

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной и клеточной биологии
Сибирского отделения Российской академии наук

На правах рукописи

Солодков Павел Павлович

**ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА ЛАМЫ ДЛЯ ТЕРАПИИ И
ПРОФИЛАКТИКИ КОРОНАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ**

1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Таранин Александр Владимирович

Новосибирск, 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
Актуальность темы исследования	6
Степень разработанности проблемы	7
Цели и задачи исследования	7
Научная новизна работы	8
Теоретическая и практическая значимость исследования.....	8
Методология и методы исследования	9
Положения, выносимые на защиту.....	9
Степень достоверности результатов.....	10
Апробация работы.....	10
Основные публикации по теме исследования	11
Вклад автора.....	12
Структура и объем работы	13
Благодарности.....	13
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1. SARS-CoV-2.....	14
1.1.1. Характеристика	14
1.1.2. Мишень SARS-CoV-2 — рецептор ACE2	16
1.1.3. Белок S	16
1.1.4. Рецептор-связывающий домен	18
1.1.5. Механизмы инфицирования клеток.....	19
1.2. Формирование анти-SARS-CoV-2 иммунного ответа	22
1.3. Эволюция SARS-CoV-2 и возникновение новых вариантов	25
1.4. Нейтрализующие и ненейтрализующие антитела	29
1.5. Методы оценки активности антител	32
1.6. Иммунная плазма для терапии.....	33
1.7. Методы получения моноклональных нейтрализующих антител	34
1.8. Одобренные терапевтические антитела против COVID-19.....	40
1.9. Классификация антител по эпитопам RBD SARS-CoV-2.....	43
1.10. Иммунное ускользание.....	46
1.11. Широко нейтрализующие антитела	48
1.12. Однодоменные антитела	50

1.12.1. Особенности структуры	50
1.12.2. Однодоменные антитела против вирусов	53
Заключение	57
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	58
2.1. Материалы.....	58
2.1.1. Реактивы и препараты	58
2.1.2. Буферы и растворы	59
2.1.3. Культуральные среды	60
2.1.4. Экспериментальные модели	60
2.1.5. Олигонуклеотиды и векторы	61
2.1.6. Оборудование и программное обеспечение	62
2.2. Методы.....	62
2.2.1. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле	62
2.2.2. Работа со штаммами клеток <i>E. coli</i>	63
2.2.3. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции.....	63
2.2.4. Секвенирование нуклеиновых кислот	63
2.2.5. Электротрансформация	64
2.2.6. Получение рекомбинантных RBD S-белка вариантов SARS-CoV-2.....	65
2.2.7. Биотинилирование рекомбинантных RBD	66
2.2.8. Иммунизация ламы	66
2.2.9. Выделение суммарной РНК периферических В-лимфоцитов	67
2.2.10. Конструирование кДНК-библиотеки.....	68
2.2.11. Амплификация фага-хелпера VCSM13	70
2.2.12. Перестройка библиотеки в фаговую форму и ее амплификация	70
2.2.13. Аффинное обогащение фаговой библиотеки	71
2.2.14. Конкурентное иммуноаффинное обогащение фаговой библиотеки	72
2.2.15. Иммуноферментный анализ.....	73
2.2.16. Получение и очистка рекомбинантных белков в <i>E. coli</i>	75
2.2.17. Электрофорез белков в полиакриламидном геле	77
2.2.18. Конкурентный иммуноферментный анализ	77
2.2.19. Анализ конкурентного связывания RBD однодоменными антителами с использованием проточной цитофлуориметрии.....	78
2.2.20. Биослойная интерферометрия	78

2.2.21. Получение mAb человека в эукариотических клетках	80
2.2.22. Получение VHH-Fc	81
2.2.23. Получение S-псевдотипированных лентивирусов	81
2.2.24. Анализ нейтрализации S-псевдотипированного лентивируса	82
2.2.25. Анализ защитных свойств <i>in vivo</i>	82
2.2.26. Статистический анализ	83
2.2.27. Этические аспекты исследования	83
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	84
3.1. Получение и характеристика рекомбинантных однодоменных антител после иммунизации ламы RBD уханьского варианта SARS-CoV-2	84
3.1.1. Иммунизация ламы и создание библиотеки 1	84
3.1.2. Аффинная селекция VHH-клонов библиотеки 1	86
3.1.3. Нарботка и очистка однодоменных антител суббиблиотеки 1.1	87
3.1.4. Оценка блокирующих свойств однодоменных антител суббиблиотеки 1.1	88
3.1.5. Конкурентное связывание однодоменных антител суббиблиотеки 1.1	89
3.1.6. Отбор и характеристика однодоменных антител библиотеки 1 против альтернативных эпитопов	90
3.1.7. Определение кинетики взаимодействия наноантител библиотеки 1 с RBD	92
3.1.8. Получение олигомерных конструкторов на основе наноантител библиотеки 1	93
3.1.9. Нейтрализация псевдотипированного лентивируса на основе уханьского варианта S-белка SARS-CoV-2 наноантителами библиотеки 1	94
3.1.10. Нейтрализующая активность наноантител библиотеки 1 против лентивирусов, псевдотипированных мутантными вариантами S-белка SARS-CoV-2	95
3.2. Поиск широко нейтрализующих антител	96
3.2.1. Отбор VHH-клонов библиотеки 1 против варианта BA.1	96
3.2.2. Серия иммунизаций ламы и создание новой библиотеки	96
3.2.3. Аффинная селекция VHH-клонов библиотеки 2	97
3.2.4. Нарботка и очистка однодоменных антител библиотеки 2	97
3.2.5. Определение кинетики взаимодействия наноантител библиотеки 2 с RBD S-белка разных вариантов SARS-CoV-2	98
3.2.6. Получение Fc-димеров с VHH-доменами библиотеки 2	99
3.2.7. Конкурентное связывание однодоменных антител библиотеки 2	99

3.2.8. Нейтрализующая активность наноантител библиотеки 2 против лентивирусов, псевдотипированных мутантными вариантами S-белка SARS-CoV-2	101
3.3. Оценка репертуара SARS-CoV-2-специфичных VHH.....	103
3.4. Сравнение Fc-димеров наноантител с моноклональными антителами человека ...	105
3.5. Картирование эпитопов	108
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ	112
4.1. Создание библиотек и дифференциальный скрининг	112
4.2. Роль последовательной иммунизации и соматического гипермутагенеза в формировании bnAb	114
4.3. Моноклональные антитела и Fc-димеры однодоменных антител	116
4.4. Эпитопы и широта нейтрализации.....	116
4.5. Заключение	118
ВЫВОДЫ.....	119
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	120
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	123

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Инфекции остаются одной из ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире, регулярно приводя к появлению новых эпидемий, требующих срочных мер реагирования. Пандемия коронавирусной инфекции 2019 года (COVID-19, coronavirus disease 2019), обусловленная коронавирусом-2, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), стала главным инфекционным вызовом последнего десятилетия и оказала сильное негативное воздействие на социальные и экономические сферы, что подчеркивает необходимость разработки универсальных, быстро адаптируемых биотерапевтических подходов. У пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, развиваются респираторные симптомы различной степени тяжести, способные привести к летальному исходу. Ограничение социальных контактов, массовая вакцинация и формирование популяционного иммунитета способствовали снятию статуса пандемии COVID-19. Однако вирус продолжает циркулировать по всему миру и представляет смертельную опасность для иммунокомпрометированных людей. Для их защиты используется пассивная иммунизация с применением терапевтических моноклональных антител (mAb, monoclonal antibody). Однако высокая генетическая изменчивость SARS-CoV-2 приводит к появлению резистентных вариантов вируса, против которых одобренные ранее mAb уже неэффективны. В этой связи разработка средств, способных защитить от существующих и будущих штаммов вируса, остается актуальной задачей. Многообещающим направлением является создание мультиспецифичных молекул на основе вируснейтрализующих антител широкого спектра действия. Хотя данная работа сосредоточена на SARS-CoV-2 как наиболее актуальной модели, полученные результаты имеют более широкое значение: принципы дизайна, методы селекции и механизмы действия антител, продемонстрированные для SARS-CoV-2, могут быть применены и к другим респираторным и высокопатогенным вирусам, обеспечивая основу для создания универсальных платформ против будущих инфекционных угроз.

Вирус SARS-CoV-2 проникает в клетки человека посредством взаимодействия поверхностного шиповидного S-белка. Его рецептор-связывающий домен (RBD, receptor-binding domain) способен взаимодействовать с рецептором — ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2, angiotensin converting enzyme 2), который преимущественно экспрессируется на мембранах пневмоцитов 2 типа и кишечных эпителиальных клеток.

Одним из главных направлений терапии SARS-CoV-2 является разработка рекомбинантных mAb, способных нейтрализовать вирус за счет блокирования ключевых эпитопов S-белка, предотвращая его связывание с ACE2. В рамках этого направления значительное внимание

привлекают однодоменные антитела (sdAb, single-domain antibody), которые представляют собой переменные домены (VHH, variable domain of heavy-chain only antibody) антител, состоящих только из тяжелых цепей (HCAb, heavy-chain only antibody). Такие HCAb (IgG2 и IgG3 изотипов) продуцируются В-клетками верблюдовых наряду с полноразмерными антителами (IgG1 изотипа). Однодоменные антитела обладают рядом достоинств: небольшим размером, высокой стабильностью в «жестких» условиях, низкой иммуногенностью и эффективным потенциалом для мультимеризации. Благодаря этим свойствам sdAb рассматриваются как перспективные кандидаты для профилактики и терапии SARS-CoV-2, а также других высокопатогенных вирусных инфекций.

Степень разработанности проблемы

Разработка нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 привела к созданию ряда эффективных терапевтических препаратов. Однако появление новых вариантов вируса, прежде всего линии Омикрон, существенно снизило эффективность большинства ранее разработанных антител. В связи с этим особый интерес представляет поиск широко нейтрализующих антител, распознающих консервативные эпитопы коронавирусов. В последние годы активно развиваются исследования, направленные на выявление таких эпитопов и получение нацеленных на них VHH, обладающих малым размером и значительным терапевтическим потенциалом. Вместе с тем механизмы формирования широко нейтрализующих VHH и подходы к их целенаправленному получению остаются недостаточно изученными, что определяет необходимость дальнейших исследований в данном направлении.

Цели и задачи исследования

Целью данного исследования является разработка и функциональная характеристика однодоменных антител ламы, обладающих широким спектром нейтрализующей активности в отношении вариантов SARS-CoV-2.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести серию последовательных иммунизаций ламы разными мутантными вариантами RBD SARS-CoV-2, а также SARS-CoV для генерации VHH-репертуара с широкой перекрестной активностью.
2. Создать кДНК-библиотеки VHH последовательностей и провести дифференциальный скрининг нейтрализующих клонов с различной эпитопной специфичностью.
3. Оценить взаимосвязь нейтрализующих свойств VHH с кодирующими их последовательностями.

4. Картировать эпитопы полученных VHH.
5. Исследовать нейтрализующий потенциал выделенных VHH и димерных конструкций на их основе в тестах *in vitro* и *in vivo* в сопоставлении с mAb человека, полученными в рамках данного исследования.

Научная новизна работы

В работе впервые показано, что последовательная иммунизация ламы антигенами, представляющими RBD эволюционно разошедшихся коронавирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV, является эффективным подходом для получения широко нейтрализующих VHH. Установлено, что расширение спектра нейтрализации достигается как за счет аффинного созревания ранее сформированных клонов, так и за счет формирования новых VHH, распознающих консервативные эпитопы RBD. Получена и охарактеризована панель VHH, обладающих нейтрализующей активностью в отношении различных вариантов SARS-CoV-2. Выявлена связь между уровнем соматического гипермутагенеза и расширением спектра нейтрализующей активности VHH. Проведено эпитопное картирование полученных VHH и определены наиболее перспективные кандидаты для создания мультифункциональных антител нового поколения с высокой устойчивостью к иммунному ускользанию вируса. Разработан и экспериментально апробирован комплексный подход к получению широко нейтрализующих VHH, включающий последовательную иммунизацию, дифференциальный скрининг и функциональную характеристику клонов.

Теоретическая и практическая значимость исследования

Полученные результаты расширяют современные представления о механизмах формирования широко нейтрализующих антител к быстро эволюционирующим вирусам. Установленные закономерности формирования VHH-репертуара при последовательной иммунизации позволяют лучше понять роль аффинного созревания и соматического гипермутагенеза в возникновении перекрестно-реактивного противовирусного иммунитета.

Практическая значимость работы заключается в создании панели широко нейтрализующих VHH и разработке подхода к их целенаправленному получению. Выделенные VHH могут служить основой для конструирования терапевтических и профилактических препаратов нового поколения против SARS-CoV-2. Предложенная стратегия может быть использована для разработки антител широкого спектра действия против других высокоизменчивых вирусных патогенов.

Методология и методы исследования

Методологическую основу исследования составили современные представления молекулярной иммунологии, вирусологии и биотехнологии антител, согласно которым получение широко нейтрализующих антител возможно путем направленного формирования иммунного ответа на консервативные антигенные детерминанты вирусов. Исследование базировалось на концепции последовательной иммунизации различными антигенными вариантами RBD коронавирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV для индукции формирования VHH-репертуара с расширенной перекрестной специфичностью. Для достижения поставленной цели использован комплекс взаимодополняющих молекулярно-биологических, иммунологических, биохимических и вирусологических методов. Экспериментальная работа включала получение рекомбинантных вариантов RBD S-белка SARS-CoV-2, иммунизацию ламы, выделение РНК периферических В-лимфоцитов и создание библиотек VHH-последовательностей. Поиск антиген-специфичных клонов осуществляли методом фагового дисплея с применением аффинной селекции. Для характеристики полученных антител использовали иммуноферментный анализ, конкурентный иммуноферментный анализ, проточную цитометрию и биослойную интерферометрию. С помощью указанных методов определяли специфичность связывания, кинетические параметры взаимодействия антител с антигеном, а также особенности конкурентного связывания различных антител с RBD. Рекомбинантные VHH и их производные конструкции получали методами генной инженерии с последующей экспрессией в прокариотических и эукариотических клеточных системах. Очистку белков осуществляли с использованием аффинной хроматографии. Контроль качества полученных белков проводили методом электрофореза в полиакриламидном геле. Функциональную активность антител оценивали в тестах нейтрализации панели псевдотипированных лентивирусов, несущих S-белки различных вариантов SARS-CoV-2. Защитные свойства *in vivo* исследовали на сирийских хомячках. Для картирования эпитопов и определения взаимного расположения участков связывания использовали конкурентную биослойную интерферометрию. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета GraphPad Prism. Достоверность различий оценивали с применением методов статистики, включая однофакторный и двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA), а также непарный t-критерий Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Положения, выносимые на защиту

1. Широко нейтрализующие антитела могут быть индуцированы с помощью последовательной иммунизации различными вариантами RBD вирусов SARS-CoV-2 и SARS-CoV.

2. Однодоменные антитела, связывающие консервативные участки RBD классов 4 и 5, обладают наиболее широким спектром нейтрализующей активности и, в отличие от полноразмерных антител этих классов, сохраняют нейтрализующую активность в отношении поздних вариантов SARS-CoV-2.
3. Полученные SARS-CoV-2-нейтрализующие VHH, димеризованные с помощью Fc-фрагмента hIgG1, сопоставимы с традиционными mAb человека по функциональной активности *in vitro* и *in vivo*.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов обеспечивается использованием современных методов молекулярной биологии, иммунологии и вирусологии, соответствующих поставленным задачам исследования. Экспериментальные данные получены на достаточном объеме материала с применением взаимодополняющих подходов, что позволило провести независимую верификацию ключевых результатов. Специфичность, аффинность и функциональная активность VHH подтверждены несколькими независимыми методами, включая иммуноферментный анализ, биослойную интерферометрию, анализ конкурентного связывания и тесты нейтрализации псевдотипированных вирусов. Все эксперименты выполняли не менее чем в двух независимых постановках, что обеспечивало воспроизводимость полученных результатов. Защитные свойства дополнительно подтверждены в экспериментах *in vivo*. Обработка и анализ результатов выполнены с использованием современных методов статистики. Полученные данные согласуются между собой, не противоречат современным представлениям о механизмах противовирусного иммунитета и подтверждаются опубликованными результатами отечественных и зарубежных исследований.

Апробация работы

Доклады и тезисы по данной работе были представлены на следующих конференциях:

1. VIII Международная научно-практическая конференция молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio-2021», Научград Кольцово (Новосибирская область), 5–7 октября 2021 г.
2. Школа-конференция «Геномные технологии в получении вирус-нейтрализующих антител», г. Новосибирск, 9 сентября 2022 г.
3. X Международная конференция молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов «OpenBio-2023», Научград Кольцово (Новосибирская область), 26–29 сентября 2023 г.

4. Научная школа-конференция для молодых ученых «BioTop-2024», г. Новосибирск, 17–18 декабря 2024 г.
5. Научно-практическая конференция с международным участием «Генетика-2025», г. Москва, 5–7 ноября 2025 г.

Основные публикации по теме исследования

1. Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Guselnikov S.V., Baranov K.O., Belovezhets T.N., Mechetina L.V., Volkova O.Y., Najakshin A.M., Chikaev N.A., Chikaev A.N., Solodkov P.P., Larichev V.F., Gulyaeva M.A., Markhaev A.G., Kononova Y.V., Alekseyev A.Y., Shestopalov A.M., Yusubalieva G.M., Klypa T.V., Ivanov A.V., Valuev-Elliston V.T., Baklaushev V.P., Taranin A.V. / Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern // Cell Discov. Nature Publishing Group, 2021. Vol. 7, № 1. Art. 96. DOI: 10.1038/s41421-021-00340-8.
2. Solodkov P.P., Najakshin A.M., Chikaev N.A., Kulemzin S.V., Mechetina L.V., Baranov K.O., Guselnikov S.V., Gorchakov A.A., Belovezhets T.N., Chikaev A.N., Volkova O.Y., Markhaev A.G., Kononova Y.V., Alekseev A.Y., Gulyaeva M.A., Shestopalov A.M., Taranin A.V. / Serial Llama Immunization with Various SARS-CoV-2 RBD Variants Induces Broad Spectrum Virus-Neutralizing Nanobodies // Vaccines. 2024. Vol. 12, № 2. Art. 129. DOI: 10.3390/vaccines12020129.
3. Guselnikov S.V., Baranov K.O., Kulemzin S.V., Belovezhets T.N., Chikaev A.N., Murasheva S.V., Volkova O.Y., Mechetina L.V., Najakshin A.M., Chikaev N.A., Solodkov P.P., Sergeeva M.V., Smirnov A.V., Serova I.A., Serov O.L., Markhaev A.G., Kononova Y.V., Alekseev A.Y., Gulyaeva M.A., Danilenko D.M., Battulin N.R., Shestopalov A.M., Taranin A.V. / A potent, broadly neutralizing human monoclonal antibody that efficiently protects hACE2-transgenic mice from infection with the Wuhan, BA.5, and XBB.1.5 SARS-CoV-2 variants // Front. Immunol. 2024. Vol. 15. Art. 1442160. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1442160.
4. Баранов К.О., Беловежец Т.Н., Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Гусельников С.В., Кулемзин С.В., Мечетина Л.В., Наякшин А.М., Солодков П.П., Таранин А.В., Чикаев А.Н., Чикаев Н.А. Однодоменное антитело ламы H5 и его производное H5-Fc, специфически связывающие RBD-домен S-белка вируса SARS-CoV-2, обладающие вируснейтрализующей активностью. Патент на изобретение №2793967. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 11.04.2023.
5. Баранов К.О., Беловежец Т.Н., Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Гусельников С.В., Кулемзин С.В., Мечетина Л.В., Наякшин А.М., Солодков П.П., Таранин А.В., Чикаев А.Н., Чикаев Н.А. Моноклональное антитело iC1 и его антигенсвязывающий фрагмент, селективно связывающие рецептор-связывающий домен Spike-белка вируса SARS-CoV-2, обладающие

вируснейтрализующей активностью. Патент на изобретение №2817696. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 18.04.2024.

6. Баранов К.О., Беловежец Т.Н., Волкова О.Ю., Горчаков А.А., Гусельников С.В., Кулемзин С.В., Мечетина Л.В., Наякшин А.М., Солодков П.П., Таранин А.В., Чикаев А.Н., Чикаев Н.А. Моноклональное антитело iC2 и его антигенсвязывающий фрагмент, селективно связывающие рецепторсвязывающий домен Spike-белка вируса SARS-CoV-2, обладающие вируснейтрализующей активностью. Патент на изобретение №2817697. Зарегистрирован в Государственном реестре изобретений Российской Федерации 18.04.2024.

Вклад автора

Автор участвовал во всех этапах исследования, включая планирование и выполнение экспериментальных работ, анализ и интерпретацию полученных результатов, подготовку публикаций. Автором самостоятельно проведены анализ литературы, статистическая обработка данных, написание текста диссертации, конструирование фаговых библиотек, аффинная селекция антител методом фагового дисплея, отбор и характеристика отдельных клонов, иммуноферментный анализ, получение плазмидных конструкций и рекомбинантных белков VNN и их димеров, а также исследование кинетики взаимодействия антител с антигенами. Автором самостоятельно получена часть рекомбинантных белков RBD SARS-CoV-2, остальные белки получены Н.А. Чикаевым (ИМКБ СО РАН). Часть генетических конструкций и рекомбинантных mAb получена автором лично, остальные конструкции и белки — А.А. Горчаковым, С.В. Гусельниковым и К.О. Барановым (ИМКБ СО РАН). Часть экспериментов по эпитопному картированию выполнена автором, остальные — К.О. Барановым. Иммунизацию ламы и отбор образцов крови проводили совместно с Л.В. Мечетиной (ИМКБ СО РАН), конструирование библиотек — совместно с Н.А. Наякшиным (ИМКБ СО РАН). Отбор отдельных В-клеток осуществляли С.В. Гусельников и сотрудники лаборатории иммуногенетики и лаборатории инженерии антител ИМКБ СО РАН. Трансфекции и наработку белковых конструкций в эукариотических клетках проводили О.Ю. Волкова, Т.Н. Беловежец и А.Н. Чикаев (ИМКБ СО РАН). Суррогатный тест блокирования методом проточной цитометрии выполняли С.В. Кулемзин и Т.Н. Беловежец (ИМКБ СО РАН). Аффинную селекцию библиотеки против варианта WA.1 проводил Н.А. Чикаев. Получение плазмид, кодирующих фрагменты S-белка, псевдотипированных вирусов и эксперименты по их нейтрализации выполняли сотрудники ИМКБ СО РАН: А.А. Горчаков, А.М. Наякшин, С.В. Гусельников, С.В. Кулемзин, Т.Н. Беловежец, С.В. Мурашева, А.Н. Чикаев, П.Ю. Десюкевич. Эксперименты *in vivo* на сирийских хомячках проводили А.Г. Мархаев, Ю.В. Кононова, А.Ю. Алексеев, М.А. Гуляева и А.М.

Шестопапов (ФИЦ ФТМ). Работы выполнены под руководством А.В. Таранина (ИМКБ СО РАН).

Структура и объем работы

Диссертация изложена на 151 странице и включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результаты, обсуждение, выводы и список литературы. Работа иллюстрирована 44 рисунками и 5 таблицами. Библиографический список содержит 312 источников.

Благодарности

Автор благодарит А.М. Наякшина, А.В. Таранина и весь коллектив лаборатории иммуногенетики и лаборатории инженерии антител ИМКБ СО РАН за помощь в проведении экспериментов, ценные советы и переданный опыт; сотрудников ФИЦ ФТМ за проведение тестов *in vivo*; семью и друзей за поддержку.

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки России, грант № 075-15-2021-1086 (ЕГИСУ НИОКТР № 122031000036-2).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. SARS-CoV-2

1.1.1. Характеристика

Коронавирусы представляют собой обширную и генетически разнообразную группу вирусов, способных инфицировать широкий спектр животных. В семействе *Coronaviridae* выделяют 4 рода: *Alphacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gammacoronavirus* и *Deltacoronavirus* [1]. Известно, что только альфа- и бета-коронавирусы способны инфицировать людей, что приводит к различным патологиям, варьирующимся от поражений верхних дыхательных путей, типичных для простуды, до опасных для жизни заболеваний нижних дыхательных путей. В 2002 и 2012 гг. соответственно были идентифицированы два высокопатогенных коронавируса зоонозного происхождения — коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV, severe acute respiratory syndrome-related coronavirus), впервые выявленный в провинции Гуандун (КНР), и коронавирус, вызывающий ближневосточный респираторный синдром (MERS-CoV, Middle East respiratory syndrome-related coronavirus), впервые выявленный в Саудовской Аравии, вызвавшие вспышки тяжелых острых респираторных заболеваний [2]. Эти случаи привлекли внимание к коронавирусам как к потенциально опасным возбудителям новых инфекционных заболеваний и обозначили их как серьезную угрозу для общественного здравоохранения в XXI веке. В конце 2019 г. в городе Ухань (КНР) был выявлен новый коронавирус, получивший обозначение SARS-CoV-2, который стал причиной вспышки атипичной вирусной пневмонии. Из-за высокой контагиозности это инфекционное заболевание, впоследствии получившее название COVID-19, в кратчайшие сроки распространилось по всему миру. По числу зарегистрированных случаев инфицирования и масштабам географического распространения SARS-CoV-2 значительно превзошел предыдущие коронавирусы SARS-CoV и MERS-CoV. Пандемия COVID-19 и ее глобальные социальные и экономические разрушительные последствия ознаменовали третье зоонозное внедрение высокопатогенного коронавируса в человеческую популяцию.

Вирус SARS-CoV-2 является представителем рода бета-коронавирусов, подрода сарбековирусов, к которым также относится SARS-CoV. Его геном представлен положительной одноцепочечной РНК длиной около 30 т.п.н. [3]. Как и у других коронавирусов, гены SARS-CoV-2 подразделяются на три группы: неструктурные, структурные и вспомогательные. Геномная РНК SARS-CoV-2 включает 14 открытых рамок считывания (ORF) и кодирует 29 белков (Рисунок 1) [4]. Две основные ORF — ORF1a и ORF1b — охватывают две трети генома. Трансляция ORF1a приводит к синтезу полипротеина 1a (pp1a). С частотой 0,25–0,75 в области 3'-конца ORF1a происходит запрограммированный рибосомный сдвиг рамки считывания на –1,

который позволяет рибосоме продолжить чтение в ORF1b и образовать удлинённый полипротеин 1ab (pp1ab) [5]. Этот сдвиг стимулируется трехстеблевым псевдоузлом, известным как элемент стимуляции сдвига рамки (FSE, frameshift stimulatory element). Этот элемент содержит шпильки и располагается за «скользящей» последовательностью UUUAAAC. Если сдвиг рамки не происходит, стоп-кодон в стебле 1 приводит к терминации трансляции. В случае же успешного -1 сдвига трансляция продолжается, что обеспечивает синтез pp1ab, удлинённого примерно на 2700 аминокислотных остатков (АО).

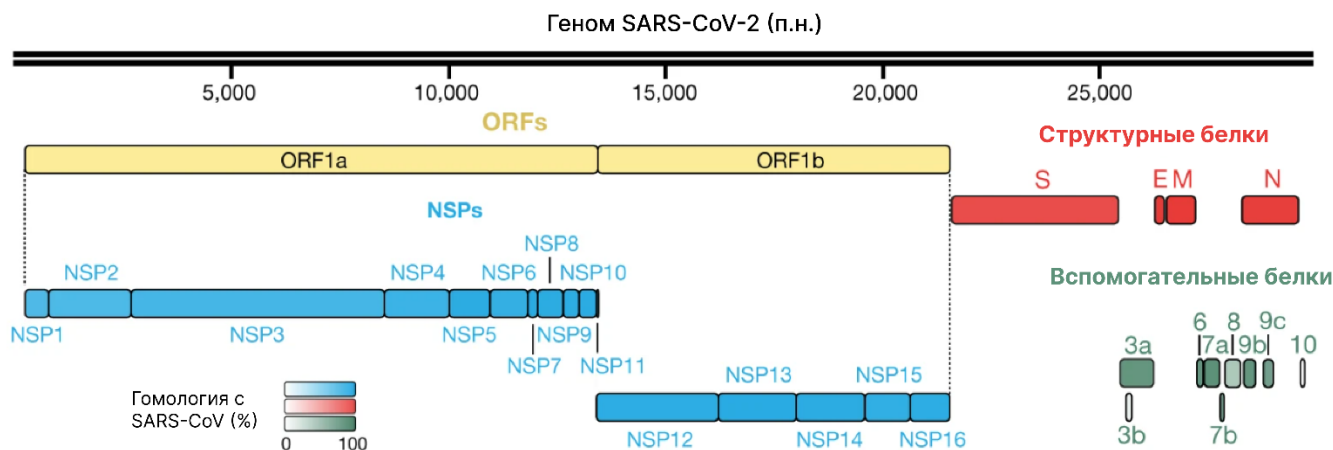


Рисунок 1. Структура генома SARS-CoV-2 ([4], с изменениями)

Геном SARS-CoV-2 кодирует 2 цистеиновые протеазы: папаин-подобную протеазу (PLpro), или NSP3, и 3C-подобную протеазу (3CLpro), или NSP5. После процессинга pp1a и pp1ab вирусными протеазами PLpro и 3CLpro образуются неструктурные белки (NSP1–16), которые играют важную роль в транскрипции и репликации вируса. Оставшаяся треть генома на 3'-конце имеет перекрывающиеся ORF, кодирующие четыре основных структурных белка: белок шипа (S), мембранный белок (M), белок оболочки (E) и белок нуклеокапсида (N); а также ряд генов (ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF9b, ORF9c и ORF10), которые кодируют вспомогательные белки. Геном SARS-CoV-2 во многом схож с геномом SARS-CoV, однако их 3'-области различаются: у SARS-CoV-2 присутствуют ORF3b, ORF8 и ORF10, для которых выявлена лишь ограниченная гомология с SARS-CoV [6].

Белок M важен для включения основных вирусных компонентов в новые вирионы во время морфогенеза; белок N отвечает за упаковку вирусного генома; белок E образует ионный канал в вирусной мембране и участвует в сборке и отпочковывании вируса; белок S играет центральную роль в проникновении вируса в клетку-хозяина. Вспомогательные белки не имеют важных функций в репликации и не составляют основу структуры вируса, однако их продукты могут модулировать врожденный или адаптивный иммунный ответ хозяина и играть важную роль в патогенности вируса.

1.1.2. Мишень SARS-CoV-2 — рецептор ACE2

При вирусной инфекции SARS-CoV-2 может внедрить свой геном в клетку-хозяина двумя основными путями: через эндосомы или посредством прямого слияния вирусной оболочки с мембраной клетки. Этот процесс опосредован связыванием S-белка вируса с ACE2, расположенным на поверхности клетки. Аффинность S-белка уханьского варианта SARS-CoV-2 к ACE2 в 20 раз выше ($K_D \approx 15$ нМ), чем у S-белка SARS-CoV ($K_D \approx 300$ нМ) [7]. Предполагается, что именно эта особенность способствует более высокой контагиозности нового коронавируса.

Рецептор ACE2 представляет собой интегральный мембранный белок типа I, карбоксипептидазу из 805 АО, которая удаляет одну аминокислоту с С-конца своих субстратов [8]. Он экспрессируется преимущественно в эпителиальных клетках легких и кишечника, а также в меньшей степени — в почках, сердце, жировой ткани, мужских и женских репродуктивных органах [9]. Белок ACE2 состоит из двух основных структурных частей: N-концевого металлопептидазного домена, содержащего цинксвязывающий мотив HEXXH в каталитическом центре, который гомологичен ангиотензинпревращающему ферменту (ACE, angiotensin converting enzyme); и С-концевого фрагмента, включающего трансмембранный домен, гомологичный коллектрину. Являясь важным компонентом ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, ACE2 в норме выполняет ключевую функцию, катализируя превращение ангиотензина I и ангиотензина II, образующихся под действием ренина и ACE, в ангиотензин 1-9 и ангиотензин 1-7 соответственно [10].

Подобно ACE2, для ряда других коронавирусов облигатными рецепторами также служат протеазы: например, дипептидилпептидаза-4 (DPP4, также известная как CD26) для MERS-CoV и аминопептидаза N (APN) для HCoV-229E [11, 12]. Примечательно, что каталитические сайты этих рецепторов и вирус-связывающие участки пространственно разделены, и ферментативная активность не требуется для связывания вируса. В частности, низкомолекулярные ингибиторы каталитического центра ACE2 не препятствуют инфицированию клеток SARS-CoV [13]. Тем не менее установлено, что снижение экспрессии ACE2 в результате инфицирования SARS-CoV усугубляет течение заболевания за счет нарушения работы ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Аналогичный механизм предполагается и для SARS-CoV-2, поскольку оба вируса используют ACE2 в качестве рецептора по сходному принципу [14].

1.1.3. Белок S

Белок S вируса SARS-CoV-2 является тримером, а каждый мономер состоит примерно из 1200 АО, формирующих две субъединицы, S1 и S2 (Рисунок 2, А) [15]. Субъединица S1 включает RBD, N-концевой домен (NTD, N-terminal domain), а также 2 С-концевых домена (CTD, C-terminal domain) — CTD1 и CTD2. Домен RBD представлен пятицепочечным

антипараллельным β -листом, фланкированным с обеих сторон короткими α -спиралями. Из его ядра выступает рецептор-связывающий мотив (RBM, receptor-binding motif), соединяющий тяжи $\beta 4$ и $\beta 5$ и формирующий колыбелеобразную структуру, которая обеспечивает связывание с рецептором. Участок RBM (АО 436–507) стабилизирован дисульфидной связью и не обладает регулярной вторичной структурой, за исключением двух небольших β -листов [16].

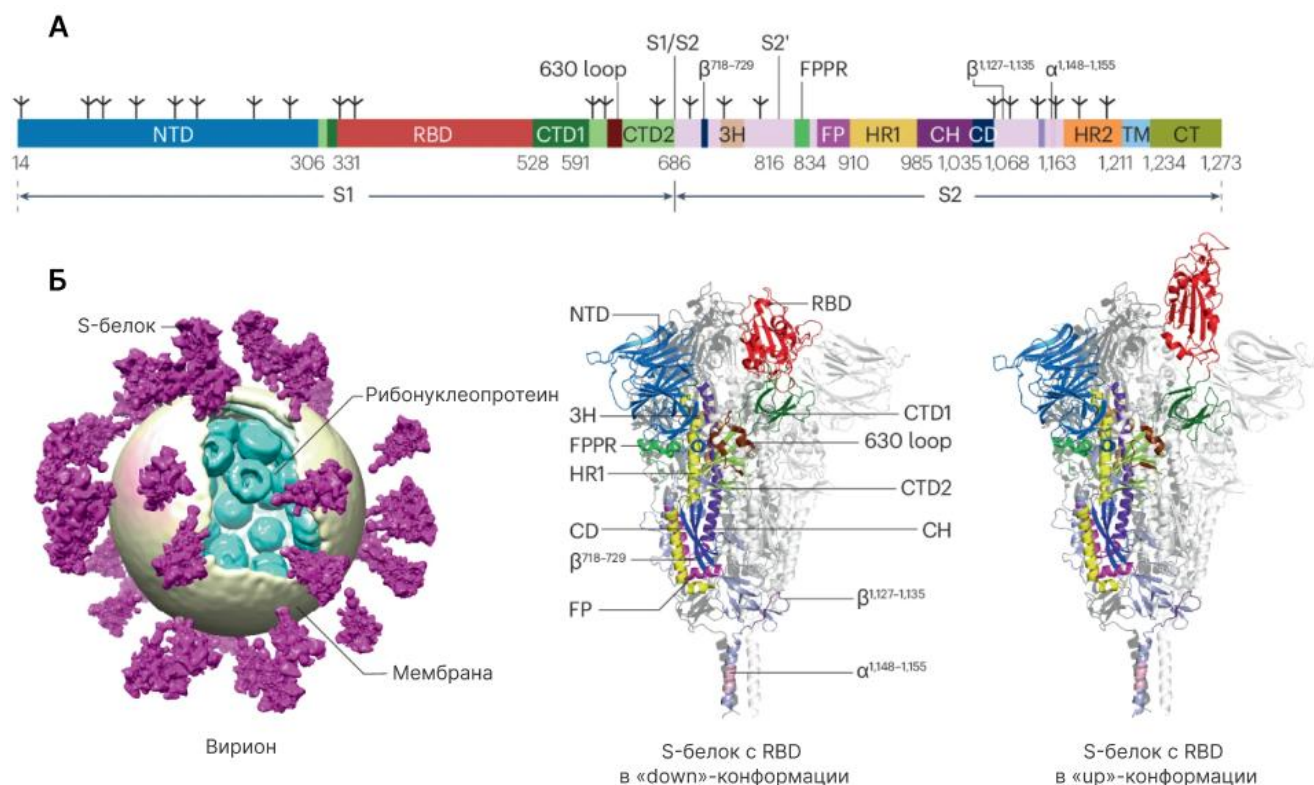


Рисунок 2. А. Схема последовательности S-белка SARS-CoV-2. **Б.** Криоэлектронная томографическая реконструкция инактивированного вириона SARS-CoV-2 (EMDB: EMD-30430) и криоэлектронная микроскопия (крио-ЭМ) структур полноразмерного тримера белка S в конформации три RBD «down» (PDB: 7KRQ23) и в конформации один RBD «up» (PDB: 7KRR23); 630 loop — петля 630 АО; S1/S2 — сайт расщепления S1/S2; S2' — сайт расщепления S2'; β 718–729 — β -тяж 718–729 АО; 3H — трехспиральный сегмент; FPPR проксимальная область FP; β 1,127–1,135 — β -тяж 1127–1135 АО; α 1,148–1,155 — α -спираль 1148–1155 АО; древовидные символы — гликаны ([15], с изменениями)

В составе S-тримера домен RBD способен принимать два конформационных состояния: закрытое (нижнее, «down») и открытое (верхнее, «up»). В «down»-конформации углы RBD ориентированы к центральной полости тримера, экранируя рецептор-связывающие участки. В «up»-конформации RBD совершает шарнироподобное движение, экспонируя детерминантные области для взаимодействия с рецептором ACE2 на мембране клетки-хозяина. При этом состояние «up» считается менее стабильным по сравнению с состоянием «down» (Рисунок 2, Б).

Домен NTD содержит галектиноподобную складку, включающую карман для связывания сахаров, а также куполообразную надстройку на вершине. Предполагается, что NTD участвует в

распознавании углеводных фрагментов на ранних этапах прикрепления и играет значимую роль в переходе белка S в новую конформацию.

Субъединица S2 (стебель) включает в себя различные α -спиральные мотивы вторичной структуры: пептид слияния (FP, fusion peptide), два гептадных повтора (HR, heptad repeat) — HR1 и HR2, центральную спираль (CH, central helix), соединительный домен (CD, connector domain), стволовую спираль (SH, stem helix), трансмембранный домен (TM, transmembrane domain) и цитоплазматический хвост (CT, cytoplasmic tail). Область HR1 формирует основной спиральный пучок субъединицы S2, тогда как область HR2 остается гибкой до слияния мембран вируса и клетки-хозяина. Пептид FP представлен коротким гидрофобным сегментом.

1.1.4. Рецептор-связывающий домен

Переход RBD из состояния «down» в состояние «up» определяется внутренней подвижностью тримера, ослаблением междоменных контактов и влиянием гликанового окружения. Показано, что открытие может происходить вследствие термических флуктуаций, тогда как связывание ACE2 преимущественно стабилизирует уже открытые или частично открытые состояния [17]. Существенную роль в этом процессе играет гликан N343, функционирующий как «гликановый затвор» (glycan gate). Он образует транзиторные контакты с рецептор-связывающим мотивом и тем самым облегчает переход RBD через промежуточные состояния в рецептор-доступную конформацию [18, 19].

В открытом состоянии RBD формирует обширный интерфейс связывания с ACE2: в этом взаимодействии участвуют более 16 АО со стороны RBD и 21 АО со стороны рецептора [20]. Межмолекулярный контакт преимущественно обеспечивается гидрофильными взаимодействиями, включая водородные связи и солевые мостики [7]. Таким образом, переход RBD в состояние «up» не только повышает доступность рецептор-связывающего участка, но и создает структурные условия для формирования устойчивого комплекса RBD-ACE2.

