

УДК 577.2

ДОСТАВКА АНТИТЕЛОПОДОБНЫХ МОЛЕКУЛ, МОНОБОДИ, СПОСОБНЫХ СВЯЗЫВАТЬСЯ С НУКЛЕОКАПСИДНЫМ БЕЛКОМ ВИРУСА SARS-COV-2, В КЛЕТКИ-МИШЕНИ

© 2022 г. Ю. В. Храмцов¹, А. В. Уласов¹, Т. Н. Лупанова¹, академик РАН Г. П. Георгиев¹, член-корреспондент РАН А. С. Соболев^{1,2,*}

Поступило 15.06.2022 г.
После доработки 07.07.2022 г.
Принято к публикации 11.07.2022 г.

На основании предыдущих исследований были выбраны две антителоподобные молекулы, монободы, способные с высоким сродством (константа диссоциации десятки нМ) взаимодействовать с нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV-2. Для доставки в клетки-мишени методами генной инженерии были получены и проэкспрессированы в *E. coli* конструкции, содержащие, кроме монободы, последовательность TAT-пептида на N- или на C-конце полученного полипептида. Методом термофореза была выявлена конструкция с наибольшим сродством к нуклеокапсидному белку вируса SARS-CoV-2. Клеточным анализом теплового сдвига была показана способность данной конструкции взаимодействовать с нуклеокапсидным белком в клетках HEK293T, трансфицированных нуклеокапсидным белком вируса SARS-CoV-2, слитым с флуоресцентным белком mRuby3. Использование вместо TAT-пептида в полученной конструкции шатл-пептида S10, содержащего кроме улучшенного TAT-пептида еще эндосомолитический пептид, существенно улучшает проникновение конструкции в клетки-мишени.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, TAT-пептид, шатл-пептид S10, нуклеокапсидный белок, антителоподобные молекулы, монободы, термофорез, клеточный анализ теплового сдвига

DOI: 10.31857/S2686738922050146

Необходимость разработки новых противовирусных препаратов стала как никогда очевидной на фоне пандемии коронавируса SARS-CoV-2. Наряду с классическими низкомолекулярными ингибиторами вирусной активности [1] весьма перспективным представляется использование противовирусных препаратов, содержащих антитела или антителоподобные молекулы, которые можно получить практически для любого белкового антигена. Антителоподобные молекулы в этом плане могут быть более перспективными в связи с относительно небольшим, по сравнению с природными антителами, размером при сохранении нужной специфичности и аффинности [2]. В качестве мишени можно выбрать один из вирусных белков, критически важных для сборки вируса. Для вируса SARS-CoV-2 таким белком может быть нуклеокапсидный белок или N-белок, кото-

рый связывается с вирусной РНК и принимает активное участие в сборке и упаковке вируса, а также имеет целый ряд других важных для вируса функций [3–5]. В предыдущей работе [6] нами было показано, что несколько антителоподобных молекул, монободы (Fn-N), к N-белку вируса SARS-CoV, созданных на основе десятого домена фибронектина 3 типа человека [7], способны с высоким сродством взаимодействовать с N-белком вируса SARS-CoV-2. Для неспецифической доставки данных монободы в клетки можно присоединить к ним проникающий в клетку пептид, например, TAT-пептид – пептид из белка транскриптора ВИЧ-1 [8]. Это было сделано для двух монободы Fn-N15 и Fn-N20, причем TAT-пептид был на N- или на C-конце конструкции. Из полученных конструкций отбиралась конструкция с наибольшим сродством к N-белку. Далее изучалась способность данной конструкции связываться с N-белком в клетках HEK293T. Для улучшения эффективности проникновения в клетки изучена также конструкция, содержащая вместо TAT-пептида шатл-пептид S10 [9].

