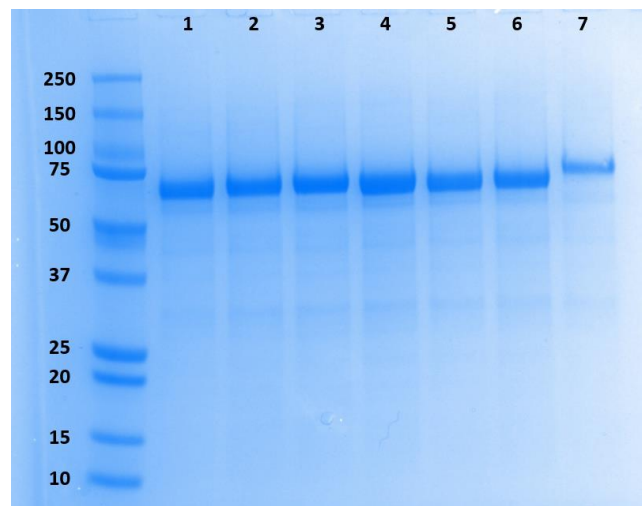


Рис. 3.8. Перевірка нових кон'югованих частинок RBD-mi3 після фільтрування методом SDS-PAGE

Після отримання нових частинок (рис. 3.7-3.8) і для перевірки їх функціонування було проведено повторний експеримент щодо реактивності антитіла C102 (рис. 3.9)

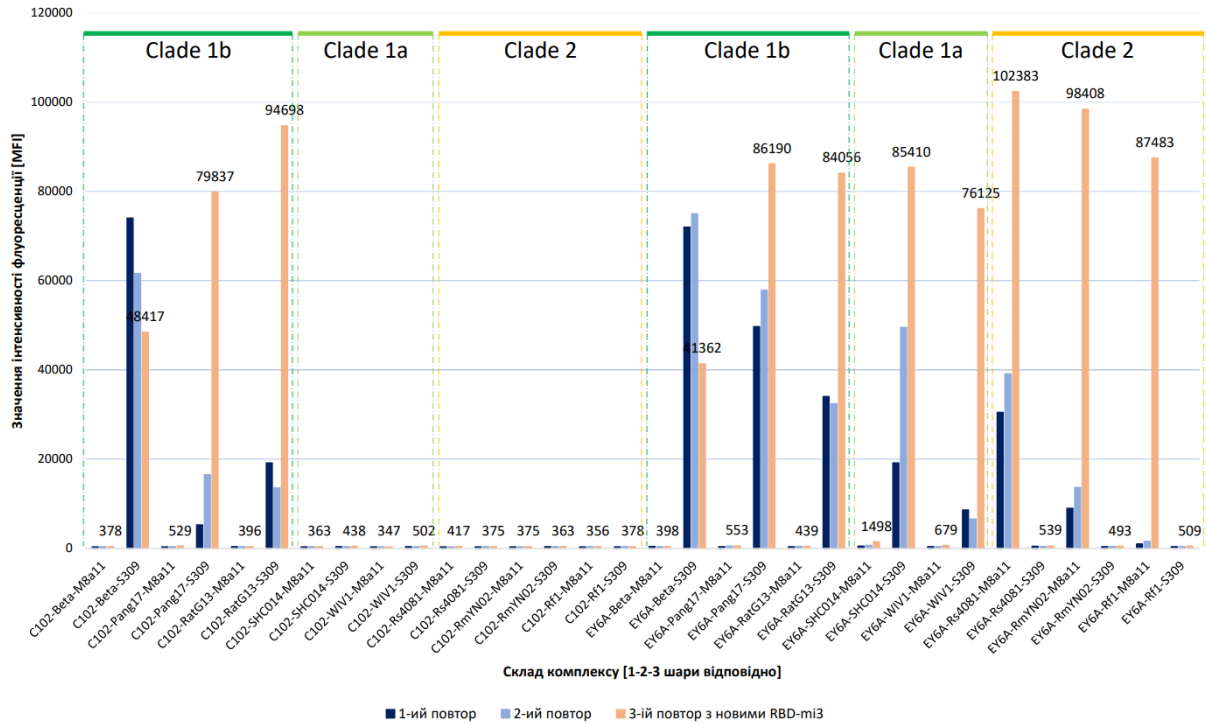


Рис. 3.9. Зміна реактивності антитіла C102 за використання нових RBD-міЗ

Очевидно, що за використання нових частинок отримано зовсім іншу активність (рис. 3.9), порівняно з деградованими. Спостерігалися однозначно позитивні зразки при взаємодії антитіла C102 з Beta-міЗ, Pang17-міЗ та RatG13-міЗ, а також зразок A2 зі значно зниженою активністю Beta-міЗ. На проведеному раніше SDS-PAGE (рис. 3.7, зразок 8) спостерігалася відсутність додаткових смуг, проте вже у наступному експерименті активність буде значно зниженою, що свідчило про початковий етап деградації. Враховуючи факт ймовірної деградації, проведено кон'югацію нових частинок Beta-міЗ, а також їх аліквотування і зберігання за тих же умов, що і попередні зразки (-80°C).

3.6. Перевірка реактивності антитіла M8a-7 відносно WIV1-mi3

Як нам відомо з попередніх досліджень, за результатами ІФА була підтверджена нейтралізуюча активність антитіла M8a-7 відносно WIV1 без супутньої перехресної реактивності, що робить його потенційним специфічним антитілом для стандартизації поряд з V38 [16]. Проведено перевірку для підтвердження результатів ІФА методом фарбування за допомогою суперпарамагнетних частинок (табл. 3.4, рис. 3.10).