Обратный переход в состояние «down» является энергетически более выгодным и сопровождается восстановлением междоменных взаимодействий, характерных для закрытой формы. Таким образом, конформационная динамика RBD представляет собой обратимый процесс, обеспечивающий баланс между доступностью рецептора и его конформационной маскировкой [17]. Следует также отметить, что на поверхности вириона SARS-CoV-2 могут одновременно присутствовать как префузионные (до слияния), так и постфузионные (после слияния) формы S-белка, причем их относительное содержание может варьировать [21].

Мутации в RBD способны существенно изменять это равновесие, влияя на вероятность открытия, устойчивость комплекса RBD-ACE2 и антигенные свойства S-белка. Для линии Омикрон показано, что совокупность аминокислотных замен изменяет конформационный

профиль RBD, что связывают с адаптацией одновременно к более эффективному рецепторному взаимодействию и иммунному уклонению [22, 23].

В одном из исследований было показано, что S-белок содержит «карман», связывающий молекулу линолевой кислоты — жирной кислоты, участвующей во многих клеточных функциях, включая воспалительные реакции и развитие иммунного ответа [24]. Связывание линолевой кислоты способствует стабилизации RBD в конформации «down». Обнаружено четыре молекулярных фактора, которые опосредуют связывание линолевой кислоты с SARS-CoV-2: консервативный гидрофобный карман; спираль, расположенная на входе в карман; АО, предварительно расположенные для взаимодействия с главной карбоксильной группой линолевой кислоты и менее компактно упакованные RBD в апо-форме. По-видимому, одна или несколько из этих четырех архитектурных предпосылок часто отсутствуют в структурах S-белка. Связывание линолевой кислоты с S-белком вызывает блокирование гидрофильного якоря и уплотнение тримера RBD.

1.1.5. Механизмы инфицирования клеток

Существует два способа проникновения SARS-CoV-2 в клетки: 1) через слияние мембран после активации сериновыми протеазами, например TMPRSS2 — «ранний» путь; 2) через эндосомно-лизосомные компартменты, включая процессинг лизосомальными катепсинами — «поздний» путь (Рисунок 3) [25, 26].

Вклад каждого способа проникновения в определенном типе клеток во многом зависит от экспрессии протеаз, в частности TMPRSS2. Когда экспрессируется TMPRSS2 или другие сериновые протеазы, предпочтительным является первый путь раннего входа, тогда как в отсутствие данных протеаз проникновение происходит по второму пути, который включает эндоцитоз и активацию катепсином L [27].

В процессе слияния S-белок проходит через три конформационных состояния: 1) нативное префузионное состояние, за которым следует 2) промежуточное состояние до формирования шпильки и 3) постфузионное состояние шпильки после слияния мембран.

Четыре домена S1 (NTD, RBD, CTD1, CTD2) в префузионной конформации экранируют S2, где HR1 формирует изогнутый спиральный пучок, направленный обратно к мембране вируса. Три RBD S-белка образуют его апикальную часть. Спираль на N-конце ACE2 взаимодействует с внешней поверхностью RBM в субъединице S1. Это взаимодействие формирует сеть из 14 водородных связей и одного солевого мостика [23]. Связывание ACE2 с RBD способствует стабилизации RBD в конформации «up», инициации отсоединения субъединицы S1, которое катализируется протеазами хозяина, такими как фурин, TMPRSS2 и катепсин B/L, и, в конечном итоге, переходу S-белка в постфузионную конформацию [21].

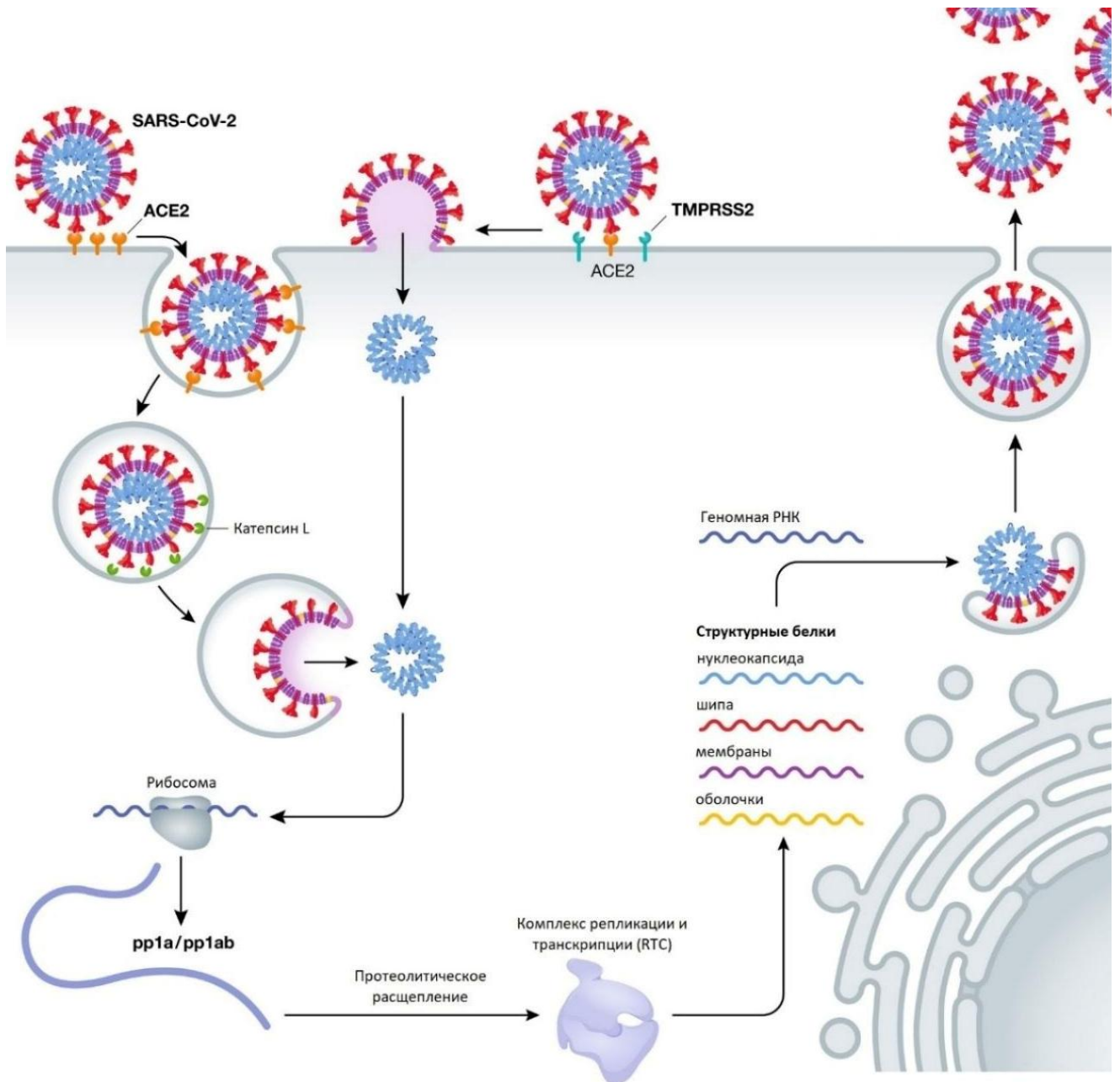


Рисунок 3. Жизненный цикл SARS-CoV-2 ([25], с изменениями)

Для активации слияния мембран необходим процесс предварительного протеолитического расщепления S-белка на двух участках. Расщепление первого участка — на границе S1/S2 фурином приводит к отсоединению субъединицы S1 от S2, после чего S2 претерпевает каскад рефолдинговых событий, формируя стабильный и удлиненный тример постфузионного состояния (Рисунок 4) [28].

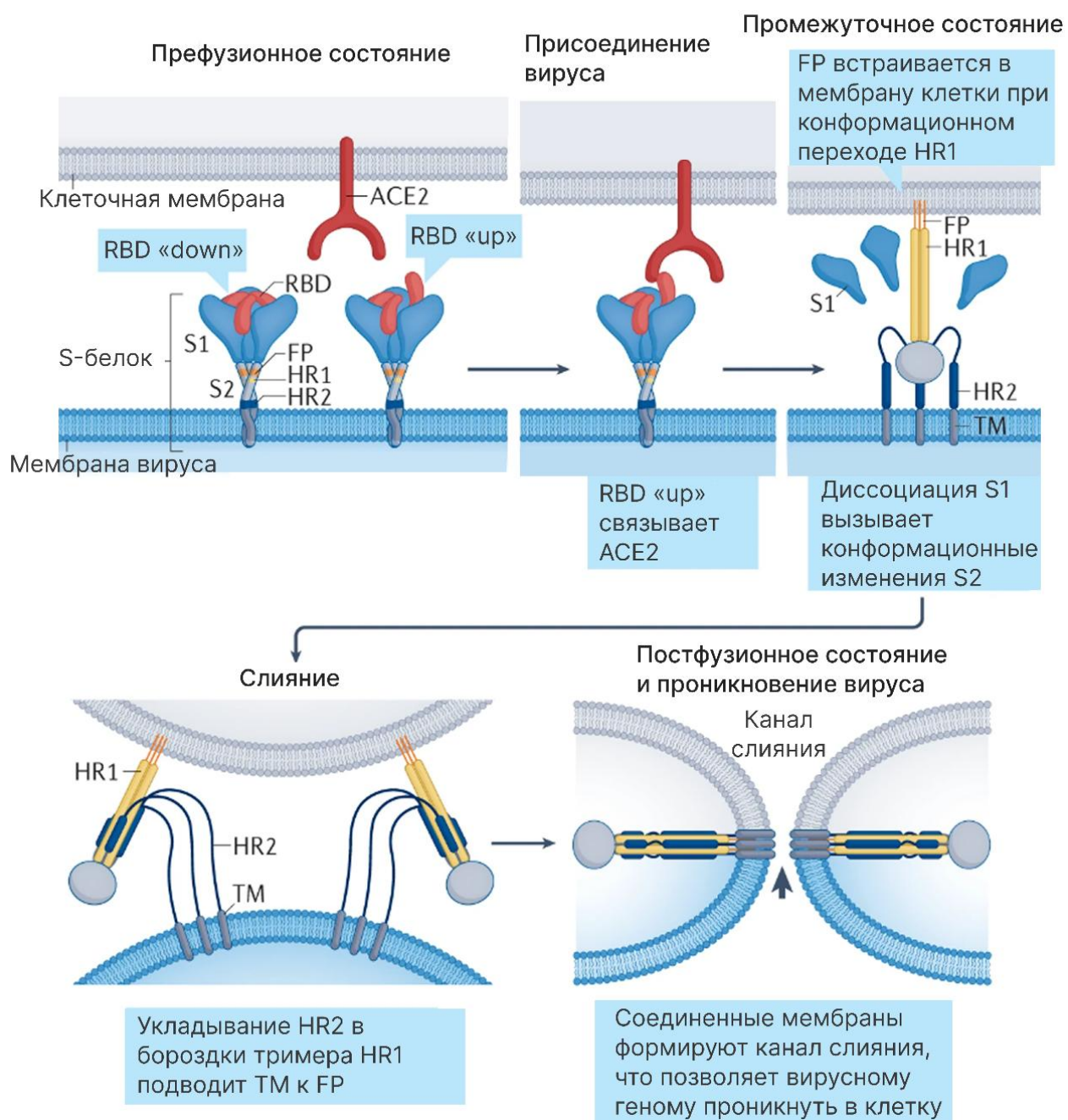


Рисунок 4. Механизм проникновения SARS-CoV-2 в клетку-мишень, «ранний» путь ([28], с изменениями)

После связывания S-белка с рецептором ACE2 протеаза TMPRSS2 дополнительно расщепляет субъединицу S2 по сайту S2', активируя FP. На последующих стадиях три спирали HR1 тримерной субъединицы S2 взаимодействуют с парными спиралями HR2, формируя стабильный шестиспиральный пучок. В данной структуре три спирали HR2 антипараллельно укладываются в гидрофобные бороздки ядра тримера HR1. Такое конформационное перестроение способствует встраиванию FP в мембрану клетки-хозяина, с последующим слиянием вирусной и клеточной мембран с помощью TM, после чего вирусная РНК, покрытая

белком N, высвобождается в цитоплазму клетки. В цитоплазме вирус задействует клеточные механизмы хозяина, а также собственные ферменты для репликации генома.

1.2. Формирование анти-SARS-CoV-2 иммунного ответа

Легочные эпителиальные клетки относятся к числу первых клеточных элементов врожденного иммунитета, подвергающихся инфицированию SARS-CoV-2. В ответ на вирусную инвазию они секретируют интерлейкин-8 (IL-8), выполняющий функцию хемоаттрактантного цитокина для нейтрофилов и Т-лимфоцитов. Альвеолярные макрофаги и нейтрофилы, наряду с легочными эпителиальными клетками, инициируют ранний врожденный иммунный ответ на вирус [29].

Иммунные клетки распознают вторгшиеся вирусы по патоген-ассоциированным молекулярным паттернам (PAMP, pathogen-associated molecular patterns), которые взаимодействуют с паттерн-распознающими рецепторами (PRR, pattern recognition receptors), локализованными на поверхности или внутри иммунных клеток, что приводит к их активации и запуску противовирусного ответа. Для коронавирусов PAMP представлены вирусной геномной РНК и промежуточными продуктами репликации, в том числе двухцепочечной РНК. Эти структуры распознаются PRR, включая эндосомальные толл-подобные рецепторы (TLR, toll-like receptors), в частности TLR7 и TLR3, а также цитозольные РНК-сенсоры, такие как ген I, индуцируемый ретиноевой кислотой (RIG-I), и ген 5, ассоциированный с дифференцировкой меланомы (MDA5) [30].

Эндосомальный рецептор TLR7, экспрессируемый в моноцитах, макрофагах и дендритных клетках, распознает одноцепочечную вирусную РНК, что приводит к активации ряда сигнальных путей и транскрипционных факторов (TF, transcription factor), включая сигнальный путь янус-киназ и активаторов транскрипции (JAK-STAT), ядерный фактор каппа В (NF-κB), активаторный белок-1 (AP-1), а также факторы регуляции интерферонового ответа IRF3 и IRF7 [31]. Активация указанных сигнальных каскадов в инфицированных клетках сопровождается усиленной продукцией провоспалительных цитокинов, таких как IL-1, IL-6, моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1), фактор некроза опухоли (TNF-α), макрофагальный воспалительный белок-1 альфа (MIP-1A), а также интерфероны I типа (IFN-I) [32, 33].

Кроме того, IL-8, продуцируемый легочными эпителиальными клетками, обеспечивает быстрое привлечение нейтрофилов в очаг инфекции, где они реализуют противовирусную активность посредством различных механизмов, включая образование внеклеточных ловушек нейтрофилов, развитие окислительного взрыва и синтез антимикробных пептидов, таких как дефенсины [34].

Клинические исследования пациентов с COVID-19, проведенные в Ухане, выявили увеличение общего числа нейтрофилов, повышение сывороточных уровней интерлейкина-6 (IL-6) и С-реактивного белка (CRP), а также снижение количества лимфоцитов [35]. При этом нейтрофилия и лимфопения тесно коррелировали с тяжестью течения заболевания и летальным исходом [36]. У пациентов, нуждающихся в интенсивной терапии, также отмечено повышение в плазме концентраций ряда цитокинов врожденного иммунитета, включая MCP-1, TNF- α , индуцируемый интерфероном γ белок-10 (IP-10) и MIP-1A [37].

Аналогично COVID-19, раннее повышение уровней провоспалительных цитокинов в сыворотке крови наблюдалось при инфекциях SARS-CoV и MERS-CoV, что указывает на возможное сходство механизмов тяжелого течения заболеваний, ассоциированных с развитием цитокинового шторма [38, 39]. Помимо цитокинового шторма, значимую роль в патогенезе и прогрессировании COVID-19 играют дисрегуляция иммунного ответа и синдром активации макрофагов [40, 41]. Установлено, что выраженное повреждение легочной ткани и развитие тяжелой пневмонии у пациентов с осложненными формами COVID-19 в большей степени обусловлены гипервоспалительной реакцией [42].

Адаптивная иммунная система, также называемая приобретенной или специфической, обеспечивает антиген-специфический ответ на патогены с формированием защитного иммунитета. Она включает два основных компонента: клеточный иммунитет, опосредованный Т-лимфоцитами, и гуморальный иммунитет, опосредованный В-лимфоцитами, продуцирующими антитела [43].

При вирусных инфекциях эффективный адаптивный иммунный ответ имеет решающее значение для элиминации вируса из организма хозяина, предотвращения тяжелого течения заболевания и обеспечения выздоровления пациентов [44]. В этом контексте ключевую роль играют Т-хелперные клетки (Th, T helper cells; CD4⁺ Т-лимфоциты), координирующие адаптивный иммунный ответ, инициируемый после вирусной инфекции [45]. После распознавания вируса антигенпрезентирующими клетками (АПК), процессинга и представления вирусных антигенов CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам, АПК формируют специфическое цитокиновое микроокружение, определяющее направленность дифференцировки и функциональной активности Т-клеток [46]. Т-хелперные клетки участвуют в продукции широкого спектра цитокинов, обеспечивающих рекрутирование иммунных клеток, а также активацию Т-киллеров и В-клеток. В свою очередь, цитотоксические Т-лимфоциты (CTL, cytotoxic T lymphocytes; Т-киллеры; CD8⁺ Т-клетки) играют ключевую роль в элиминации инфицированных клеток посредством высвобождения цитотоксических гранул, содержащих перфорины и гранзимы [47].

Взаимодействие Т-хелперных клеток, включая фолликулярные Т-хелперные клетки (Tfh, T follicular helper cells), с В-лимфоцитами приводит к индукции генерации вирус-специфических

антител. Антитела выполняют функцию блокирования проникновения патогенов в клетки, а также вызывают агглютинацию свободных вирусных частиц и уничтожение клеток, инфицированных вирусами [48]. Кроме того, антитела способны взаимодействовать с эффекторными компонентами врожденного иммунитета, включая фагоциты, НК-клетки и систему комплемента, обеспечивая функциональную связь между врожденным и адаптивным иммунитетом [49]. Контакт рецептора В-клеток (BCR, B cell receptor) с соответствующими антигенами инициирует активацию В-лимфоцитов и их дифференцировку в плазмобласты и плазматические клетки, секретирующие антитела [50]. После взаимодействия с антигеном наивные В-клетки мигрируют в герминативные (зародышевые) центры фолликулов вторичных лимфоидных органов, таких как селезенка и лимфатические узлы. В герминативных центрах активированные В-клетки пролиферируют, проходят рекомбинацию вариабельных генных сегментов и введение соматических мутаций, взаимодействуя с Т-лимфоцитами и антигенами [51–53]. В результате формируется чрезвычайно разнообразный репертуар прошедших класс-переключение антител с повышенной аффинностью, кодируемый в популяциях долгоживущих плазматических клеток и В-клеток памяти. Исследование аспириатов дренирующих лимфатических узлов у вакцинированных лиц показало, что антигены S-белка сохраняются в герминативных центрах до восьми недель после вакцинации [54].

Продукция антител и сероконверсия происходят в течение первых двух недель после появления симптомов COVID-19 [55]. Как и при других вирусных инфекциях, иммуноглобулин М (IgM) является ранним маркером иммунного ответа и циркулирует непродолжительное время, тогда как иммуноглобулин G (IgG) обеспечивает более длительную и эффективную защиту от SARS-CoV-2. Соответственно, антитела класса G играют значимую роль в контроле инфекции и выздоровлении пациентов [44, 56]. Показано, что для мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC, peripheral blood mononuclear cells) в фазе реконвалесценции наблюдается снижение количества наивных В-клеток при одновременном увеличении числа плазматических клеток [57]. Ряд исследований демонстрирует, что высокие титры SARS-CoV-2-специфических антител ассоциированы с более выраженной вируснейтрализующей активностью *in vitro* и обратно коррелируют с вирусной нагрузкой у инфицированных пациентов [58–60].

У пациентов с тяжелым течением COVID-19 ранний врожденный иммунный ответ характеризуется задержкой и сниженной эффективностью, что приводит к недостаточному контролю вирусной репликации в начальной фазе инфекции [61]. В результате адаптивный иммунный ответ формируется уже на фоне высокой вирусной нагрузки и продолжающегося повреждения тканей [62]. Запаздывающая генерация вирус-специфических антител ассоциируется с прогрессированием тяжелых форм заболевания, тогда как более ранний гуморальный ответ коррелирует с эффективным подавлением инфекции [63, 64].

1.3. Эволюция SARS-CoV-2 и возникновение новых вариантов

Уже в течение первых месяцев после первоначального выявления возбудителя COVID-19 была зафиксирована и стремительно распространилась по всему миру линия SARS-CoV-2, характеризующаяся наличием мутации D614G в S-белке [65]. Показано, что данная мутация индуцирует изменение конформационного состояния S-белка в сторону формы, обладающей более высокой аффинностью к рецептору ACE2, что, в свою очередь, повышает вирусную приспособленность [66]. Конформационная стабильность, обеспечиваемая мутацией D614G, послужила основой для последующего накопления от восьми до одиннадцати дополнительных мутаций и делеций в S-белке у таких вариантов, как B.1.1.7 (Альфа), B.1.351 (Бета), P.1 (Гамма) и B.1.617.2 (Дельта), что способствовало снижению эффективности существующих вакцин и нейтрализующей активности сывороток (Рисунок 5) [67, 68].

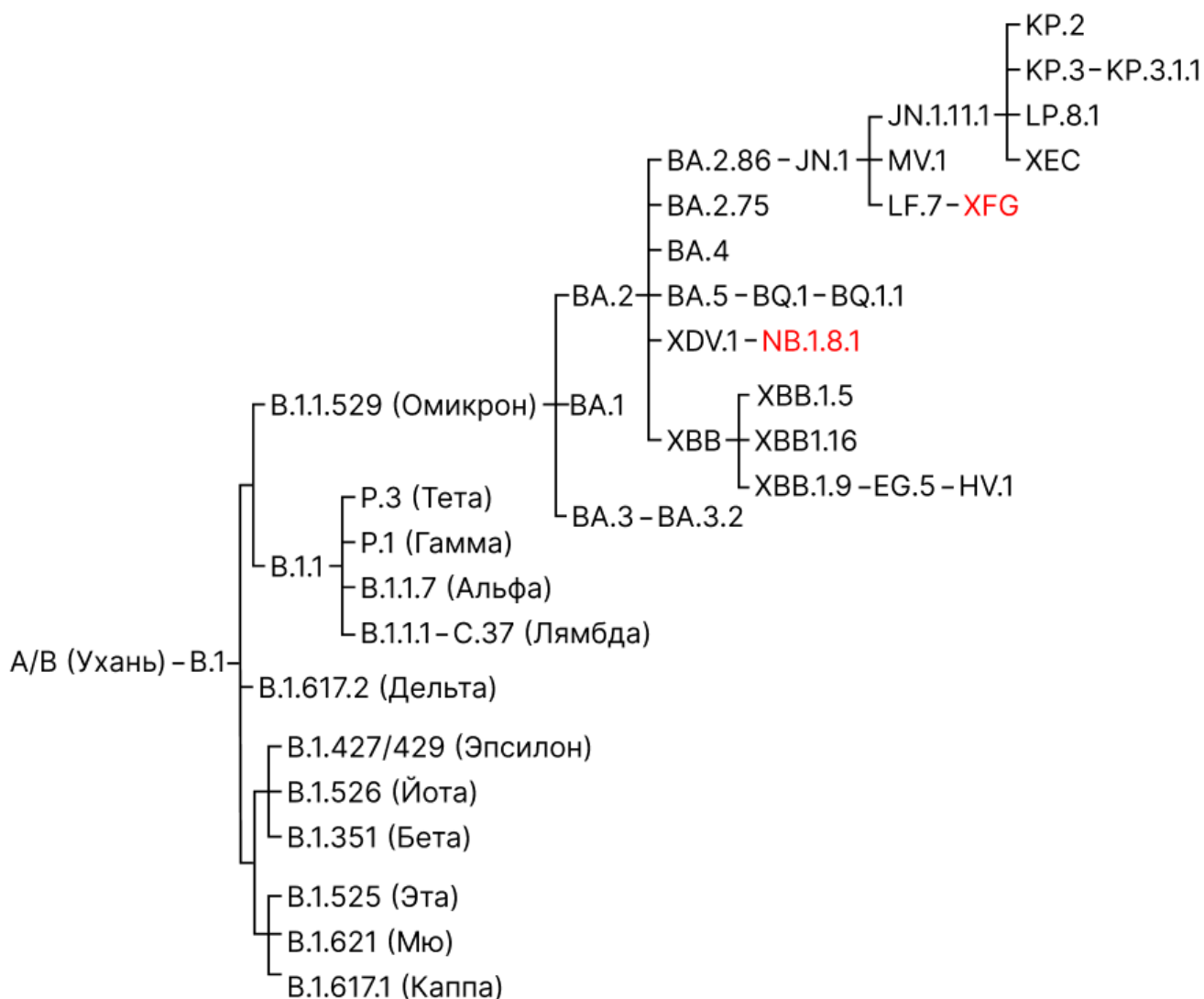


Рисунок 5. Филогенетическое дерево обозначенных вариантов SARS-CoV-2. Красным отмечены варианты, доминировавшие в 2026 г. Дерево построено на основе данных GISAID [69]

Появление многочисленных генетических вариантов SARS-CoV-2, в особенности варианта B.1.1.529 (Омикрон) и его подвариантов, начавших активно циркулировать с ноября 2021 г., привело к значительному увеличению контагиозности вируса и снижению уровня популяционного иммунитета. Формирование иммунного ответа на SARS-CoV-2 в значительной степени происходило под влиянием предыдущего иммунного опыта — первичного инфицирования ранними вариантами и в результате вакцинации, основанной на исходном уханьском штамме SARS-CoV-2. У варианта Омикрон было выявлено множество мутаций в S-белке, включая изменения в позициях K417 и E484. Эти мутации обеспечили значительное снижение эффективности ранее сформированного иммунного ответа [70]. Омикрон быстро распространился по всему миру с беспрецедентной скоростью, став доминирующим вариантом всего за два месяца. На последующих этапах пандемии подварианты линии Омикрон стабильно доминировали среди передающихся штаммов SARS-CoV-2 во всем мире. Эволюционный отбор благоприятствовал вариантам вируса, характеризующимся повышенной резистентностью к индуцированным ранее антителам при сохранении или улучшении репликативного потенциала и трансмиссивности [71].

Связывание RBD S-белка SARS-CoV-2 с рецептором ACE2 клетки-хозяина является ключевым этапом, инициирующим проникновение вируса в клетку. Согласно данным, полученным методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR, surface plasmon resonance), новые варианты SARS-CoV-2 демонстрируют более высокое сродство к ACE2 по сравнению с ранними штаммами [72]. Так, аффинность S-тримера варианта с мутацией D614G к ACE2 составляет 152 нМ, тогда как для вариантов XBB.1.5 и EG.5 она снижается до 73 нМ и 92 нМ соответственно. Повышенное сродство S-белков поздних вариантов SARS-CoV-2 к ACE2 обусловлено, в первую очередь, более медленной скоростью диссоциации комплекса, что компенсирует снижение скорости ассоциации.

В процессе эволюции SARS-CoV-2 ряд аминокислотных замен в RBD способствовал укреплению взаимодействия с рецептором ACE2 (Рисунок 6). Так, замена N501Y усиливает связывание за счет дополнительного π - π -взаимодействия с АО Y41 ACE2 и π -катионного взаимодействия с K353, увеличивая сродство комплекса RBD-ACE2 приблизительно в четыре раза [73]. Остаток F486 взаимодействует с гидрофобным карманом ACE2, включающим АО L79, M82 и Y83. Его замены, такие как F486V в вариантах BA.4, BA.5, BQ.1, BQ.1.1 и F486S в XBB.1, приводят к снижению аффинности [74]. Однако мутация F486P, зафиксированная в XBB.1.5 и ряде последующих вариантов, способствует восстановлению и даже усилению сродства по сравнению с вариантом F486S [75]. При этом по эффективности связывания с ACE2 АО P486 сопоставим с исходным F486.

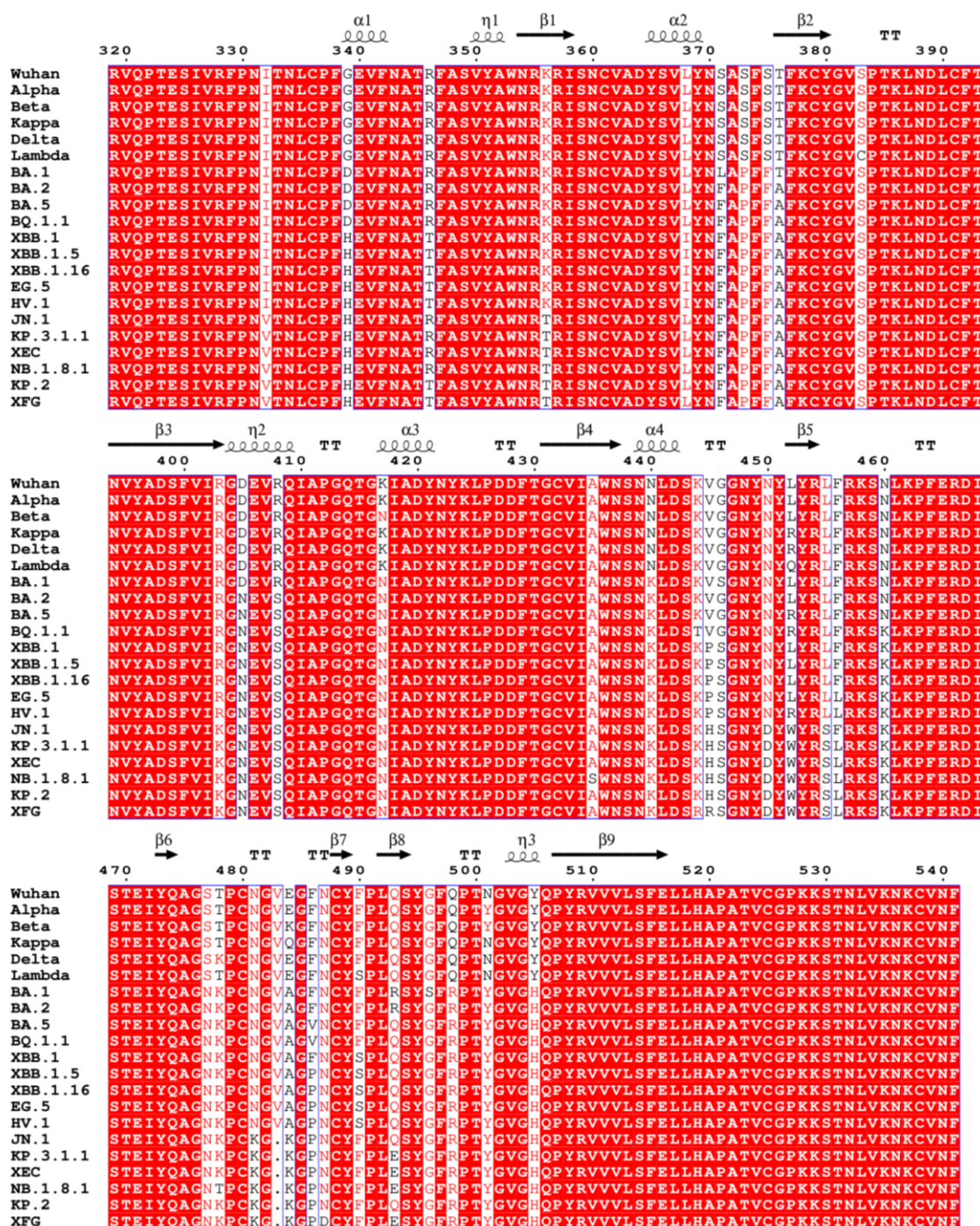


Рисунок 6. Выравнивание аминокислотных последовательностей RBD вариантов SARS-CoV-2: Wuhan (Ухань, GenBank: MN908947.3), Alpha (Альфа, GenBank: MW487270.1), Beta (Бета, GenBank: MZ314998.1), Kappa (Каппа, GenBank: MZ571142.1), Delta (Дельта, GenBank: MZ208926.1), Lambda (Лямбда, GenBank: MZ275302.1), BA.1 (GenBank: OL800702.1), BA.2 (GenBank: OM617939.1), BA.5 (GISAID: EPI_ISL_12812500), BQ.1.1 (GISAID: EPI_ISL_16098101), XBB.1 (GISAID: EPI_ISL_14917652), XBB.1.5 (PDB: 8WE4), XBB.1.16 (PDB: 8Z6Q), EG.5 (PDB: 8V0W), HV.1 (PDB: 8XN3), JN.1 (PDB: 8X4H), KP.2 (PDB: 9D8J), KP.3.1.1 (GISAID: EPI_ISL_19272251), XEC (GenBank: PV635430.1), NB.1.8.1 (GenBank: PZ120670.1), XFG (GISAID: EPI_ISL_20227119). Выравнивание выполнено с использованием MAFFT 7 [76], визуализация и оформление выполнены с использованием ESPript 3.2 [77]. Элементы вторичной структуры (PDB: 6LZG): α — α-спираль, β — β-тяж, η — 3_{10} -спираль, ТТ — β-поворот

Помимо отдельных мутаций, усиливающих связывание с рецептором ACE2, важную роль играют эпистатические взаимодействия между аминокислотными заменами в RBD. Например, мутация K417N, характерная для вариантов Бета и Омикрон, в изоляции снижает аффинность к ACE2 приблизительно в шесть раз. Однако в сочетании с мутацией N501Y, также присутствующей в этих вариантах, общее сродство восстанавливается за счет синергического эффекта [78]. Аналогично, замена Q498R, обнаруженная в подвариантах линии Омикрон, сама по себе незначительно снижает сродство к ACE2 в сравнении с уханьским RBD. Однако при сочетании с N501Y наблюдается значительное усиление связывания, что свидетельствует о синергическом взаимодействии между этими мутациями [79]. Еще один пример — мутация Q493E, появившаяся в линии КР.3. Хотя обособленно она снижает аффинность взаимодействия S-белка с ACE2, другая мутация, F456L, также присутствующая в этом варианте, проявляет эпистатический эффект, восстанавливая и значительно усиливая связывание с рецептором [80].

Актуальные в 2026 г. варианты SARS-CoV-2 содержат более 30 замен АО в RBD относительно RBD изначального уханьского варианта (Рисунок 7). Большинство из них затрагивают RBM. Такие эволюционные изменения обусловили приспособленность вируса как через повышение контагиозности, так и через ускользание от иммунного ответа.

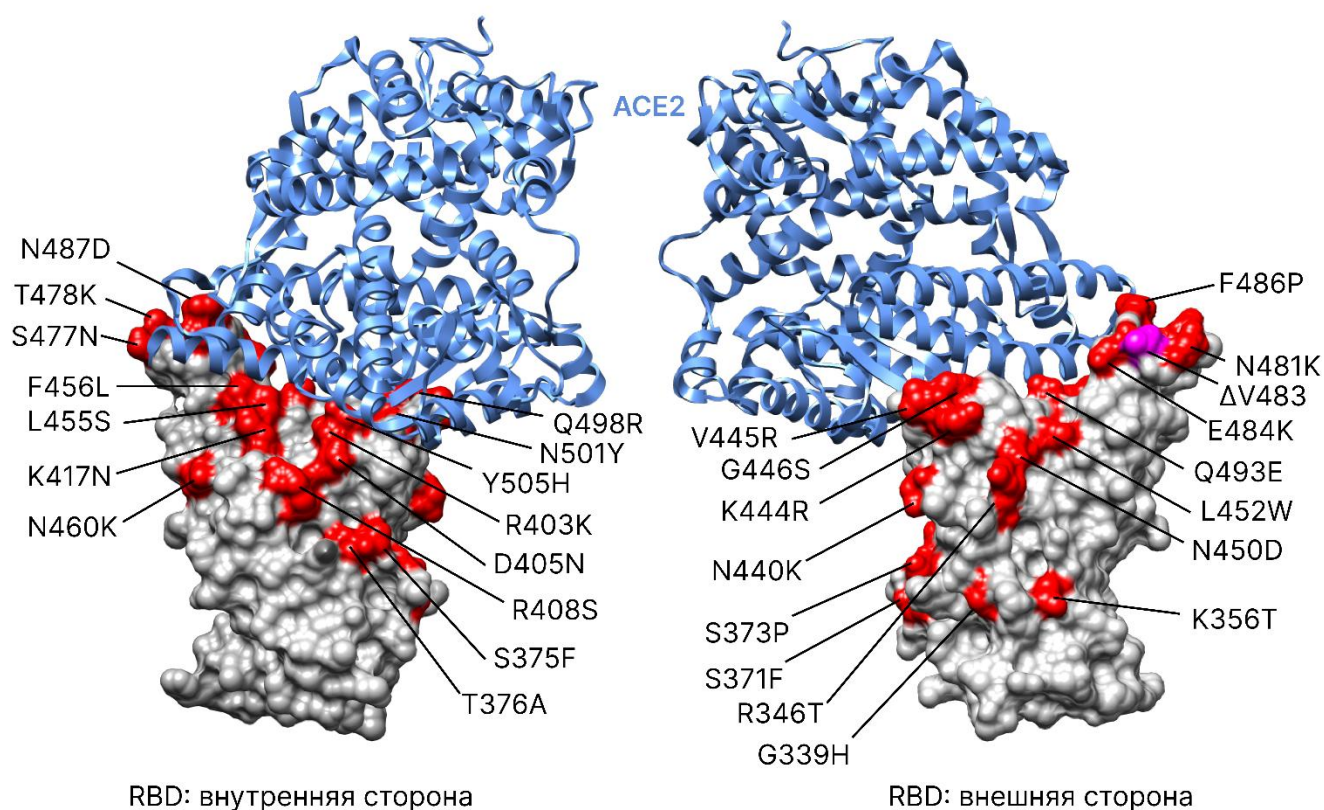


Рисунок 7. Структура комплекса RBD варианта Ухань с ACE2 (PDB: 6LZG) с указанием замен АО варианта XFG

1.4. Нейтрализующие и ненейтрализующие антитела

Гуморальный ответ против SARS-CoV-2 включает широкий спектр иммуноглобулинов, различающихся по специфичности, аффинности и функциональной активности. В функциональном отношении антитела подразделяются на нейтрализующие и ненейтрализующие, что определяется их способностью непосредственно подавлять инфекционный процесс. Нейтрализующие антитела (nAb, neutralizing antibody) препятствуют заражению клеток, тогда как ненейтрализующие, несмотря на сохранение антигенсвязывающей активности, не оказывают прямого ингибирующего действия на проникновение вируса в клетку-хозяина [81].

Нейтрализующие антитела являются одним из основных компонентов защиты при инфекционных заболеваниях [82], ограничивают распространение вируса на поздних стадиях и предотвращают повторное инфицирование [83]. Высокоаффинные nAb способны распознавать вирус посредством антигенсвязывающих фрагментов (Fab, fragment antigen binding), блокируя его проникновение в клетку-хозяина [84].

В отличие от нейтрализующих, ненейтрализующие антитела связываются с вирусными антигенами, но не препятствуют инфицированию клеток. Такие антитела могут быть направлены как против нефункциональных участков S-белка, так и против других вирусных белков, включая N-белок. Несмотря на отсутствие прямой нейтрализующей активности, ненейтрализующие антитела способны участвовать в противовирусной защите за счет Fc-опосредованных механизмов иммунитета [81]. К числу Fc-зависимых механизмов относятся антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC, антителозависимая клеточная цитотоксичность), антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP, антителозависимый клеточный фагоцитоз) и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC, комплементзависимая цитотоксичность). При ADCC Fc-фрагмент антитела взаимодействует с Fcγ-рецепторами NK-клеток, что приводит к уничтожению инфицированных клеток [85]. В случае ADCP антитела способствуют фагоцитозу вирусных частиц и инфицированных клеток макрофагами и нейтрофилами. Кроме того, антитела могут активировать классический путь системы комплемента, усиливая воспалительный ответ и элиминацию вируса [86]. Следует отметить, что граница между нейтрализующими и ненейтрализующими антителами является условной. Некоторые антитела обладают относительно слабой нейтрализующей активностью *in vitro*, однако демонстрируют выраженный защитный эффект *in vivo* благодаря Fc-опосредованным механизмам иммунитета [86]. Кроме того, функциональная активность антител может зависеть от их концентрации, изотипа и гликозилирования Fc-фрагмента. Отдельное внимание в исследованиях коронавирусных инфекций уделяется феномену антителозависимого усиления инфекции (antibody-dependent

enhancement, ADE). При ADE антитела потенциально способны облегчать проникновение вируса в клетки через Fc-рецепторы. Несмотря на наличие подобных механизмов при некоторых вирусных инфекциях, убедительных доказательств клинически значимого ADE при SARS-CoV-2 получено не было [87]. Тем не менее возможность Fc-опосредованных эффектов учитывается при разработке терапевтических антител и вакцин.