¹ Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия

*e-mail: alsobolev@yandex.ru

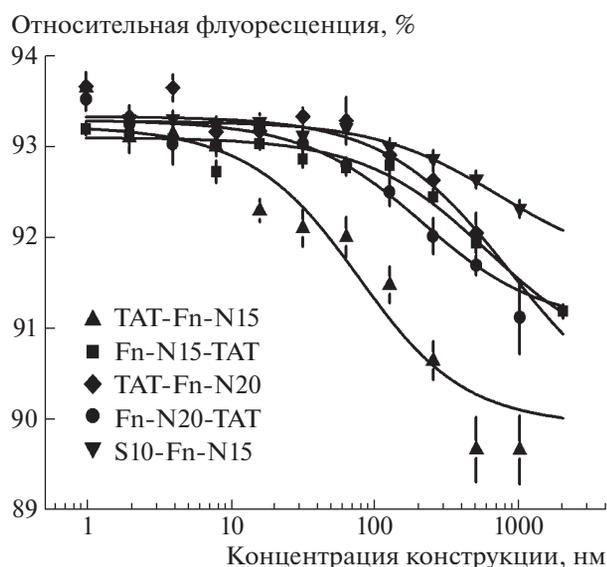


Рис. 1. Зависимости относительной интенсивности флуоресценции (за 100% принята интенсивность флуоресценции до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации полипептидных конструкций при постоянной концентрации N-белка (40 нМ). Указана среднеквадратичная ошибка определения относительной интенсивности флуоресценции (8–12 повторов).

Генно-инженерными методами были получены четыре плазмиды, каждая из которых содержала ген, кодирующий антителоподобную молекулу с His-тагом и TAT-пептид на N- или на C-конце. Плазмиды, кодирующие N-белок SARS-CoV-2 с His-тагом и N-белок SARS-CoV-2, слитый с флуоресцентным белком mRuby3, были любезно предоставлены компанией ShineGene (Китай) и доктором Raphael Gaudin (Addgene plasmid # 170466) соответственно. Экспрессию антителоподобных молекул, слитых с TAT-пептидом, и N-белка проводили в штамме *E. coli* BL21(DE3). Индукцию экспрессии Fn-N с TAT и N-белка проводили 500 мкМ IPTG в течение 20 ч при 37°C для Fn-N с TAT и в течение 3 ч при 37°C для N-белка. Fn-N с TAT и N-белок выделяли из нерастворимой фракции [10], а затем очищали аффинной хроматографией на носителях HisTrap FF для Fn-N с TAT и Protino® Ni-TED Resin для N-белка. Выделенные белки хранили в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 8.

Денатурирующий электрофорез в полиакриламидном геле продемонстрировал достаточную степень чистоты полученных белков (98.9% для N-белка; 98.8% для TAT-Fn-N15; 96% для Fn-N15-TAT; 61.5% для TAT-Fn-N20; 97.5% для Fn-N20-TAT и 94.4% для S10-Fn-N15).

Взаимодействие полученных полипептидных конструкций с N-белком изучали так же, как описано в [6], методом термофореза на приборе Monolith NT.115 Series (“NanoTemper Technologies

GmbH”, Германия) в буфере 10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 7. N-белок был помечен флуоресцентным красителем AF488, подобно тому, как это описано в [6]. Степень модификации составила 2.2 молекулы AF488 на одну молекулу N-белка. Клеточный анализ теплового сдвига проводили на клетках HEK293T, временно трансформированных N-белком, слитым с флуоресцентным белком mRuby3, подобно тому, как описано в [11], с тем исключением, что флуоресценцию образцов измеряли в капиллярах на приборе Monolith NT.115 Series (“NanoTemper Technologies GmbH”, Германия). Для каждой концентрации полипептида образец делили на четыре аликвоты. Количество клеток в аликвотах и процент трансфекции N-белком (20–30%), слитым с красным белком, определяли с помощью проточного цитофлуориметра MACSQuant Analyzer (Miltenyi Biotec, Франция). Одну аликвоту не нагревали, а три другие нагревали до температур 45, 50 и 55°C, соответственно, в течение 3 мин. Далее аликвоты клеток лизировали четырьмя циклами замораживания в жидком азоте — оттаивания при 37°C. Для отделения от клеточных остатков и денатурированных белков лизированные клетки центрифугировали при 8000 g в течение 1 ч. Из флуоресценции каждого из супернатантов вычитали флуоресценцию используемого буфера, и полученную разность нормировали на число клеток в образце. Из такой нормированной флуоресценции вычитали значение фона, полученное для клеток HEK293T, не трансформированных N-белком. Полученное значение флуоресценции нормировали на флуоресценцию образцов, которые не подвергались нагреванию.