Таблиця 3.4

Дослідження реактивності антитіла M8a-7

N	1й шар (bio)	2-й шар	Група (clade)	3й шар (AF647)	+/-	MFI (1)	MFI (2)
A1	M8a-7	mi3-Beta	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	371	356
A2	M8a-7	mi3-Beta	1b	S309 (non-Clade 2)	-	998	1559
A3	M8a-7	mi3-Pang17	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	370	353
A4	M8a-7	mi3-Pang17	1b	S309 (non-Clade 2)	-	718	783
A5	M8a-7	mi3-RTG13	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	369	358
A6	M8a-7	mi3-RTG13	1b	S309 (non-Clade 2)	-	1220	1507
A7	M8a-7	mi3-SHC014	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	362	358
A8	M8a-7	mi3-SHC014	1a	S309 (non-Clade 2)	-	451	561
A9	M8a-7	mi3-WIV1	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	509	515
A10	M8a-7	mi3-WIV1	1a	S309 (non-Clade 2)	+	93514	91524
A11	M8a-7	mi3-Rs4081	2	M8a-11 (Clade 2)	-	578	680
A12	M8a-7	mi3-Rs4081	2	S309 (non-Clade 2)	-	371	353
A13	M8a-7	mi3-RmYN02	2	M8a-11 (Clade 2)	-	2210	1967
A14	M8a-7	mi3-RmYN02	2	S309 (non-Clade 2)	-	377	349
A15	M8a-7	mi3-Rf1	2	M8a-11 (Clade 2)	-	814	847

N	1й шаг (bio)	2-й шаг	Группа (clade)	3й шаг (AF647)	+/-	MFI (1)	MFI (2)
A16	M8a-7	mi3-Rf1	2	S309 (non-Clade 2)	-	384	368
B1	EY-6A	mi3-Beta	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	391	389
B2	EY-6A	mi3-Beta	1b	S309 (non-Clade 2)	+	75394	72775
B3	EY-6A	mi3-Pang17	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	623	514
B4	EY-6A	mi3-Pang17	1b	S309 (non-Clade 2)	+	101340	75526
B5	EY-6A	mi3-RTG13	1b	M8a-11 (Clade 2)	-	667	599
B6	EY-6A	mi3-RTG13	1b	S309 (non-Clade 2)	+	81645	80089
B7	EY-6A	mi3-SHC014	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	1391	1399
B8	EY-6A	mi3-SHC014	1a	S309 (non-Clade 2)	+	80907	84618
B9	EY-6A	mi3-WIV1	1a	M8a-11 (Clade 2)	-	663	726
B10	EY-6A	mi3-WIV1	1a	S309 (non-Clade 2)	+	84998	94448
B11	EY-6A	mi3-Rs4081	2	M8a-11 (Clade 2)	+	99373	99405
B12	EY-6A	mi3-Rs4081	2	S309 (non-Clade 2)	-	535	502
B13	EY-6A	mi3-RmYN02	2	M8a-11 (Clade 2)	+	100094	101290
B14	EY-6A	mi3-RmYN02	2	S309 (non-Clade 2)	-	479	526
B15	EY-6A	mi3-Rf1	2	M8a-11 (Clade 2)	+	88684	74082
B16	EY-6A	mi3-Rf1	2	S309 (non-Clade 2)	-	524	718
C	N/A	N/A	N/A	N/A	-	338	359

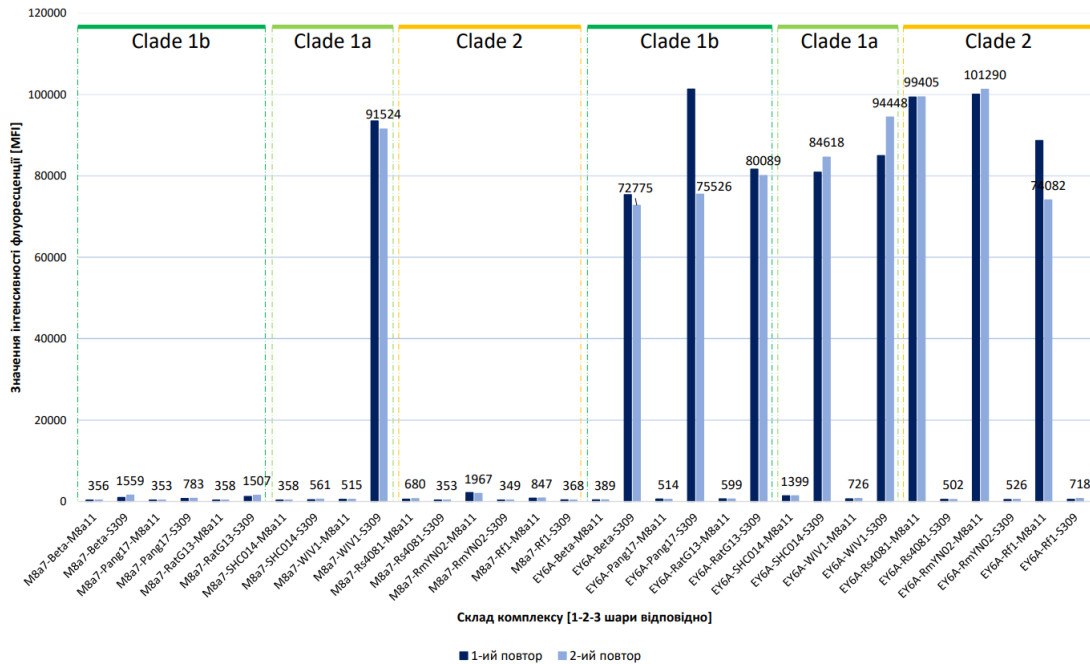


Рис. 3.10. Активність антитіла M8a7 (зліва) та відповідні позитивні контролі (справа)

При оцінці результатів одразу помітне збільшення активності за використання нових частинок RBD-mi3. Шаблон активності в межах двох повторів є більш сталим відносно попередніх експериментів, на що могла вплинути деградація наночастинок. Одразу можна помітити високопозитивний зразок A10 (табл. 3.4), що відповідає комплексу M8a7-WIV1-S309 (рис. 3.10) і вказує на очікувану високу специфічність антитіла M8a7 (значення у діапазоні 91-93 тисячі у порівнянні з позитивним контролем (84-94 тисячі)). Отже, на даному етапі роботи були отримані 2 специфічних антитіла без супутньої перехресної реактивності – B38 (Beta) та M8a-7 (WIV1). Для пошуку наступних потенційних антитіл було задіяно НАТ-тест, який дозволяє провести аналіз 12 моноклональних антитіл (mAb) проти восьми вірусів, включених у модель вакцини.