Гуморальный ответ на SARS-CoV-2 характеризуется разнообразным спектром распознаваемых эпитопов. В условиях естественного инфекционного процесса иммунная система хозяина формирует пул антител, преимущественно нацеленный на белки S и N вируса [88]. Качественный состав этого ответа существенно варьирует в зависимости от типа вакцинной платформы: цельновирионные инактивированные препараты индуцируют выработку антител к широкому набору структурных белков [89], тогда как мРНК- и векторные вакцины, большинство из которых сконструированы для экспрессии S-белка, закономерно индуцируют анти-S и анти-RBD ответ [90]. В отличие от внутренних белков, поверхностный S-белок непосредственно доступен для взаимодействия с компонентами гуморального иммунитета, что делает его главной мишенью как естественного, так и индуцированного иммунного ответа [91].

Большинство pAb нацелены на RBD S-белка [92]. Иммунодоминантность RBD обусловлена его поверхностной доступностью и функциональной значимостью для вируса. Связывание pAb с RBD может блокировать взаимодействие вируса с рецептором ACE2, тем самым предотвращая прикрепление вирусной частицы к клетке-хозяина (Рисунок 8).

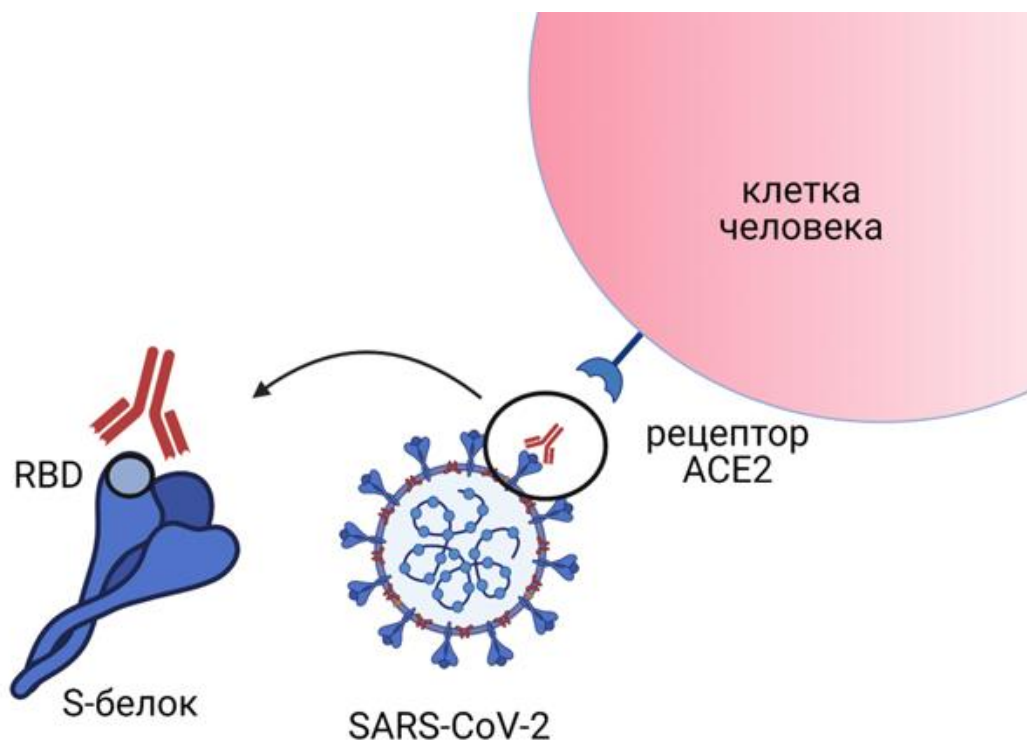


Рисунок 8. Схема блокирования нейтрализующим антителом взаимодействия RBD S-белка с ACE2

Нейтрализующие антитела могут реализовывать противовирусный эффект различными механизмами. Наиболее распространенным является стерическое блокирование рецепторного взаимодействия, однако возможны и другие механизмы, включая ингибирование конформационных изменений S-белка, нарушение процесса мембранного слияния и агрегацию вирусных частиц. Так, многие pAb связывают RBD и конкурируют за его связывание с ACE2, когда RBD находится в конформации «up», тем самым препятствуя инфицированию [93]. Некоторые pAb могут связываться с белком, находящимся в состоянии «down» и стабилизировать его, тем самым, предотвращая конформационные изменения, необходимые для проникновения вируса. Эффективность нейтрализации определяется не только аффинностью антитела, но и локализацией эпитопа, доступностью антигенного участка и пространственной организацией S-белка.

Часть pAb также направлена против NTD и консервативных участков субъединицы S2. В NTD был идентифицирован так называемый «антигенный суперсайт», содержащий эпитопы для ряда pAb [94]. Однако вследствие высокой вариабельности данный домен рассматривается как менее стабильная мишень по сравнению с консервативными участками S-белка. Субъединица S2 характеризуется существенно большей консервативностью среди различных вариантов SARS-CoV-2 и других представителей сарбековиров. В составе S2 выделяют несколько функционально значимых регионов, включая FP, HR1, HR2 и SH. Эти участки рассматриваются как мишени для антител благодаря низкой частоте мутаций и высокой степени структурной консервативности [95]. Вместе с тем нейтрализующая активность S2-специфичных pAb, как правило ниже, чем у антител против RBD и NTD.

Помимо S-белка, иммунная система распознает и другие структурные белки SARS-CoV-2, включая N-белок. Данный белок отличается высокой иммуногенностью и индуцирует интенсивный гуморальный ответ, что делает его важным маркером серологической диагностики [96]. Тем не менее антитела к N-белку обычно не обладают выраженной вируснейтрализующей активностью вследствие внутривиральной локализации соответствующих эпитопов. Белки М и Е также способны индуцировать образование антител, однако их вклад в формирование защитного гуморального ответа изучен значительно меньше. Хотя данные белки являются консервативными, они низко иммуногенны вследствие малого размера их эктодоменов, доступных для связывания иммунными клетками [89]. Противовирусная активность антител, специфичных к белку М, выражена слабее чем у антител, специфичных к RBD S-белка, и, вероятно, по большей части обусловлена Fc-опосредованными функциями [97]. Таким образом, основное внимание исследователей сконцентрировано на поиске высокоактивных антител к RBD S-белка.

1.5. Методы оценки активности антител

Потентность антител или антительных препаратов определяется как их способность оказывать биологический эффект при определенной концентрации и является одним из ключевых параметров, характеризующих функциональную активность гуморального иммунного ответа. В контексте SARS-CoV-2 под потентностью, как правило, понимается эффективность нейтрализации вируса или подавления его репликации в экспериментальных системах, что отражает биологическую значимость антител независимо от их общего титра [50]. При этом важно различать количественные показатели содержания антител и их функциональные характеристики, поскольку высокая концентрация иммуноглобулинов не всегда коррелирует с выраженной нейтрализующей активностью [98].

Оценка потентности антител основывается на определении их способности ингибировать инфекционный процесс. Наиболее распространенным подходом является использование нейтрализационных тестов, в рамках которых измеряется снижение инфекционности вируса в присутствии исследуемых антител. Классическим методом является тест с использованием живого вируса, при котором оценивается цитопатический эффект или уровень репликации вируса в культуре клеток [99]. Такие системы требуют условий биобезопасности высокого уровня, что ограничивает их широкое применение.

Альтернативой являются псевдовирусные нейтрализационные тесты, основанные на использовании рекомбинантных вирусных частиц (например, на базе лентивирусов или вируса везикулярного стоматита), несущих S-белки SARS-CoV-2. Подобные системы были быстро адаптированы для оценки нейтрализующей активности в условиях пандемии и позволяют безопасно моделировать процесс вирусного входа в клетки [100, 101]. Псевдовирусные тесты хорошо коррелируют с результатами, полученными при использовании живого вируса, и широко применяются в исследовательской и практической деятельности.

Ключевыми количественными параметрами, характеризующими потентность, являются концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50} , half-maximal inhibitory concentration) и концентрация 90% ингибирования (IC_{90} , 90% inhibitory concentration), отражающие концентрацию антител, необходимую для ингибирования 50% или 90% вирусной активности соответственно. Эти показатели являются стандартом для количественной оценки нейтрализующей активности и используются для сравнения эффективности различных антител и сывороток [99]. Более низкие значения IC_{50} свидетельствуют о более высокой потентности антител.

Помимо нейтрализационных тестов, применяются методы, основанные на оценке связывания антител с вирусными антигенами, такие как иммуноферментный анализ (ИФА) [102].

Существуют форматы конкурентного ИФА, позволяющие напрямую оценивать способность антител блокировать взаимодействие RBD-ACE2. В таких суррогатных тестах на планшете сорбируют рекомбинантный RBD или ACE2, а затем, добавляя сыворотку или очищенные антитела, оценивают ингибирование связывания меченого белка-партнера. Хотя эти системы не моделируют полноценную вирусную инфекцию, они дают ценную функциональную информацию о блокирующей активности антител в бесклеточной системе, просты в выполнении и хорошо коррелируют с результатами нейтрализации псевдовirusа или живого вируса, что позволяет использовать их для высокопроизводительного скрининга [103, 104].

Дополнительным направлением оценки активности антител является анализ Fc-опосредованных эффектов. Применяются клеточные тест-системы, позволяющие оценивать взаимодействие антител с Fc-рецепторами и последующую активацию эффекторных клеток [98].

Несмотря на всю ценность *in vitro* подходов, окончательным критерием потентности антител является их способность проявлять защитные свойства в условиях живого организма. Наиболее распространенными моделями для *in vivo* оценки защитной эффективности антител против SARS-CoV-2 служат трансгенные мыши, экспрессирующие человеческий ACE2 (например, линия K18-hACE2) [105], и хомяки (сирийские, или золотистые хомячки), которые естественным образом восприимчивы к вирусу [106]. В типичном эксперименте исследуемые антитела вводят животным либо профилактически (до заражения вирусом), либо терапевтически (после заражения). Ключевыми параметрами потентности *in vivo* являются: снижение вирусной нагрузки в респираторном тракте (легкие, трахея, носовые ходы), предотвращение потери массы тела, уменьшение гистопатологических изменений в легочной ткани, а также снижение летальности.

1.6. Иммунная плазма для терапии

С началом разработки вакцин и противовирусных препаратов использование потенциала антител в клинической практике стало одной из приоритетных задач в условиях пандемии COVID-19. Одним из первых терапевтических подходов стало использование реконвалесцентной плазмы, представляющей собой легкодоступный источник поликлональных антител к SARS-CoV-2.

Иммунная (реконвалесцентная) плазма представляет собой компонент крови, полученный от доноров, перенесших инфекцию SARS-CoV-2, и содержащий специфические антитела против вируса. Данный подход основан на пассивной иммунизации и предполагает передачу готовых гуморальных факторов иммунитета пациенту с целью снижения вирусной нагрузки и улучшения клинического исхода. Применение реконвалесцентной плазмы имеет длительную историю и использовалось при лечении различных инфекционных заболеваний, включая грипп, SARS и

MERS [107]. В случае COVID-19 ее применение получило распространение на ранних этапах пандемии в отсутствие эффективных альтернатив [108].

Несмотря на то, что результаты большинства рандомизированных клинических исследований не выявили значимого терапевтического эффекта реконвалесцентной плазмы [109, 110], эти исследования позволили определить ключевые факторы, влияющие на эффективность антительной терапии. В частности, использование плазмы с высокими титрами нейтрализующих антител к SARS-CoV-2, а также ее введение на ранних стадиях заболевания коррелировали с более благоприятным течением инфекции и замедлением прогрессирования COVID-19 [108].

Безопасность терапии реконвалесцентной плазмой в целом оценивается как удовлетворительная, однако возможны риски, характерные для трансфузионных процедур, включая аллергические реакции, перегрузку объемом и трансфузионно-ассоциированное острое повреждение легких [111]. Несмотря на вариабельность результатов клинических исследований, данный подход сыграл важную роль на ранних этапах пандемии и остается значимым инструментом для изучения гуморального иммунитета и разработки новых терапевтических стратегий [107, 112].

1.7. Методы получения моноклональных нейтрализующих антител

Быстрая идентификация mAb, обладающих нейтрализующей активностью против SARS-CoV-2, стала возможной благодаря стратегиям, ранее разработанным и усовершенствованным при изучении других вирусов. Популяции В-клеток, контактировавших с антигеном, широко используются для поиска nAb. Такие В-клетки часто получают от людей после естественной инфекции или от животных (включая мышей, крыс, кур и кроликов) после иммунизации, а затем выделяют из тканей и органов доноров, например, из образцов донорской крови или селезенки мышей. После получения и выделения популяций В-клеток, контактировавших с антигеном, для облегчения поиска mAb доступно несколько стандартных подходов, включая гибридную технологию и скрининг отдельных В-клеток.

Гибридная технология, открытая в 1975 г. Сезаром Мильштейном и Георгом Келером (Нобелевская премия 1984 г.), стала первой платформой для получения mAb. Именно она позволила создать муромонаб-CD3 (ОКТ3) — первое терапевтическое антитело, одобренное FDA в 1986 г. [113]. Суть метода заключается в иммортализации первичных В-клеток путем их слияния с миеломными клетками (линией раковых В-клеток) с помощью электрослияния или химической обработки. Главный недостаток — низкая эффективность слияния: лишь одна из примерно 100 000 клеток дает жизнеспособный гибридный клон, стабильно секретирующий антитела [114]. После слияния отдельные клоны изолируют, например, методом предельного

разведения, а неочищенные супернатанты скринируют на желаемую связывающую активность, чаще всего с помощью ИФА.

Несмотря на трудоемкость, гибридная технология остается привлекательной благодаря двум ключевым особенностям: сохраняет нативное спаривание переменных доменов тяжелой (VH, variable domain of heavy chain) и легкой (VL, variable domain of light chain) цепей и опирается на полувековой опыт успешного применения в разработке терапевтических антител [115]. Десятки mAb гибридного происхождения присутствуют на современном фармацевтическом рынке [116]. Чаще всего метод используют для мышиных В-клеток, однако он адаптирован и для других видов, включая человека — правда, с меньшей эффективностью и с особыми требованиями к размножению В-клеток и условиям слияния [114]. Получение полностью человеческих антител стало более доступным благодаря использованию трансгенных мышей, несущих человеческие иммуноглобулиновые локусы.

Фаговый дисплей — альтернатива традиционной гибридной технологии, позволяющая выделять полностью человеческие mAb из обширных репертуаров генов иммуноглобулинов, экспонированных на поверхности бактериофагов. В 1985 г. Джордж П. Смит впервые показал, что нитчатые фаги способны презентовать чужеродный пептид на своей поверхности после вставки фрагмента ДНК в ген белка оболочки [117]. Затем Пармли и Смит разработали метод аффинного отбора, позволившего выделять пептид-фаговые гибриды из 10^8 -кратного избытка фагов дикого типа по их специфичности к биотинилированным антителам [118]. Позднее Маккаферти и Уинтер впервые применили фаговый дисплей для создания комбинаторных библиотек антител на нитчатых фагах с целью получения антиген-специфичных mAb [119, 120]. Фаг M13 — один из нитчатых бактериофагов *E. coli* и самый распространенный вектор для фагового дисплея антител [121]. Нитчатые фаги заражают исключительно штаммы *E. coli*, несущие F-пили, за счет взаимодействия пилей с белком оболочки фага [122]. Фаг M13 представляет собой гибкую цилиндрическую частицу с кольцевым одноцепочечным геномом (6407 оснований), кодирующим пять структурных белков (pIII, pVIII, pVI, pVII, pIX) и шесть белков сборки и репликации [123]. Большинство фаговых дисплейных систем основано на слиянии с pIII благодаря его структурной гибкости и способности экспонировать крупные белки без нарушения функции [124]. Прогрессу технологии способствовало открытие миниатюрных форматов антител: переменных фрагментов (Fv, fragment variable), одноцепочечных переменных фрагментов (scFv, single-chain variable fragment), диател (diabodies), VHH и sdAb акул (VNAR, variable new antigen receptor), а также антигенсвязывающих фрагментов (Fab) [125]. В отличие от полноразмерных антител, требующих сборки четырех цепей и образования множества дисульфидных связей, эти фрагменты легко экспрессируются в бактериях.

Существуют стратегии переноса иммунных репертуаров в библиотеки дисплея с сохранением нативного спаривания VH/VL [126]. Преимущество этих технологий — простота проведения последовательных раундов селекции, что полезно для отбора клонов с заданной аффинностью и специфичностью. Поверхностный дисплей уже привел к созданию нескольких одобренных FDA терапевтических антител, включая адалимумаб (Хумира) [127].

Помимо фагового дисплея, для решения задач по поиску и инженерии антител был разработан ряд альтернативных технологий *in vitro*, каждая из которых обладает собственными преимуществами и ограничениями. Одной из таких систем является дрожжевой дисплей, впервые описанный Бодером и Виттрапом в 1997 г. [128]. В данной технологии фрагменты антител, чаще всего в формате scFv или Fab, экспрессируются на поверхности клеток *Saccharomyces cerevisiae* через заякоривание с белками Aga1 и Aga2 [129]. Основным преимуществом метода является возможность проведения проточной цитофлуориметрии (FACS, fluorescence-activated cell sorting) в ходе отбора, что делает его особенно ценным инструментом для аффинной селекции. По сравнению с фаговым дисплеем, размер дрожжевых библиотек, как правило, меньше [130].

Принципиально иной подход реализован в рибосомном дисплее. Это бесклеточная система, не требующая использования живых клеток, в которой отбор происходит на основе стабилизированного комплекса мРНК-рибосома-белок [131, 132]. Отсутствие этапа клеточной трансформации позволяет преодолеть связанные с ним ограничения и создавать библиотеки огромного разнообразия, достигающие от 10^{12} до 10^{15} вариантов [133]. Процесс отличается высокой скоростью, поскольку исключает стадии клеточного культивирования, однако может быть лимитирован относительно низким уровнем функциональных рибосомных комплексов.

Дисплей на клетках млекопитающих представляет собой технологию, основанную на экспрессии антител в виде слитых белков в клетках млекопитающих с последующим отбором с помощью аффинной селекции. Его ключевое преимущество заключается в способности презентировать полноразмерные молекулы иммуноглобулинов в их нативной форме, что гарантирует корректную укладку и естественные посттрансляционные модификации, отсутствующие в других платформах [134]. Этот фактор делает метод подходящим не только для селекции, но и для непосредственного производства антител. Основным недостатком данного дисплея является, как правило, ограниченный размер получаемых библиотек.

Наконец, бактериальный дисплей предполагает экспрессию фрагментов или полноразмерных антител на поверхности грамотрицательных (например, *E. coli*) и грамположительных (например, *Staphylococcus aureus*) бактерий [135]. Метод привлекателен благодаря низкой стоимости, высокой скорости роста бактериальных клеток и потенциальной возможности создания крупных библиотек. Однако присущее бактериальным системам

отсутствие посттрансляционных модификаций, характерных для эукариотических клеток, и, в ряде случаев, более низкая эффективность трансформации являются факторами, ограничивающими применение этого дисплея [136].

Серьезной альтернативой гибридомному подходу стал скрининг отдельных В-клеток, позволяющий обойти стадию клеточного слияния. Типичный рабочий процесс включает очистку В-клеток с помощью магнитного сортирования (MACS), их мечение антигеном и антителами для позитивной/негативной селекции по клеточным маркерам, а затем сортировку по одной клетке на лунку методом FACS [137]. РНК из каждой клетки преобразуют в кДНК с помощью ОТ-ПЦР, затем амплифицируют гены VH и VL и секвенируют по Сэнгеру. По сравнению с гибридомной технологией скрининг отдельных В-клеток выигрывает в эффективности, времени и трудозатратах, при этом также сохраняя нативное спаривание VH/VL. Метод был многократно усовершенствован для упрощения [126, 138–140]. Он стал неотъемлемым инструментом при выделении антител для лечения инфекционных заболеваний и для анализа гуморальных ответов с целью разработки улучшенных вакцин. Так, с его помощью из образцов плазмы человека были получены антитела с широкой нейтрализующей активностью против ВИЧ [141] и респираторно-синцитиального вируса (RSV) [142].

Одним из наиболее значительных прорывов последних лет стало секвенирование нового поколения (NGS, next-generation sequencing), что привело к разработке таких технологий, как LIBRA-seq (linking B-cell receptor to antigen specificity through sequencing), которая объединяет секвенирование отдельных В-клеток и ДНК-штрихкодирование для высокопроизводительного сопоставления последовательности BCR с его антигенной специфичностью [143, 144]. В рамках данного подхода В-клетки инкубируют с панелью антигенов, каждый из которых содержит уникальный ДНК-штрихкод, после чего антигенсвязывающие клетки сортируют методом FACS. Затем в изолированных эмульсионных каплях амплифицируют кДНК BCR и ДНК-штрихкоды антигенов, при этом ампликоны получают уникальный для каждой клетки штрихкод, предоставляемый гидрогелевой микросферой. Последующее секвенирование методом NGS позволяет сопоставить парные гены VH/VL и ДНК-штрихкоды соответствующих антигенов. Количественная оценка этого соответствия с использованием показателей LIBRA-seq позволяет отбирать BCR на основании их антигенной специфичности.

Метод LIBRA-seq уже успешно применен для поиска терапевтических антител при инфекционных заболеваниях. В работе с В-клетками ВИЧ-инфицированных доноров исследователи идентифицировали антитела с широкой нейтрализующей активностью против глобальной панели псевдовирсов ВИЧ [144]. В другом исследовании метод позволил обнаружить перекрестно-реактивные антитела к ВИЧ-1 и вирусу гепатита С у коинфицированного донора [145]. Данный метод также использовали для транскриптомного

профилирования антиген-специфичных В-клеток при COVID-19, что привело к идентификации мощных нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 [146].

Среди других инновационных подходов выделяется TRAPnSeq (antigen specificity mapping through immunoglobulin secretion trap and sequencing) — технология, позволяющая захватывать секретируемые IgG или IgE из антитело-секретирующих клеток. В этом процессе клетки биотинилируют, инкубируют со стрептавидин-конъюгированными Fc-связывающими фрагментами, затем добавляют штрихкодированные или флуоресцентно меченые антигены и после инкапсуляции секвенируют парные VH/VL. В отличие от LIBRA-seq, TRAPnSeq работает не только с В-клетками памяти, но и с другими В-клетками, что было продемонстрировано на примере профилирования IgE при аллергии [147].

Платформа Beason (Berkeley Lights, США) — еще одна прорывная технология, основанная на оптических и нанофлюидных принципах для изоляции, культивирования и анализа отдельных В-клеток в высокопроизводительном режиме (10 000–100 000 клеток) [148, 149]. С помощью оптофлюидной системы плазматические клетки направляют в камеры NanoPen объемом в несколько нл. Секретируемые IgG исследуют на связывание антигена (обычно по флуоресцентной колокализации с антиген-нагруженными гранулами), а также на блокирование лиганда, специфичность и уровень секреции. Желаемые клоны затем извлекают, секвенируют и валидируют.

В сравнительном исследовании на В-клетках реконвалесцентных пациентов с COVID-19 параллельное применение Beason и микрофлюидной платформы Chromium X (10x Genomics, США) показало, что большинство идентифицированных последовательностей были уникальными для каждого метода, а совпадения встречались редко. Оба подхода позволили выявить нейтрализующие антитела к SARS-CoV-2 и SARS-CoV [149].

Пандемия COVID-19 резко повысила спрос на быстрые методы обнаружения и характеристики противовирусных антител. Клонирование отдельных В-клеток сыграло здесь центральную роль. Например, скрининг PBMC от донора, переболевшего COVID-19, с использованием микрофлюидной системы позволил изолировать антитело-секретирующие клетки, инкубировать их с гранулами, несущими S-белок SARS-CoV-2 или его RBD, и после ПЦР на отдельных клетках и NGS получить сотни парных последовательностей VH/VL. Специальный алгоритм машинного обучения помог идентифицировать анти-RBD антитела бибтеловимаб и бамланивимаб [150, 151].

Несмотря на явные преимущества новых технологий, их внедрение идет относительно медленно. Методы LIBRA-seq и TRAPnSeq предоставляют лишь информацию о нуклеотидных последовательностях VH/VL, что делает обязательным последующий генный синтез для получения рекомбинантных mAb и замедляет их валидацию. Платформа Beason позволяет

извлекать единичные клетки и амплифицировать их кДНК без генного синтеза, однако высокая стоимость существенно ограничивает ее доступность для большинства лабораторий. Традиционные методы — гибридная технология, скрининг отдельных В-клеток — по-прежнему широко используются благодаря скорости, доступности и накопленному опыту. Более того, разные методы поиска антител (например, Beacon и Libra-seq) часто дают различные наборы перспективных кандидатов антител, что оправдывает использование нескольких подходов.

Важное направление будущего развития — функциональный скрининг, то есть отбор антител не только по аффинности или специфичности, но и по конкретной биоактивности. Один из шагов в этом направлении уже сделан: микрофлюидный инструмент Cyto-Mine (Sphere Fluidics, Великобритания) позволяет сортировать антитело-секретирующие клетки по функциональной активности до секвенирования [152]. Платформа Beacon благодаря культивированию отдельных клонов дает возможность проводить функциональные тесты (например, на стабильность или неспецифическое связывание) на ранних этапах [153]. Еще одна технология — Fluidot (Cellenion, Франция) — пригодна для анализа не только плазматических клеток, но и других В-клеток [154].

Большие надежды возлагаются на методы машинного обучения. Данные NGS, особенно генерируемые LIBRA-seq (сопоставляющие последовательность антитела с его антигенной специфичностью), идеально подходят для обучения предсказательных моделей. В будущем это позволит предсказывать последовательности антител с желаемыми свойствами, даже если они не были выявлены в экспериментальных данных, что существенно ускорит ответ на новые инфекционные угрозы [155].

Большинство антител, предлагаемых для терапевтического использования при COVID-19, были выделены с использованием методов клонирования В-клеток, основанных на идентификации S-реактивных В-лимфоцитов у лиц, перенесших инфекцию [156]. Помимо этого, mAb получали с помощью фагового дисплея [157], а также от иммунизированных мышей, несущих человеческие гены иммуноглобулинов [158]. Важным источником послужили и образцы от лиц, ранее инфицированных родственным вирусом SARS-CoV (2003 г.), что позволило идентифицировать перекрестно-нейтрализующие антитела с широкой активностью [159]. Отобранные для клинической разработки антитела продемонстрировали высокую нейтрализующую активность *in vitro*, и практически все они нацелены на RBD S-белка SARS-CoV-2. Эксперименты на животных моделях убедительно продемонстрировали их потенциал *in vivo*. Введение nAb как до, так и после заражения предотвращало или ослабляло инфекцию, что проявлялось в снижении вирусных титров и уменьшении воспалительных изменений [160].

1.8. Одобренные терапевтические антитела против COVID-19

Пандемия COVID-19 обусловила стремительное развитие пассивной иммунотерапии, основанной на применении mAb, направленных против SARS-CoV-2. Терапевтические антитела стали одними из первых специфических средств лечения новой коронавирусной инфекции и активно применялись для пациентов с высоким риском тяжелого течения заболевания [161]. Большинство разработанных терапевтических антител относятся к IgG1 изотипу. Высокая специфичность и выраженная вируснейтрализующая активность позволили в короткие сроки внедрить данные препараты в клиническую практику [162].

Первым mAb, получившим разрешение на экстренное применение (EUA, Emergency Use Authorization) Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA, Food and Drug Administration), стал бамланивимаб (LY-CoV555), разработанный компанией Eli Lilly (США) (Таблица 1). Препарат продемонстрировал способность снижать вирусную нагрузку и риск госпитализации у амбулаторных пациентов с COVID-19 [163]. В дальнейшем для повышения эффективности терапии устойчивых вариантов вируса бамланивимаб начали применять в комбинации с этесевимабом (LY-CoV016). Комбинированная терапия показала более выраженный клинический эффект у пациентов из групп риска [164].

В свою очередь, компанией Regeneron была разработана комбинация касиривимаба и имдевимаба (REGEN-COV, REGN-COV2) [165]. Эти антитела связываются с различными эпитопами RBD S-белка, обеспечивая синергетическую нейтрализующую активность и снижая вероятность возникновения резистентных вариантов вируса. В клинических исследованиях препарат способствовал снижению вирусной нагрузки, риска госпитализации и летальности, а также использовался для постконтактной профилактики COVID-19 [166].

Важным этапом развития пассивной иммунотерапии стало создание сотровимаба (VIR-7831), разработанного компаниями GSK (Великобритания) и Vir Biotechnology (США). В отличие от большинства ранних антител, сотровимаб связывается с более консервативным участком S-белка, благодаря чему сохранял активность против ряда циркулировавших вариантов SARS-CoV-2. Клинические исследования продемонстрировали снижение риска госпитализации и прогрессирования заболевания у пациентов с легким и среднетяжелым течением COVID-19 [167].

Таблица 1. Моноклональные антитела против SARS-CoV-2 для клинического применения.

КИ — клиническое исследование, ЕС — Европейский союз

mAb	Разработчик	Статус	Резистентные варианты
Бамланивимаб (LY-CoV555)	Eli Lilly	EUA FDA выдано в 2020 г.; отозвано в 2021 г. [168]	Бета и Гамма
Бамланивимаб + этесевимаб (LY-CoV555 + LY-CoV016)	Eli Lilly	EUA FDA выдано в 2021 г.; отозвано в 2023 г. [168]	Омикрон
Касиривимаб + имдевимаб (REGN-COV2)	Regeneron	EUA FDA выдано в 2020 г.; отозвано в 2024 г. [168]	Омикрон
Регданвимаб (CT-P59)	Celltrion	Одобрено в Южной Корее [169] и ЕС (2021 г.); отозвано в ЕС (2025 г.) [170]	Омикрон
Сотровимаб (VIR-7831)	GSK / Vir Biotechnology	EUA FDA выдано в 2021 г.; отозвано в 2024 г. [168]	BA.2
Тиксагевимаб + цилгавимаб (AZD7442, Evusheld)	AstraZeneca	EUA FDA выдано в 2021 г.; отозвано в 2024 г. [168]	BA.1, BA.2, BA.4, BA.5, XBB
Амубарвимаб + ромлусевимаб (BR11-196 + BR11-198)	Brii Biosciences	Одобрено в Китае (2021 г.) [171]	BA.1
Бибтеливимаб (LY-CoV1404)	Eli Lilly	EUA FDA выдано в 2022 г.; отозвано в 2024 г. [168]	BQ.1, BQ.1.1, XBB
Сипавибарт (AZD3152, Omi-42)	AstraZeneca	Одобрено в ЕС (2025 г.) [172]	KP.2, KP.3, LB.1, KP.3.1.1
Пемивибарт (VYD222, Pemgarda)	Invivyd	EUA FDA (2024 г.) [173]	KP.3.1.1, NB.1.8.1
AER002 (P2G3)	Aerium Therapeutics	Фаза II КИ (с 2023 г.) [174]	BQ.1.1, XBB.1, XBB.1.5
SA55 (BD55-5514)	Brii Biosciences	Фаза II КИ (с 2023 г.) [175]	—
VYD2311	Invivyd	Фаза III КИ (с 2026 г.) [176]	—

К числу зарегистрированных препаратов также относится комбинация тиксагевимаба и цилгавимаба (AZD7442, Evusheld), разработанная компанией AstraZeneca (Великобритания). Данные антитела содержали Fc-модификации, увеличивающие период полувыведения и обеспечивающие длительную циркуляцию препарата в организме. Препарат Evusheld применялся преимущественно для доконтактной профилактики COVID-19 у пациентов с иммунодефицитными состояниями и недостаточным иммунным ответом на вакцинацию [177].

Кроме перечисленных препаратов, в различных странах были зарегистрированы и другие mAb, включая регданвимаб (CT-P59), разработанный компанией Celltrion (Республика Корея) [178], а также комбинацию амубарвимаба и ромлусевимаба (BR11-196/BR11-198), применявшуюся преимущественно в странах Азии [179].

Бетбелвимаб характеризовался высокой нейтрализующей активностью против большинства циркулировавших вариантов SARS-CoV-2, однако появление резистентных вариантов BQ.1.1 и XBB привело к отзыву EUA [180]. Сипавибарт (AZD3152, Omi-42), разработанный AstraZeneca для доконтактной профилактики COVID-19 у иммунокомпрометированных пациентов получил одобрение в ЕС в 2025 г. На текущий момент его активность зависит от циркулирующих вариантов, поскольку сипавибарт не нейтрализует варианты с заменой F456L в RBD (KP.2, KP.3, LB.1, KP.3.1.1) [181]. Пемивибарт (VYD222, Remgarda), разработанный компанией Invivyd, получил EUA FDA в 2024 г. для доконтактной профилактики COVID-19 у лиц с умеренным или тяжелым иммунодефицитом. Однако появление и распространение резистентных вариантов (KP.3.1.1, NB.1.8.1) привело к необходимости учитывать их циркуляцию при принятии решения о его применении [182, 183].

В настоящее время продолжается разработка новых mAb с расширенным спектром нейтрализующей активности. AER002 проходило фазу II клинических исследований для пациентов с постковидным синдромом, однако по данным препринта исследования уже завершены, а препарат не продемонстрировал преимуществ по сравнению с плацебо [184]. Антитела SA55 и VYD2311 сохраняют высокую нейтрализующую активность *in vitro* против ряда актуальных вариантов SARS-CoV-2, включая LP.8.1.1, NB.1.8.1 и XFG, и находятся на поздних этапах клинических исследований [182, 185].

Несмотря на значительные успехи применения mAb для терапии COVID-19, дальнейшая эволюция SARS-CoV-2 стала серьезным ограничением их клинической эффективности. Появление вирусных вариантов с множественными мутациями в S-белке, особенно варианта Омикрон и его сублиний, привело к снижению нейтрализующей активности ранее одобренных антител. Антигенная изменчивость вируса и механизмы иммунного ускользания обусловили необходимость разработки новых терапевтических подходов, направленных на создание антител широкого спектра действия, способных распознавать консервативные эпитопы [70].

1.9. Классификация антител по эпитопам RBD SARS-CoV-2

Формирование классификации эпитопов и соответствующих классов антител стало возможным благодаря накоплению структурных и функциональных данных о взаимодействии SARS-CoV-2 с антителами, полученных с использованием крио-ЭМ, рентгеноструктурного анализа и картирования эпитопов. Данная классификация основана на локализации участков связывания антител, особенностях их взаимодействия с RBD и механизмах нейтрализации. Она позволяет систематизировать разнообразие антительного ответа, сопоставлять свойства различных нейтрализующих антител и анализировать влияние мутаций S-белка на сохранение или потерю их активности.

В начале пандемии классификация антител, нацеленных на RBD, основывалась на характере их взаимодействия с различными эпитопами в пределах домена, которые были условно разделены на четыре структурных квадранта [186]. В дальнейшем, помимо основных 4 классов, были идентифицированы классы 5 [187] и 6 [156] (Рисунок 9, А), а также предложены альтернативные варианты классификаций [71, 188].

Антитела класса 1 специфически распознают RBD в конформации «up». Их эпитоп частично перекрывается с RBM, что обеспечивает эффективное блокирование взаимодействия RBD с ACE2 и, как следствие, высокую нейтрализующую активность против вируса. К данному классу относятся антитела S2E12 (Рисунок 9, Б) [189], CB6 (этесевимаб) [190] и REGN10933 (касиливимаб) [158]. Отдельную категорию класса 1 составляют антитела, эпитоп которых почти идентичен сайту связывания RBD с ACE2 (ACE2-миметики). Они также способны эффективно блокировать взаимодействие с RBD и присоединение вируса к клетке-хозяину. К ним относятся антитела S2K146 [191], P2C-1F11 [192] и регданвимаб (CT-P59) [178].

Антитела класса 2 связываются с участком RBM как в конформации «up», так и в «down», блокируя взаимодействие с ACE2, аналогично антителам класса 1 [186]. Представителями данного класса являются антитела LY-CoV555 (бамланивимаб) [151], P2B-2F6 [56], MD65 [193] и P5S-2A9 [192].

Антитела класса 3 распознают участки RBD, расположенные вне ACE2-связывающего сайта. Такие эпитопы обычно локализованы на более консервативной боковой поверхности домена и доступны как в состоянии «up», так и в «down». Несмотря на отсутствие прямого перекрывания RBD-ACE2 интерфейса, антитела данного класса способны эффективно нейтрализовать вирус за счет стерических эффектов или ограничения конформационной подвижности S-белка.

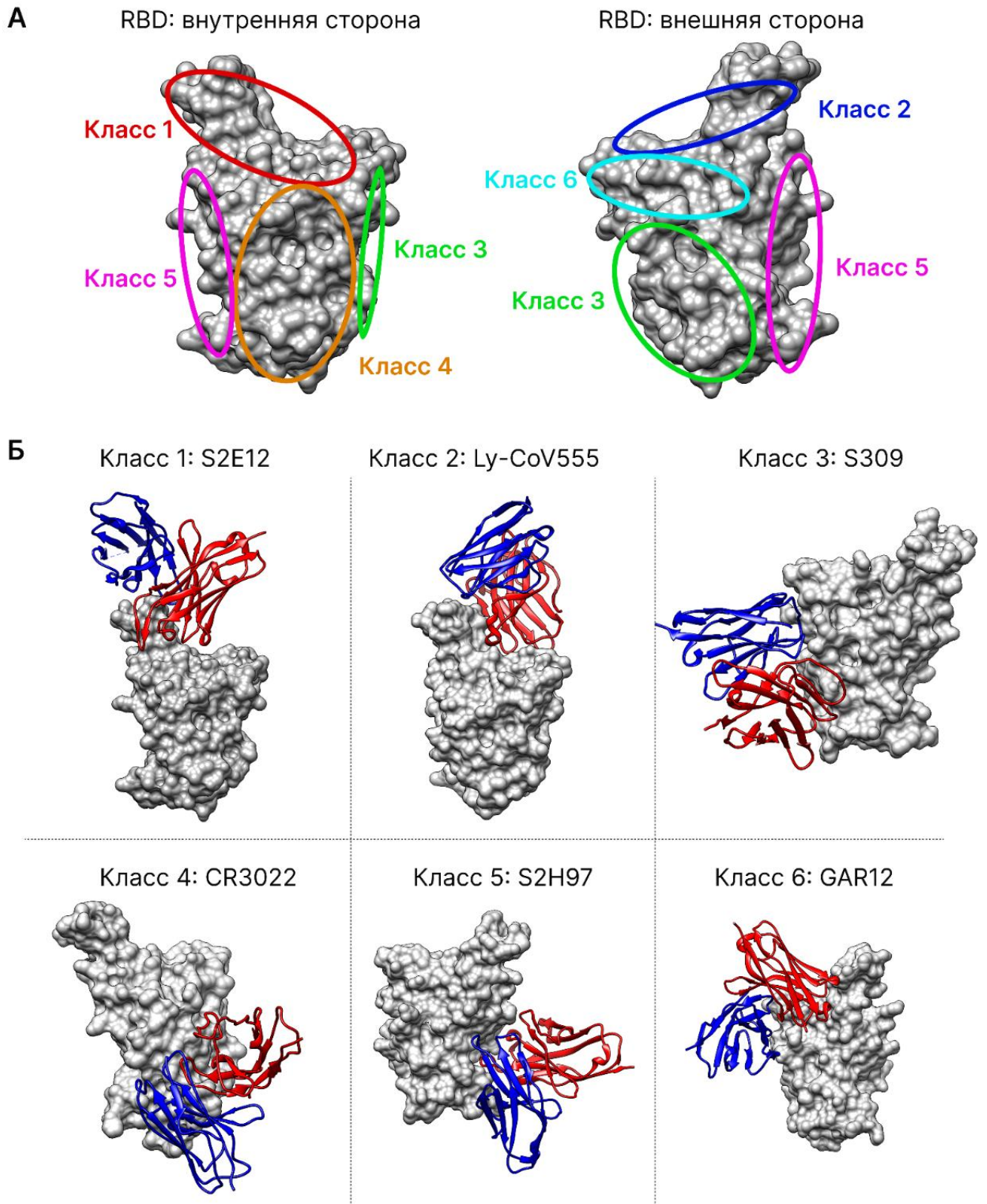


Рисунок 9. А. Структура RBD (PDB: 7K45) с обозначением областей эпитопов 6 классов антител. Б. Комплексы RBD-mAb: S2E12 (PDB: 7K45), LY-CoV555 (PDB: 7KMG), S309 (PDB: 7XSW), CR3022 (PDB: 8FAH), S2H97 (PDB: 7M7W), GAR12 (PDB: 8DXT)

Наиболее известным представителем класса 3 является антитело S309 [194], оптимизированная форма которого — сотровимаб, получила EUA FDA в 2021 г. для терапии

COVID-19 [195]. Антитело LY-CoV1404 (бебтеловимаб), выделенное от реконвалесцента, связывается с участком RBD, доступным в обеих конформациях и частично перекрывающимся с RBM, блокируя взаимодействие с ACE2 [150]. Хотя по механизму клон LY-CoV1404 близок к антителам класса 2, его эпитоп схож с S309. К классу 3 также относятся антитела SP1-77 [196], SW186 [197], S2X324 [198] и REGN10987 (имдевивааб) [158].