При фиксированной концентрации N-AF488 (40 нМ) методом термофореза были получены зависимости относительной флуоресценции (за 100% принята флуоресценция до начала термофореза) через 20 с после начала термофореза от концентрации полученных конструкций (рис. 1). Для каждого эксперимента получали четыре таких зависимости, и весь эксперимент повторяли два-три раза. По каждой кривой определяли константу диссоциации комплекса полипептидной конструкции с N-белком, ее усредняли по всем 8–12 кривым и определяли относительную ошибку ее измерения. Константы диссоциации комплексов конструкций с N-белком составили 46 ± 5 , 710 ± 260 , 350 ± 80 и 190 ± 90 нМ для конструкций TAT-Fn-N15, Fn-N15-TAT, TAT-Fn-N20 и Fn-N20-TAT соответственно. Таким образом, наилучшее сродство к N-белку наблюдается для конструкции TAT-Fn-N15. Для конструкции S10-Fn-N15 (рис. 1) константа диссоциации с N-белком составила 700 ± 270 нМ.

Для изучения взаимодействия полученных конструкций с N-белком в клетке был использован вариант клеточного анализа теплового сдви-

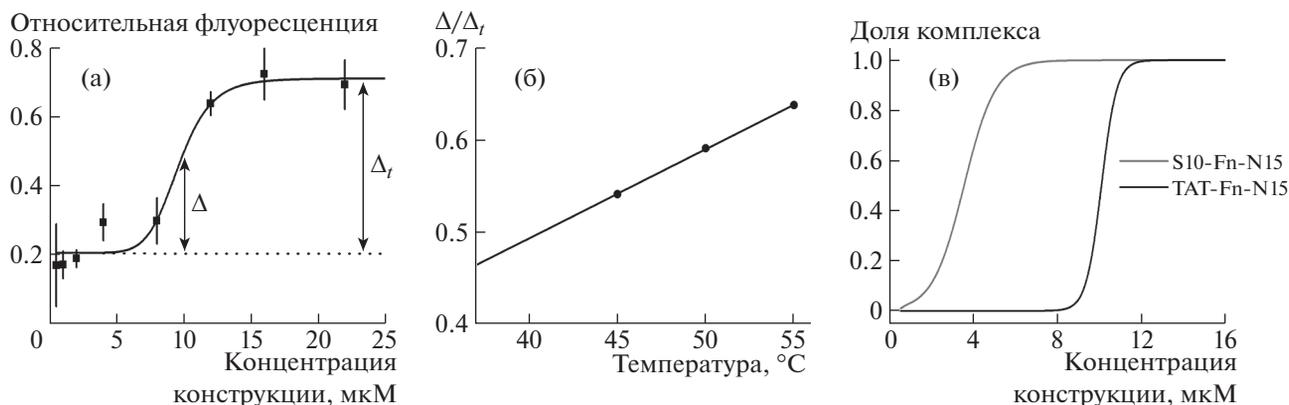


Рис. 2. (а) Зависимость относительной интенсивности флуоресценции (по отношению к флуоресценции образца, не подвергнувшегося нагреванию) от концентрации конструкции TAT-Fn-N15, полученная нагреванием 3 мин при 50°C. Кривой показана интерполяция сигмоидной зависимостью. (б) Зависимость отношения доли комплекса TAT-Fn-N15 с N-белком, Δ , к амплитуде перехода, Δ_f , от температуры при 10 мкМ TAT-Fn-N15. Прямой линией показана интерполяция экспериментальных данных до температуры 37°C. (в) Зависимости доли комплекса S10-Fn-N15 или TAT-Fn-N15 с N-белком от концентрации конструкции вне клеток при физиологических условиях.

га, в котором изменяется концентрация добавляемой полипептидной конструкции [12]. Такие зависимости были получены для конструкций TAT-Fn-N15 и S10-Fn-N15 на клетках HEK293T при разных температурах, например, 50°C (рис. 2а). Интерполяция сигмоидной кривой позволяет определить амплитуду перехода, Δ_f , и при любой концентрации конструкции – долю комплекса конструкции с N-белком при выбранной температуре, Δ/Δ_f (рис. 2а). Эту долю можно линейной зависимостью экстраполировать до температуры 37°C (рис. 2б) и тем самым получить зависимости доли комплекса конструкции с N-белком от концентрации конструкции вне клеток при физиологических температурах (рис. 2в). Для конструкций TAT-Fn-N15 и S10-Fn-N15 по полученным кривым получили, что $EC_{50} = 10.1 \pm 0.8$ и 3.5 ± 0.8 мкМ соответственно (рис. 2в).