3.7. Виявлення потенційних специфічних антитіл з існуючого пулу за допомогою реакції непрямой гемаглютинації

Реакція непрямой гемаглютинації – один з доволі швидких методів визначення специфічності антитіл, в основі якого лежить феномен аглютинації еритроцитів. За принципом, описаним в розділі 2, кров (як джерело RBC), поєднують з рецептор-зв'язуючим доменом SARS-CoV-2 за допомогою нанотіла ІН4. Після інкубації протягом години можна починати інтерпретацію результатів (рис. 3.11), які виглядають наступним чином:

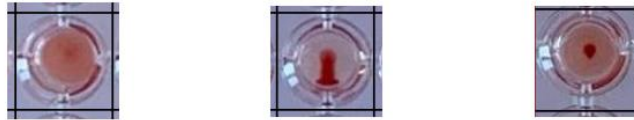


Рис. 3.11. Інтерпретація результатів тесту непрямой гемаглютинації: зліва – позитивний результат («парасолька»), по центру – негативний («гудзик»), справа – негативний/сумнівний

Оцінюючи отримані результати (рис. 3.12-3.14), чітко позитивними вважаються зразки, що не містять жодного осаду у вигляді еритроцитів на дні мікропланшети, чітко негативними – ті, які мають виражений осад, що при нахиланні мікропланшети формує краплю. Щодо сумнівного результату, такі зразки повторюють декілька разів, проте в більшості випадків результат буде залежати від властивостей самого антитіла.

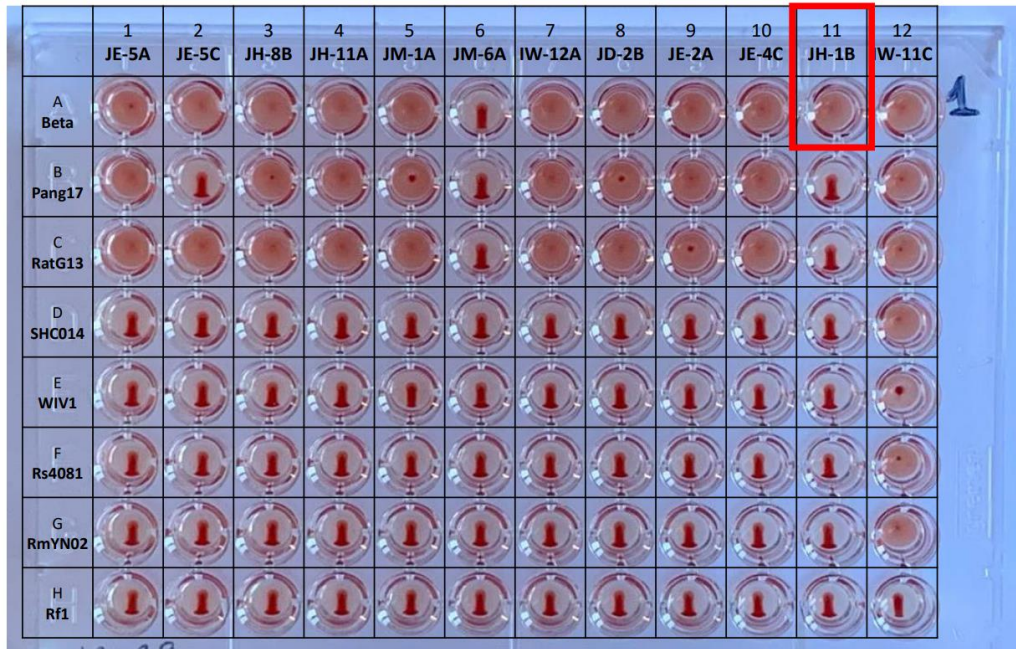


Рис. 3.12. Результати реакції непрямой гемаглютинації та потенційні антитіла (виділені червоним). Ряди А-Н – 8 гомотипових RBD-міЗ, які присутні на мозаїчній модельній частинці, кожен стовпець відповідає індивідуальному антитілу згідно позначень

Щодо результатів на рис. 3.12 чітко помітні негативні та позитивні зразки, за винятком декількох зразків, де спостерігається утворення невеликого «гудзика» в центрі лунки. Оскільки «гудзик» не сформував осад, подібний до краплі, в даному контексті подібні результати інтерпретуються як позитивні. Отже, з дванадцяти протестованих антитіл спостерігали 8, які мають реактивність з Beta, Pang17 та RatG13 одночасно, які є представниками групи 1 (стовпці 1, 3-5, 7-10), одне – з реактивністю виключно на Beta та RatG13 (стовпець 2), та ще одне - з реактивністю на 7 з восьми RBD (стовпець 12). Серед результатів ідентифіковане одне антитіло (JM-6A), яке не реагує з RBD, представленими на мозаїчній моделі, також спостерігаємо одне антитіло (JH-1B), яке є активним тільки до Beta, яке і є ще одним потенційним специфічним антитілом.