Антитела класса 4 связываются с эпитопами вне RBM в «up»-конформации RBD [199]. Большинство из них обладает перекрестной реактивностью в отношении различных сарбековиров, однако часто характеризуется умеренной нейтрализующей активностью. Типичное для данного класса антитело CR3022, выделенное от пациента с SARS, распознает высококонсервативный эпитоп, общий для SARS-CoV и SARS-CoV-2, недоступный в префузионном состоянии S-белка. Его связывание способствует переходу белка в постфузионную форму, приводя к дестабилизации тримера [200]. К данному классу относятся также антитела ADG-2 [201], S2X259 [202], DH1047 [203] и 10-40 [204].

Некоторые антитела относят к промежуточным классам ввиду перекрывания ими эпитопов смежных областей RBD [205]. Например, антитело BD55-5514 (SA55) [206] относят к классу 1/4, так как оно частично перекрывает эпитопы классов 1 и 4 [71]. Оно было выделено из библиотеки антител (~13 000 вариантов), полученных от лиц, ранее перенесших SARS-CoV и позднее вакцинированных против SARS-CoV-2, и демонстрирует очень высокую нейтрализующую активность. Эпитоп SA55 остается консервативным даже у новых вариантов вируса. Кроме того, рассматривается назальная форма SA55, которая может повысить эффективность ранней местной защиты слизистых оболочки дыхательных путей [207].

Антитела класса 5 нацелены на криптоический, высококонсервативный эпитоп в области E465, общий для различных сарбековиров [208]. Этот эпитоп частично перекрывается с NTD и становится доступен только в «up»-конформации хотя бы одного RBD [209]. Связывание этого участка антителом S2H97 ускоряет переход S-белка в постфузионное состояние и эффективно блокирует проникновение вируса в клетку-хозяина [187]. Антитело XMA09 распознает схожий эпитоп и сохраняет активность против варианта Омикрон [210]. Антитело ION_300 взаимодействует с участком на противоположной стороне RBM [211]. Эпитоп антитела WRAIR-2057 частично совпадает с S2H97 и ION_300, а WRAIR-2063 связывает RBD в «up»-конформации и способствует распаду S-тримера. Аналогичный механизм наблюдается у антител FD20, 7D6 и 6D6, которые дестабилизируют S-белок, вызывая его диссоциацию на субъединицы и тем самым нейтрализуя вирус [212]. Связывание WRAIR-2063 усиливает доступность криптоических участков для антител, таких как CR3022, что указывает на возможное влияние антител класса 5 на конформационную динамику S-белка и повышение эффективности нейтрализации [209].

Эпитопы антител класса 6 представляют собой криптические, преимущественно скрытые в «down»-конформации участки RBD, которые становятся доступны при переходе домена в «up»-конформацию. Данный класс антител связывает консервативную область, расположенную отдаленно от участков, конкурирующих с ACE2 (классы 1 и 2), между эпитопами антител классов 3 и 5. Механизм нейтрализации антител класса 6 не сводится к блокированию взаимодействия RBD-ACE2, а связан с нарушением конформационной динамики S-белка. Связывание антител стабилизирует нежелательные для вируса конформации RBD и препятствует образованию функциональной структуры, необходимой для эффективного взаимодействия с ACE2. Эпитопы антител данного класса отличаются высокой степенью консервативности среди сарбековирусов, что делает такие антитела перспективными кандидатами для разработки препаратов широкого спектра действия. К числу наиболее изученных представителей относится антитело GAR12 [156], а также антитела 4C12-B12 и 4G1-C2, полученные путем *in vitro* мутагенеза [213].

1.10. Иммунное ускользание

В то время как стойкий, пожизненный иммунитет, индуцированный вакцинацией или перенесенной инфекцией, наблюдается для ряда вирусных заболеваний, таких как корь [214], для сезонных коронавирусов человека (NL63, 229E, OC43 и HKU1) характерна кратковременная гуморальная защита [215]. Помимо различий в динамике формирования иммунного ответа, существенную роль играет и эволюция самих вирусов, приводящая к возникновению вариантов, способных ускользать от действия антител. Иммунитет большинства населения мира сформировался преимущественно в ответ на воздействие первых появившихся штаммов SARS-CoV-2. В результате иммунологическая память оказалась импринтирована ранними антигенными вариантами вируса. Тем не менее в отдельных случаях у людей, подвергшихся воздействию антигенов, существенно отличающихся от исходного варианта SARS-CoV-2 (например, BA.1 или JN.1), наблюдалась *de novo* активация В-клеток, специфичных к вариантам Омикрон [216]. Более того, праймирование иммунной системы наивных (ранее не инфицированных и не вакцинированных) индивидуумов подвариантами XBB или JN.1 приводило к формированию эпитоп-специфических антител с минимальной перекрестной реактивностью к уханьскому штамму, что указывает на выраженный антигенный разрыв между этими вариантами и предполагает возможность формирования различных серотипов SARS-CoV-2 у человека [217]. Эти данные позволяют предположить, что использование антигенно удаленных вакцинных конструкций или инфицирование вариантами, существенно отличающимися от оригинального штамма, может индуцировать качественно новый иммунный ответ, способный преодолевать эффект антигенного импринтинга как у лиц с ранее

сформированной иммунологической памятью, так и у последующих поколений, не обладающих первичным иммунитетом [71].

Предыдущие исследования позволили идентифицировать ряд В-клеточных эпитопов и множество mAb, направленных против SARS-CoV-2. Однако в условиях быстрой эволюции вируса значительная часть pAb, включая те, которые использовались в клинической терапии, утратила эффективность из-за мутаций в иммунодоминантных областях антигена. Особенно наглядно это проявилось с появлением варианта Омикрон и его подвариантов, несущих многочисленные мутации в S-белке [218]. Практически все терапевтические антитела, получившие EUA FDA в период пандемии COVID-19, оказались уязвимыми к иммунному ускользанию новых вариантов вируса.

У многих вирусов, включая грипп и ВИЧ, сайты связывания с рецепторами хозяина (например, гемагглютинин у гриппа [219] и белок оболочки Env у ВИЧ [220]) являются умеренно консервативными. Существенные изменения в этих регионах могут нарушить способность вируса к инфицированию, что ограничивает допустимый спектр мутаций. Однако RBM SARS-CoV-2 является исключением: он остается одним из наиболее вариабельных участков S-белка, способным к накоплению мутаций без существенной потери вирусной приспособленности.

Антитела, нацеленные на RBM, как правило, обладают высокой нейтрализующей активностью за счет блокирования его взаимодействия с ACE2. Однако именно в RBM локализуется значительная часть мутаций, что позволяет вирусу избегать связывания с высокоаффинными pAb и ограничивает их перекрестную реактивность. Аналогичную картину можно наблюдать и для NTD, где большинство антител теряют активность в отношении новых вариантов. Таким образом, несмотря на высокую активность, антитела к RBM и NTD, как правило, обладают узкой специфичностью. Появление мутаций K417N, E484K и N501Y в RBD, которые были впервые выявлены у вариантов Бета и Гамма, понизило аффинность антител классов 1 и 2, взаимодействующих с RBM, что привело к иммунному ускользанию вируса и снижению эффективности нейтрализации [78, 221]. Терапевтическое антитело класса 2 LY-CoV555 (бамланивимаб) полностью теряет способность связываться с RBD при наличии мутации E484K [151]. Аналогично, мутация E484K уменьшает эффективность антитела P2B-2F6, ограничивая активность LY-CoV555 и P2B-2F6 в отношении варианта Альфа [222].

Антитела класса 3 связываются с относительно консервативными участками и сохраняют активность против ранних подвариантов линии Омикрон [223]. Однако появление вариантов ХВВ и ВQ.1, содержащих мутации R346T, K444T, V445P и N460K, снизило эффективность этой группы антител. Аминокислотная замена F371 усиливает пространственное взаимодействие с гликаном вблизи сайта гликозилирования N343, что снижает нейтрализующую активность

антитела S309 [224]. Аналогично, терапевтическое нейтрализующее антитело LY-CoV1404 демонстрировало высокую эффективность против вариантов SARS-CoV-2. Однако появление мутаций K444N/T, V445P/H и G446S у новых генетических линий вируса, таких как BQ.1.1 и XBB, снизило эффективность связывания антитела с вирусом и способствовало его нейтрализационной устойчивости. Антитело AZD8895 (тиксагевимаб/COV2-2196) взаимодействует с так называемой «гребневой» областью RBM, центр которой составляют гидрофобные АО, включая F486. Взаимодействие антител класса 3 с этим АО является ключевым для нейтрализации вируса. Однако в более поздних вариантах RBM АО F486 подвергся замене на серин (S), валин (V) или пролин (P), что значительно снизило сродство вируса к AZD8895, а также к ряду других антител, нацеленных на данную область [71].

Антитела классов 4-6, как правило, взаимодействуют с более консервативными участками RBD вне иммунодоминантного RBM и в меньшей степени зависят от переменных АО, непосредственно участвующих в связывании ACE2 [213, 225]. Благодаря этому они характеризуются более широкой перекрестной реактивностью и меньшей подверженностью иммунному ускользанию.

На сегодняшний день циркуляция SARS-CoV-2 сохраняется во всем мире, создавая устойчивые риски для глобального здравоохранения и поддерживая давление отбора, стимулирующее дальнейшую вирусную эволюцию. В этой связи разработка потентных нейтрализующих антител, способных сохранять активность против широкого спектра вариантов вируса и потенциально обеспечивать защиту от будущих сарбековирусов, является одной из приоритетных задач современной противовирусной терапии [225]. Более того, разработанные методологические подходы могут послужить основой для создания универсальных платформ, направленных против других высокоизменчивых вирусов.

1.11. Широко нейтрализующие антитела

Целью современной противовирусной терапии является создание широко нейтрализующих антител (bnAb), которые нацелены на консервативные эпитопы и сочетают в себе как высокую активность, так и устойчивость к иммунному ускользанию [226]. Создание таких антител сопряжено с принципиальной трудностью: необходимостью сбалансировать эффективность и широту действия, поскольку эти характеристики часто находятся в противоречии. На сегодняшний день лишь единичные антитела сохранили статус bnAb и высокую нейтрализующую активность против полного спектра вариантов SARS-CoV-2, включая XFG и NB.1.8.1. К их числу относятся CYFN1006-1, SA55, BD55-1205 [182] и VYD2311 [185] (Рисунок 10).

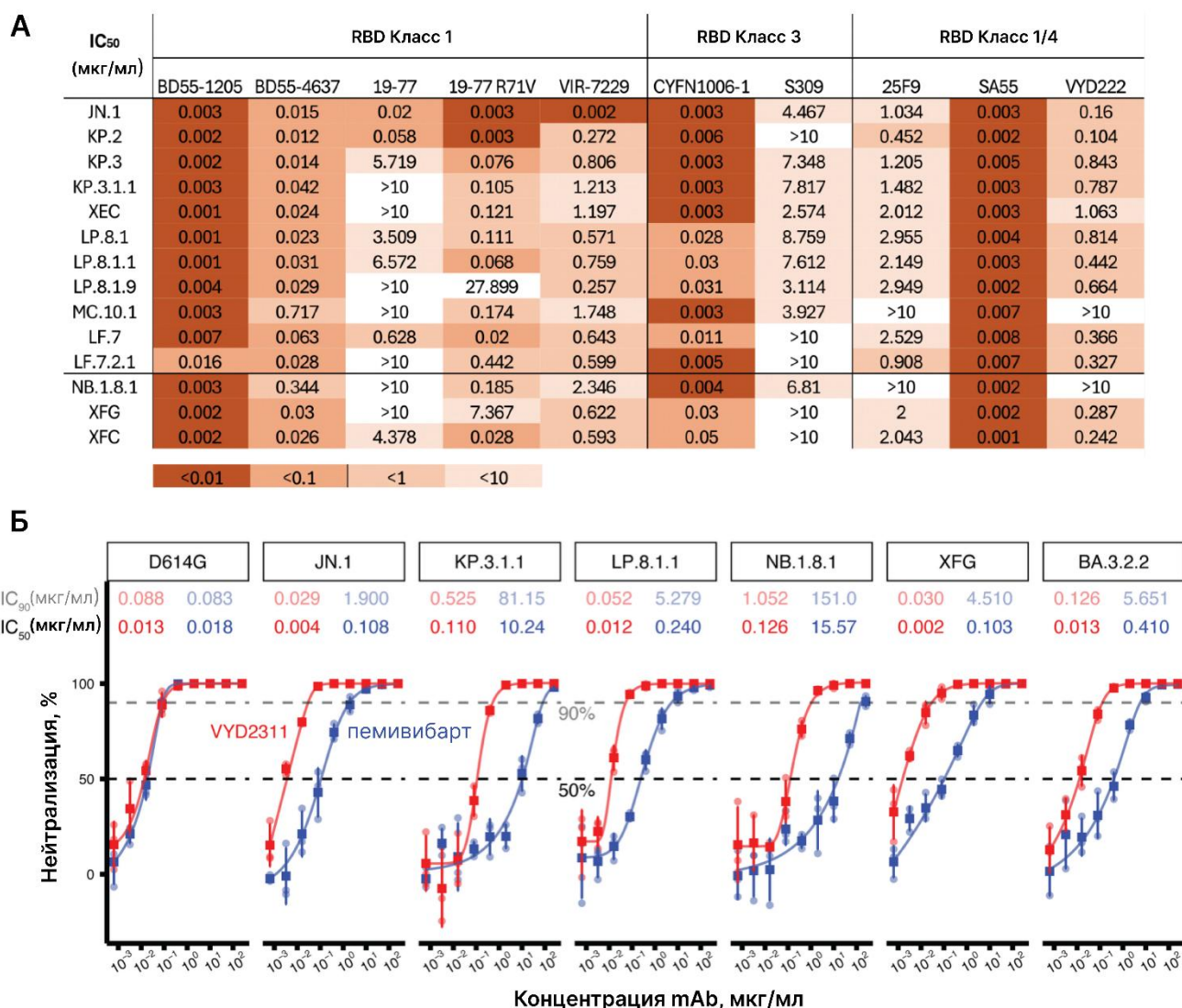


Рисунок 10. Активность mAb при нейтрализации лентивирусов, псевдотипированных S-белком вариантов SARS-CoV-2. **А.** Нейтрализующая активность bnAb CYFN1006-1, SA55, BD55-1205 и других mAb ([182], с изменениями). **Б.** Нейтрализующая активность пемивибарта (VYD222) и bnAb VYD2311 ([185], с изменениями)

Вероятность выявления новых bnAb с сопоставимой активностью остается крайне низкой, что обуславливает необходимость применения дополнительных подходов. Одним из решений является использование коктейлей антител, то есть комбинаций молекул, нацеленных на различные, неперекрывающиеся эпитопы S-белка [227]. Подход основан на принципе функциональной избыточности: даже если мутации снижают сродство одного антитела, другие компоненты коктейля продолжают обеспечивать нейтрализацию, существенно сокращая вероятность вирусного ускользания. Дополнительно применяется стратегия создания биспецифических антител, которые объединяют два независимых связывающих домена в одной молекуле [228]. Такие конструкторы могут одновременно взаимодействовать с двумя различными

участками RBD или даже двумя разными белками вируса, что не только усиливает авидность, но и делает нейтрализацию более устойчивой к появлению точечных мутаций.

Параллельным подходом к созданию терапевтических средств против SARS-CoV-2 является получение VHH, эпитопы которых, как правило, располагаются в более консервативных и менее доступных для мутаций областях RBD, что существенно снижает вероятность иммунного ускользания [229]. Кроме того, их малая молекулярная масса и модульность делают VHH удобными строительными блоками для создания мультиспецифичных конструкций, способных объединять несколько функциональных доменов в одной молекуле. Эти особенности определяют их перспективность и будут рассмотрены в следующем разделе.

1.12. Однодоменные антитела

1.12.1. Особенности структуры

Структура антитела IgG, состоящего из двух идентичных тяжелых цепей (HC, heavy chain) и двух идентичных легких цепей (LC, light chain), хорошо известна и высококонсервативна у млекопитающих. Легкая цепь этих иммуноглобулинов представлена двумя доменами, в то время как тяжелая цепь состоит из четырех доменов. Нуклеотидные последовательности N-концевых доменов HC и LC варьируют между антителами (VH и VL). Парные VH/VL домены составляют паратоп — Fv-фрагмент, распознающий антиген.

Открытие в сыворотке крови представителей семейства верблюдовых антител, состоящих только из тяжелых цепей, создало основу для разработки новых терапевтических препаратов [230]. В крови верблюдовых содержатся как полноразмерные (классические) антитела (IgG1 изотипа), так и особые антитела (IgG2 и IgG3 изотипов), не имеющие первого константного домена тяжелой цепи (CH1) и обеих легких цепей, HCAb (Рисунок 11) [231]. Наличие в эпитопсвязывающем фрагменте HCAb единственного вариабельного домена позволяет легко идентифицировать VHH против конкретного антигена после иммунизации, клонирования VHH-репертуара В-клеток, циркулирующих в крови, и аффинной селекции [232].

Семейство верблюдовых включает следующие роды: верблюды (одногорбые *Camelus dromedarius*, двугорбые *Camelus bactrianus*), ламы (*Lama glama*, *Lama guanicoe*), альпаки (*Vicugna vicugna*, *Vicugna pacos*). Вариабельные домены VHH представителей этого семейства формировались в течение более 50 млн лет [230]. Рекомбинантные VHH также называют наноантителами (Nb, nanobody), так как они составляют лишь 1/10 массы полноразмерного IgG (15 кДа против 150 кДа). Несмотря на малый размер, VHH обладают высокой аффинностью и специфичностью к антигенам [233]. Как и классические антитела, HCAb в своем вариабельном домене несут четыре консервативные каркасные области (Fr, framework region) — Fr1–4, разделенные тремя вариабельными участками, определяющими комплементарность (CDR,

complementary determining region) — CDR1–3. Отличительной особенностью Fr2 VHH является наличие гидрофильной поверхности, которая компенсирует отсутствие вариабельного домена легкой цепи, так как гидрофильные аминокислоты препятствуют агрегации VHH, в то время как VH-домены классических антител агрегируют друг с другом в отсутствие VL-доменов.

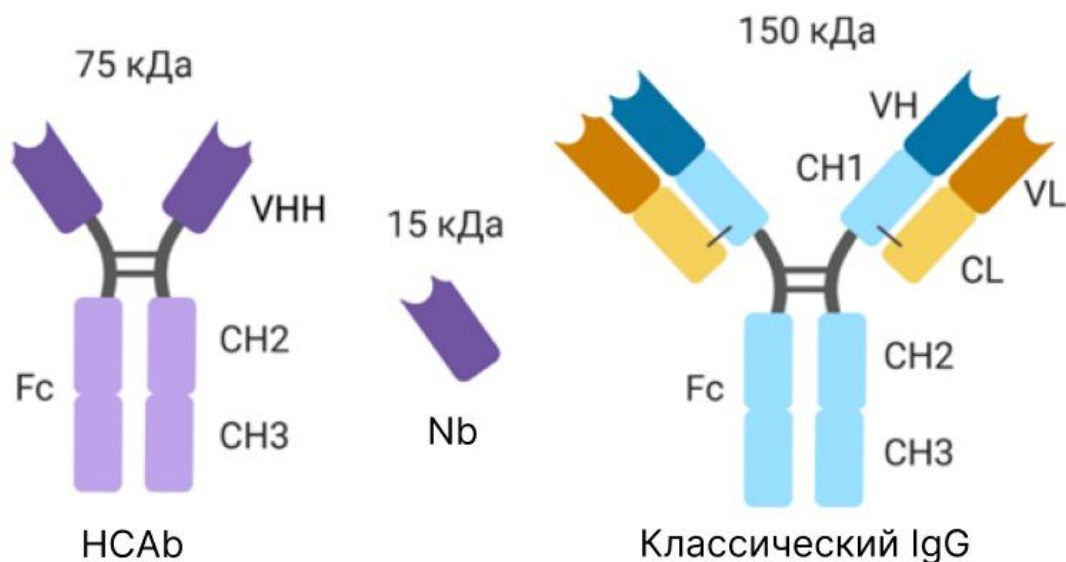


Рисунок 11. Сравнительная схема структур HCAb верблюдовых и классического IgG1 антитела. CH (1–3) — константные домены тяжелых цепей, CL — константный домен легкой цепи, Nb — наноантитело, VH — вариабельный домен тяжелой цепи, VL — вариабельный домен легкой цепи, Fc — кристаллизуемый фрагмент, VHH — вариабельный домен тяжелой цепи HCAb верблюдовых

Еще одной особенностью VHH является необычное положение и длина петли CDR3, которая обычно загибается к тому участку поверхности, который у VH-доменов классических антител взаимодействует с VL-доменом легкой цепи, к тому же CDR3 у VHH часто длиннее и более разнообразны по размеру (3–28 АО), чем у классических антител (8–15 АО) [234]. Необычный размер CDR3-петли VHH увеличивает поверхность потенциального взаимодействия антитела с антигеном-мишенью, тем самым частично компенсируя отсутствие VL домена. Петля CDR3 является уникальной структурой молекулы антитела, так как кодируется фрагментом ДНК, который образуется путем рекомбинации во время развития В-клетки. Также CDR3 вносит основной вклад в разнообразие и специфичность антител. В свою очередь, петли CDR1 и CDR2 не столь разнообразны, поскольку кодируются ограниченным числом различных V-элементов генома В-клеток зародышевой линии.

С-концевая часть длинной петли CDR3 способна складываться к поверхности VHH, которая у обычных антител соответствует месту взаимодействия VH с VL, что объясняет часто искаженный тип связывания VHH с мишенью по сравнению с типичным лобовым связыванием антигена VH-VL паратопом. Частичное свертывание петли CDR3 стерически исключает

связывание ассоциированного VL домена и тем самым способствует независимости структуры VHH. Также длинный CDR3 VHH может образовывать пальцеобразное расширение, способное поместиться в полости целевого белка, что позволяет связывать уникальные эпитопы, недоступные обычным mAb, антигенсвязывающая поверхность которых обычно плоская [235].

Малый размер, однодоменность и наличие гидрофильных АО в Fr2 обуславливают высокую растворимость и физическую стабильность VHH. В результате такие белки в сравнении с классическими антителами способны сохранять связывающую активность в более широком температурном диапазоне и в относительно агрессивных составах сред, отлично проникают в различные ткани и могут быть эффективно произведены в микроорганизмах с низкими затратами ввиду отсутствия сайтов гликозилирования [236].

Простота получения и удобство использования Nb являются особым преимуществом по сравнению с классическими антителами, поэтому Nb стали чрезвычайно ценным реагентом в биохимии, структурной биологии и разработке диагностических тестов [237]. Так, в 2021 г. была опубликована работа, описывающая конструирование тест-системы на основе сэндвич-ИФА для обнаружения и количественного определения S-белка с использованием Nb [238]. Nb против RSV успешно вводятся непосредственно в дыхательные пути [239], что позволяет избежать лечения путем инъекции. Несмотря на явные терапевтические преимущества в сравнении с классическими антителами, Nb имеют и свои недостатки. Так, например, они подвержены быстрому почечному клиренсу. Для терапевтического применения часто конструируют олигомерные варианты на основе VHH, чтобы увеличить их период полужизни в кровотоке, придать им авидность и свойства мультивалентных антител. Существует несколько стратегий олигомеризации, включающих объединение VHH в цепочки с помощью пептидных линкеров или слияние с другими олигомерными белками, кроме того, VHH также могут быть усилены Fc-фрагментами человека для конструирования формата гуманизированного антитела, состоящего только из тяжелых цепей, и для включения Fc-опосредованных эффекторных функций.

В 2019 г. FDA одобрило первый препарат на основе VHH — каплацизумаб (Cablivi) — гуманизированный VHH-димер, применяемый для лечения тромботической тромбоцитопенической пурпуры [240]. В дальнейшем клиническое применение VHH было расширено: в Японии в 2022 г. был одобрен озорализумаб (Nanozora) — VHH-тример, применяемый для лечения ревматоидного артрита [241]. В Китае в 2021 г. был одобрен энвафолимаб (KN035) — гуманизированный VHH-Fc для лечения опухолей с высокой микросателлитной нестабильностью или дефицитом системы репарации неспаренных оснований [242]. Кроме того, в 2022 г. FDA одобрило терапевтическую конструкцию цилакабтаген аутолейсел (Carvykti) для лечения рецидивирующей или рефрактерной

множественной миеломы, которая содержит два VHH в составе химерного антигенного рецептора Т-клеток [243].

1.12.2. Однодоменные антитела против вирусов

Исходя из уникальных преимуществ VHH, их широко используют при разработке лекарственных средств против множества вирусов, включая вирусы гриппа, ВИЧ-1 и RSV [244]. Их получают из иммунных, наивных или синтетических библиотек. Иммунные библиотеки могут быть созданы на основе лимфоцитов периферической крови (PBL, *peripheral blood lymphocytes*), выделенных из верблюдовых, иммунизированных полноценным вирусным агентом или определенным вирусным антигеном [245]. К тому же, VHH с приемлемой целевой специфичностью могут быть получены из наивных библиотек, которые были сконструированы из В-клеток верблюдовых, не иммунизированных целевым вирусным агентом. В свою очередь, синтетические VHH-библиотеки не требуют содержания модельных животных для иммунизации. Такие библиотеки построены на основе хорошо охарактеризованных VHH, в которых сохраняются консервативные F_g-участки, а аминокислотные последовательности в CDR могут быть изменены посредством сайт-направленного мутагенеза [246]. В то же время первостепенным выбором для выделения высокоаффинных VHH часто являются иммунные библиотеки, так как естественное соматическое созревание антител приводит к их высокому разнообразию и оптимизации структуры для связывания с антигеном. Антиген-специфичные VHH в дальнейшем выделяют из библиотек при помощи фагового, дрожжевого или рибосомного дисплеев [247–249].

Было описано множество VHH, способных нейтрализовать вирусы на различных этапах жизненного цикла. Например, VHH, которые предотвращают проникновение вируса гриппа в клетку, блокируя взаимодействие его поверхностных белков с рецепторами клетки (связывание белка гемагглютинаина) [250], ВИЧ-1 (связывание gp120) [251] и MERS-CoV (связывание белков оболочки) [252]. Кроме того, сообщалось о Nb, блокирующих белок слияния RSV в префузионном состоянии [253]. Эти Nb способны предотвращать проникновение вируса, ингибируя слияние мембран вируса и клетки-хозяина. Другое применение Nb — их экспрессия в клетках-мишенях, где они могут влиять, например, на репликацию вируса и ядерный транспорт вирусных рибонуклеопротеинов, как было показано для Nb против нуклеопротеина вируса гриппа [254], а Nb против белка Rev ВИЧ-1 могут ингибировать ядерный экспорт вирусной мРНК [255]. Кроме того, перспективным направлением является доставка Nb непосредственно в легкие с помощью небулайзеров в качестве средства блокирования респираторных вирусов до того, как они проникнут в клетки.

Специфические к SARS-CoV-2 Nb могут представлять большой фундаментальный интерес при описании и определении критических эпитопов RBD, участвующих во взаимодействии с ACE2. Кроме того, VHH могут служить высокоэффективным диагностическим инструментом. Их можно применять в иммуноферментном и иммунохроматографическом анализе, а термостабильность VHH делает их особенно привлекательными для диагностических приложений в местах оказания медицинской помощи [256].

Нейтрализующие SARS-CoV-2 Nb с более высоким средством в основном получают методом *in vivo*. Рекомбинантный S-белок или RBD используют для иммунизации экспериментальных животных, таких как верблюды, ламы или альпаки. Антитела, продуцируемые В-клетками, подвергаются аффинному созреванию *in vivo*. Далее выделяют суммарную РНК PBL и конструируют иммунную библиотеку VHH-последовательностей. Дисплеи и другие технологии используются для эффективного скрининга таких библиотек и получения Nb против SARS-CoV-2.

Первым структурно охарактеризованным Nb против SARS-CoV-2 стало VHH72 [257], которое ранее было идентифицировано как специфичное к S-белку SARS-CoV. Оно связывается не с RBM, взаимодействующим с ACE2, а с латеральной областью домена, консервативной у SARS-CoV и SARS-CoV-2. Способ связывания VHH72 с RBD подразумевает стерическую конкуренцию со связыванием с ACE2, таким образом, механизм нейтрализации в данном случае отличается от прямой конкуренции с ACE2, когда антитело блокирует связывание вируса с рецептором. В одном из исследований антитела, связывающиеся вблизи этого эпитопа, обозначены как «кластер 1» [258], тогда как по классификации Barnes и др. антитела, связывающие подобные эпитопы, относят к классу 4 [186]. Данное несоответствие объясняется тем, что эпитопы Nb нередко имеют криптоический характер, то есть располагаются в труднодоступных для классических полноразмерных иммуноглобулинов участках антигена. В связи с этим классификация, традиционно применяемая для полноразмерных mAb (классы 1–6), ограничено применима к Nb. Для описания эпитопов Nb в литературе чаще используется альтернативная классификация, основанная на делении на кластеры. Согласно такой кластеризации, Nb, эпитопы которых расположены удаленно от RBM, относят к кластеру 1, тогда как Nb, взаимодействующие с RBM и блокирующие связывание RBD с рецептором ACE2, относят к кластеру 2.

После исследования VHH72 сообщалось о других Nb кластера 1, включая C1, F2, Sb68 (полностью синтетический белок), VHH-U, VHH-W, NM1226, Nb12, Nb30, WNb10 и SR3 [259–265]. Эпитопы RBD для этих Nb различаются, однако в каждом комплексе наблюдается взаимодействие с β -тяжем (аминокислотные остатки с S375 по Y380). Nb кластера 1 используют различные элементы своей структуры для контакта с этим β -тяжем. Для VHH72, C1, WNb10 и

Sb68 взаимодействие напоминает связывание антипараллельных β -тяжей в первую очередь через CDR3. Nb F2, VHH-U и VHH-W тоже используют CDR3, но связывают область, еще более отдаленную от сайта взаимодействия RBD-ACE2. Nb SR3 связывает α -спираль G532-Q539, которая находится немного за пределами RBD [265]. Сравнение комплексов этих Nb с RBD и комплексом RBD-ACE2 показало, что ориентация некоторых Nb, таких как VHH72, предотвращает связывание RBD с ACE2, в то время как другие, например F2, не предотвращают связывание с ACE2, но все же нейтрализуют вирус, дестабилизируя тример S-белка и предотвращая его взаимодействие с рецептором [259].

Первым Nb, способным распознавать эпитоп кластера 2 (класс 1 и 2), было H11-H4, аффинность которого к RBD с Fc-фрагментом (RBD-Fc) составила 12 нМ. Nb H11-H4 конкурирует с ACE2 за связывание с RBD [266]. В дальнейшем различные группы исследователей получили и охарактеризовали множество других Nb данного кластера, включая C5, H3, mNb6, Nb6, Nb20, NM1230, Sb23, Ty1, Nanosota-1, VHH-E, WNb2, MR17, SR4, Sb14, Sb16 и Sb45 [259–262, 264–272]. Данные Nb связывают верхнюю поверхность RBD, и лишь для нескольких из них эпитопы почти не перекрываются. В совокупности эти участки образуют сплошную перекрывающуюся область на RBD, охватывающую АО RBD с P491 по T500 и с G446 по Y449. АО Q493 входит в эпитоп каждого из представленных Nb и играет существенную роль в связывании ACE2 [7]. Таким образом, Nb кластера 2 блокируют связывание RBD с ACE2 за счет того, что их эпитопы перекрывают участок RBD, включающий остаток Q493, а также остатки с Y489 по Y505 [273].

В форме S-белка, в которой все три RBD находятся в конформации «down», эпитопы Nb кластера 1 не доступны для связывания [24]. В одной из публикаций приводились данные о том, что Nb C1 и F2 нарушают тримерную структуру S-белка [259]. При связывании Nb Nb30 и VHH-V (в сочетании с VHH-E) кластера 1, в структуре S-белка все три RBD находятся в «up»-конформации, а при связывании Nb12 — два RBD в «up»-конформации и один в «down».

В отличие от Nb кластера 1, эпитоп кластера 2 доступен для связывания в закрытой форме S-белка. Комплекс Nb Sb23 с S-белком стабилизирует тример в конфигурации с двумя RBD в «up»- и одним в «down»-положении (2-up/1-down). Nb H11-H4, Ty1 и Sb45, напротив, фиксируют S-белок в конфигурации 1-up/2-down. Кроме того, комплекс Sb45 с S-белком может находиться в обеих конфигурациях: как 2-up/1-down, так и 1-up/2-down. Nb C5, Nb6 и mNb6 связывают S-белок со всеми RBD в «down»-состоянии.

Сердцевина эпитопа кластера 1 представляет собой β -тяж RBD (АО с S375 по Y380), в то время как сердцевина эпитопа кластера 2 состоит из двух структурных областей (с G446 по Y449 и с P491 по T500). Эти эпитопы представляют собой два пространственно различных участка на поверхности RBD. Структура VHH-V кластера 1 и VHH-E кластера 2 в комплексе с мономером

S-белка, полученная с помощью крио-ЭМ, отражает возможность одновременного связывания RBD двумя Nb [266]. Было показано, что это приводит к аддитивной нейтрализации при комбинированном использовании Nb CR3022 и H11-H4 [261]. Кроме того, один из сэндвич-ИФА для определения S-белка основан на способности Nb C5 и C1, относящихся к разным кластерам, одновременно связываться с RBD [238].

Мультивалентные антитела, объединяющие два или более VHH, нацеленных на различные эпитопы RBD, усиливают нейтрализующую активность и обеспечивают более широкий охват циркулирующих штаммов [274]. Например, XVR011, бивалентная версия Nb VHH-72 с Fc-фрагментом и повышенной аффинностью, продемонстрировала улучшенную эффективность по сравнению с родительским Nb [275]. Гетеродимерные конструкторы aRBD-2-5 и aRBD-2-7 демонстрируют более чем десятикратное повышение аффинности за счет нацеливания на неперекрывающиеся эпитопы, обеспечивая эффективную нейтрализацию различных вариантов вируса [276]. Бипаратопические конструкции NM1267, NM1268 и LR5-MR3 на основе Nb, распознающие как консервативные, так и переменные эпитопы, показали высокую эффективность против нескольких штаммов SARS-CoV-2 [272, 277]. Биспецифические конструкции VHH-Fc превосходят моноспецифические аналоги по связыванию субъединицы S1 и блокированию взаимодействия RBD-ACE2 благодаря способности одновременно нацеливаться на два различных эпитопа, что повышает avidность и снижает вероятность вирусного ускользания. Триспецифические VHH-Fc, такие как 3F-1B-2A и 1B-3F-2A, в которых третий VHH добавлен для синергетического усиления активности, демонстрируют улучшенное связывание, блокирование и нейтрализацию псевдовируса, подчеркивая их терапевтический потенциал [278]. Гомотримерное антитело PiN-21 при интраназальном введении в верхних дыхательных путях эффективно снижает вирусные титры в легких и облегчает течение инфекции [279]. Коктейли Nb, нацеленные как на RBD, так и на не-RBD области S-белка, усиливают нейтрализацию и повышают устойчивость к вариантам, включая Альфа, Бета и мутациям N501Y, D614G, за счет синергического связывания с различными эпитопами [264].

Для повышения аффинности и нейтрализующей активности VHH к ним присоединяют Fc-фрагменты IgG или IgA. Гетеробивалентные VHH-Fc также демонстрируют улучшенные показатели в отношении различных вариантов вируса. Например, тетравалентные конструкции Nb-015 и Nb-021 или бивалентное антитело p3113.1-Fc проявляют высокую нейтрализующую активность в отношении различных вариантов SARS-CoV-2, включая подварианты линии Омикрон [280, 281]. Секреторные IgA-конъюгаты, такие как S2-3IgA2m2, превосходят аналоги с Fc-IgG по нейтрализации новых вариантов вируса, включая ХВВ и BQ.1.1 [282]. Дополнительным преимуществом таких конструкций является способность Fc-домена

обеспечивать эффекторные функции, включая CDC, ADCC и ADCP, что способствует ускорению клиренса инфицированных клеток и повышает общую противовирусную эффективность VHH.

Следует отметить, что, несмотря на описанную высокую нейтрализующую активность некоторых VHH и олигоспецифических конструкций на их основе, данные об их эффективности против вариантов вируса 2025–2026 гг. в настоящий момент отсутствуют.

Заключение

Таким образом, разработка технологий получения высокоэффективных нейтрализующих антител против SARS-CoV-2 является важным направлением для совершенствования методов борьбы с вирусными инфекциями. Особый интерес представляют sdAb, которые благодаря своим уникальным биологическим свойствам являются перспективной платформой для создания противовирусных препаратов. Мультиспецифичные форматы и комбинации VHH демонстрируют высокий потенциал в нейтрализации генетически разнообразных и быстро эволюционирующих вирусов.