Таким образом, из четырех полученных конструкций (два монободии и TAT-пептид на N- или C-конце) конструкция TAT-Fn-N15 обладает наибольшим сродством к N-белку вируса SARS-CoV2 (константа диссоциации 46 ± 5 нМ). Клеточным анализом теплового сдвига было показано, что эта конструкция может проникать в клетки HEK293T и взаимодействовать в них с N-белком, слитым с флуоресцентным белком mRuby3. Включение в состав конструкции вместо TAT-пептида шатл-пептида S10 [9], который содержит как улучшенный TAT-пептид, так и эндосомотический пептид, приводит к уменьшению втрое EC_{50} (рис. 2в). Несмотря на то что сродство конструкции S10-Fn-N15 к N-белку в 15 раз хуже, чем конструкции TAT-Fn-N15, это с избытком компенсируется увеличением эффективности проникновения в клетки конструкции с S10, по сравнению с конструкцией с TAT-пептидом. Следует

отметить, что ранее шатл-пептид S10 добавляли одновременно с доставляемой конструкцией, т.е. они не образовывали химической связи друг с другом [9]. В настоящей работе было показано, что S10 эффективен и в составе слитых конструкций. Однако в полученной конструкции S10 существенно ухудшает сродство монободии к N-белку. Дальнейшее повышение эффективности конструкции возможно путем повышения этого сродства, например, введением дополнительного спейсера между S10 и монободии или выбором другого монободии.

В результате проведенной работы нами было продемонстрировано, что наибольшей эффективностью взаимодействия с N-белком вируса SARS-CoV-2 в клетках HEK293T обладает конструкция S10-Fn-N15. Данная конструкция потенциально способна стать основным противовирусным препаратом, нацеленным как на SARS-CoV, так и на SARS-CoV-2.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 21-14-00130). Эксперименты были выполнены с использованием оборудования Центра коллективного пользования ИБГ РАН.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Clercq E.D., Li G. // Clin Microbiol Rev. 2016. V. 29. P. 695–747.

2. Gebauer M., Skerra A. // *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2020. V. 60. P. 391–415.
3. Surjit M., Lal S.K. // *Infect Genet Evol*. 2008. V. 8. P. 397–405.
4. Wu C., Zheng M. // *Preprints*. 2020. P. 2020020247.
5. Prajapat M., Sarma P., Shekhar N., et al. // *Indian J Pharmacol*. 2020. V. 52. P. 56.
6. Khramtsov Y.V., Ulasov A.V., Lupanova T.N. et al. // *Dokl Biochem Biophys*. 2022. V. 503. P. 90–92.
7. Liao H.-I., Olson C.A., Hwang S., et al. // *J Biol Chem*. 2009. V. 284. P. 17512–17520.
8. Reis L.G., Traini D. // *Expert Opin Drug Deliv*. 2020. V. 17. P. 647–664.
9. Krishnamurthy S., Wohlford-Lenane C., Kandimalla S., et al. // *Nat Commun*. 2019. V. 10, P. 4906.
10. Li G., Li W., Fang X., et al. // *Protein Expr Purif*. 2021. V. 186. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105908>
11. Naidu S.D., Dikovskaya D., Moore T.W., et al. // *STAR Protocols*. 2022. V. 3, P. 101265.
12. Molina D.M., Jafari R., Ignatushchenko M., et al. // *Science*. 2013. V. 341. P. 84–87.

DELIVERY OF ANTIBODY-LIKE MOLECULES, MONOBODIES, CAPABLE OF BINDING WITH SARS-COV-2 VIRUS NUCLEOCAPSID PROTEIN, INTO TARGET CELLS

Y. V. Khramtsov^a, A. V. Ulasov^a, T. N. Lupanova^a, G. P. Georgiev^a,
and Corresponding Member of the RAS A. S. Sobolev^{a,b,#}

^a *Institute of Gene Biology, RAS, Moscow, Russian Federation*

^b *Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation*

[#]*e-mail: alsobolev@yandex.ru*

Based on previous studies, there were selected two antibody-like molecules, monobodies, capable of high affinity interaction with the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein (dissociation constant of tens of nM). For delivery to target cells, genetically engineered constructs containing monobody and TAT peptide, placed either at the N- or C-terminus of the resulting polypeptide, were produced and expressed in *E. coli*. The construct with the highest affinity to the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein was revealed with the use of thermophoresis technique. Cellular thermal shift assay demonstrated the ability of this construct to interact with the nucleocapsid protein within HEK293T cells transfected with the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein fused to the mRuby3 fluorescent protein. Replacement of TAT peptide to S10 shuttle peptide, containing endosomal peptide, significantly improved the penetration of the construct into the target cells.

Keywords: SARS-CoV-2, TAT peptide, S10 shuttle peptide, nucleocapsid protein, antibody-like molecules, monobody, thermophoresis, cellular thermal shift assay