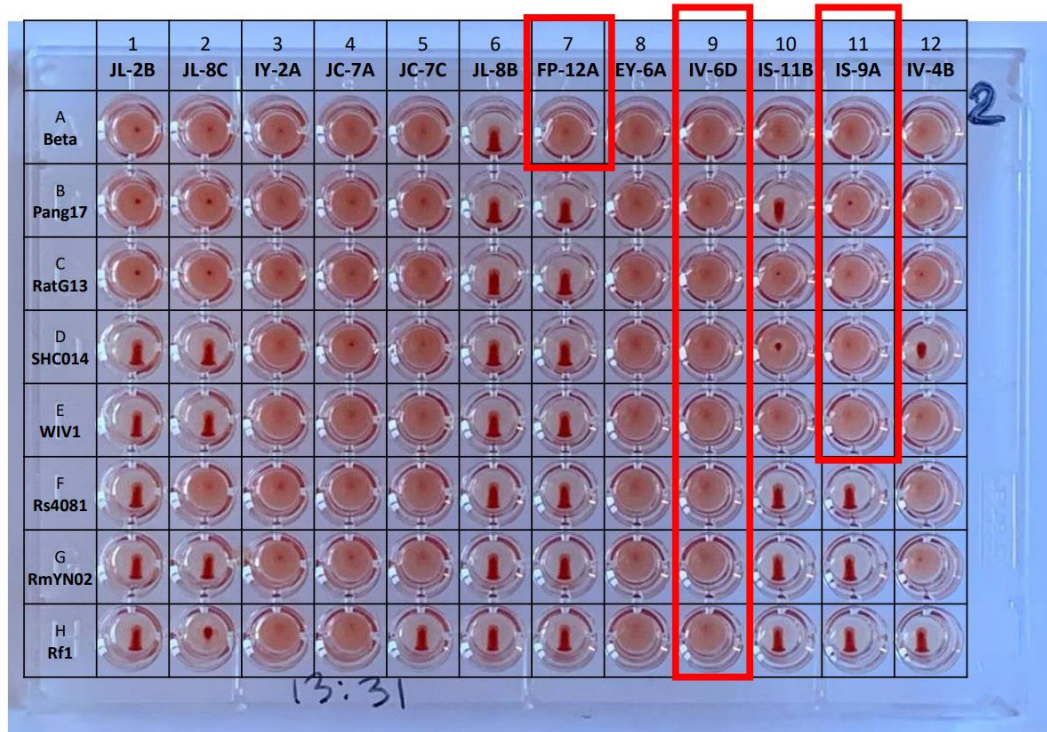


Рис. 3.13. Результати реакції непрямой гемаглютинації та потенційні антитіла (виділені червоним). Ряди А-Н – 8 гомотипових RBD-mi3, які присутні на мозаїчній модельній частинці, кожен стовпець відповідає індивідуальному антитілу згідно позначень. EY6A (стовпець 8) – позитивний контроль

Після оцінки рис. 3.13 показано зміну активності, в тому числі і збільшення сумнівних зразків, зокрема 2H, 10B та 12D з частково сформованою краплею. З потенційних mAb можна виділити наступні:

- FP-12A (реактивність виключно до Beta) – належить до групи 4, і є альтернативою B38;
- IV-6D (активність на усіх RBD-mi3) – альтернатива EY-6A в якості позитивного контролю;
- IS-9A (реактивність до всього класу 1) – група 4, альтернатива S309

Необхідність альтернативних антитіл інших груп зумовлена можливою конкуренцією mAb однієї й тієї ж групи в межах 1-го та 3-го шару, що спричинює

послаблення зв'язування, а це, в свою чергу, призводить до зниження значення MFI при перевірці кожного експерименту методом проточної цитометрії.

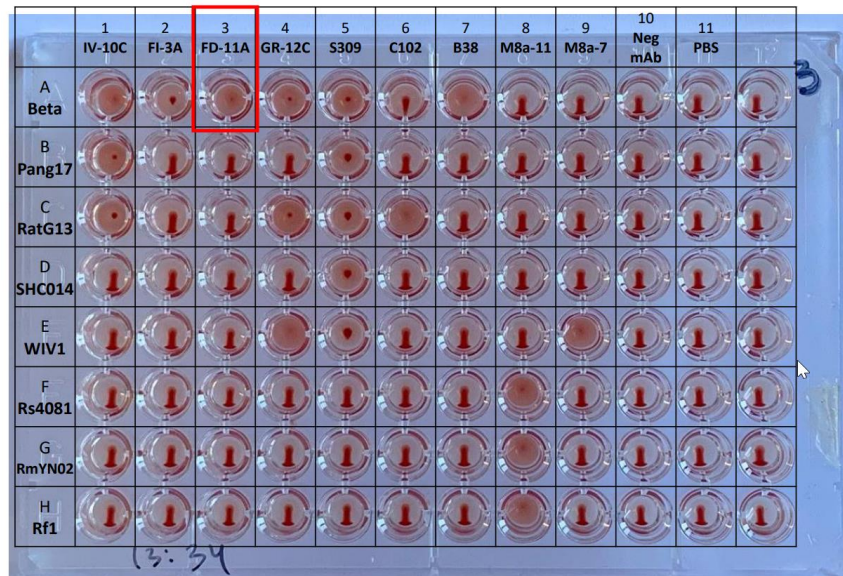


Рис. 3.14. Результати реакції непрямой гемаглютинації тесту та потенційні антитіла (виділені червоним). Ряди А-Н – 8 гомотипових RBD-міЗ, які присутні на мозаїчній модельній частинці, кожен стовпець відповідає індивідуальному антитілу згідно позначень. Neg mAb – антитіло до нейрамінідази вірусу грипу, негативний контроль. PBS – лунки лише з буфером, негативний контроль

З результатів зображених на рис. 3.14 підтверджено два потенційні антитіла, а також деякі mAb, перевірені раніше: B38, C102, M8a-11, M8a-7, S309. Більшість з них, як от B38, M8a-11 та M8a-7 чітко підтверджують отримані раніше результати щодо їх специфічності. S309 демонструвало дещо знижену реактивність, що можна спостерігати з невеликих точок по центру лунок, які можуть бути зумовлені власне особливостями самого антитіла. Щодо попередньо протестованого C102, ми бачимо певну невідповідність в лунці 6В – можна припустити, що молекули зв'язалися з RBD, асоційованим з еритроцитами, проте не змогли зв'язатися із рецептор-зв'язуючими доменами на поверхні сусідніх еритроцитів для формування “парасольки” [47]. Серед виділених як потенційні,

продемонстровано антитіло FD-11A, яке можна використати як альтернативу B38 та FP-12A.