Совокупность представленных данных подчеркивает актуальность дальнейшего развития препаратов нового поколения на основе антител. Современные исследования в области mAb и sdAb открывают возможности для создания универсальных платформ защиты, которые могут быть оперативно адаптированы к будущим вирусным угрозам и обеспечат основу для ускоренного реагирования на новые инфекционные вызовы. Кроме того, внедрение таких технологий в отечественной системе здравоохранения позволит укрепить биомедицинскую инфраструктуру и обеспечит возможность оперативной разработки препаратов против других высокопатогенных вирусов, что является ключевым элементом долгосрочной биологической безопасности.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

2.1.1. Реактивы и препараты

2-меркаптоэтанол (Sigma-Aldrich, США); ACE2 (лаборатория иммуногенетики ИМКБ СО РАН); BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США); Blotto, non-fat dry milk (Santa Cruz Biotechnology, США); BSA (СибЭнзим, Россия); D-дестиобиотин (Sigma-Aldrich-Aldrich, США); DEPC (Sigma-Aldrich, США); dNTP (СибЭнзим, Россия); FBS (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США); Ficoll-Paque™ Plus (Cytiva, Швеция); HEPES (AppliChem, Германия); HiDi (Applied Biosystems, США); L-глутамин (PanEco, Россия); Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США); MagnaBind™ Streptavidin Beads (Thermo Fisher Scientific, США); mouse monoclonal anti-M13 antibody (Sino Biological, США); NaCl (Хеликон, Россия); Ni-NTA агароза (Novagen, США); PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, кат. № 26619 (Thermo Fisher Scientific, США); PEG 6000 (Sigma-Aldrich, США); Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США); PMSF (Sigma-Aldrich, США); RAM-HRP (Sigma-Aldrich, США); Recombinant Protein A Agarose (McLab, США, кат. № PPA-503); SDS (Хеликон, Россия); Strep-Tactin® TACS Agarose (IBA Lifesciences, Германия); Streptavidin-HRP (Sigma-Aldrich, США); Sulfo-NHS-S-S-biotin (Thermo Fisher Scientific, США); СУМО-протеаза (лаборатория иммуногенетики ИМКБ СО РАН); Taq ДНК-полимераза (Биоспецифика, Россия); TEMED (Хеликон, Россия); Triton X-100 (Sigma-Aldrich, США); Tween 20 (Thermo Fisher Scientific, США); адъювант Fama (Gerbu, Германия); агар (Хеликон, Россия); агароза (Хеликон, Россия); акриламид (неоFroxx, Германия); азид натрия (Реахим, Россия); ампициллин (Синтез, Россия); АТФ (СибЭнзим, Россия); ацетат натрия (Хеликон, Россия); бисакриламид (неоFroxx, Германия); бромистый этидий (Serva, Германия); бромфеноловый синий (Sigma-Aldrich, США); буферы для рестрикции (СибЭнзим, Россия); гидрокарбонат натрия (Gerbu, Германия); гидроортофосфат калия (AppliChem, Германия); гидроортофосфат натрия (AppliChem, Германия); гликоген (Thermo Fisher Scientific, США); глицерин (Serva, Германия); глицин (Химмед, Россия); глюкоза (Химмед, Россия); дигидроортофосфат калия (AppliChem, Германия); дитиотреитол (Bio-Rad, США); ДНК-лигаза фага T4 (Биоспецифика, Россия); ДНК-маркер 100 bp + 1,5 Kb + 3 Kb, кат. № M27 (СибЭнзим, Россия); дрожжевой экстракт (ДИА-М, Россия); изоамиловый спирт (Реахим, Россия); изопропанол (Shell, Великобритания); имидазол (ДИА-М, Россия); ИПТГ (ДИА-М, Россия); канамицин (Синтез, Россия); конъюгат APC-стрептавидин (Thermo Fisher Scientific, США); кумасси бриллиантовый голубой R-250 (ДИА-М, Россия); ксиленцианоловый FF (Sigma-Aldrich, США); лаурилсаркозинат натрия (Sigma-Aldrich, США); ледяная уксусная кислота (Реахим, Россия); лимонная кислота (AppliChem, Германия); маннитол (AppliChem, Германия); метанол

(Реахим, Россия); о-фенилендиамин (Реахим, Россия); пенициллин/стрептомицин (Thermo Fisher Scientific, США); перекись водорода (AppliChem, Германия); персульфат аммония (Реахим, Россия); рестрикционные эндонуклеазы (СибЭнзим, Россия); сахароза (Химмед, Россия); серная кислота (Союзхимпром, Россия); соляная кислота (Союзхимпром, Россия); сульфат магния (Хеликон, Россия), тетрациклин (Синтез, Россия); тиоцианат гуанидина (ДИА-М, Россия); трипсин-ЭДТА, раствор 0,5% (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США); триптон (ДИА-М, Россия); трихлоруксусная кислота (AppliChem, Германия); Трис (Хеликон, Россия); фенол (Реахим, Россия); хлорид калия (Хеликон, Россия); хлорид магния (Хеликон, Россия); хлороформ (Реахим, Россия); цитрат натрия (AppliChem, Германия); ЭДТА (Хеликон, Россия); этанол (Реахим, Россия).

Коммерческие наборы: GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, США); GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, США); GeneJET Plasmid Miniprep Kit (Thermo Fisher Scientific, США); RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Fisher Scientific, США); Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems (Bio-Rad, США); NLuc FLASH Assay (NanoLight® Technologies, США).

2.1.2. Буферы и растворы

В работе использовали следующие буферы и растворы:

1. 30% раствор акриламида/бисакриламида: 292 г/л акриламида и 80 г/л N,N'-метиленбисакриламида;
2. ТАЕ: 40 mM Трис, 1 mM ЭДТА, 0,02 M ледяной уксусной кислоты, pH 8,4;
3. TE: 10 mM Трис-HCl, pH 8,0; 1 mM ЭДТА;
4. TES: 20 mM Трис-HCl, pH 8,0; 1 mM ЭДТА; 50 mM NaCl; 8% сахарозы;
5. PBS: 1,7 mM KH_2PO_4 ; 5,2 mM Na_2HPO_4 ; 150 mM NaCl, pH 7,4;
6. буфер нанесения белков для электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) (4×): 50 mM Трис-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 25% глицерина; 5% 2-меркаптоэтанола; 0,01% бромфенолового синего;
7. буфер нанесения ДНК в агарозный гель (5×): 0,5% бромфенолового синего; 0,5% ксиленицианолового; 50% глицерина;
8. электродный буфер для SDS-PAGE: 25 mM Трис-HCl, pH 8,3; 192 mM глицина; 0,1% SDS;
9. денатурирующий раствор (раствор D): 25 mM цитрата натрия; 4 M тиоцианата гуанидина, pH 7,0; 0,5% лаурилсаркозината натрия; 0,1 M 2-меркаптоэтанола;

10. концентрирующий буфер для SDS-PAGE: 1 мл 1,5 М Трис-НCl, pH 6,8; 0,5 мл 30% раствора акриламида/бисакриламида; 0,5 мл dH₂O; 20 мкл 10% персульфата аммония; 20 мкл 10% SDS; 10 мкл TEMED;
11. разделяющий буфер для SDS-PAGE: 2,35 мл 1,5 М Трис-НCl, pH 8,8; 2,5 мл 30% раствора акриламида/бисакриламида; 75 мкл 10% персульфата аммония; 75 мкл 10% SDS; 10 мкл TEMED;
12. субстратный буфер: 2,4 объема 0,5 М NaOH; 1 объем 0,5 М лимонной кислоты, pH 5,2; 0,5 мг/мл о-фенилендиамина и 0,01% H₂O₂.

Компоненты буферов и растворов растворяли в воде, очищенной на установке Arium pro (Sartorius, Германия).

2.1.3. Культуральные среды

В работе использовали следующие среды:

1. 2×TY: 16 г/л триптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl;
2. DMEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США);
3. IMDM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США);
4. LB: 10 г/л NaCl, 10 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, pH 7,0;
5. Opti-MEM (Gibco, Thermo Fisher Scientific, США);
6. SOB: 20 г/л триптона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 10 мл/л 1 М MgCl₂, 10 мл/л 1 М MgSO₄, 1,25 мл/л 2 М KCl;
7. TB: 12 г/л триптона, 24 г/л дрожжевого экстракта, 2,3 г/л KH₂PO₄, 12,5 г/л K₂HPO₄, 2,5 мл/л глицерина;
8. агар (нижний агар): среда, содержащая 1,5% агара;
9. бессывороточная среда EX-CELL® для клеток HEK293 (Sigma-Aldrich, США);
10. верхний агар: среда, содержащая 0,7–0,8% агара.

Компоненты питательных сред смешивали и растворяли в dH₂O, после чего автоклавировали. Среда хранили при 4 °C, среды с агаром во избежание затвердевания хранили в термостате при 56 °C.

2.1.4. Экспериментальные модели

В работе использовали следующие биологические объекты: ламу (*Lama glama*); бактериофаг VCSM13; штаммы *E. coli* TG1, XL-Blue MRF', HB2151 и SHuffle T7 Express (New England Biolabs, США); клеточные линии HEK293T и HEK293T-hACE2 (лаборатория иммуногенетики ИМКБ СО РАН); S-псевдотипированные лентивирусы на основе вариантов SARS-CoV-2 и SARS-CoV; аутентичный вирус SARS-CoV-2/human/RUS/Nsk-FRCFTM-1/2020

(EPI_ISL_481284, линия В.1, замена D614G в S-белке); сирийские хомячки (*Mesocricetus auratus*), полученные из SPF-вивария Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия).

2.1.5. Олигонуклеотиды и векторы

Использованные в работе праймеры представлены в таблице 2. Все олигонуклеотиды произведены компанией Биоссет (Россия).

Таблица 2. Последовательности праймеров, использованных для ПЦР и секвенирования

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
GIII	CCACAGACAGCCCTCATAG
LMB3	CACAGGAAACAGCTATGAC
CALL001	GTCCTGGCTGCTCTTCTACAAGG
CALL002	GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC
VHH-Back	GATGTGCAGCTGGAGGAGTCTGGRGGAGG
VHH-For	CTAGTGCGGCCGCGTGAGGAGACGGTGACCTGGGT
VhhIgfor	GATTCACCGGTGTACATTCTCAGGTGCAGCTGCAGG
VhhIgrev	CATGGGCCCCGAGGAGACGGTGACCTGG
rbdVAgeF	GCACCGGTAGAGTGCAGCCCACCGAATCCATC
rbdVXmaF	GCCCCGGGAGAGTGCAGCCCACCGAATCCATC
rbdVBamR	ACGGATCCCGAAGTTCACGCATTTGTTCTT
mIgleaderF	CCATGGGATGGTCATGTATCA
EF1Fseq	TGGAGCCTACCTAGACTCAGC

Также использовали набор праймеров (не представлены) для внесения одиночных замен методом сайт-направленного мутагенеза.

В работе использовали следующие векторы:

1. pAbVec-HC/LC(κ/λ)/Fc — плазмиды для экспрессии HC, LC (κ/λ) mAb и VHH-Fc;
2. pCAGGS-mRBD-His6 — плазида для экспрессии RBD-His6;
3. pCAGGS-Spike — плазида для псевдотипирования лентивирусных частиц;
4. pCDH3 — плазида для экспрессии RBD-Strep;
5. pCDH-NLuc — трансферная плазида, содержащая ген нанолуциферазы;
6. pET-SUMO — плазида для экспрессии гетеродимеров VHH1-VHH2;
7. pHEN4-НН — плазида для фагового дисплея (фагмида);
8. psPAX2 — упаковочная плазида, несущая гены gag, pol и rev.

2.1.6. Оборудование и программное обеспечение

В работе использовали следующие оборудование: 8-капиллярный секвенатор 3500 LifeTechnologies (Thermo Fisher Scientific, США); Octet® Red96 (Sartorius, Германия); UV-трансиллюминатор (IO Rodeo, США); автоклав Systec DB-23 (Systec, Германия); амплификатор T100 ThermalCycler (Bio-Rad, США); вортекс V-3 SkyLine (ELMI, Латвия); инкубатор Binder BD 23 (Binder, Германия); инкубатор Binder BD 23 (Binder, Германия); камера для вертикального гель-электрофореза Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems (Bio-Rad, США); клеточный сортер Sony SH800 (Sony, Япония); микробиологические ламинарные системы Modernclass 3 (Lamsystems, Россия); микропланшетный/кюветный спектрофотометр Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, США); мультипоратор (Eppendorf, Германия); низкотемпературный и обычные холодильники для хранения образцов и реагентов; планшетный люминометр Luminoskan™ 48 Microplate Luminometer (Thermo Fisher Scientific, США); проточный цитофлуориметр BD FACSCanto II (ACEA, США); проточный цитофлуориметр NovoCyte (Agilent, США); система документации гелей и блотов ChemiDoc (Bio-Rad, США); система очистки воды Arium pro (Sartorius, Германия); спектрофотометр Nanodrop 2000c (Thermo Fisher Scientific, США); термостат ТС-80М-2 (НИИМИ, Россия); ультразвуковой диспергатор И10-840 (ИНЛАБ — Ультразвук, Россия); центрифуга 5418R с охлаждением (Eppendorf, Германия); центрифуга 5810R с охлаждением (Eppendorf, Германия); центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Германия); электрофоретическая камера Vari-Gel SystemUnit (Thermo Fisher Scientific, США).

В работе использовали следующее программное обеспечение: Chromas v. 2.4.3 (Technelysium Pty Ltd., Австралия); Data Acquisition Software (Sartorius, Германия); Data Analysis HT 11.1 Software (Sartorius, Германия); FACSDiva v. 8.0 (BD Life Sciences, США); FlowJo v. 10 (BD Life Sciences, США); GraphPad Prism v. 8.0 (GraphPad Software, США); MEGA11 (Pennsylvania State University, США); NanoDrop 2000c Operating Software (Thermo Fisher Scientific, США); SnapGene (GSL Biotech LLC, США); Quantity One v. 4.6.7 (Bio-Rad, США); UCSF Chimera v.1.16 (University of California, США); Vector NTI Advance 9 (Invitrogen, США).

2.2. Методы

2.2.1. Электрофорез нуклеиновых кислот в агарозном геле

Электрофорез нуклеиновых кислот проводили в 1% агарозном геле. Агарозу (0,5 г) растворяли в 50 мл буфера ТАЕ, этим же буфером заполняли камеру. В карманы геля наносили по 10 мкл раствора ДНК. Для оценки длины ДНК-фрагментов использовали ДНК-маркер 100 bp+1,5 Kb+3 Kb. Электрофорез проводили при напряжении 140–170 В.

2.2.2. Работа со штаммами клеток *E. coli*

2.2.2.1. Посев *E. coli* на агаризованную среду

Чашки Петри стерилизовали под УФ-излучением в ламинаре. Использовали пластиковые шпатели и петли для посева и отбора колоний. В большую чашку Петри ($d = 15$ см) заливали 25–30 мл LB-агара, в маленькую (6 см) — 15–20 мл. В LB-агар добавляли антибиотик в нужной концентрации в соответствии с резистентностью штаммов и плазмид. Посев замороженных в глицерине культур проводили методом истощающего штриха. При посеве с использованием микробиологического шпателя на поверхность среды наносили аликвоту нужного объема жидкой культуры, затем, одновременно вращая чашку и растирая суспензию стерильным шпателем, равномерно распределяли колонии по поверхности среды. Суспензию на открытой чашке высушивали в течение нескольких минут, закрывали чашку и помещали в термостат на 37 °C на ночь, дном вверх.

2.2.2.2. Посев ночной культуры *E. coli*

Колонии с поверхности агаризованной среды переносили с помощью микробиологической петли в стеклянные пробирки с 3 мл среды LB, в которые по необходимости добавляли антибиотик. Пробирки закрывали фольгой. Инкубировали суспензии при 37 °C, 200 об/мин в течение 12–15 ч для получения культуры клеток в стационарной фазе роста.

2.2.3. Гидролиз ДНК эндонуклеазами рестрикции

Гидролиз ДНК по определенным сайтам рестрикции проводили для получения липких концов ДНК с целью дальнейшей модификации ДНК-конструкций, например, вставки дополнительных фрагментов ДНК в плазмиды. Использовали различные подобранные рестриктазы и буферы компании СибЭнзим (Россия). Условия подбирали индивидуально для каждого фермента по протоколам производителя. Обычно реакционная смесь включала следующие компоненты: ДНК, 10×буфер для фермента, 5-кратный избыток фермента (количество единиц активности рассчитывали исходя из массы ДНК) и ddH₂O.

2.2.4. Секвенирование нуклеиновых кислот

Метод секвенирования по Сэнгеру применяли для определения нуклеотидных последовательностей ДНК, полученных на определенных стадиях эксперимента. Использовали BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit.

Реакционная смесь содержала ~100 нг анализируемого фрагмента ДНК, 3 мкл 5× буфера для BigDye™, 0,3 мкл реагента BigDye™, 50 нг праймера и ddH₂O до конечного объема 15 мкл. Программа реакции представлена в таблице 3.

Таблица 3. Программа реакции секвенирования

Этап	Температура	Время	Количество циклов
Инициализация	95 °C	3 мин	1
Денатурация	95 °C	15 с	39
Отжиг праймеров	50 °C	15 с	
Элонгация	60 °C	3,5 мин	

Финальную элонгацию проводили при 72 °C в течение 5 мин. После секвенирования проводили осаждение продуктов ДНК. Реакционную смесь переносили в пробирку объемом 1,5 мл, добавляли 5 мкл 3 М NaAc, pH 5,2; 20 мкл ddH₂O и 60 мкл изопропанола. Инкубировали смесь 1 ч при комнатной температуре и центрифугировали в течение 20 мин при 12 000 g. Затем супернатант удаляли и добавляли к осадку ДНК 190 мкл 75% этанола. Далее образец центрифугировали 5 мин при 12 000 g и удаляли супернатант. Отмывку этанолом повторяли еще один раз. Высушивали открытую пробирку с осадком ДНК в течение 10 мин в термостате при 50 °C. Затем образцы растворяли в 20 мкл раствора деионизованного формамида HiDi и наносили в лунки планшета, который затем загружали в секвенатор 3500 LifeTechnologies.

2.2.5. Электротрансформация

2.2.5.1. Приготовление электрокомпетентных клеток *E. coli*

Приготовление электрокомпетентных клеток проводили согласно протоколу приготовления высокоэффективных электрокомпетентных клеток, используя глицерин-маннитоловый слой [283]. Ночную культуру (1 мл) клеток *E. coli* добавляли в колбу с 200 мл SOB и растили при 37 °C, 200 об/мин до OD₆₀₀ = 0,4–0,6, измерение оптической плотности проводили при помощи микроспектрофотометра NanoDrop 2000с. Колбу помещали в лед на 5 мин, чтобы остановить рост и затем осаждали клетки центрифугированием в течение 15 мин при 4 °C, 2 000 g. Все последующие процедуры проводили при температуре 0–4 °C. Клетки суспендировали в 40 мл воды (0–4 °C) и, опустив пипетку ко дну центрифужной пробирки, добавляли 10 мл раствора: 20% глицерина, 1,5% маннитола. Центрифугировали 15 мин при 4 °C, 2 000 g. Удаляли супернатант, добавляли к клеточному осадку 200 мкл того же раствора глицерин-маннитола и аликвотировали суспензию по 40 мкл в заранее охлажденные пробирки. Сразу же замораживали клетки при –70 °C для хранения.

2.2.5.2. Электротрансформация клеток

Компетентные клетки размораживали на льду, добавляли ДНК и переносили смесь в охлажденную кювету. Электропорацию проводили при 1700 В, 5 мс. Далее в течение 1 мин к

клеткам добавляли 1 мл LB, предварительно нагретого до 42 °C, ресуспендировали клетки и переносили суспензию в пробирку. Затем клетки инкубировали 1 ч при 37 °C, 200 об/мин и высевали на чашки с LB-агаром и антибиотиком.

2.2.6. Получение рекомбинантных RBD S-белка вариантов SARS-CoV-2

В работе использовали два формата рекомбинантных RBD: RBD с С-концевым гексагистиридиновым тагом (RBD-His6) и RBD с С-концевым Strep-тагом (RBD-Strep).

Плазмида pCAGGS-mRBD-His6, кодирующая RBD-His6 уханьского варианта S-белка SARS-CoV-2, была любезно предоставлена профессором Флорианом Краммером [102]. Клетки HEK293T культивировали в среде DMEM, дополненной 10% FBS и 2 mM глутамина, при 37 °C в атмосфере 5% CO₂. Для трансфекции клетки высевали в четыре 100-мм чашки до достижения 70% конфлюэнтности и через 18 ч трансфицировали смесью плазмиды pCAGGS-mRBD-His6 (12 мкг на чашку) и реагента Lipofectamine 3000 (24 мкл на чашку) согласно инструкции производителя. Через 24 ч после трансфекции клетки снимали раствором трипсина-ЭДТА, ресуспендировали в свежей среде DMEM, содержащей 10% FBS, 2 mM L-глутамина и 20 mM HEPES (pH 7,2), и переносили в роллерный флакон площадью 850 см² (Corning, США). Спустя трое суток культуральную среду собирали и наносили на колонку с 3 мл Ni-NTA агарозы. Сорбент промывали 25 мл промывочного буфера — 25 mM Трис-HCl, pH 7,5; 500 mM NaCl; 10% глицерина; 1 mM 2-меркаптоэтанола, после чего проводили еще три промывки промывочным буфером с добавлением имидазола в возрастающей концентрации: 10, 30 и 50 mM (по 20 мл каждая). Белок элюировали промывочным буфером с добавлением 250 mM имидазола. Концентрацию полученного белка определяли по оптическому поглощению (OD₂₈₀) с учетом теоретического коэффициента экстинкции. Фракции с наибольшей концентрацией белка объединяли и диализовали против PBS для немедленного использования, либо добавляли к диализованным препаратам 50% глицерина и хранили при -20 °C. Качество и чистоту белковых препаратов определяли методом SDS-PAGE по п. 2.2.17.

Фрагменты, кодирующие RBD различных мутантных вариантов со Strep-тагом, амплифицировали при помощи ПЦР соответствующих плазмид, кодирующих S-белки (п. 2.2.23), с использованием прямых праймеров rbdVAgeF или rbdVXmaF (при наличии сайта AgeI в последовательности мутантного RBD) и обратного праймера rbdVBamR. Полученные ПЦР-фрагменты и вектор pCDH3 (Рисунок 12), кодирующий С-концевой Strep-таг, гидролизировали эндонуклеазами рестрикции AgeI/XmaI, BamHI (СибЭнзим, Россия) и лигировали. Таким образом, все варианты RBD несли двойной Strep-таг на С-конце.

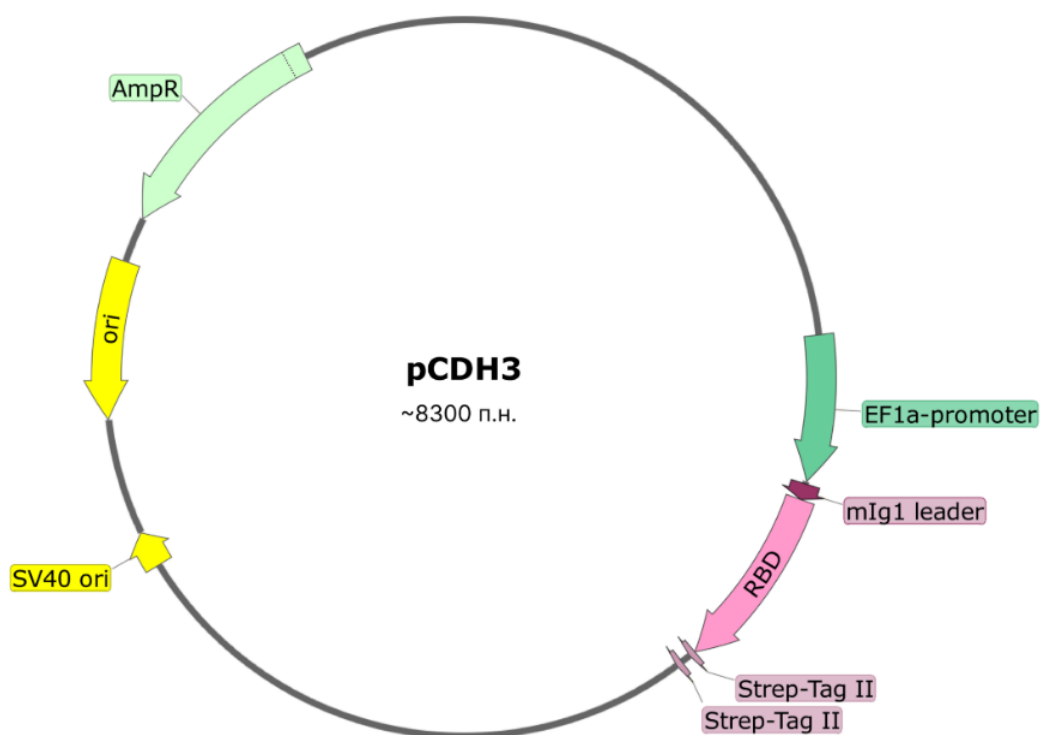


Рисунок 12. Генетическая карта вектора pCDH3 со встроенной последовательностью RBD. AmpR — ген устойчивости к ампициллину; ori — начало репликации в *E. coli*; EF1a-promoter — конститутивный промотор фактора элонгации 1 α человека; mIgG1 leader — лидерная последовательность мышиного IgG1; RBD — последовательность, кодирующая RBD; SV40 ori — начало репликации в эукариотических клетках; Strep-tag II — улучшенный Strep-таг для очистки белка на Strep-Tactin агарозе

Экспрессию полученных конструкций осуществляли в клетках HEK293T, как описано ранее для His-меченного RBD-His6. Аффинную очистку белков проводили на колонке с 2 мл Strep-Tactin® TACS агарозы. К супернатантам клеточных культур добавляли NaCl до конечной концентрации 150 мМ и доводили pH до 8,0 с помощью 1,5 М Tris-HCl, pH 8,9. Полученный раствор наносили на колонку со Strep-Tactin® TACS агарозой, после чего колонку промывали PBS до достижения фоновых значений OD₂₈₀. Белки элюировали раствором 2,5 мМ D-дестиобиотина в PBS. Определение концентрации, оценку качества, чистоты, а также диализ и хранение белка проводили, как описано для RBD-His6.

2.2.7. Биотинилирование рекомбинантных RBD

Рекомбинантные RBD-Strep (1 мл, 1 мг/мл в PBS) инкубировали с 10 мкл раствора 10 мг/мл Sulfo-NHS-S-S-Biotin в ddH₂O в течение 1 ч при комнатной температуре. По завершении реакции избыток непрореагировавшего биотина удаляли диализом против PBS.

2.2.8. Иммунизация ламы

Ламу иммунизировали в несколько этапов по стандартному протоколу с использованием адъюванта Fama [284]. Протокол включал множественные подкожные инъекции антигена в

область нижней части шеи. После каждой иммунизации был проведен отбор от 1 до 5 мл крови для мониторинга антиген-специфичного ответа с помощью ИФА. Первый этап был проведен в начале 2020 г. и включал четыре подкожные инъекции рекомбинантного RBD уханьского варианта SARS-CoV-2 (RBD Wu) в дозе 400 мкг на введение. Антиген разводили в 150 мМ NaCl. Интервал между инъекциями составлял одну неделю. На протяжении всего курса иммунизации гуморальный ответ контролировали с помощью ИФА на наличие антител к RBD. При достижении титра RBD-специфичных антител выше 1:50 000 через 7 суток после последней инъекции из образца периферической крови объемом 100 мл выделяли лимфоциты путем центрифугирования в градиенте плотности Ficoll-Paque™ PLUS. Выход составил более 10^8 PBL. Из выделенных клеток получали суммарную РНК (п. 2.2.9), которую затем использовали для синтеза кДНК и конструирования библиотеки 1 (п. 2.2.10).

Далее та же лама была последовательно иммунизирована RBD вариантов Бета и Дельта (две инъекции) во второй половине 2021 г., RBD вируса SARS-CoV (четыре инъекции) в начале 2022 г., RBD варианта BA.5 (четыре инъекции) во второй половине 2022 г.. По завершении курса иммунизации из периферической крови вновь выделяли лимфоциты, которые служили материалом для создания библиотеки 2.

2.2.9. Выделение суммарной РНК периферических В-лимфоцитов

Выделение суммарной РНК из PBL проводили согласно одностадийному кислотнo-фенольному методу выделения РНК [285]. К 100 мкл суспензии PBL, содержащей $\sim 3,5 \times 10^8$ клеток, добавляли 5 мл раствора D, перемешивали и переносили лизат в новую пробирку. Далее к лизату добавляли 1 мл 2 М NaOAc, pH 4,0; 1 мл водонасыщенного фенола и интенсивно перемешивали, затем добавляли 2 мл раствора хлороформа/изоамилового спирта (49:1) и встряхивали пробирку в течение 10 с. Образец инкубировали на льду 15 мин и центрифугировали 20 мин при 10 000 g, 4 °C. Верхнюю водную фазу переносили в новую пробирку, добавляли 1 мл изопропанола и инкубировали на льду в течение 1 ч. Образец центрифугировали 20 мин при описанных ранее для данного метода условиях и удаляли супернатант. Осадок РНК растворяли в 0,3 мл раствора D и переносили раствор в новую пробирку. РНК осаждали изопропанолом и инкубировали образец в течение 30 мин при -20 °C. Снова центрифугировали при тех же условиях и удаляли супернатант. Промывали осадок РНК 75% этанолом, инкубировали образец 15 мин при комнатной температуре, центрифугировали при тех же условиях 5 мин и удаляли супернатант. Высушивали осадок в течение 10 мин, растворяли в 100 мкл обработанной диэтилпиракарбонатом (DEPC) воды и инкубировали 10 мин при 60 °C.

2.2.10. Конструирование кДНК-библиотеки

Синтез кДНК проводили с использованием набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis по протоколу производителя с модификациями. Параллельно проводили 2 реакции с использованием двух разных праймеров — Олиго (dT)18 и статистического гексамерного праймера.

Для синтеза первой цепи кДНК в пробирке на льду смешивали следующие реагенты: 10 мкг суммарной РНК, 2 мкл одного из праймеров, ddH₂O до 24 мкл конечного объема. Смесь инкубировали 5 мин при 65 °С и остужали на льду, далее центрифугировали и помещали пробирку в лед. Затем последовательно добавляли реагенты: 8 мкл 5× буфера реакции, 2 мкл Ribolock РНКазного ингибитора, 4 мкл 10 мМ dNTP смеси, 2 мкл RevertAid M-MuLV RT. Реакционную смесь инкубировали 60 мин при 42 °С. Для инактивации ферментов образец инкубировали 5 мин при 70 °С.

Амплификацию первой цепи кДНК проводили при помощи ПЦР с использованием праймеров CALL001 и CALL002. Реакционная смесь включала в себя 2 мкл синтезированной первой цепи кДНК, по 1 мкл праймеров, 10 мкл 5×High-Fidelity буфера, 5 мкл 10 мМ dNTP смеси, 0,5 мкл Phusion High-Fidelity ДНК-полимеразы и ddH₂O до конечного объема 50 мкл. Программа реакции представлена в таблице 4.

Таблица 4. Программа реакции амплификации первой цепи кДНК

Этап	Температура	Время	Количество циклов
Инициализация	98 °С	2 мин	1
Денатурация	98 °С	20 с	19
Отжиг праймеров	64 °С	20 с	
Элонгация	72 °С	30 с	

По завершении ПЦР ДНК-продукт переносили в 1% агарозный гель и проводили электрофорез в агарозном геле, после чего скальпелем вырезали из геля фрагмент ДНК, соответствующий размеру нуклеотидной последовательности, кодирующей VHH и CH2 (~700 п.н.), и проводили выделение ДНК-фрагмента из геля с использованием набора GeneJET Gel Extraction по протоколу производителя.

Амплификацию фрагмента ДНК, кодирующего VHH, проводили при помощи ПЦР. Реакционная смесь включала: 2 мкл выделенного из геля ДНК-фрагмента, кодирующего VHH и CH2; по 50 нг праймеров VHH-Back и VHH-Forg; 5 мкл 10×буфера для Taq-полимеразы; 5 мкл 10 мМ dNTP смеси; 0,5 мкл Taq-полимеразы и ddH₂O до конечного объема 50 мкл. Программа реакции представлена в таблице 5.

Таблица 5. Программа реакции амплификации VHH-последовательностей

Этап	Температура	Время	Количество циклов
Инициализация	95 °C	2 мин	1
Денатурация	95 °C	20 с	19
Отжиг праймеров	65 °C	20 с	
Элонгация	72 °C	30 с	

Финальную элонгацию проводили при 72 °C в течение 5 мин. После завершения реакции ДНК-продукт очищали с использованием набора GeneJET PCR Purification по протоколу производителя.

Далее проводили гидролиз полученных фрагментов ДНК и фагмидного вектора — рHEN4-НН (Рисунок 13) — эндонуклеазами рестрикции PstI и NotI. После лигирования полученными плазмидными конструкциями трансформировали штамм *E. coli* TG1. В данном амбер-супрессорном штамме VHH при экспрессии сливаются с поверхностным белком III фага.

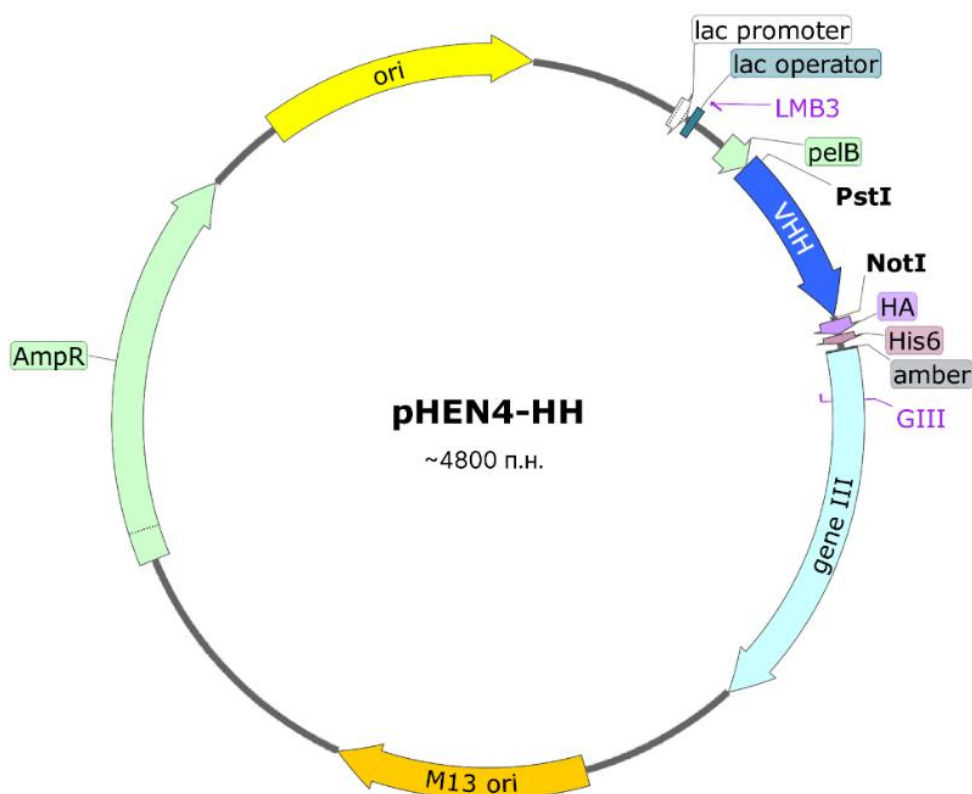


Рисунок 13. Генетическая карта фагмидного вектора рHEN4-НН со встроенной последовательностью VHH. Amber — амбер стоп-кодон, AmpR — ген устойчивости к ампициллину, ori — начало репликации *E. coli*, gene III — ген III фага M13, M13 ori — начало репликации фага M13, HA — гемагглютининовый таг, His6 — последовательность 6 гистидинов, PelB — лидерный пептид для доставки в периплазматическое пространство; VHH — последовательность, кодирующая sdAb; lac-promoter — лак-промотор; lac-operator — лак-оператор; LMB3 и GIII — праймеры; PstI и NotI — сайты рестрикции

Чтобы охватить все разнообразие VHH-последовательностей репертуара выделенных В-клеток крови ламы, нам было необходимо получить библиотеку представительностью не менее 10^7 независимых клонов. Коэффициент трансформации электрокомпетентных клеток TG1 составил $\sim 10^9$ клеток на мкг ДНК, однако он снижается при трансформации бактерий лигазной смесью несмотря на очистку пересаживанием ДНК с гликогеном. Вследствие этого, мы проводили 10 трансформаций TG1 частями лигазной смеси и высевали на 20 больших чашек ($d = 15$ см) с LB-агаром, содержащих 100 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы. Чашки инкубировали в течение ночи при 37 °С, утром определяли размер библиотеки посчитав количество всех выросших колоний. В результате представительность каждой библиотек составила не менее 10^8 клонов. Далее добавляли 4 мл LB на чашки, инкубировали несколько минут и аккуратно поднимали клетки с твердой среды шпателем. Затем собирали суспензии клеток пипеткой в пробирку на 50 мл и добавляли глицерин до финальной концентрации 20%.

2.2.11. Амплификация фага-хелпера VCSM13

Штамм XL1-Blue MRF' *E. coli* инкубировали в течение ночи при 37 °С на чашке с LB-агаром и тетрациклином в концентрации 100 мкг/мл. Вечером следующего дня переносили одиночную колонию с чашки в пробирку с LB и тетрациклином и культивировали в течение 12–15 ч. Затем 1 мл ночной культуры добавляли в колбу объемом 500 мл с 50 мл 2xTY и растили при 37 °С, 200 об/мин до $OD_{600} = 0,3$. К клеткам добавляли 20-кратный избыток фага VCSM13 и инкубировали 30 мин при 37 °С. После этого в колбу добавляли канамицин до 25 мкг/мл и культивировали 12 ч при 37 °С, 200 об/мин. Затем колбу инкубировали в течение 15 мин при 65 °С, центрифугировали суспензию 15 мин при комнатной температуре, 2 500 g и переносили супернатант с фагами в новую пробирку.

Для измерения титра фага выращивали XL1-Blue MRF' *E. coli* в колбе с 50 мл 2xTY при 37 °С, 200 об/мин до $OD_{600} = 0,5–0,6$, добавив 200 мкл ночной культуры. Подготавливали чашки с нижним 2xTY-агаром и ставили на 37 °С за час до посева. Верхний 2xTY-агар хранили при 48 °С, чтобы не допустить застывания. Разведения фага-хелпера из расчета $10^{10}–10^{12}$ БОЕ/мл держали на 37 °С. По достижении TG1 логарифмической фазы роста добавляли по 100 мкл суспензии клеток из колбы в пробирки с разведениями фага и инкубировали 15 мин при 37 °С. Затем смешивали содержимое пробирок с 3 мл верхнего 2xTY-агара, перемешивали и выливали на чашки с нижним 2xTY-агаром. Инкубировали в течение ночи при 37 °С, утром определяли титр по количеству бляшек на чашках.

2.2.12. Перестройка библиотеки в фаговую форму и ее амплификация

Данный метод использовали для наработки фагов, экспонирующих VHH. В амбер-супрессорном штамме *E. coli* TG1 VHH сливаются с белком III и экспонируются на поверхности

фаговых частиц, собранных после инфицирования TG1 фагом-хелпером VCSM13. В то же время фагида реплицируется, используя сайт начала репликации фага M13, в одноцепочечную форму и включается в состав фаговой частицы.

Суспензию кДНК-библиотеки (6 OD₆₀₀) переносили в 250-мл колбу, содержащую 60 мл среды 2xTY, 100 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы. Клетки культивировали при 37 °C, 200 об/мин до OD₆₀₀ = 0,5. Затем переносили 10 мл клеток в пробирку и инфицировали 10-кратным избытком фага VCSM13. Суспензию аккуратно перемешивали и инкубировали 30 мин при 37 °C. Инфицированные клетки центрифугировали 10 мин при 2 800 g, затем удаляли супернатант. Осадок ресуспендировали в 50 мл среды 2xTY, содержащей 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина. Суспензию инкубировали в течение ночи в 250-мл колбе при 37 °C, 200 об/мин для перестройки кДНК-библиотеки в фаговую.

На следующий день ночную культуру переносили в пробирку и центрифугировали 15 мин при 4 °C, 3 200 g. Далее 40 мл супернатанта переносили в новую пробирку, добавляли 10 мл раствора 20% PEG 6000, 2,5 M NaCl и перемешивали. Пробирку инкубировали на льду в течение 30 мин для осаждения фаговых частиц, центрифугировали 10 мин при 4 °C, 3 200 g, удаляли супернатант и ресуспендировали осадок в 1 мл охлажденного PBS. Центрифугировали суспензию 1 мин при 4 °C, 20 000 g, переносили супернатант в новую пробирку, добавляли 250 мкл раствора 20% PEG 6000, 2,5 M NaCl и инкубировали на льду в течение 10 мин. После суспензию центрифугировали 15 мин при тех же условиях, убирали супернатант, ресуспендировали в 1 мл охлажденного PBS и центрифугировали еще раз при тех же условиях в течение 1 мин. Затем переносили супернатант в новую пробирку.

Далее приступали к измерению титра фаговой библиотеки. Выращивали штамм TG1 *E. coli* до OD₆₀₀ = 0,5. Приготавливали разведения аликвот фаговой библиотеки из расчета 10¹⁰–10¹² частиц/мл. Смешивали 100 мкл TG1 с аликвотой фага, инкубировали 30 мин при 37 °C и высевали на чашки с 2xTY-агаром, ампициллином в концентрации 100 мкг/мл и 2% глюкозой.

2.2.13. Аффинное обогащение фаговой библиотеки

Аффинное обогащение фаговой библиотеки проводили согласно базовому протоколу по генерации Nb [286] с целью повышения содержания в ней фаговых клонов, экспонирующих RBD-специфичные VHH. Использовали пробирки с низкой сорбцией, дополнительно заблокировав их внутреннюю поверхность 2% сухим молоком (Blotto, non-fat dry milk) в PBS, чтобы исключить неспецифическое связывание. На 1 пробирку брали 20 мкл магнитного сорбента со стрептавидином (MagnaBind™ Streptavidin Beads). Магнитные частицы собирали у дна магнитом и удаляли супернатант. Далее промывали сорбент, добавив 500 мкл PBS, собирали сорбент магнитом и удаляли супернатант. Затем добавляли 60 мкг биотинилированного RBD.