3.8. Тестування IS-9A як альтернативи S309 в якості специфічного антитіла до групи 1

IS-9A (група 4) в НАТ-тесті проявило себе як специфічне антитіло до групи 1, що означає його реактивність на групі 1 (Beta, Pang17, RatG13, SHC014, WIV1) та повну відсутність реактивності на групі 2 (Rs4081, RmYN02, Rf1). В якості першого шару обираємо універсальне антитіло, яке повинно зв'язуватись з усіма наявними RBD на кожній частинці – це дозволить оцінити максимум зв'язування (табл 3.5).

Таблиця 3.5

Дослідження реактивності IS-9A

N	1-й шар (bio)	2-й шар	Група (clade)	3-й шар (AF647)	+/-	MFI
A1	EY-6A	mi3-Beta	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	48599
A2	EY-6A	mi3-Pang17	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	23668
A3	EY-6A	mi3-RTG13	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	82356
A4	EY-6A	mi3-SHC014	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	51705
A5	EY-6A	mi3-WIV1	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	68810
A6	EY-6A	mi3-Rs4081	2	IS-9A (non-Clade 2)	-	1479
A7	EY-6A	mi3-RmYN02	2	IS-9A (non-Clade 2)	-	849
A8	EY-6A	mi3-Rf1	2	IS-9A (non-Clade 2)	-	1169
C	N/A	N/A	N/A	N/A	-	359

Як можемо спостерігати з результатів отриманих у таблиці 3.5, IS-9A дійсно має певну реактивність на вказаній групі, проте більшість значень є досить низькими. Враховуючи те, що EY-6A є також антитіло 4 групи, потрібно враховувати ймовірність конкуруючої активності, оскільки два антитіла однієї й тієї ж групи ділять між собою один й той же епітоп, що спричинює певне блокування реакції. Зважаючи на цей факт, антитіло першого шару було замінено на S309 (група 3), яке не повинно конкурувати з IS-9A, але при цьому також дозволяє оцінити максимум зв'язування за рахунок реактивності на усій групі 1 (табл. 3.6).

Таблиця 3.6

Оцінка реактивності IS-9A зі зміненим першим шаром

N	1-й шар (bio)	2-й шар	Група (clade)	3-й шар (AF647)	+/-	MFI
1	S309	mi3-Beta	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	72989
2	EY6A	mi3-Beta	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	48599
3	S309	mi3-Pang17	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	83615
4	EY6A	mi3-Pang17	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	23668
5	S309	mi3-RTG13	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	71264
6	EY6A	mi3-RTG13	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	82356
7	S309	mi3-SHC014	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	87222
8	EY6A	mi3-SHC014	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	51705
9	S309	mi3-WIV1	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	83158
10	EY6A	mi3-WIV1	2	IS-9A (non-Clade 2)	+	68810
11	S309	mi3-Rs4081	2	IS-9A (non-Clade 2)	-	476
12	EY6A	mi3-Rs4081	2	IS-9A (non-Clade 2)	-	1479
13	S309	mi3-RmYN02	2	IS-9A (non-Clade 2)	-	431
14	EY6A	mi3-RmYN02	2	IS-9A (non-Clade 2)	-	849
15	S309	mi3-Rf1	2	IS-9A (non-Clade 2)	-	444

N	1-й шар (bio)	2-й шар	Група (clade)	3-й шар (AF647)	+/-	MFI
16	EY6A	mi3-Rf1	2	IS-9A (non-Clade 2)	-	1169

Після проведеного порівняння (табл 3.6), очевидно, що при зміні першого шару з EY-6A на S309 значення фонового зв'язування зменшилось, а значення позитивних зразків значно зросли, що підтверджує думку про блокування внаслідок конкуренції антитіл однієї групи (рис. 3.15).