Инкубировали смесь 10 мин на миксере, отмывали избыток антигена 500 мкл PBS с 0,2% Tween 20. В контрольный эксперимент антиген не добавляли. Блокировали магнитные частицы 500 мкл 2% сухого молока в PBS, инкубировали в течение 30 мин на миксере. Параллельно брали 10^{10} частиц фаговой библиотеки, блокировали равным объемом 4% сухого молока и инкубировали 30 мин на миксере, в конце добавляли Tween 20 до 0,2%. Через 30 мин удаляли блокировку из пробирок с антигеном, добавляли фаговые частицы с блокировкой и инкубировали смесь на миксере в течение 1 ч. Затем собирали сорбент магнитом и удаляли супернатант. Проводили серию отмывок, добавляли 500 мкл PBS с 0,2% Tween 20, встряхивали на миксере 30 мин, собирали магнитные частицы у дна и отбирали супернатант, данную процедуру повторяли 4 раза. Затем осадок ресуспендировали в 50 мкл PBS, переносили в другую пробирку и проводили еще 2 отмывки с PBS без Tween 20. Далее добавляли 100 мкл свежеприготовленного 10 мМ дитиотреитола и инкубировали на миксере не более 30 мин для восстановления дисульфидных связей SS-биотина и высвобождения фаговых частиц. Супернатант с отобранными целевыми фагами переносили в новую пробирку и определяли титр. При добавлении отобранных фаговых частиц к TG1 фаг транспортирует свой геном в цитоплазму клетки-хозяина, и фагида реплицируется через *ori* в бактериальных клетках.

Выращивали *E. coli* штамма TG1 в пробирке до $OD_{600} = 0,5$. К 100 мкл суспензии клеток добавляли разведения аликвот фага из расчета 10^5 – 10^6 частиц в 100 мкл супернатанта. Смесь инкубировали 30 мин при 37 °C и высевали на чашки с 2xTY-агаром, ампициллином в концентрации 100 мкг/мл и 2% глюкозой. На следующий день определяли соотношение опыта к контролю, в котором антиген не сорбировали на магнитных частицах. Если количество колониеобразующих единиц в опыте превышало контроль в 50–100 раз, то приступали к дальнейшему скринингу методом ИФА (п. 2.2.15), в противном случае проводили следующий раунд селекции с SS-биотином, предварительно амплифицировав фаг в TG1 (п. 2.2.12). Таким образом, мы получали суббиблиотеку с преобладающим количеством клонов, способных связывать RBD.

2.2.14. Конкурентное иммуноаффинное обогащение фаговой библиотеки

Данный метод использовали для дополнительного обогащения суббиблиотеки клонами, экспонирующими высокоаффинные и нейтрализующие VHH (Рисунок 14) [287].

В 5 лунок планшета для ИФА наносили по 200 мкл 0,1 М $NaHCO_3$ с ACE2 в концентрации 1 мкг/мл. Иммунизацию ACE2 проводили при 4 °C в течение ночи. Далее удаляли раствор для иммобилизации и блокировали лунки 2% сухим молоком в 0,1 М $NaHCO_3$. К 200 мкл амплифицированной фаговой суббиблиотеки ($\sim 10^{11}$ фагов) добавляли 60 нг биотинилированного RBD и инкубировали на миксере в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем смесь

переносили в первую заблокированную лунку планшета с иммобилизованным ACE2 и инкубировали на миксере в течение 30 мин при комнатной температуре. Далее смесь поочередно переносили из одной лунки в последующую с аналогичными условиями инкубации. Из 5 лунки смесь с несвязавшимся RBD и фагами переносили в заблокированную 2% сухим молоком в PBS пробирку с низкой сорбцией, в которую заранее поместили 10 мкл магнитных частиц со стрептавидином, удалив супернатант и промыв PBS. Суспензию инкубировали на миксере 15 мин при комнатной температуре. Далее промывали частицы, собирая их у дна и отбирая супернатант, с 500 мкл PBS 5 раз с инкубацией на миксере по 10 мин. После стадии отмывки удаляли супернатант и элюировали фаги, добавив 100 мкл 10 мМ дитиотреитола с инкубацией не более 30 мин. Затем суспензию переносили в новую пробирку и титровали инфекционность, как описано ранее, из расчета 10^4 – 10^6 частиц на 100 мкл.

2.2.15. Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ проводили с целью поиска отдельных фаговых клонов, экспонирующих VHH против RBD. RBD иммобилизовали на дне лунок планшета и добавляли в них отдельные фаги, экспонирующие VHH. Не связавшиеся с RBD фаги отмывали и добавляли в лунки мышинные mAb против фага M13, после чего вносили конъюгат кроличьих анти-мышинных антител, меченных пероксидазой хрена (RAM-HRP). При добавлении субстратного буфера в лунках, в которых фаги связались с иммобилизованным RBD, происходило проявление цветовой индикации в ходе ферментативной реакции.

Переносили до 96 отдельных колоний с опытной чашки, полученной в результате измерения титра инфекционности (п. 2.2.12), в лунки 96-луночного микропланшета (мастер-планшета), наполненные 100 мкл 2хТУ с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл и 2% глюкозой, и инкубировали при 37 °С в течение ночи. В одну из лунок не добавляли колонию для контроля. Мастер-планшет хранили при –70 °С. По 10 мкл суспензии из каждой лунки мастер-планшета переносили в планшет с 96 глубокими лунками, содержащими по 1 мл среды ТВ с ампициллином в концентрации 100 мкг/мл и 0,1% глюкозой, накрывали планшет газопроницаемой адгезивной бумагой и инкубировали при 37 °С, 200 об/мин. По достижению клетками экспоненциальной фазы роста добавляли 10-кратный избыток фага VCSM13 с канамицином до конечной концентрации 25 мкг/мл и инкубировали суспензии в течение ночи при 37 °С, 200 об/мин для наработки фаговых частиц. Утром планшет центрифугировали в течение 10 мин при 4 °С, 3200 g для осаждения клеточного дебриса, супернатант с фагами использовали в ИФА. RBD иммобилизовали в 96-луночном микропланшете, добавив по 100 мкл антигена в каждую лунку в концентрации 1 мкг/мл в 0,1 М NaHCO₃. Сорбцию антигена проводили в течение ночи при 4 °С. На следующий день удаляли раствор из лунок и отмывали

промывочным буфером — 0,1 М NaHCO₃, 0,1% Triton X-100. Для блокировки неспецифического связывания вносили в каждую лунку по 200 мкл 2% сухого молока в 0,1 М NaHCO₃ и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего лунки снова промывали один раз с инкубацией в течение 5 мин. Затем добавляли по 100 мкл супернатанта (наработанного фага) из каждой лунки планшета с глубокими лунками. Инкубировали в течение 1 ч, после чего суспензии сливали, а лунки промывали 5 раз по 5 мин. Далее в каждую лунку добавляли по 100 мкл антител против фага M13 (разведение 1:2500) и инкубировали в течение 1 ч, после чего проводили промывку в соответствии с описанным ранее протоколом. Перед добавлением конъюгата RAM-HRP проводили его истощение суммарным иммуноглобулином человека. В лунки добавляли по 100 мкл раствора RAM-HRP в промывочном буфере (разведение 1:5000) и инкубировали 1 ч с последующим промыванием лунок, как описано ранее.

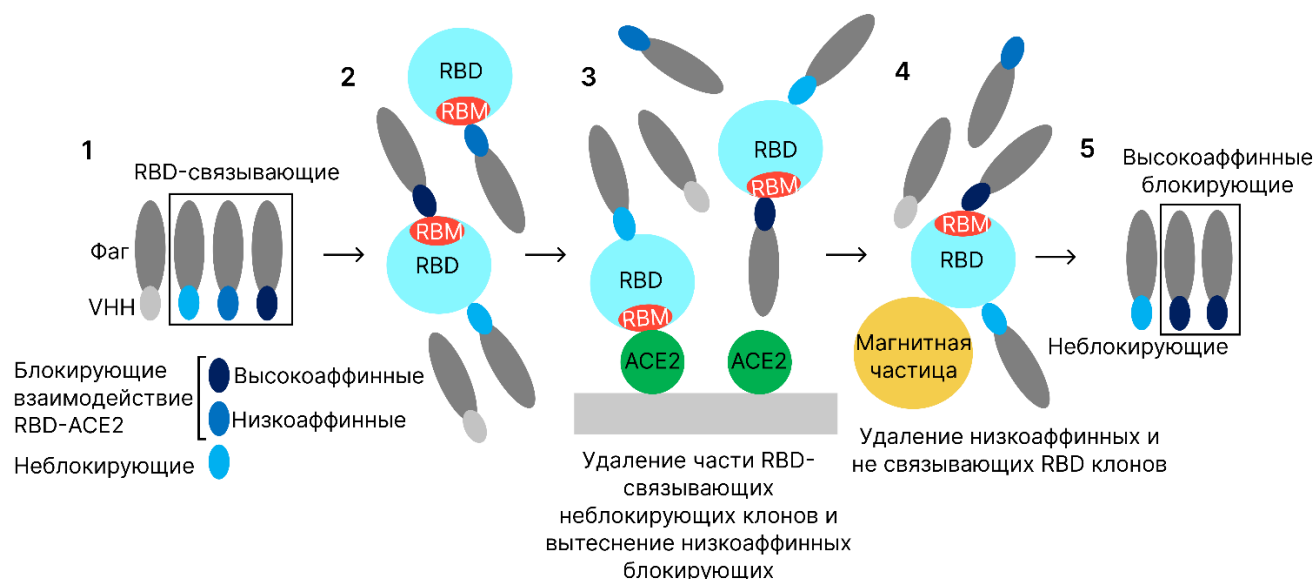


Рисунок 14. Схема аффинного обогащения фаговой библиотеки. 1 — исходная фаговая библиотека; 2 — фаги, экспонирующие RBD-связывающие VNN взаимодействуют с RBD; 3 — фаги, несущие низкоаффинные нейтрализующие VNN, вытесняются из комплекса RBD-ACE2; 4 — оставшиеся в растворе RBD иммобилизуются на магнитных частицах со стрептавидином, не связавшиеся с RBD фаги удаляются, а связавшие элюируются; 5 — суббиблиотека, обогащенная фагами, экспонирующими высокоаффинными блокирующими VNN

Для обнаружения целевых фагов в каждую лунку добавляли по 100 мкл субстратного буфера. Инкубировали смесь 5 мин до проявления цветовой индикации. Реакцию останавливали, добавив в каждую лунку по 100 мкл 30% H₂SO₄. Результаты обрабатывали с помощью микропланшетного спектрофотометра Multiskan GO при длине волны 491 нм.

2.2.16. Получение и очистка рекомбинантных белков в *E. coli*

2.2.16.1. Выделение VHH из периплазматического пространства

Наработку VHH проводили в периплазматическом пространстве *E. coli* HB2151, предварительно выделив плазмиды клонов мастер-планшета и трансформировав штамм. Колонию с чашки выращивали в пробирке с 3 мл LB, добавив 100 мкг/мл ампициллина и 2% глюкозы в течение ночи. Далее 3 мл ночной культуры переносили в колбу объемом 2 л с 400 мл TB, 100 мкг/мл ампициллина, 0,1% глюкозы и 1 mM MgCl₂. Культуру клеток растили при 37 °C, 180 об/мин до OD₆₀₀ = 0,7, добавляли 1 mM ИПТГ для индукции и продолжали инкубацию в течение 4 ч. Далее суспензию переносили в центрифужный стакан объемом 400 мл и центрифугировали в течение 15 мин при комнатной температуре и 9 000 g. Супернатант сливали, ресуспендировали осадок клеток (биомассу) в 10 мл TES и переносили в центрифужную пробирку, добавив 1 mM PMSF и 1% Triton X-100. Для разрушения внешней мембраны *E. coli* пробирку с суспензией клеток инкубировали на льду в течение 1 ч при перемешивании, затем добавляли 20 мл ледяного TES, разбавленного в 4 раза с dH₂O, и продолжали инкубацию на льду еще 45 мин при перемешивании. Пробирки центрифугировали в течение 30 мин при 4 °C и 10 000 g и переносили супернатант в новую пробирку.

2.2.16.2. Аффинная хроматография

Очистку полученных VHH проводили с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозном сорбенте. Колонку с 3 мл Ni-NTA агарозы уравнивали 30 мл буфера, содержащего 25 mM Трис-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl и 10 mM имидазола. Перед нанесением на колонку в раствор с VHH добавляли 30 мл буфера — 50 mM Трис-HCl, pH 8,0; 600 mM NaCl; 20 mM имидазола. После нанесения белков на Ni-NTA колонку промывали 2×30 мл буфера — 25 mM Трис-HCl, pH 8,0; 500 mM NaCl; 20 mM имидазола. Затем элюировали белки фракциями по 1,5 мл буфером — 25 mM Трис-HCl, pH 8,0; 300 mM NaCl; 250 mM имидазола. Фракции, содержащие белки, объединяли и проводили диализ против PBS. Определение концентрации, оценку качества, чистоты, а также диализ и хранение белков проводили, как описано ранее.

2.2.16.3. Выделение tandemных гетеродимеров VHH1-VHH2

Наработку tandemных гетеродимеров VHH1-VHH2 проводили с использованием вектора pET-SUMO (Рисунок 15) в *E. coli* штамма SHuffle T7 Express.

Фрагменты ДНК, кодирующие последовательности VHH1-(G₄S)₃-VHH2 были синтезированы компанией Genewiz (США). После гидролиза рестриктазой BstV2I ДНК-фрагменты лигировали с вектором pET-SUMO по сайтам рестрикции BsaI.

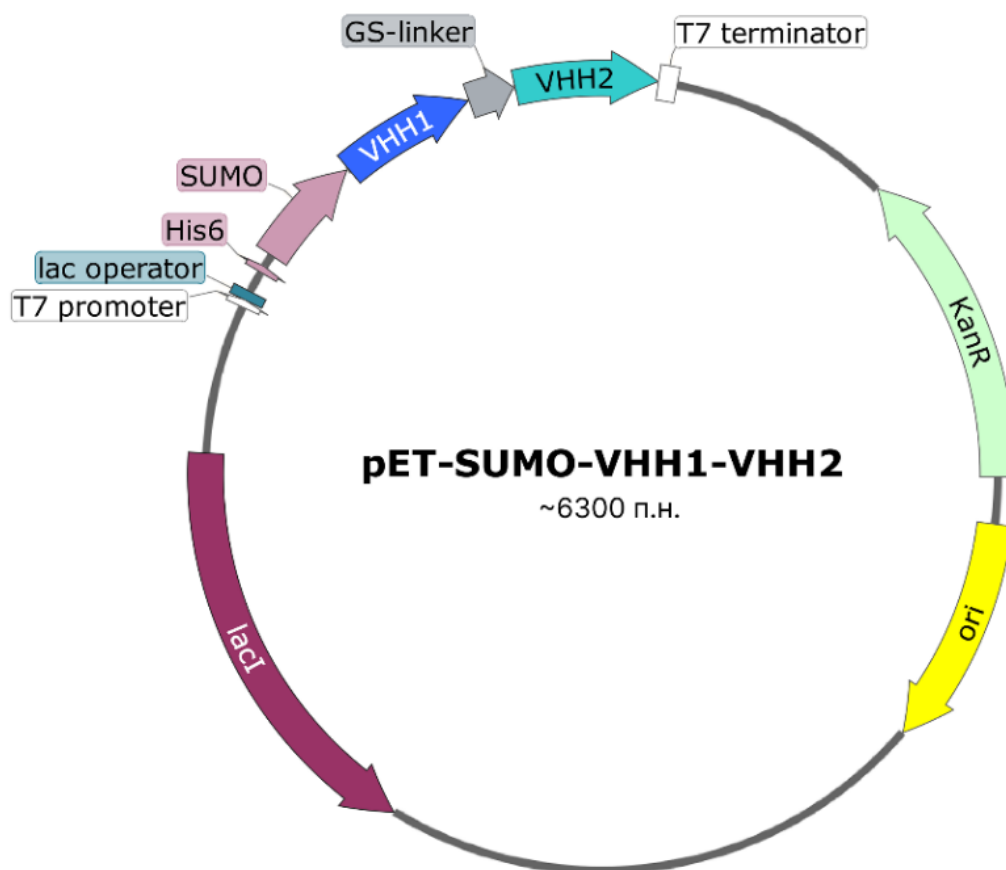


Рисунок 15. Генетическая карта вектора pET-SUMO. His6 — последовательность 6 гистидинов, KanR — ген устойчивости к канамицину, lacI — лактозный репрессор, ori — начало репликации в *E. coli*; VHH1/VHH2 — последовательности, кодирующие VHH; T7 promoter — промотор фага T7; T7 terminator — терминатор фага T7; SUMO — малый убиквитин-подобный модификатор (small ubiquitin-like modifier); lac operator — участок связывания LacI-репрессора; GS-linker — гибкий глицин-сериновый линкер

Наработку проводили согласно протоколу, приведенному в п. 2.2.16.1, за исключением стадий после получения биомассы. Осадок клеток ресуспендировали в 30 мл буфера — 25 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 300 мМ NaCl; 10 мМ имидазола — и переносили в центрифужные пробирки, добавив 1 мМ PMSF и 1% Triton X-100. Далее разрушали клетки ультразвуком 5 раз по 30 с с охлаждением пробирки на льду по 7 мин, центрифугировали клеточный лизат 30 мин при 4 °C и 10 000 g и переносили супернатант, содержащий VHH, в новую пробирку. Далее проводили аффинную хроматографию по п. 2.2.16.2, но после объединения фракций проводили протеолиз. Добавляли SUMO-протеазу, полученную ранее в лаборатории иммуногенетики, к образцам белков в соотношении 1:100 по массе (SUMO-протеаза:белок) и ставили диализ против буфера — 20 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 300 мМ NaCl; 1% глицерина; 1% дитиотреитола. Для финальной смены буфера дитиотреитол исключали. Далее наносили образцы на уравновешенную колонку с 3 мл Ni-NTA агарозы и собирали прошедшую фракцию, SUMO-протеаза при этом связывалась через His6 с сорбентом. Колонку промывали буфером — 25 мМ Трис-HCl, pH 8,0; 300 мМ

NaCl — до достижения фоновых значений OD₂₈₀. Объединяли фракции, содержащие белки, и проводили диализ против PBS. Определение концентрации, оценку качества, чистоты, а также диализ и хранение белков проводили, как описано ранее.

2.2.17. Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофорез белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS по Лэммли — SDS-PAGE [288] проводили в камере для вертикального гель-электрофореза Mini-PROTEAN® Tetra Handcast Systems. Два стекла — внутреннее и внешнее — фиксировали на столике. В полученное между стеклами пространство заливали 4–5 мл разделяющего буфера, сверху осторожно наслаивали dH₂O и инкубировали в течение 15–20 мин при комнатной температуре до полной полимеризации геля. Отбирали dH₂O и наслаивали концентрирующий буфер, вставляли гребенку и инкубировали в течение 10–20 мин до полной полимеризации геля. Для приготовления образцов смешивали 5 мкл буфера нанесения с 10 мкл образца, пробирки кипятили 2 мин, центрифугировали 2 мин при 9 000 g и вносили в предварительно промытые карманы геля. Электрофорез проводили в течение 40–60 мин, используя электродный буфер, при напряжении 150 В с повышением до 170 В спустя 15 мин. После завершения разделения гель инкубировали в фиксирующем растворе 20% трихлоруксусной кислоты в течение 20 мин с нагреванием до 50–60 °С. Окрашивание проводили раствором — 0,1% кумасси бриллиантового голубого R-250, 40% метанола, 10% ледяной уксусной кислоты — в течение 20 мин с нагреванием до 50–60 °С. Отмывку геля проводили раствором 3,5% ледяной уксусной кислоты и 20% этанола в течение ночи при комнатной температуре. Документирование результатов осуществляли фотографированием геля.

2.2.18. Конкурентный иммуноферментный анализ

Конкурентный ИФА проводили для определения эффективности VNN при блокировании взаимодействия RBD-ACE2. В лунках микропланшета иммобилизовали ACE2, добавив по 100 мкл раствора ACE2 в концентрации 2 мкг/мл в 0,1 М NaHCO₃. Сорбцию проводили в течение ночи при 4 °С. На следующий день удаляли раствор из лунок и проводили 5-кратную отмывку промывочным буфером — 0,1 М NaHCO₃, 0,1% Triton X-100 — с инкубацией в течение 2 мин. Для блокировки неспецифического связывания в каждую лунку вносили по 200 мкл 2% сухого молока в 0,1 М NaHCO₃ и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего лунки снова промывали один раз с инкубацией в течение 5 мин. Параллельно смешивали по 50 мкл разведений Nb с 50 мкл биотинилированного RBD в концентрации 0,2 мкг/мл. По 100 мкл полученных смесей вносили в заблокированные и промытые лунки микропланшета и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. Затем раствор сливали и аналогично промывали лунки 5 раз по 5 мин. Далее добавляли по 100 мкл конъюгата Streptavidin-HRP

(разведение 1:1000), инкубировали 1 ч при комнатной температуре и промывали лунки 5 раз по 5 мин. Ферментативную реакцию проводили в субстратном буфере, добавив по 100 мкл в каждую лунку, инкубировали смесь 1–3 мин до проявления цветовой индикации и останавливали реакцию с помощью 30% H_2SO_4 .

2.2.19. Анализ конкурентного связывания RBD однодоменными антителами с использованием проточной цитофлуориметрии

Nb (2 мкг/мл) предварительно смешивали с биотинилированным RBD (0,3 мкг/мл) в буфере для окрашивания FACS — PBS + 1,5% FBS — и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Смесь добавляли к суспензии 30 000 клеток ACE2-HEK293T в том же буфере и проводили инкубацию в течение 30 мин при 4 °C. Затем клетки дважды промывали буфером для окрашивания FACS и инкубировали с конъюгатом APC-стрептавидин (разведение 1:600) в буфере для окрашивания FACS в течение 30 мин. Для регистрации сигнала флуоресценции использовали проточный цитометр BD FACSCanto II. В качестве отрицательного контроля использовали нерелевантный белок PSCA (антиген стволовых клеток простаты) вместо Nb, а в положительный контроль не добавляли RBD. Сигнал фоновой флуоресценции от клеток HEK293-hACE2, окрашенных конъюгатом APC-стрептавидин, использовали для стробирования.

2.2.20. Биослойная интерферометрия

Биослойная интерферометрия — оптический аналитический метод, основанный на регистрации интерференционной картины белого света, отраженного от двух поверхностей биосенсора: внутреннего референсного слоя и внешнего биослоя, содержащего иммобилизованный лиганд. Связывание аналита из раствора с лигандом на поверхности биосенсора приводит к увеличению оптической толщины биослоя, что вызывает сдвиг интерференционной картины и, как следствие, смещение длины волны отраженного света. Величина этого сдвига ($\Delta\lambda$, нм) регистрируется в реальном времени и пропорциональна количеству связавшегося материала (Рисунок 16). Сигнал генерируется исключительно при изменении оптической толщины биослоя, а несвязавшиеся молекулы в растворе не влияют на регистрируемый сдвиг длины волны. BLI проводили с использованием восьмиканальной системы Octet RED96 для измерения констант аффинности VHH к RBD и для анализа конкурентного связывания антител с RBD.

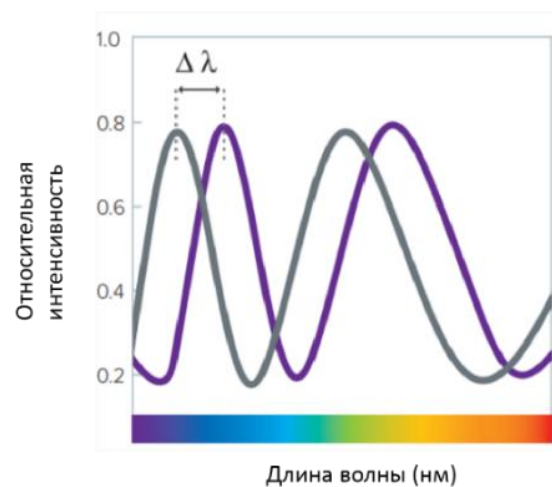
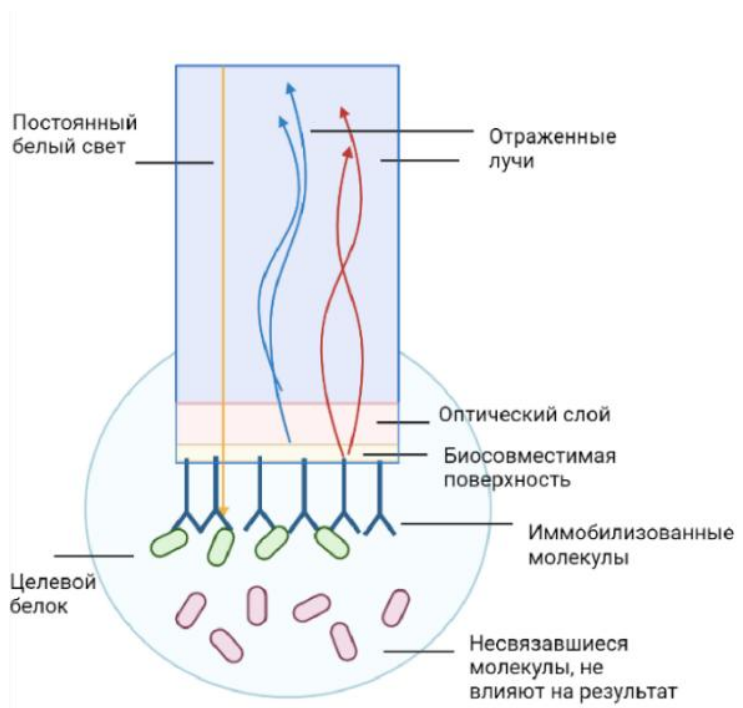


Рисунок 16. Схема измерения сигнала BLI. Интерференционная картина формируется при отражении белого света от двух поверхностей биосенсора. Связывание анализата с биослоем изменяет оптическую толщину и приводит к сдвигу длины волны ($\Delta\lambda$, нм) относительно референсной поверхности (по материалам ForteBio, Sartorius, с изменениями)

2.2.20.1. Определение кинетики взаимодействия однодоменных антител с RBD

Эксперименты и все приготовления проводили в 96-луночной планшете (Greiner Bio-One, Германия). На первом этапе VHH разводили в рабочем буфере — 0,02% Tween 20 в PBS — в концентрации 10 мкг/мл и иммобилизовали на Ni-NTA биосенсорах (Sartorius, кат. № 18-5101). Перед каждой стадией ассоциации устанавливали базовую линию в рабочем буфере. Далее погружали сенсор с VHH в лунку с RBD-Strep, разведенным в рабочем буфере, и инкубировали в течение 500 с (стадия ассоциации) с последующей стадией диссоциации в лунке с рабочим буфером в течение 1000 с. На один из сенсоров сорбировали нерелевантный белок и использовали в качестве отрицательного контроля для нормализации фона. Результаты эксперимента анализировали, используя пакет Data Analysis HT 11.1 Software, при полном глобальном фиттинге в рамках моновалентной модели взаимодействия. Качество аппроксимации контролировали по значениям $R^2 > 0,9$ и $\chi^2 < 3$.

2.2.20.2. Анализ конкурентного связывания антител с RBD

Для конкурентного BLI-анализа использовали Ni-NTA-биосенсоры. На поверхность биосенсора сорбировали рекомбинантный RBD-His6 в концентрации 10 мкг/мл. Первое (насыщающее) и второе (конкурирующее) антитела добавляли в концентрации 200 или 500 нМ.

Анализ проводили по следующему протоколу: исходная базовая линия — 60 с; иммобилизация RBD-His6 — 200 с; вторая базовая линия — 30 с; насыщение первым антителом — 600 с; внесение конкурирующего антитела — 600 с; регенерация в буфере глицин-HCl, pH 1,7 — 5 циклов по 3 с.

2.2.21. Получение mAb человека в эукариотических клетках

Гены переменных доменов тяжелых и легких цепей mAb амплифицировали из РНК отсортированных единичных В-клеток доноров и клонировали по сайтам AgeI и ApaI в векторы pAbVec [289], кодирующие константные области человеческого IgG1: CH1-hinge-Fc ($\gamma 1$) — pAbVec-HC; CL (κ или λ) — pAbVec-LC(κ) или pAbVec-LC(λ), соответствующие типу легкой цепи исходного IgG (Рисунок 17). Последовательности, кодирующие переменные фрагменты референсных антител, получали синтезом генов (Genewiz, США; Евrogen, Россия) и клонировали в тех же векторах pAbVec.

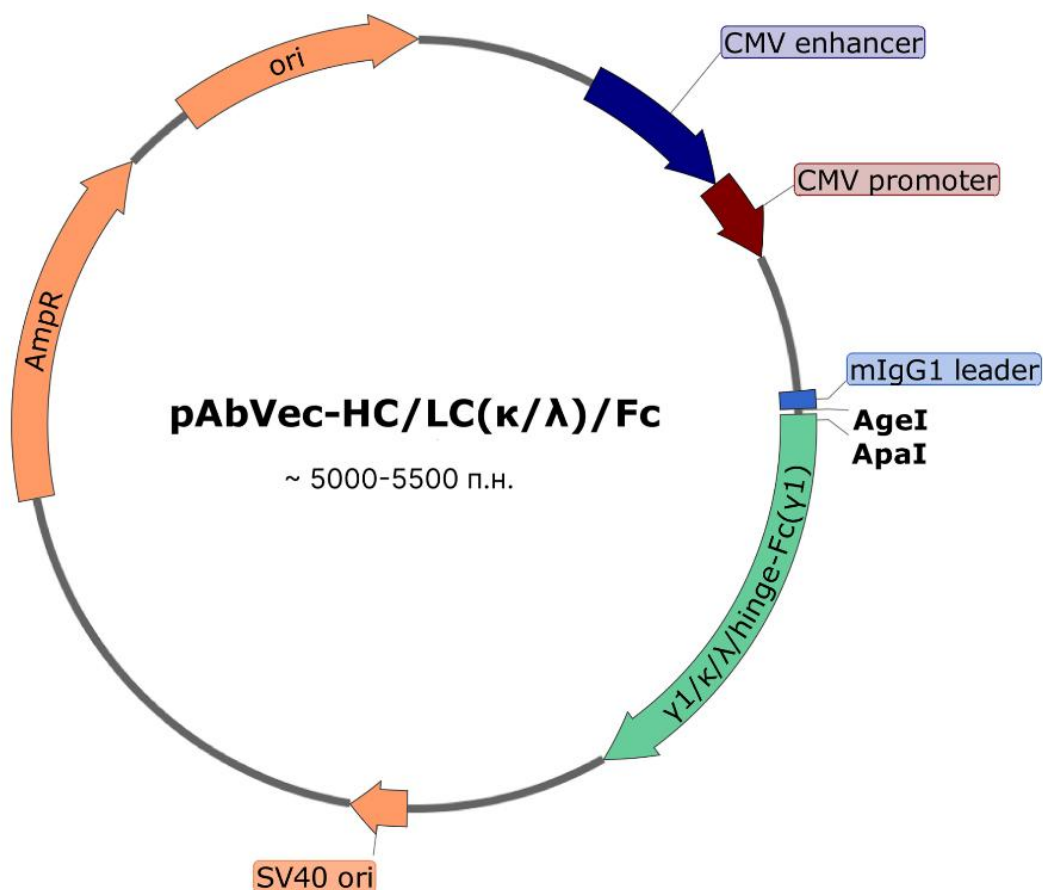


Рисунок 17. Генетическая карта векторов pAbVec-HC/LC(κ/λ)/Fc. AmpR — ген устойчивости к ампициллину; ori — начало репликации в *E. coli*; CMV enhancer — энхансер цитомегаловируса; CMV promoter — конститутивный промотор цитомегаловируса; mIgG1 leader — лидерная последовательность мышиного IgG1; $\gamma 1/\kappa/\lambda/\text{hinge-Fc}(\gamma 1)$ — последовательности, кодирующие константные области антител; SV40 ori — начало репликации в эукариотических клетках; ApaI и AgeI — сайты рестрикции

Пары экспрессирующих конструкций, кодирующих соответствующие тяжелые и легкие цепи антител, доставляли в клетки HEK293T с использованием кальций-фосфатной трансфекции [290]. За 12 ч до трансфекции 10^7 клеток высевали в колбу со 150 мл IMDM с добавлением 10% FBS и смеси пенициллин/стрептомицин. Плазмидные ДНК предварительно смешивали в молярном соотношении 1:1 и добавляли 2 М CaCl_2 до конечной концентрации 25 мМ. Объем трансфекционной смеси доводили добавлением стерильной ddH₂O до 3 мл. Смесь медленно добавляли к 3 мл 2× раствора HBS — 50 мМ HEPES; 1,5 мМ Na_2HPO_4 ; 280 мМ NaCl; 10 мМ KCl; 12 мМ сахарозы, pH 7,11 — при постоянном встряхивании. Полученный раствор по каплям добавляли к клеткам. Через 8 ч среду для выращивания заменяли бессывороточной средой EX-CELL® для HEK293 клеток. Трансфицированные клетки выдерживали в течение шести дней в CO₂-инкубаторе при 37 °C, 5% CO₂. Клеточные супернатанты, очищенные от клеточного дебриса кратким центрифугированием (4 000 g, 10 мин), фильтровали через 0,22 мкм PES-фильтр (TPP, Швейцария), а белковые продукты очищали на колонке с 3 мл Protein A-агарозы согласно инструкции производителя. Вкратце, после нанесения белковых образцов колонку дважды промывали PBS. Целевые белки элюировали буфером — 0,1 М глицин-HCl, pH 2,7; 150 мМ NaCl — в нейтрализующий буфер — 1 М Трис, pH 8,0 — в соотношении 1:20. Объединяли фракции, содержащие белки, и проводили диализ против PBS. Определение концентрации, оценку качества, чистоты, а также диализ и хранение белков проводили, как описано ранее.

2.2.22. Получение VHH-Fc

Для получения гомодимеров VHH с Fc-фрагментом hIgG1 последовательности, кодирующие VHH, амплифицировали с использованием праймеров VhhIgfor и VhhIgrev и клонировали по сайтам рестрикции AgeI-ApaI в модифицированный вектор pAbVec-Fc, содержащий последовательность Fc-фрагмента hIgG1, но с удаленной последовательностью CH1. Экспрессию и очистку VHH-Fc проводили согласно протоколу получения mAb человека.

2.2.23. Получение S-псевдотипированных лентивирусов

Плазмиды pCAGGS-Spike (лаборатория иммуногенетики и лаборатория инженерии антител ИМКБ СО РАН) кодировали S-белок уханьского варианта SARS-CoV-2 либо одного из мутантных вариантов, а также вируса SARS-CoV. Конструкции, несущие мутантные варианты S-белка, получали с помощью синтеза генов (Genewiz, США; NovoPro Bioscience, Китай; Евроген, Россия) либо сайт-направленного мутагенеза с использованием наборов мутагенных праймеров. Идентичность нуклеотидных последовательностей подтверждали секвенированием по Сэнгеру. S-псевдотипированные лентивирусные частицы получали путем котрансфекции (п. 2.2.21) клеток HEK293T смесью плазмид psPAX2, pCDH-NLuc и pCAGGS-Spike в молярном

соотношении 4:6:3. Через 8 ч после трансфекции ростовую среду заменяли на среду Opti-MEM, дополненную 2,5% FBS, инаktivированной нагреванием. Супернатанты собирали через 48 ч, фильтровали через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм и концентрировали центрифугированием при 20 000 g и 4 °C в течение 90 мин.

2.2.24. Анализ нейтрализации S-псевдотипированного лентивируса

2.2.24.1. Нейтрализации с использованием FACS

Клетки HEK293T-ACE2, стабильно экспрессирующие человеческий ACE2, высевали при плотности 30 000 клеток на лунку в 96-луночный планшет в день анализа нейтрализации. Антитела серийно разбавляли в Opti-MEM + 2,5% FBS и совместно инкубировали с 20 000 S-псевдотипированных лентивирусных частиц в течение 30 мин при 37 °C в объеме 100 мкл. Смесь анализируемых белков с S-псевдотипированным лентивирусом добавляли к клеткам HEK293T-ACE2 и помещали планшет в CO₂-инкубатор. Через 72 ч после трансдукции процент трансдуцированных (GFP+) клеток измеряли в культурах с помощью проточной цитометрии. IC₅₀ определяли методом нелинейной регрессии как концентрацию антитела, при которой наблюдалась 50% нейтрализация псевдотипированного лентивируса.

2.2.24.2. Нейтрализация с использованием Luminoskan

Клетки ACE2-HEK293T инкубировали со смесью антитела и S-псевдотипированного лентивируса в течение 48 ч, после чего дважды отмывали PBS и лизировали в PBS, содержащем 0,2% Triton X-100. В качестве контролей использовали клетки ACE2-HEK293T, трансдуцированные в отсутствие антител, а также нетрансдуцированные клетки. Через 48 ч после трансдукции клетки отмывали, лизировали и измеряли интенсивность люминесценции с использованием люминометра Luminoskan и набора NLuc FLASH Assay после добавления субстрата — 1,25 мкг свежеприготовленного h-целентеразина в 50 мкл PBS на лунку; сигнал регистрировали в течение 3 с. IC₅₀ определяли методом нелинейной регрессии как концентрацию антитела, при которой наблюдалась 50% нейтрализация псевдотипированного лентивируса.

2.2.25. Анализ защитных свойств *in vivo*

Сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*) предоставил SPF-виварий Института цитологии и генетики СО РАН (Новосибирск, Россия). Животных взвешивали перед началом эксперимента и ежедневно на протяжении всего периода наблюдения. Защитную эффективность антител оценивали как в профилактической, так и в терапевтической схемах введения. В профилактической схеме группам животных внутрибрюшинно вводили антитела за 24 ч до заражения изолятом вируса SARS-CoV-2, принадлежащим к линии B.1 и характеризующимся единственной аминокислотной заменой D614G в S-белке. Заражение проводили интраназально

(по 50 мкл в каждую ноздрю) в общей дозе 1×10^4 БОЕ. В терапевтической схеме группу животных заражали аналогичным образом, а антитела вводили через 6 ч после заражения. Животных выводили из эксперимента на пятые сутки после заражения. Вирусную нагрузку определяли количественно в гомогенатах легочной ткани при помощи количественной ПЦР.

2.2.26. Статистический анализ

Статистический анализ значимости различий между группами проводили в программе GraphPad Prism v.8.0. Для определения качества аппроксимации кривых взаимодействия белков использовали пакет Data Analysis HT 11.1 Software ($R^2 > 0,9$ и $\chi^2 < 3$); для сравнения числа аминокислотных замен использовали непарный t-критерий Стьюдента (unpaired t-test); для анализа динамики изменения веса хомячков — двухфакторный дисперсионный анализ (two-way ANOVA) с множественными сравнениями; для анализа вирусной нагрузки — однофакторный дисперсионный анализ (ordinary one-way ANOVA) с множественными сравнениями.

2.2.27. Этические аспекты исследования

Исследования с участием человека проводили в соответствии с принципами Хельсинкской декларации 1975 г. Сбор и анализ клинической информации и биологических образцов были одобрены Комитетом по этике Федерального научно-клинического центра Федерального медико-биологического агентства России (ФНКЦ ФМБА России, Москва) (протокол № 4_2020 от 28 апреля 2020 г.). Получение письменного информированного согласия от всех участников исследования осуществляли в соответствии с процедурами, одобренными указанным Комитетом. Информированное согласие оформляли в двух экземплярах: один экземпляр предоставляли участнику исследования, второй хранили в ФНКЦ ФМБА России.