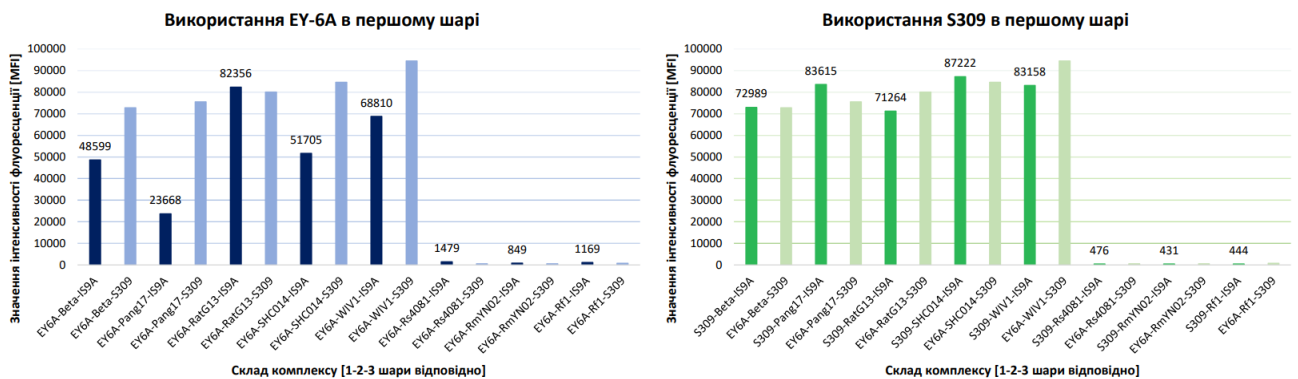


Рис. 3.15. Порівняння активності IS-9A за умов зміни антитіла 1-го шару

3.9. Кореляція результатів та обговорення

Для проведеного дослідження було відібрано моноклональні антитіла з потенційною реактивністю до одного з восьми рецептор-зв'язуючих доменів наночастинок, що є основою майбутньої вакцини. Протягом виконання усієї роботи проводився аналіз наступних антитіл: В38 (група 1), С102 (група 1), М8а-7 (група 4) та IS-9А (група 4) на предмет їх специфічності до одного з рецептор-зв'язуючих доменів, присутніх на модельній наночастиці. Крім

вищезазначених, також використовувались наступні моноклональні антитіла: EY-6A (універсальне антитіло, група 4), S309 (реактивність відносно групи 1, група 3), M8a-11 (реактивність відносно групи 2, група невідома, структура антитіла не досліджена). Отримання результатів здійснювалась за допомогою проточної цитометрії. Додатково також були залучені аналізи, описані в розділі 2.

В ході підготовки антитіла однаково мітять як біотином (для використання в першому шарі), так і флуоресцентною міткою (для використання в третьому шарі) для оцінки взаємодії. Після проведення проточної цитометрії оцінюється значення інтенсивності флуоресценції комплексу, яке є пропорційним кількості зв'язаних в комплексі антитіл з флуоресцентною міткою в третьому шарі. Якщо використовується гомотипова частинка з одним типом RBD-mi3 на поверхні, то значення інтенсивності флуоресценції демонструє специфічність зв'язування з певним антитілом, представленим в третьому шарі.

Потенційно специфічне антитіло повинно демонструвати високі значення інтенсивності флуоресценції тільки на одному з восьми сарбековірусів, зі значеннями близькими до відповідного позитивного контролю.

Як було зазначено раніше, M8a7 продемонструвало досить високу нейтралізуючу активність відносно WIV1 за використання рутинного немодифікованого методу ELISA [16]. В ході перевірки даного антитіла шляхом фарбування за допомогою Dynabeads було підтверджено його високу специфічність відносно WIV1-mi3. Також була описана реактивність антитіл M8a-11 в якості позитивного контролю до усієї групи 2, C102 із реактивністю до RatG13-mi3 та деяких інших рецептор-зв'язуючих доменів. Також зазначено антитіло S309, яке в ході виконання ELISA було використано в якості позитивного контролю до усієї групи 1 задля демонстрації найвищих рівнів EC50.

В інших деяких дослідженнях була продемонстрована висока нейтралізуюча здатність антитіла В38 за рахунок того, що В38-зв'язуючий сайт перекривається із сайтом зв'язування АСЕ2 [49, 50]. Структура комплексу RBD-В38 показала, що більшість амінокислотних залишків на епітопі перекриваються з інтерфейсом зв'язування RBD-АСЕ2, що пояснює блокуючий ефект та нейтралізуючу здатність. Проведений аналіз підтверджує повну нейтралізуючу здатність даного антитіла а також відсутність крос-реактивності на інших RBD, представлених на мозаїчних частинках.

Універсальне антитіло ЕУ-6А, виділене від реконвалесцентного донора, за існуючими даними володіє досить високою нейтралізуючою активністю, нейтралізуючи SARS-CoV-2 та перехресно реагуючи з SARS-CoV-1 [51]. Напівмаксимальна інгібуюча концентрація (IC50) становила 54 нМ, тобто приблизно у сім разів перевищувала аналогічний показник Fab CR302215 (аналог ЕУ-6А, виділений у пацієнта з SARS-CoV-1) та була еквівалентна розчинному АСЕ2-Fc.

Щодо IS-9А, яке проявляло високий рівень специфічності, то подібні дані наразі не опубліковані і тому висновки щодо його специфічності базувалися на основі реакції непрямой гемаглютинації і надалі були підтверджені методом фарбування за допомогою Dynabeads.

Загалом, отримані результати підтверджують раніше отримані дані з різних джерел в ході суміжних експериментів типу ELISA: як і очікувалось, антитіло В38 володіє виключною специфічністю щодо Beta-mi3 в тій же мірі, що і антитіло М8а7 відносно WIV1-mi3. Такі властивості цих антитіл дозволяють їх надалі використовувати для підтвердження присутності певного типу RBD-mi3 на загальній мозаїчній частинці, титрування, тощо.

Отже, на даному етапі роботи отримано 2 абсолютно специфічних антитіла, що дозволяють продемонструвати присутність двох з восьми рецептор-

зв'язуючих доменів на мозаїчній наночастинці – WIV1 та Beta. Після отримання усіх восьми специфічних антитіл для стандартизації та демонстрації присутності кожного RBD на моделі, усі складові комплексу надалі будуть виготовлятися згідно норм GMP з подальшими замінами систем експресії та буферів.