Эксперименты с использованием животных проводили в соответствии с установленными требованиями к обеспечению их благополучия и применимыми этическими нормами. Иммунизацию и отбор крови ламы проводили в соответствии с одобрением Комитета по этике исследований на животных и человеке ИМКБ СО РАН (протокол № 01/20 от 11 февраля 2020 г.). Исследования защитной активности антител *in vivo* на сирийских хомячках были одобрены Комитетом по биомедицинской этике ФИЦ ФТМ (протокол № 35 от 5 декабря 2020 г.).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Получение и характеристика рекомбинантных однодоменных антител после иммунизации ламы RBD уханьского варианта SARS-CoV-2

3.1.1. Иммунизация ламы и создание библиотеки 1

Первой задачей данной работы являлось получение библиотеки VHH, специфичных к RBD вируса SARS-CoV-2. В исследовании были использованы иммунные библиотеки, поскольку, в отличие от синтетических и наивных, они обогащены клонами, прошедшими аффинное созревание *in vivo*, и потому с большей вероятностью содержат варианты, обладающие высокой аффинностью к антигену. В качестве модельного животного для иммунизации была выбрана лама (*Lama glama*) — представитель семейства верблюдовых, традиционно используемый для получения VHH благодаря способности продуцировать функциональные антитела, лишенные легкой цепи.

С целью отбора VHH, обладающих перекрестной нейтрализующей активностью, были получены две иммунные библиотеки VHH-последовательностей: первая — в 2020 г., вторая — в конце 2022 г. (Рисунок 18) [291]. Стратегии иммунизации и селекции для этих библиотек принципиально различались, что отразилось на свойствах сформированных репертуаров.

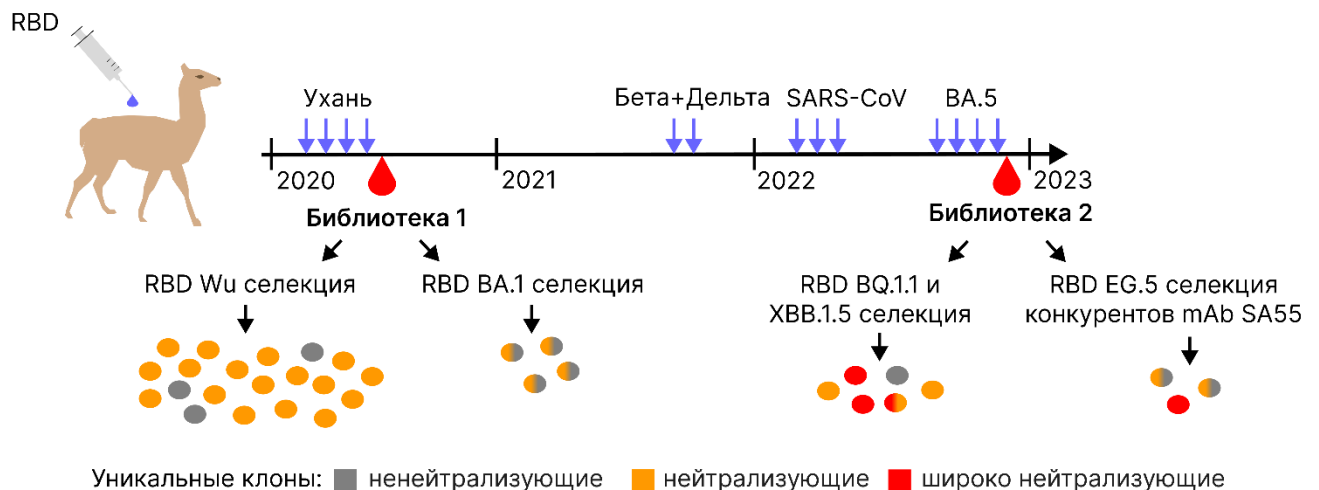


Рисунок 18. Схема последовательной иммунизации ламы различными вариантами RBD SARS-CoV-2. Синими стрелками обозначены инъекции соответствующими мутантными вариантами RBD, красными значками — отбор крови и создание библиотек. Создано две библиотеки VHH последовательностей ламы — в 2020 г. и в конце 2022 г.

Первую иммунную библиотеку получали против RBD уханьского варианта S-белка SARS-CoV-2 (RBD Wu). После того как титр связывающих RBD антител достиг величины 1:50000, был осуществлен забор 100 мл крови и PBL. Количество суммарной РНК, полученной

из PBL, составило около 200 мкг. Из них 20 мкг было использовано в качестве матрицы для конструирования кДНК-библиотеки.

На сегодняшний день разработано несколько протоколов амплификации VHH-фрагментов из кДНК В-лимфоцитов [292–294]. В настоящем исследовании использовалась двухэтапная схема. На первом этапе при помощи ПЦР были амплифицированы как VH-, так и VHH-последовательности. Использовали праймер CALL001, специфичный для консервативной области лидерной последовательности III семейства V-генов (наиболее представительное семейство у верблюдовых), а также праймер на CH2 домен IgG — CALL002 (Рисунок 19, А). Далее проводили электрофорез в агарозном геле для анализа результата ПЦР и выделения ампликона, соответствующего продукту амплификации VHH-последовательностей (Рисунок 19, Б).

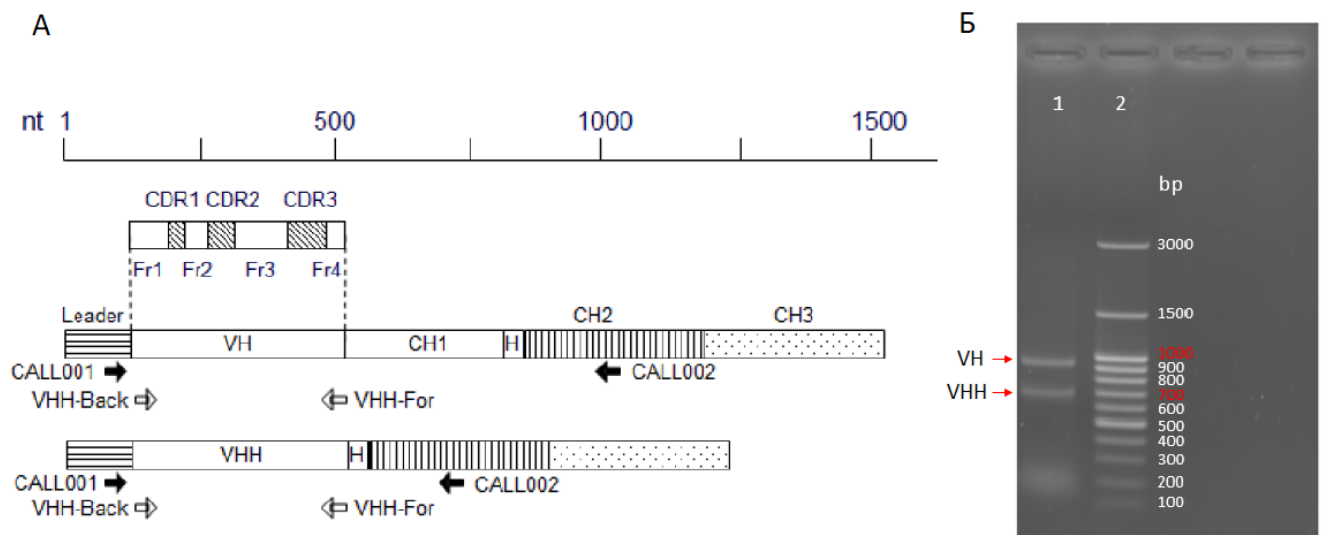


Рисунок 19. Амплификация VH и VHH фрагментов. **А.** Схема расположения праймеров для амплификации VHH. CDR (1–3) — гипервариабельные участки; nt — нуклеотиды; VH — вариабельный домен тяжелой цепи; VHH — вариабельный домен тяжелой цепи HCAb верблюдовых; Fr (1–4) — каркасные области; H — шарнирный участок; leader — последовательность сигнального пептида [286]. **Б.** Результаты ЭФ продуктов амплификации кДНК с использованием праймеров CALL001 и CALL002. 1 — продукты амплификации, 2 — ДНК-маркер, bp — пары нуклеотидов

На втором этапе фрагменты ДНК, кодирующие VHH, были выделены из геля и амплифицированы при помощи ПЦР с использованием VHH-специфичных праймеров (VHH-Back и VHH-For). После гидролиза эндонуклеазами рестрикции фрагменты были лигированы по PstI и NotI сайтам и клонированы в фагмидном векторе pHEN4-НН, содержащем ген III фага M13 (Рисунок 13, стр. 69). Далее трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма TG1 полученными фагмидами для последующей сборки фаговых частиц,

экспонирующих VHH на поверхности капсида. После трансформации высевали все клетки на чашки и проводили подсчет выросших колоний для определения размера библиотеки.

В результате была получена кДНК-библиотека (библиотека 1) представительностью 10^8 клонов, что согласуется с популяцией В-лимфоцитов крови ламы, использованной для выделения РНК и синтеза кДНК [295]. Анализ ПЦР 48 случайно выбранных клонов библиотеки с использованием фланкирующих праймеров (LMB3 и GIII) показал, что не менее 95% этих клонов содержат вставки, размер которых соответствует длине нуклеотидной последовательности VHH. Секвенирование 20 случайно выбранных клонов показало, что не менее 85% последовательностей не содержат стоп-кодона, а также делеций и вставок, приводящих к сдвигу рамки считывания.

3.1.2. Аффинная селекция VHH-клонов библиотеки 1

В работе был применен метод фагового дисплея, который позволяет получить сохраняющий свои исходные биологические характеристики чужеродный белок, экспонированный в составе белков капсида однокитчатого фага.

Для проведения аффинной селекции клонов библиотеки, VHH-продукты которых способны связывать RBD вируса SARS-CoV-2, иммунная библиотека VHH-последовательностей была предварительно переведена из бактериальной в фаговую форму (п. 2.2.12). Титр фаговой библиотеки составил 10^{12} БОЕ/мл.

Для получения высокоаффинных нейтрализующих VHH мы использовали схему двухстадийной аффинной селекции с помощью фагового дисплея. Первая стадия включала раунд селекции против биотинилированного RBD Wu, иммобилизованного на магнитных частицах. В результате была получена суббиблиотека 1, обогащенная VHH-экспонирующими клонами, специфичными к RBD Wu. На второй стадии после реамплификации суббиблиотеки 1 проводили раунд конкурентной иммуноаффинной селекции (п. 2.2.14) [287]. Суть данного подхода заключалась в обогащении суббиблиотеки VHH-клонами, способными блокировать взаимодействие RBD-ACE2. Фаги инкубировали с RBD в растворе и добавляли в лунку с иммобилизованным ACE2. Блокирующие взаимодействие клоны оставались в супернатанте, тогда как неблокирующие оставались связанными с ACE2 через RBD. В результате была получена суббиблиотека 1.1, дополнительно обогащенная клонами, экспонирующими высокоаффинные VHH, блокирующие взаимодействие RBD Wu с ACE2.

Отбор отдельных независимых клонов был проведен с помощью ИФА. В результате из 95 случайно выбранных для анализа было обнаружено 40 VHH-экспонирующих клонов, которые способны связывать RBD Wu. Для дальнейшего анализа отбирали клоны с $OD_{450} > 0,3$; OD_{450} для отрицательного контроля (без фага) составила 0,12 (Рисунок 20). В результате секвенирования

40 отобранных клонов было установлено, что 15 из них содержат фагмиды, кодирующие уникальные последовательности VHH.

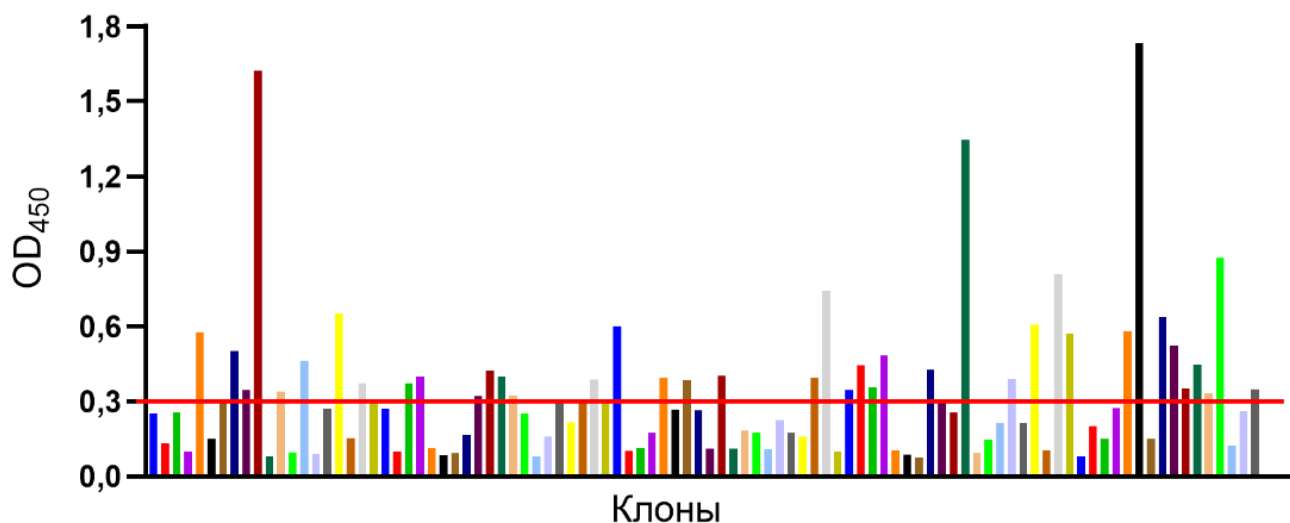


Рисунок 20. Диаграмма результатов ИФА 95 случайно выбранных фаговых клонов суббиблиотеки 1.2. По оси X расположены индивидуальные фаговые клоны; по оси Y — OD₄₅₀, оптическая плотность после субстратно-ферментативной реакции, полученная с использованием микропланшетного ридера Multiskan GO при длине волны 450 нм. Красная линия — нижняя граница отбора клонов для секвенирования

3.1.3. Нарботка и очистка однодоменных антител суббиблиотеки 1.1

Для получения рекомбинантных Nb компетентные клетки *E. coli* штамма HB2151 трансформировали плазмидными конструкциями 15 отобранных независимых клонов. Белки были выделены из периплазматического пространства клеток *E. coli* и очищены методом аффинной хроматографии на Ni-NTA агарозе по п. 2.2.16.2. Качество образцов рекомбинантных Nb определяли с помощью SDS-PAGE по п. 2.2.17 (Рисунок 21).

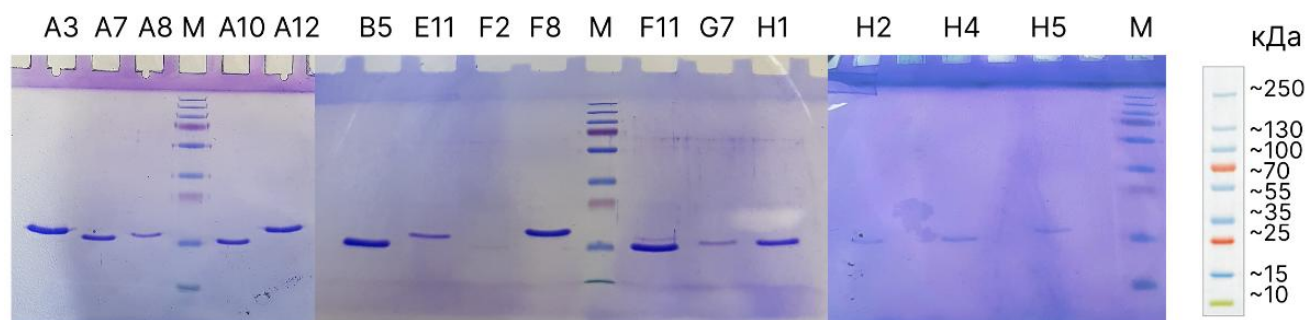


Рисунок 21. SDS-PAGE полученных и очищенных с помощью аффинной хроматографии Nb суббиблиотеки 1.1 в восстанавливающих условиях. Названия VHH-клонов указаны над соответствующими дорожками геля. М - маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, кат. № 26619), кДа — килодальтон

3.1.4. Оценка блокирующих свойств однодоменных антител суббиблиотеки 1.1

Далее был проведен эксперимент по оценке способности выделенных Nb блокировать взаимодействие RBD-ACE2 с использованием линии клеток HEK293T, экспонирующих рецептор ACE2. Эксперименты были проведены с помощью FACS (п. 2.2.19). В результате было показано, что клоны H5 и G7 практически полностью нейтрализуют связывание RBD Wu с ACE2 при добавлении меченого антигена к клеткам в присутствии анализируемых Nb (Рисунок 22).

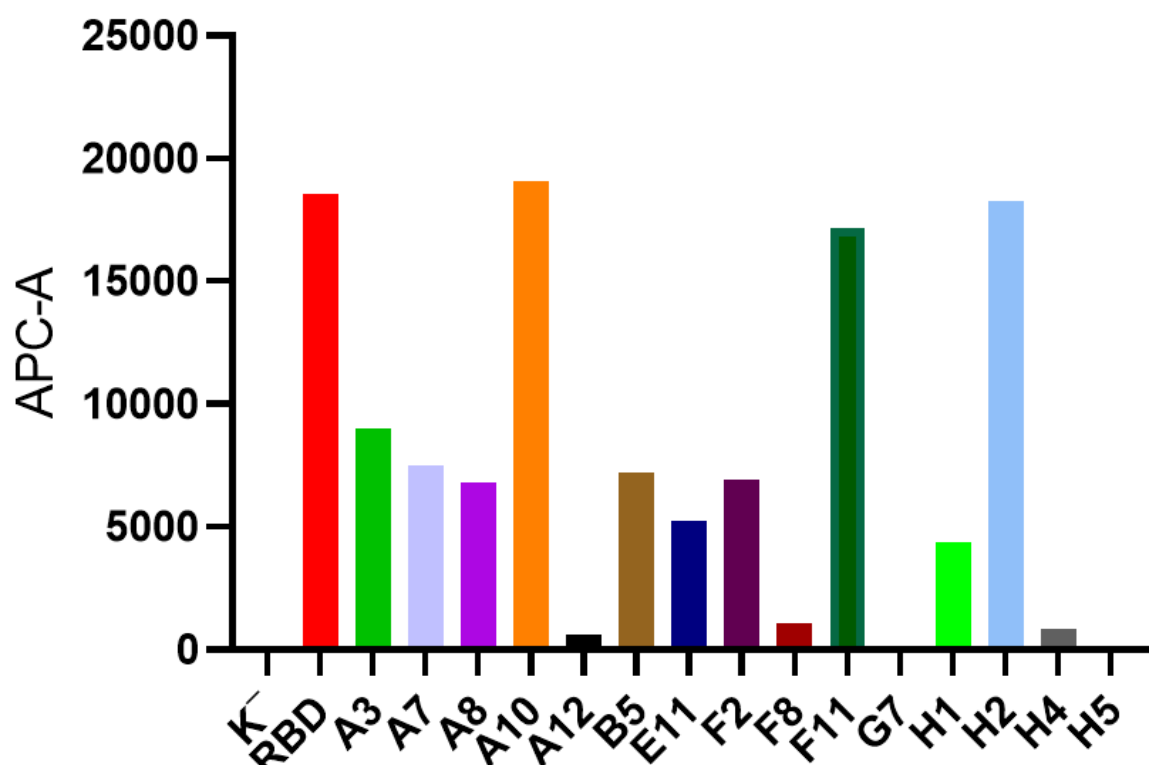


Рисунок 22. Оценка блокирования взаимодействия RBD-ACE2 полученными Nb на линии клеток HEK293T-hACE2. APC-A — интенсивность флуоресценции аллофикоцианина по площади под кривой (A, area) в относительных единицах; K⁻ — RBD к клеткам не добавлен (положительный контроль); RBD — добавлен только RBD (отрицательный контроль); остальные наименования — полученные Nb (при добавлении RBD)

Также полученные Nb оценивали по способности связывать RBD и блокировать взаимодействие RBD-ACE2 с использованием ИФА конкурентного формата. Наибольшую активность показали Nb H5 и G7, которые блокировали связывание RBD Wu с ACE2 с $IC_{50} \sim 2,30$ нМ (1,98–2,66 нМ) и $\sim 2,26$ нМ (2,08–2,45 нМ) соответственно (Рисунок 23). Значения IC_{50} , соответствующие концентрации антител, обеспечивающей полумаксимальное ингибирование связывания RBD, рассчитывали методом нелинейной регрессии с помощью программного обеспечения GraphPad Prism v.8.0. Таким образом, среди 15 полученных VHH-клоны H5 и G7 являются наиболее эффективными.

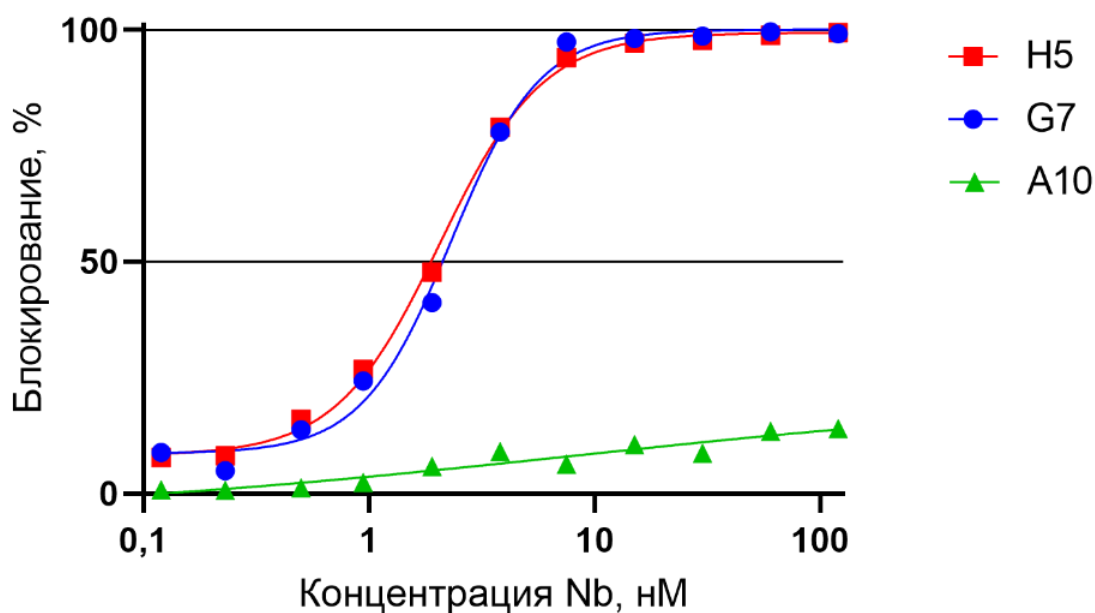


Рисунок 23. Результаты конкурентного ИФА рекомбинантных Nb. Nb H5 и G7 с высокой эффективностью блокируют взаимодействие RBD-ACE2. В качестве примера приведено Nb A10, для которого блокирующая активность практически полностью отсутствует

3.1.5. Конкурентное связывание однодоменных антител суббиблиотеки 1.1

Известно, что комбинированное использование антител, направленных на разные эпитопы RBD, может повысить устойчивость к мутационному ускользанию вируса, поэтому был проведен конкурентный BLI-анализ эпитопной специфичности наиболее эффективных Nb — H5 и G7. Использовали Ni-NTA биосенсоры с иммобилизованным RBD-His6, а добавление Nb проводили последовательно. По результатам симметричного анализа было показано, что Nb H5 и G7 конкурируют за связывание RBD. Каждое из них при взаимодействии с RBD полностью блокировало связывание другого (Рисунок 24). Таким образом, на данном этапе были обнаружены два VHH, которые, вероятно, нацелены на иммунодоминантную область RBD.

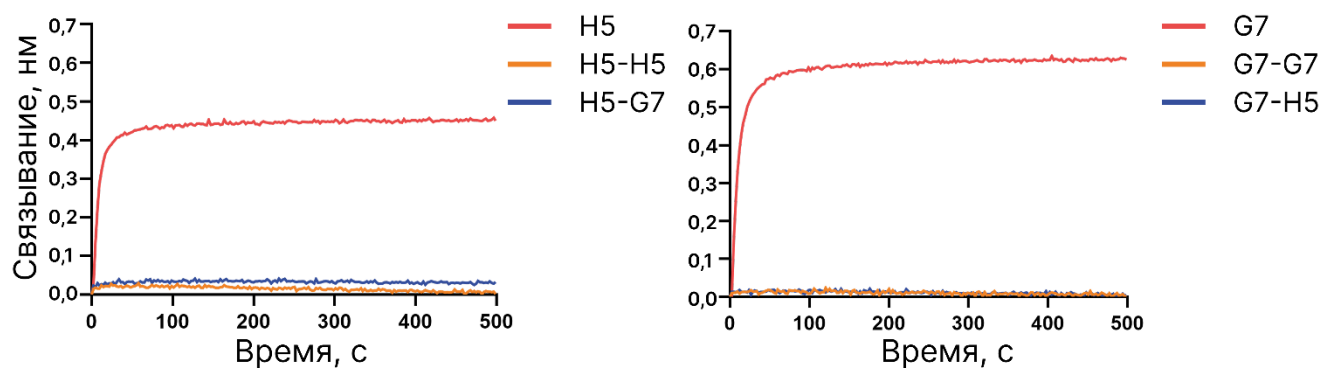


Рисунок 24. Сенсограммы BLI конкурентного связывания H5 и G7 с RBD

3.1.6. Отбор и характеристика однодоменных антител библиотеки 1 против альтернативных эпитопов

Для получения VHH, связывающих альтернативные эпитопы RBD, был проведен дополнительный этап аффинной селекции, в ходе которого биотинилированный RBD Wu предварительно инкубировали с Nb H5 для блокирования эпитопа. В результате была получена суббиблиотека 1.2. Суммарное количество фаговых клонов, представленных в данной суббиблиотеке, не превышало 10^3 . После проведения ИФА 40 случайно выбранных клонов было обнаружено 16 клонов, экспонирующих VHH, связывающие RBD Wu (Рисунок 25). Из них по результатам секвенирования были выявлены 5 клонов, имеющих уникальные VHH-последовательности.

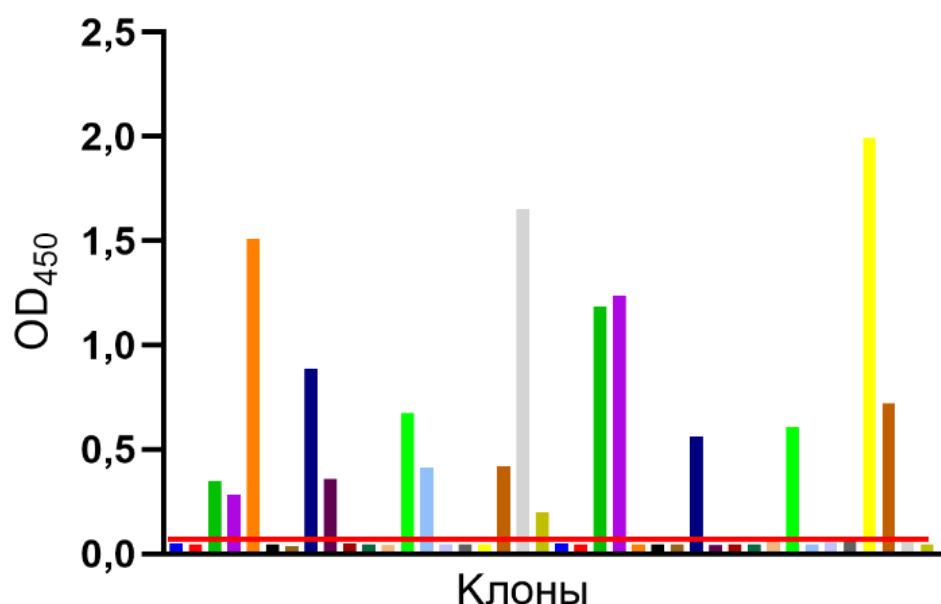


Рисунок 25. Диаграмма результатов ИФА 40 случайно выбранных фаговых клонов суббиблиотеки 1.2, обогащенной клонами, VHH-продукты которых потенциально распознают альтернативные эпитопы RBD. Красная линия — нижняя граница отбора клонов для секвенирования, соответствует уровню оптической плотности для отрицательного контроля (без фага)

VHH, кодируемые этими 5 клонами, были экспрессированы и очищены аналогично клонам суббиблиотеки 1.1. Результаты SDS-PAGE представлены на рисунке 26.

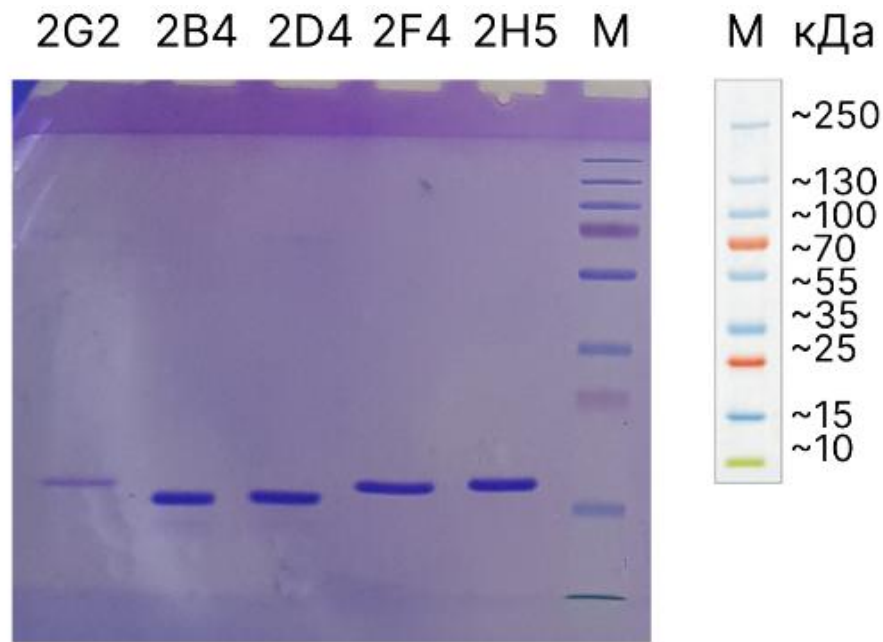


Рисунок 26. SDS-PAGE полученных и очищенных с помощью аффинной хроматографии Nb суббиблиотеки 1.2 в восстанавливающих условиях. Названия VHH-клонов указаны над соответствующими дорожками геля. М — маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, кат. №26619), кДа — килодальтон

На следующем этапе был проведен конкурентный анализ эпитопной специфичности с помощью BLI. В результате было обнаружено, что 4 из 5 VHH суббиблиотеки 1.2 распознают альтернативные эпитопы RBD и не конкурируют с H5 и G7. В качестве примера на рисунке 27 показано, что Nb 2F4 связывается с иммобилизованным на сенсоре RBD независимо от H5 и G7.

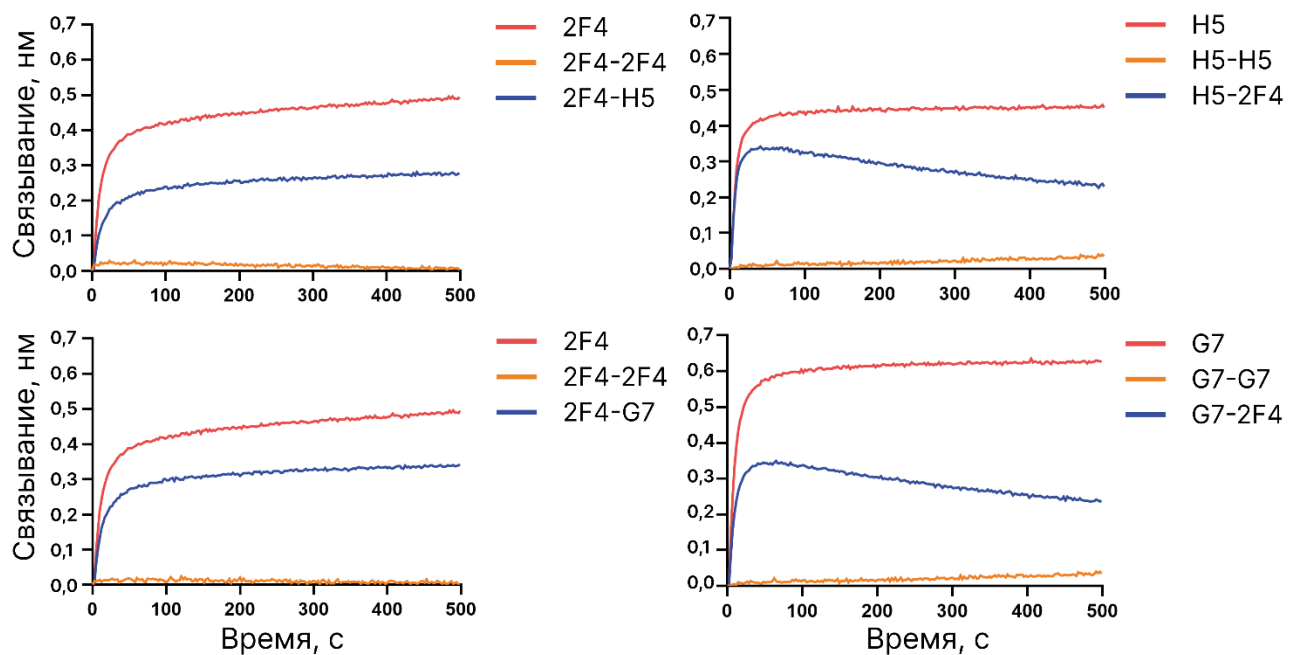


Рисунок 27. Сенсограммы BLI конкурентного связывания 2F4 с RBD в присутствии H5 и G7

В результате конкурентного ИФА 4 Nb, связывающих альтернативные эпитопы RBD, установлено, что наиболее эффективным среди них является 2F4, которое блокирует взаимодействие RBD Wu с ACE2 с $IC_{50} \sim 3,56$ нМ (2,40–5,96) (Рисунок 28).

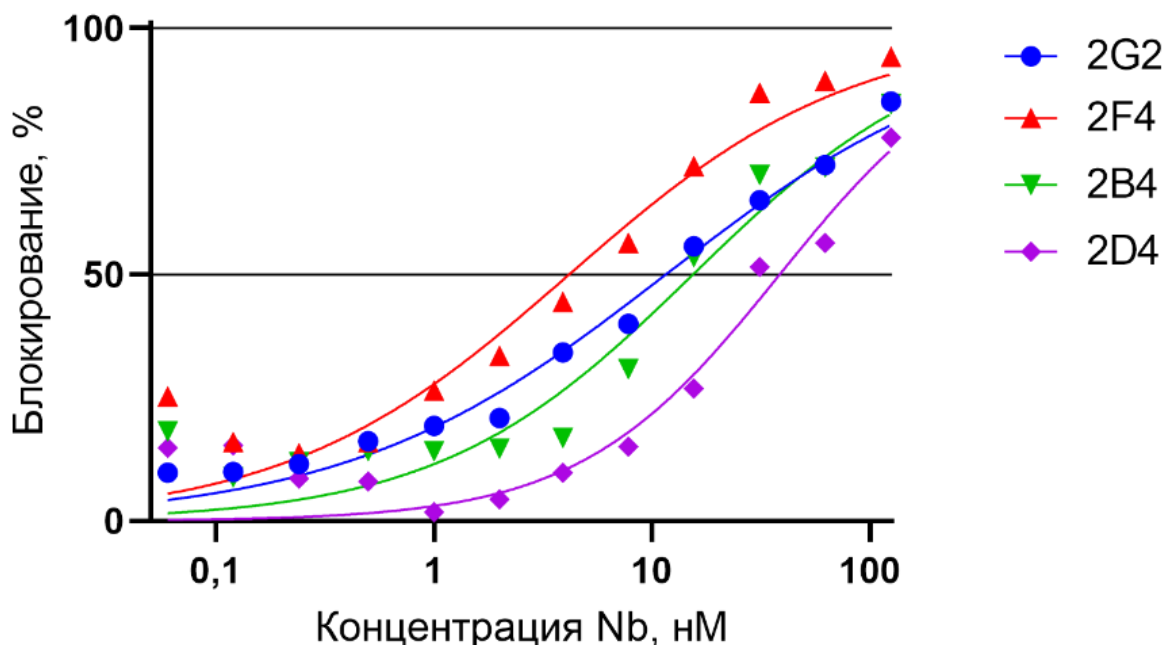


Рисунок 28. Результаты конкурентного ИФА рекомбинантных Nb 2F4, 2D4, 2B4 и 2G2, распознающих альтернативные эпитопы RBD

3.1.7. Определение кинетики взаимодействия наноконтактной библиотеки 1 с RBD

В результате проведенных экспериментов были отобраны три наиболее эффективных Nb — H5, G7 и 2F4. Дальнейшая их характеристика включала определение аффинности к RBD методом BLI по п 2.2.20.1. Равновесная константа диссоциации (K_D) является количественной мерой силы взаимодействия антитела с антигеном: чем ниже K_D , тем более прочно антитело удерживается на мишени. Кинетический анализ позволяет, кроме того, дифференциально оценить вклад скорости ассоциации (k_{on}), характеризующей скорость образования комплекса антиген-антитело, и скорости диссоциации (k_{off}), которая отражает стабильность комплекса и определяет продолжительность нейтрализующего действия.

В данном анализе Nb иммобилизовали на Ni-NTA биосенсорах в концентрации 10 мкг/мл с последующими стадиями ассоциации и диссоциации RBD Wu в пяти различных концентрациях (2,5 нМ; 5 нМ; 10 нМ; 20 нМ и 40 нМ). Установлено, что Nb H5, G7 и 2F4 связывают RBD Wu с $K_D < 1$ пМ, 0,17 нМ и 0,39 нМ соответственно (Рисунок 29). Нижняя граница разрешающей способности анализа составляет 1 пМ, поэтому фактически значение K_D для H5 может быть ниже. Уникально высокая аффинность H5 обусловлена чрезвычайно низкой k_{off} .

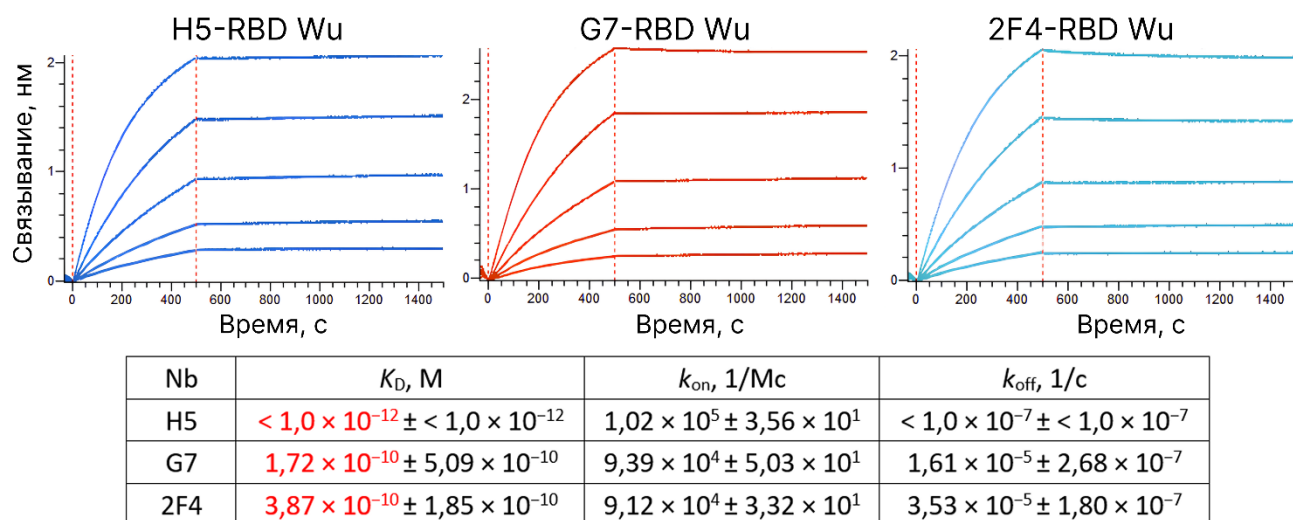


Рисунок 29. Сенсограммы BLI-анализа, отражающие взаимодействие VHH-RBD Wu. До пунктирной линии представлена стадия ассоциации, после — стадия диссоциации. Данные констант аффинности были получены с помощью программного обеспечения Data Analysis HT 11.1 Software. K_D — равновесная константа диссоциации, k_{on} — константа ассоциации, k_{off} — константа диссоциации

3.1.8. Получение олигомерных конструкторов на основе наноантител библиотеки 1

На следующем этапе были созданы гетеро- и гомодимерные гибриды трех наиболее эффективных VHH для повышения их нейтрализующего потенциала. Ранее было показано, что мультивалентные молекулы, содержащие домены VHH, характеризуются повышенной эффективностью вследствие усиления связывания с антигеном за счет эффекта avidности [296]. Кроме того, присоединение Fc-фрагмента позволяет увеличить период полувыведения VHH в сыворотке крови и обеспечить реализацию Fc-опосредованных эффекторных функций, таких как ADCC, ADCP и CDC [297].