ВИСНОВКИ

1. В ході дослідження доведено стійкість шаблону активності для всіх досліджуваних антитіл, які є перспективними для розробки та стандартизації нової вакцини від COVID-19, і виявлено зміни їх активності при застосуванні деградованих наночастинок.
2. Доведено специфічність антитіл M8a-7 (WIV1-mi3) та B38 (Beta-mi3) в якості антитіл 1-го шару, і підтверджено специфічність антитіла IS-9A до усієї групи 1.
3. Виявлено конкуруючу активність між антитілами EY-6A (група 4) та IS-9A (група 4), що в майбутньому буде використано для уникнення подібної реактивності і отримання більш точних результатів.
4. Ідентифіковані нові потенційні специфічні антитіла, зокрема JH-1B (Beta, група 2/3), FP-12A (Beta, група 4), IS9A (група 1, група 4), FD-11A (Beta, група 3), що можуть бути використані для запобігання конкуруючої активності між антитілами однієї групи.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sohrabi, C. *et al.* (2021) ‘Impact of the coronavirus (COVID-19) pandemic on scientific research and implications for clinical academic training – A review’, *International Journal of Surgery*, 86, pp. 57–63. doi: 10.1016/j.ijssu.2020.12.008.
2. Pollard, C. A., Morran, M. P. and Nestor-Kalinoski, A. L. (2020) ‘The COVID-19 pandemic: a global health crisis’, *Physiological Genomics*, 52(11), pp. 549–557. doi: 10.1152/physiolgenomics.00089.2020.
3. Payne, S. (2017) ‘Family Coronaviridae’, in *Viruses*. Elsevier, pp. 149–158. doi: 10.1016/B978-0-12-803109-4.00017-9.
4. Pal, M. *et al.* (2020) ‘Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus-2 (SARS-CoV-2): An Update’, *Cureus*. doi: 10.7759/cureus.7423.
5. Yan, R. *et al.* (2020) ‘Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2’, *Science*, 367(6485), pp. 1444–1448. doi: 10.1126/science.abb2762.
6. Meyerowitz, E. A. *et al.* (2021) ‘Transmission of SARS-CoV-2: A Review of Viral, Host, and Environmental Factors’, *Annals of Internal Medicine*, 174(1), pp. 69–79. doi: 10.7326/M20-5008.
7. Cascella, M. *et al.* (2023) Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19), *StatPearls*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23770275>.
8. McIntosh, K.; Hirsch, M.; Bloom, A. (2020) ‘Coronavirus disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, virology, and prevention’, *Lancet Infect. Dis*, 1, pp. 2019–2020.

9. Wei, J. and Li, Y. (2016) 'Airborne spread of infectious agents in the indoor environment', *American Journal of Infection Control*, 44(9), pp. S102–S108. doi: 10.1016/j.ajic.2016.06.003.
10. Klompas, M., Baker, M. A. and Rhee, C. (2020) 'Airborne Transmission of SARS-CoV-2', *JAMA*, 324(5), p. 441. doi: 10.1001/jama.2020.12458.
11. Cevik, M. *et al.* (2020) 'Virology, transmission, and pathogenesis of SARS-CoV-2', *BMJ*, p. m3862. doi: 10.1136/bmj.m3862.
12. Hoffmann, M. *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor', *Cell*, 181(2), pp. 271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
13. Zou, L. *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 Viral Load in Upper Respiratory Specimens of Infected Patients', *New England Journal of Medicine*, 382(12), pp. 1177–1179. doi: 10.1056/NEJMc2001737.
14. Barnes, C. O., Jette, C. A., *et al.* (2020) 'SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies', *Nature*, 588(7839), pp. 682–687. doi: 10.1038/s41586-020-2852-1.
15. Wrapp, D. *et al.* (2020) 'Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation', *Science*, 367(6483), pp. 1260–1263. doi: 10.1126/science.abb2507.
16. Fan, C. *et al.* (2022) 'Neutralizing monoclonal antibodies elicited by mosaic RBD nanoparticles bind conserved sarbecovirus epitopes', *Immunity*, 55(12), pp. 2419-2435.e10. doi: 10.1016/j.immuni.2022.10.019.
17. Zost, S. J. *et al.* (2020) 'Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2', *Nature*, 584(7821), pp. 443–449. doi: 10.1038/s41586-020-2548-6.

18. Barnes, C. O., West, A. P., *et al.* (2020) ‘Structures of Human Antibodies Bound to SARS-CoV-2 Spike Reveal Common Epitopes and Recurrent Features of Antibodies’, *Cell*, 182(4), pp. 828-842.e16. doi: 10.1016/j.cell.2020.06.025.
19. Wu, N. C. *et al.* (2020) ‘An Alternative Binding Mode of IGHV3-53 Antibodies to the SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain’, *Cell Reports*, 33(3), p. 108274. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108274.
20. Hsieh, C.-L. *et al.* (2020) ‘Structure-based design of prefusion-stabilized SARS-CoV-2 spikes’, *Science*, 369(6510), pp. 1501–1505. doi: 10.1126/science.abd0826.
21. Robbiani, D. F. *et al.* (2020) ‘Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals’, *Nature*, 584(7821), pp. 437–442. doi: 10.1038/s41586-020-2456-9.
22. Pinto, D. *et al.* (2020) ‘Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody’, *Nature*, 583(7815), pp. 290–295. doi: 10.1038/s41586-020-2349-y.
23. ter Meulen, J. *et al.* (2006) ‘Human Monoclonal Antibody Combination against SARS Coronavirus: Synergy and Coverage of Escape Mutants’, *PLoS Medicine*. Edited by D. R. Burton, 3(7), p. e237. doi: 10.1371/journal.pmed.0030237.
24. Tian, X. *et al.* (2020) ‘Potent binding of 2019 novel coronavirus spike protein by a SARS coronavirus-specific human monoclonal antibody’, *Emerging Microbes & Infections*, 9(1), pp. 382–385. doi: 10.1080/22221751.2020.1729069.
25. Yuan, M. *et al.* (2020) ‘A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV’, *Science*, 368(6491), pp. 630–633. doi: 10.1126/science.abb7269.

26. Reddington, S. C. and Howarth, M. (2015) ‘Secrets of a covalent interaction for biomaterials and biotechnology: SpyTag and SpyCatcher’, *Current Opinion in Chemical Biology*, 29, pp. 94–99. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.10.002.
27. Hatlem, D. *et al.* (2019) ‘Catching a SPY: Using the SpyCatcher-SpyTag and Related Systems for Labeling and Localizing Bacterial Proteins’, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(9), p. 2129. doi: 10.3390/ijms20092129.
28. Zakeri, B. *et al.* (2012) ‘Peptide tag forming a rapid covalent bond to a protein, through engineering a bacterial adhesin.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(12), pp. E690-7. doi: 10.1073/pnas.1115485109.
29. Hsia, Y. *et al.* (2016) ‘Design of a hyperstable 60-subunit protein icosahedron’, *Nature*, 535(7610), pp. 136–139. doi: 10.1038/nature18010.
30. Jin, J. *et al.* (2017) ‘Accelerating the clinical development of protein-based vaccines for malaria by efficient purification using a four amino acid C-terminal “C-tag”’, *International Journal for Parasitology*, 47(7), pp. 435–446. doi: 10.1016/j.ijpara.2016.12.001.
31. de Wit, E. *et al.* (2016) ‘SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses’, *Nature Reviews Microbiology*, 14(8), pp. 523–534. doi: 10.1038/nrmicro.2016.81.
32. Menachery, V. D. *et al.* (2016) ‘SARS-like WIV1-CoV poised for human emergence.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), pp. 3048–53. doi: 10.1073/pnas.1517719113.
33. Menachery, V. D. *et al.* (2015) ‘A SARS-like cluster of circulating bat coronaviruses shows potential for human emergence’, *Nature Medicine*, 21(12), pp. 1508–1513. doi: 10.1038/nm.3985.

34. Raj, V. S. *et al.* (2013) ‘Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC’, *Nature*, 495(7440), pp. 251–254. doi: 10.1038/nature12005.
35. Vlasak, R. *et al.* (1988) ‘Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses.’, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 85(12), pp. 4526–4529. doi: 10.1073/pnas.85.12.4526.
36. Cohen, A. A. *et al.* (2021) ‘Mosaic nanoparticles elicit cross-reactive immune responses to zoonotic coronaviruses in mice.’, *Science (New York, N.Y.)*, 371(6530), pp. 735–741. doi: 10.1126/science.abf6840.
37. López-Sagasetta, J. *et al.* (2016) ‘Self-assembling protein nanoparticles in the design of vaccines.’, *Computational and structural biotechnology journal*, 14, pp. 58–68. doi: 10.1016/j.csbj.2015.11.001.
38. Tan, T. K. *et al.* (2021) ‘A COVID-19 vaccine candidate using SpyCatcher multimerization of the SARS-CoV-2 spike protein receptor-binding domain induces potent neutralising antibody responses.’, *Nature communications*, 12(1), p. 542. doi: 10.1038/s41467-020-20654-7.
39. Zhou, H. *et al.* (2020) ‘A Novel Bat Coronavirus Closely Related to SARS-CoV-2 Contains Natural Insertions at the S1/S2 Cleavage Site of the Spike Protein.’, *Current biology: CB*, 30(11), pp. 2196-2203.e3. doi: 10.1016/j.cub.2020.05.023.
40. Rahikainen, R. *et al.* (2021) ‘Overcoming Symmetry Mismatch in Vaccine Nanoassembly through Spontaneous Amidation.’, *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, 60(1), pp. 321–330. doi: 10.1002/anie.202009663.
41. 2015 [online]. Available at: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/100024235_AttuneNxT_HW_UG.pdf.

42. Phan, T. G. *et al.* (2009) 'Immune complex relay by subcapsular sinus macrophages and noncognate B cells drives antibody affinity maturation.', *Nature immunology*, 10(7), pp. 786–93. doi: 10.1038/ni.1745.
43. Bivi, N. *et al.* (2019) 'Investigation of pre-existing reactivity to biotherapeutics can uncover potential immunogenic epitopes and predict immunogenicity risk.', *mAbs*, 11(5), pp. 861–869. doi: 10.1080/19420862.2019.1612699.
44. Bruun, T. U. J. *et al.* (2018) 'Engineering a Rugged Nanoscaffold To Enhance Plug-and-Display Vaccination.', *ACS nano*, 12(9), pp. 8855–8866. doi: 10.1021/acsnano.8b02805.
45. Smith, P. K. *et al.* (1985) 'Measurement of protein using bicinchoninic acid.', *Analytical biochemistry*, 150(1), pp. 76–85. doi: 10.1016/0003-2697(85)90442-7.
46. Manns, J. M. (2011) 'SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) of Proteins', *Current Protocols in Microbiology*, 22(1). doi: 10.1002/9780471729259.mca03ms22.
47. Townsend, A. *et al.* (2021) 'A haemagglutination test for rapid detection of antibodies to SARS-CoV-2', *Nature Communications*, 12(1), p. 1951. doi: 10.1038/s41467-021-22045-y.
48. Wegmann, T. G. and Smithies, O. (1966) 'A Simple Hemagglutination System Requiring Small Amounts of Red Cells and Antibodies', *Transfusion*, 6(1), pp. 67–73. doi: 10.1111/j.1537-2995.1966.tb04696.x.
49. Dejnirattisai, W. *et al.* (2021) 'The antigenic anatomy of SARS-CoV-2 receptor binding domain', *Cell*, 184(8), pp. 2183–2200.e22. doi: 10.1016/j.cell.2021.02.032.
50. Wu, Y. *et al.* (2020) 'A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2', *Science*, 368(6496), pp. 1274–1278. doi: 10.1126/science.abc2241.

51. Zhou, D. *et al.* (2020) ‘Structural basis for the neutralization of SARS-CoV-2 by an antibody from a convalescent patient’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(10), pp. 950–958. doi: 10.1038/s41594-020-0480-y.