Нами были получены производные конструкции на основе трех Nb — тандемные гетеродимеры (VHH1-VHH2) и гомодимеры с Fc-фрагментом hIgG1(VHH-Fc) (Рисунок 30).

Для получения гетеродимеров фрагменты ДНК, кодирующие последовательности H5-(GS)₃₃-2F4, 2F4-(GS)₃₃-H5, G7-(GS)₃₃-2F4 и 2F4-(GS)₃₃-G7 были синтезированы компанией Geniwiz (КНР). После гидролиза рестриктазой BstV2I ДНК-фрагменты были лигированы с вектором pET-SUMO (Рисунок 15, стр. 76) по сайтам рестрикции BsaI. Гетеродимерные полипептиды были наработаны и очищены по п. 2.2.16.2. Для получения гомодимеров с Fc-фрагментом hIgG1 последовательности, кодирующие Nb H5, G7 и 2F4, были амплифицированы с использованием праймеров VhhIgfor и VhhIgrev и клонированы по сайтам рестрикции AgeI-ApaI в эукариотический экспрессирующий вектор pAbVec-Fc (Рисунок 17, стр. 80), содержащий

последовательность ДНК, кодирующую Fc-фрагмент hIgG1. Трансфекцию клеток HEK293T и выделение гомодимеров проводили по п. 2.2.21.

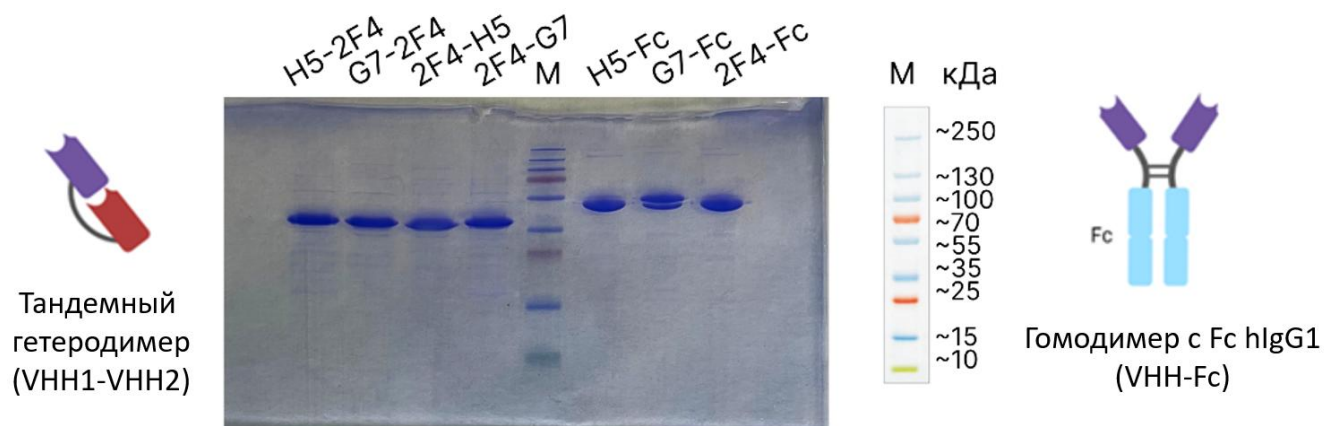


Рисунок 30. SDS-PAGE полученных и очищенных с помощью аффинной хроматографии димерных белковых конструкций на основе VHH в восстанавливающих условиях. Названия конструкций указаны над соответствующими дорожками геля. М — маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, кат. № 26619), кДа — килодальтон

3.1.9. Нейтрализация псевдотипированного лентивируса на основе уханьского варианта S-белка SARS-CoV-2 наноантителами библиотеки 1

Анализ нейтрализующих свойств полученных белковых конструкций был проведен с использованием S-псевдотипированной лентивирусной системы на основе уханьского варианта SARS-CoV-2. Всего было проведено три эксперимента, разнесенных во времени: в первом эксперименте использовали мономеры Nb (VHH), их коктейли (VHH1 и VHH2) и тандемные гетеродимеры (VHH1-VHH2), во втором и третьем — гомодимеры с Fc-фрагментом hIgG1 (VHH-Fc) (Рисунок 31).

Исходя из результатов данного анализа, стоит отметить, что использование гомодимеров VHH-Fc показало примерно десятикратное улучшение IC_{50} , то есть эффективность нейтрализации существенно повысилась. В свою очередь, комбинированное применение Nb различной эпитопной специфичности в составе коктейлей, а также использование тандемных гетеродимеров по сравнению с мономерными формами не приводило к существенному изменению значений IC_{50} при нейтрализации S-псевдовируса уханьского варианта SARS-CoV-2. Вместе с тем применение коктейлей и мультиспецифичных конструкций представляет значительный интерес с точки зрения повышения барьера к иммунному ускользанию вируса.

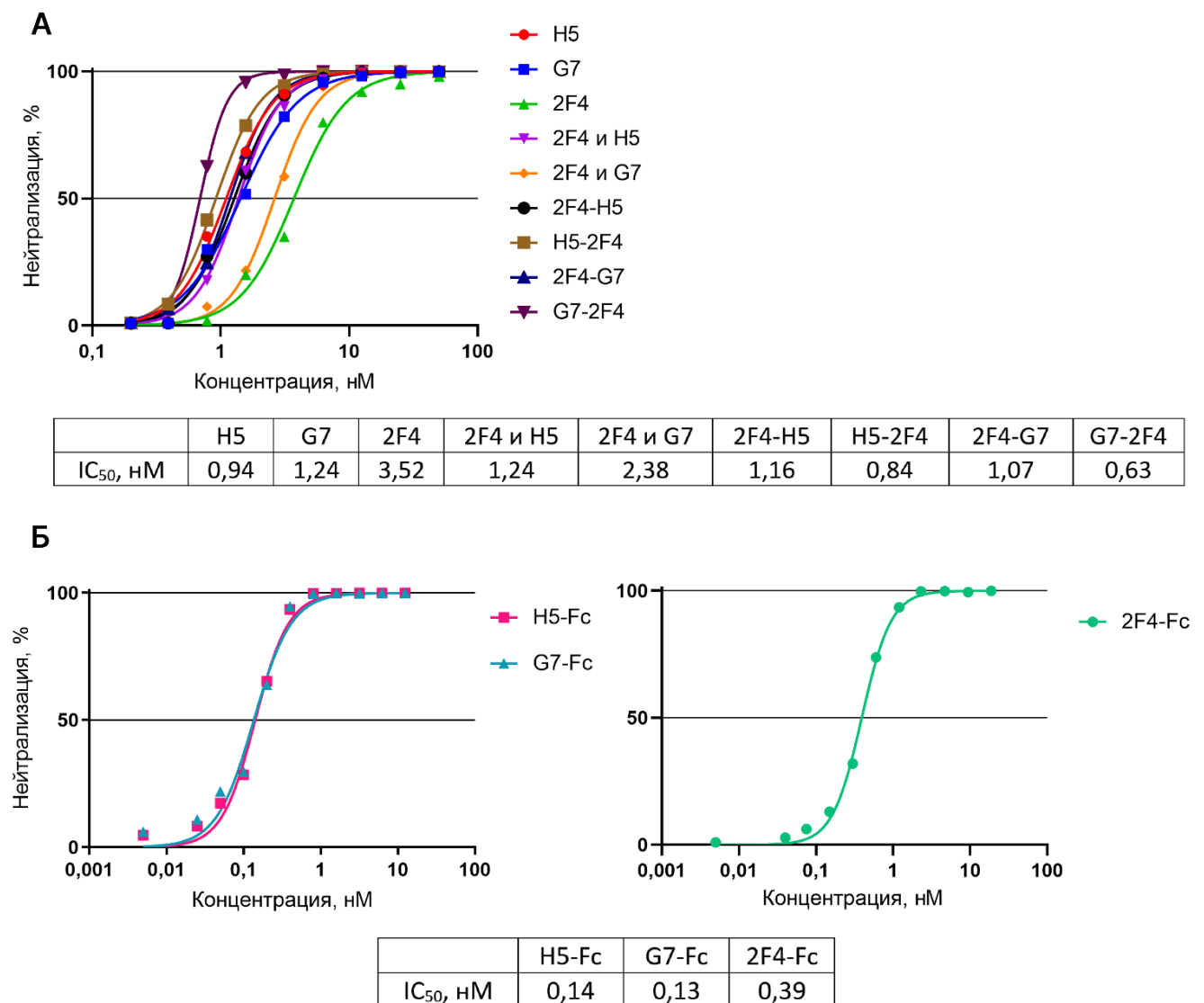


Рисунок 31. Результаты нейтрализующего анализа S-псевдотипированного лентивируса на основе уханьского варианта с использованием полученных конструкций, содержащих домены VHH. **А.** Анализ Nb, коктейлей и tandemных гетеродимеров. **Б.** Анализ гомодимеров с Fc-фрагментом hIgG1

3.1.10. Нейтрализующая активность наноантител библиотеки 1 против лентивирусов, псевдотипированных мутантными вариантами S-белка SARS-CoV-2

Появление новых мутантных вариантов SARS-CoV-2 потребовало провести оценку широты нейтрализации полученных VHH. С этой целью мы сконструировали панель лентивирусов, псевдотипированных S-белками вариантов SARS-CoV-2, актуальных в период 2021–2022 гг.: Бета, Дельта, Лямбда, Каппа и ВА.1. Nb G7 нейтрализовало вариант Дельта в 5 раз хуже уханьского варианта и не проявляло активности против других вариантов (Рисунок 32). Nb H5 кроме варианта Ухань нейтрализовало Бета, Дельта и Каппа, но не Лямбда и ВА.1 варианты. Nb 2F4 нейтрализовало со сходной активностью все ранние варианты SARS-CoV-2, но не проявляло активности против варианта ВА.1.

Вариант Nb	Ухань	Дельта	Лямбда	Каппа	BA.1
H5	0,94	0,87	Н/Н	2,3	Н/Н
G7	1,24	10,2	Н/Н	Н/Н	Н/Н
2F4	3,52	3,58	3,5	2	Н/Н
Замены в RBD		L452R, T478K, D614G, P681R	L452Q, F490S, D614G	L452R, E484Q, D614G, P681R	G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493R, G496S, Q498R, N501Y, Y505H

IC₅₀, нМ

< 1

1–3

3–5

5–15

Н/Н

Рисунок 32. Нейтрализующая активность Nb H5, G7 и 2F4 в отношении псевдовирюсов, несущих S-белок вариантов SARS-CoV-2: Ухань, Дельта, Лямбда, Каппа и BA.1. Н/Н — нейтрализация не наблюдалась

Таким образом, полученные варианты VHH не проявили нейтрализующую активность в отношении эволюционировавших вариантов SARS-CoV-2, что согласуется с данными о резком снижении эффективности антител против уханьского варианта, включая одобренные для экстренного применения. В связи с полной потерей активности исходных VHH дальнейшее конструирование и исследование гетероспецифичных форматов на их основе не представлялось целесообразным, поскольку объединение компонентов, не обладающих нейтрализующей активностью в отношении циркулирующих вариантов вируса, не могло обеспечить получение эффективных терапевтических молекул.

3.2. Поиск широко нейтрализующих антител

3.2.1. Отбор VHH-клонов библиотеки 1 против варианта BA.1

С целью выявления VHH более широкого спектра действия мы провели в библиотеке 1 дополнительный этап аффинной селекции, используя в качестве мишени RBD варианта BA.1. В результате были отобраны 12 VHH-клонов с уникальными последовательностями (Рисунок 18, стр. 84). Четыре обнаруженных клон имели последовательности CDR3, не выявленные при первом скрининге. Однако согласно результатам суррогатного анализа (FACS) эти последовательности кодировали VHH со слабой нейтрализующей активностью или вовсе без нее (данные не представлены).

3.2.2. Серия иммунизаций ламы и создание новой библиотеки

Полученные результаты показали, что VHH, распознающие консервативные эпитопы RBD и обладающие в то же время высокой нейтрализующей активностью, отсутствуют или относительно редки в иммунном репертуаре ламы после иммунизации уханьским вариантом RBD. С целью увеличения частоты таких VHH мы провели дополнительную серию последовательных иммунизаций этой ламы, в ходе которых она получила две инъекции

эквимольярной смеси RBD вариантов Бета и Дельта, затем с перерывом в два месяца три инъекции RBD SARS-CoV и с перерывом в полгода четыре инъекции варианта BA.5 (Рисунок 18, стр. 84). В общей сложности эта лама получила 13 инъекций антигена в течение двух с половиной лет.

3.2.3. Аффинная селекция VHH-клонов библиотеки 2

После окончательной иммунизации была создана библиотека 2 VHH-последовательностей. Сначала эту библиотеку обогащали клонами, связывающими RBD варианта BQ.1.1, затем, на втором этапе, в качестве мишени использовали RBD варианта XBB.1.5, а на третьем этапе отбирали клоны, вытесняющие ACE2 из комплекса с RBD XBB.1.5. Для выявления клонов, специфичных к консервативным эпитопам RBD, был проведен параллельный ИФА-скрининг 96 случайно выбранных клонов против двух вариантов RBD (BQ.1.1 и XBB.1.5.) Клоны, показавшие положительный сигнал на обоих планшетах, были отобраны для последующего секвенирования. В результате ИФА было выявлено 11 перекрестно-реагирующих клонов, шесть из которых имели уникальные последовательности VHH (9A4, 9A7, 9A21, 9A57, 9A58, 9A80).

Дополнительно была применена схема альтернативной аффинной селекции. Первый раунд обогащения библиотеки 2 проводили по стандартному протоколу против RBD варианта EG.5. После реамплификации суббиблиотеки проводили второй раунд обогащения против RBD варианта EG.5, но элюцию фагов осуществляли вытеснением VHH-продуктов из комплекса с RBD добавлением молярного избытка антитела SA55. Как было описано в главе 1, данное антитело является высокопотентным и широко нейтрализующим. Данную стратегию селекции применяли для выделения клонов, конкурирующих с SA55 за связывание с эпитопом RBD. Скрининг 96 индивидуальных клонов проводили с помощью ИФА параллельно на двух планшетах. В лунках обоих планшетов иммобилизовали RBD варианта EG.5. При этом во втором планшете перед нанесением фагов RBD предварительно инкубировали с SA55, чтобы заблокировать эпитоп, распознаваемый этим антителом. Фаговые клоны, связавшие RBD в первом планшете, но не связавшие во втором, были отобраны для секвенирования. В результате были выявлены 3 клонa, имеющих уникальные VHH-последовательности (9D48, 9D60 и 9D66).

3.2.4. Нарботка и очистка однодоменных антител библиотеки 2

Рекомбинантные VHH, отобранные из библиотеки 2, экспрессировали и очищали по тому же протоколу, что и клоны библиотеки 1. Результаты SDS-PAGE представлены на рисунке 33.

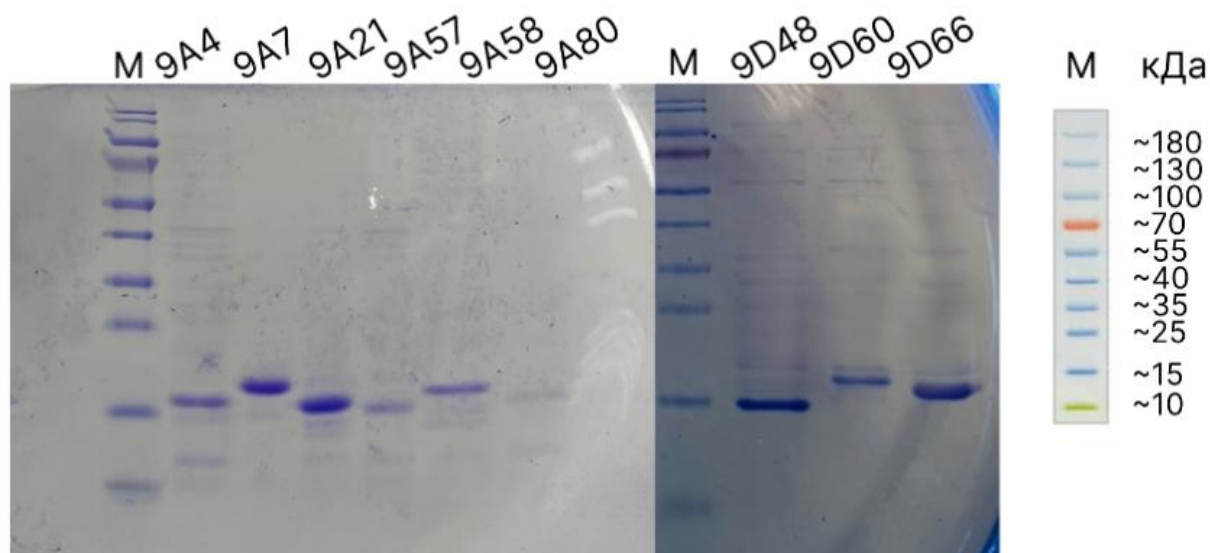


Рисунок 33. SDS-PAGE полученных и очищенных с помощью аффинной хроматографии Nb библиотеки 2 в восстанавливающих условиях. Названия VHH-клонов указаны над соответствующими дорожками геля. М — маркер PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, № 26616), кДа — килодальтон

3.2.5. Определение кинетики взаимодействия наноантител библиотеки 2 с RBD S-белка разных вариантов SARS-CoV-2

Для измерения кинетики взаимодействия Nb иммобилизовали на Ni-NTA биосенсорах в концентрации 10 мкг/мл и добавляли RBD различных вариантов SARS-CoV-2 в трех концентрациях (5 нМ, 10 нМ и 20 нМ). Nb 9A7, 9A21, 9A57, 9A58, 9A80, 9D48, 9D60 и 9D66 связывали варианты RBD со сродством в диапазоне от нано- до пикомолярного (от $1,64 \times 10^{-8}$ до $< 1,0 \times 10^{-12}$ М) (Рисунок 34). Nb 9A4 исключили из этого анализа, поскольку в предварительных экспериментах оно не нейтрализовало варианты сублинии XBB (раздел 3.2.8).

Наибольшее сродство к RBD всех протестированных вариантов S-белка SARS-CoV-2 продемонстрировало Nb 9A58, для которого значения K_D варьировали от $4,23 \times 10^{-10}$ до $< 1,0 \times 10^{-12}$ М, то есть находились в пикомолярном диапазоне. Nb 9A57 не связывало варианты EG.5, KP.2 и KP.3.1.1, но было включено в дальнейшие эксперименты, так как было получено до появления этих вариантов. Клоны 9D48 и 9D66 не связывали варианты BA.1 и KP.3.1.1, поэтому были исключены из дальнейшей работы. Остальные Nb (9A7, 9A21, 9A80 и 9D60) связывали RBD всех протестированных вариантов SARS-CoV-2 с K_D от $3,19 \times 10^{-9}$ до $1,37 \times 10^{-10}$ М.

Nb RBD	9A7	9A21	9A57	9A58	9A80	9D48	9D60	9D66	Аффинность (K _D , М)
Ухань	$1,37 \times 10^{-10}$	$7,79 \times 10^{-10}$	$5,19 \times 10^{-10}$	$9,31 \times 10^{-11}$	$5,71 \times 10^{-10}$	$3,01 \times 10^{-9}$	$6,49 \times 10^{-9}$	$8,14 \times 10^{-9}$	10^{-12}
BA.1	$1,57 \times 10^{-10}$	$7,30 \times 10^{-10}$	$2,80 \times 10^{-10}$	$< 1,0 \times 10^{-12}$	$7,24 \times 10^{-10}$	Н/С	$5,28 \times 10^{-9}$	Н/С	10^{-11}
BA.5	$4,07 \times 10^{-10}$	$1,94 \times 10^{-9}$	$1,93 \times 10^{-9}$	$< 1,0 \times 10^{-12}$	$3,19 \times 10^{-9}$	$2,74 \times 10^{-9}$	$2,51 \times 10^{-9}$	$1,52 \times 10^{-9}$	10^{-10}
XBB.1.5	$2,39 \times 10^{-9}$	$1,94 \times 10^{-9}$	$1,15 \times 10^{-9}$	$6,31 \times 10^{-11}$	$2,84 \times 10^{-9}$	Н/Д	Н/Д	Н/Д	10^{-9}
EG.5	$2,49 \times 10^{-10}$	$3,73 \times 10^{-10}$	Н/С	$< 1,0 \times 10^{-12}$	$4,01 \times 10^{-10}$	$1,52 \times 10^{-8}$	$1,55 \times 10^{-9}$	$1,08 \times 10^{-8}$	10^{-8}
JN.1	$3,06 \times 10^{-10}$	$7,84 \times 10^{-10}$	$3,62 \times 10^{-9}$	$1,70 \times 10^{-10}$	$1,64 \times 10^{-9}$	$1,64 \times 10^{-8}$	$2,38 \times 10^{-9}$	$9,92 \times 10^{-9}$	10^{-9}
HV.1	$2,38 \times 10^{-10}$	$4,72 \times 10^{-10}$	$4,5 \times 10^{-9}$	$1,51 \times 10^{-10}$	$9,18 \times 10^{-10}$	Н/Д	Н/Д	Н/Д	10^{-8}
KP.2	$6,47 \times 10^{-10}$	$7,91 \times 10^{-10}$	Н/С	$4,86 \times 10^{-11}$	$1,69 \times 10^{-9}$	$3,71 \times 10^{-9}$	$1,86 \times 10^{-9}$	$8,72 \times 10^{-9}$	Н/С
KP.3.1.1	$4,23 \times 10^{-10}$	$5,97 \times 10^{-10}$	Н/С	$4,23 \times 10^{-10}$	$1,82 \times 10^{-9}$	Н/С	$2,48 \times 10^{-9}$	Н/С	Н/Д

Рисунок 34. Аффинность Nb 9A7, 9A21, 9A57, 9A58, 9A80, 9D48, 9D60 и 9D66 к RBD различных вариантов SARS-CoV-2. Н/С — связывание не наблюдалось, Н/Д — нет данных

3.2.6. Получение Fc-димеров с VHH-доменами библиотеки 2

Для дальнейшего анализа были отобраны клоны 9A7, 9A21, 9A57, 9A58 и 9D60. Указанные VHH экспрессировали в димерной форме в составе химерных белков с Fc-фрагментом hIgG1. Методика получения плазмидных конструкций соответствовала использованной ранее для Fc-димеров с VHH-доменами библиотеки 1. Результаты наработки и аффинной очистки 9A7-Fc, 9A21-Fc, 9A57-Fc, 9A58-Fc и 9D60-Fc представлены на рисунке 35.

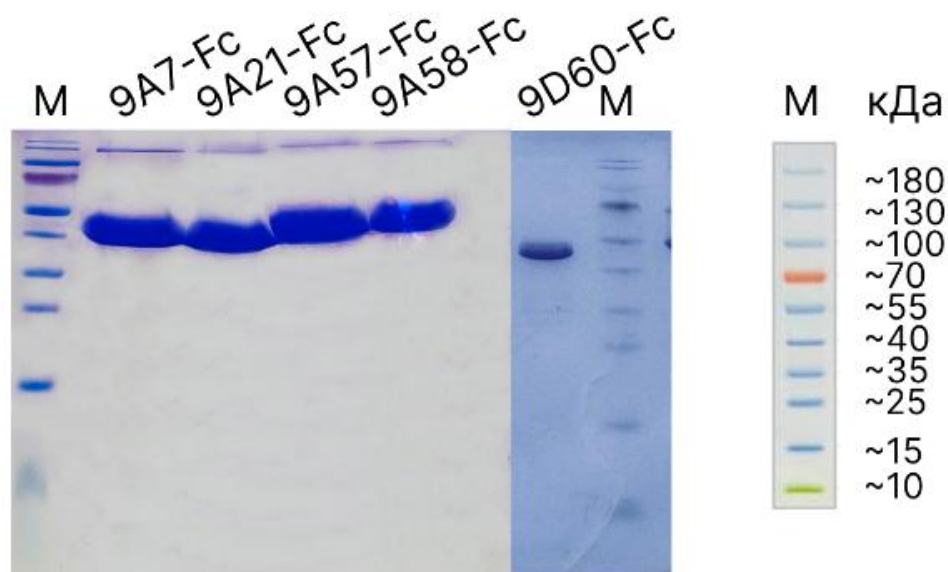


Рисунок 35. SDS-PAGE полученных и очищенных с помощью аффинной хроматографии Fc-димеров лучших VHH библиотеки 2 в восстанавливающих условиях. Названия конструкций указаны над соответствующими дорожками геля. М - маркер PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher Scientific, № 26619), кДа — килодальтон

3.2.7. Конкурентное связывание однодоменных антител библиотеки 2

Анализ эпитопной конкуренции полученных VHH проводили с помощью BLI с использованием конструкций 9A7-Fc, 9A21-Fc, 9A57-Fc и 9A58-Fc. RBD-His6 уханьского

варианта иммобилизовали на сенсорах в концентрации 10 мкг/мл. Конструкции VHH-Fc последовательно добавляли на сенсор с RBD в концентрациях 500 нМ.

Полученные сенсограммы демонстрируют, что 9A7-Fc и 9A57-Fc не конкурируют за связывание с RBD друг с другом, а также с 9A21-Fc и 9A58-Fc (Рисунок 36).

Предварительная инкубация 9A58-Fc с RBD блокировала связывание 9A21-Fc, однако при обратной сорбции образование комплекса 9A21-Fc с RBD лишь частично препятствовало связыванию 9A58-Fc.

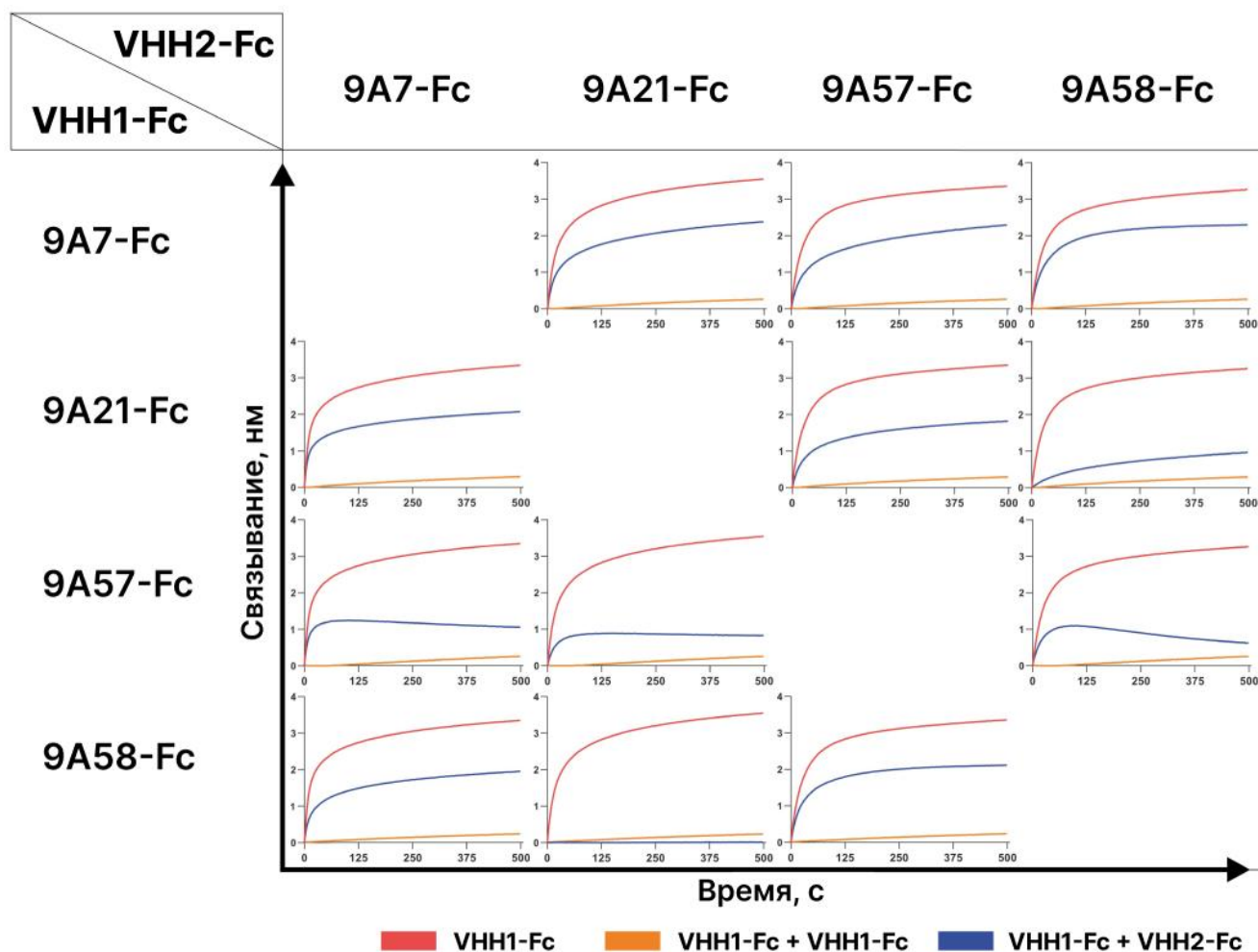


Рисунок 36. Матрица сенсограмм BLI конкурентного связывания 9A7-Fc, 9A21-Fc, 9A57-Fc и 9A58-Fc с RBD

В результате анализа конкурентного связывания 9D60-Fc было показано, что VHH 9D60 направлено на еще один независимый эпитоп и не конкурирует с другим отобранными VHH библиотеки 2 (Рисунок 37, А). Также 9D60-Fc не конкурировало с антителом SA55, несмотря на то что аффинная селекция была направлена на отбор VHH, распознающих эпитопы, перекрывающиеся с эпитопом SA55.

Дополнительно был проведен анализ конкуренции VHH библиотеки 2 с двумя лучшими VHH библиотеки 1, распознающими независимые эпитопы — H5 и 2F4 (Рисунок 37, Б).

Показано, что 9A57-Fc конкурирует с H5-Fc и, по всей видимости, связывает близкий иммунодоминантный эпитоп, что объясняет иммунное ускользание новых вариантов SARS-CoV-2 от противовирусного действия H5. Димеры 9A7-Fc, 9A21-Fc и 9A58-Fc не конкурируют с H5-Fc и 2F4-Fc. Димер 9D60-Fc, в свою очередь, конкурирует с 2F4-Fc.

А

VHH2-Fc VHH1-Fc	9D60-Fc	9A7-Fc	9A57-Fc	9A58-Fc	SA55
9D60-Fc					
9A7-Fc					
9A57-Fc					
9A58-Fc					
SA55					

Нет конкуренции
 Конкуренция

Б

VHH2-Fc VHH1-Fc	H5-Fc	2F4-Fc	9A7-Fc	9A57-Fc	9A58-Fc	9D60-Fc
H5-Fc						
2F4-Fc						
9A7-Fc						
9A57-Fc						
9A58-Fc						
9D60-Fc						

Рисунок 37. BLI-анализ конкурентного связывания. **А.** Конкуренция 9D60-Fc с 9A7-Fc, 9A57-Fc, 9A58-Fc и антителом SA55 за связывание с RBD. **Б.** Конкуренция H5-Fc и 2F4-Fc с 9A7-Fc, 9A57-Fc, 9A58-Fc и 9D60-Fc за связывание с RBD

Важно отметить, что полученные нами результаты свидетельствуют о множественности консервативных эпитопов в RBD. Распознающие эти эпитопы VHH могут быть использованы в качестве компонентов мультифункциональных антител нового поколения, более устойчивых к мутационному ускользанию вируса SARS-CoV-2.

3.2.8. Нейтрализующая активность наноантител библиотеки 2 против лентивирусов, псевдотипированных мутантными вариантами S-белка SARS-CoV-2

Оценку потентности полученных Nb библиотеки 2 (9A4, 9A7, 9A21, 9A57, 9A58, 9A80, 9D60) и димеров VHH-Fc на их основе проводили с использованием широкой панели лентивирусов, псевдотипированных различными мутантными вариантами S-белка SARS-CoV-2 (Ухань, BA.1, BA.2, BA.5, BQ.1.1, XBB.1, XBB.1.5, XBB.1.16, EG.5, HV.1, JN.1, KP.2, KP.3.1.1, XEC, NB.1.8.1, XFG), а также S-белком SARS-CoV. Для определения нейтрализующей активности были сопоставлены два методологических подхода. Первый подход базировался на

люминесцентном детектировании с использованием прибора Luminoskan. Однако вследствие высокой межпостановочной вариабельности данных, получаемых с помощью люминесценции, для дальнейшего анализа был выбран второй подход — классический формат оценки нейтрализующей активности методом FACS, ранее успешно примененный нами для анализа VHH библиотеки 1. При этом люминесцентный анализ, несмотря на выявленные ограничения, позволил установить нейтрализующую активность антител с приемлемым уровнем достоверности.

Nb проявили в основном умеренную или слабую нейтрализующую активность против панели псевдовирсов (Рисунок 38).

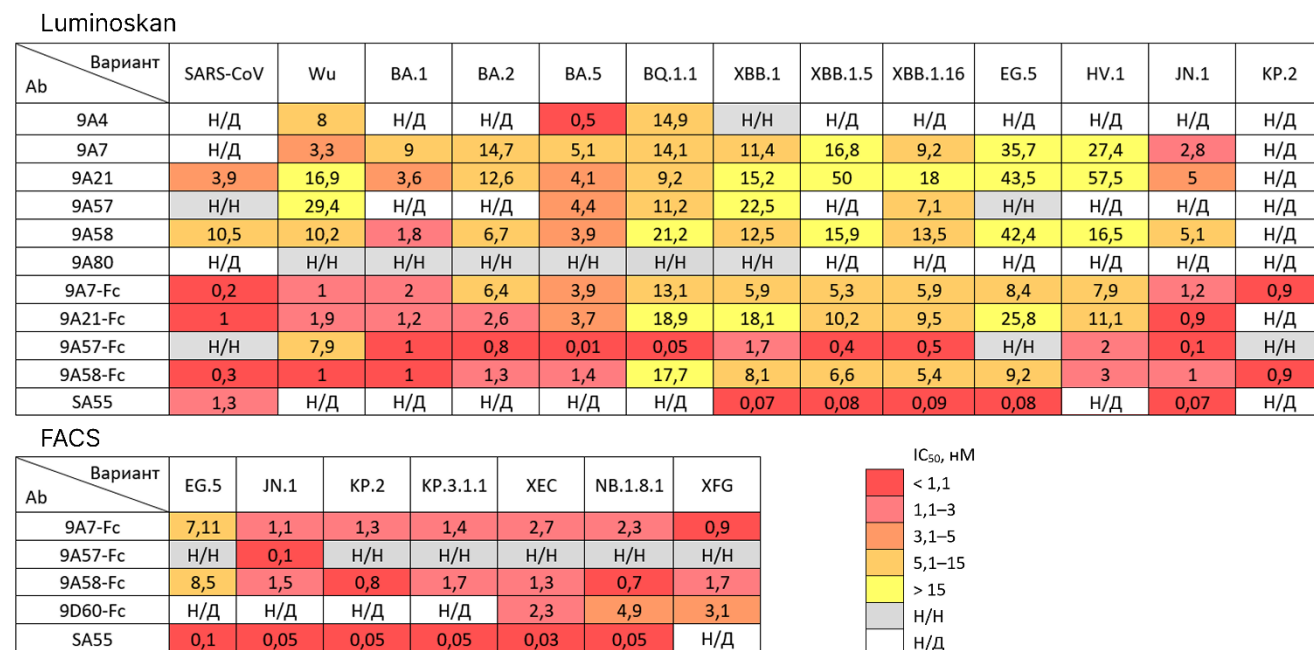


Рисунок 38. Активность Nb 9A4, 9A7, 9A21, 9A57, 9A58, 9A80, 9D60; Fc-димеров 9A7-Fc, 9A21-Fc, 9A57-Fc, 9A58-Fc, 9D60-Fc и референсного mAb SA55 в тесте на нейтрализацию псевдовирсов с использованием S-белка различных вариантов SARS-CoV-2, а также SARS-CoV. Н/Н — нейтрализация не наблюдалась, Н/Д — нет данных

Лучшее значение IC₅₀ среди мономеров VHH выявлено для Nb 9A4 при нейтрализации варианта BA.5 (IC₅₀ = 0,5 нМ), однако 9A4 не нейтрализовало вариант XBB.1 и в дальнейших экспериментах не использовалось. Nb 9A80 связывает широкий спектр мутантных вариантов SARS-CoV-2 (раздел 3.2.5), однако лишено нейтрализующей активности. В остальных случаях IC₅₀ для Nb находится в диапазоне от 1,8 до 57,5 нМ. Nb 9A57 не нейтрализовало вариант EG.5 и псевдовирс на основе SARS-CoV, однако использовалось в дальнейших экспериментах, так как они были проведены до теста нейтрализации данных S-псевдовирсов. Nb 9A7, 9A21 и 9A58, в свою очередь, нейтрализовали все варианты S-псевдовирсов, для которых был проведен эксперимент. Стоит отметить, что нейтрализующая активность этих Nb увеличилась в

отношении варианта JN.1, ставшего родоначальником спектра сублиний, доминировавших в поздние периоды распространения SARS-CoV-2 (2024–2026 гг.).

Димеризация VHH с использованием Fc-фрагмента hIgG1 в данных тестах позволила достичь существенного улучшения показателей нейтрализующей активности. Диапазон IC_{50} для Fc-димеров составил от 0,01 до 25,8 нМ. Для количественной оценки усиления нейтрализации использовали среднее геометрическое отношений IC_{50} по всем протестированным вариантам вируса. Fc-димеризация приводила к улучшению нейтрализующей активности в 2,4 раза для 9A7-Fc, в 2,6 раз для 9A21-Fc, в 37 раз для 9A57-Fc и в 3,9 раз для 9A58-Fc.

Димер 9A21-Fc не включали в FACS-тесты нейтрализации, так как он частично конкурирует с 9A58-Fc, но менее активен. Наибольшую активность проявил димер 9A57-Fc и нейтрализовал большинство вариантов с IC_{50} до 1 нМ, однако, как и множество других потентных pAb, нацеленных на иммунодоминантную область RBD, утратил активность против новых вариантов SARS-CoV-2 и не был активен против SARS-CoV. Димеры 9A7-Fc и 9A58-Fc нейтрализовали весь спектр S-псевдовирuсов на основе представленных вариантов SARS-CoV-2, а также вируса SARS-CoV в диапазоне IC_{50} 0,2–13,1 нМ и 0,3–17,7 нМ соответственно. Для 9D60-Fc было проведено только три эксперимента против циркулировавших в 2025–2026 гг. вариантов XEC, NB.1.8.1 и XFG, в результате которых данный димер нейтрализовал S-псевдовирuс на основе XEC с IC_{50} = 2,3 нМ, NB.1.8.1 с IC_{50} = 4,9 нМ и XFG с IC_{50} = 3,1 нМ. Таким образом, было установлено, что Fc-димеры трех VHH (9A7-Fc, 9A58-Fc и 9D60-Fc) библиотеки 2 являются потентными и широко нейтрализующими.

3.3. Оценка репертуара SARS-CoV-2-специфичных VHH

Для сравнения иммунного репертуара SARS-CoV-2-специфичных VHH в библиотеках 1 и 2 мы провели филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей VHH с использованием пакета программ MEGA11 (Рисунок 39) [298].

Последовательности из библиотеки 1 были разделены на 2 группы: одна включала VHH, селектированные против варианта RBD Wu, другая — VHH, селектированные против варианта BA.1. Филогенетический анализ показал, что BA.1-селектированные VHH из библиотеки 1 имели высокое и очень высокое сходство в области CDR3 с Ухань-селектированными клонами этой же библиотеки, причем с теми из них, которые либо обладали слабой нейтрализующей активностью, либо не имели ее.

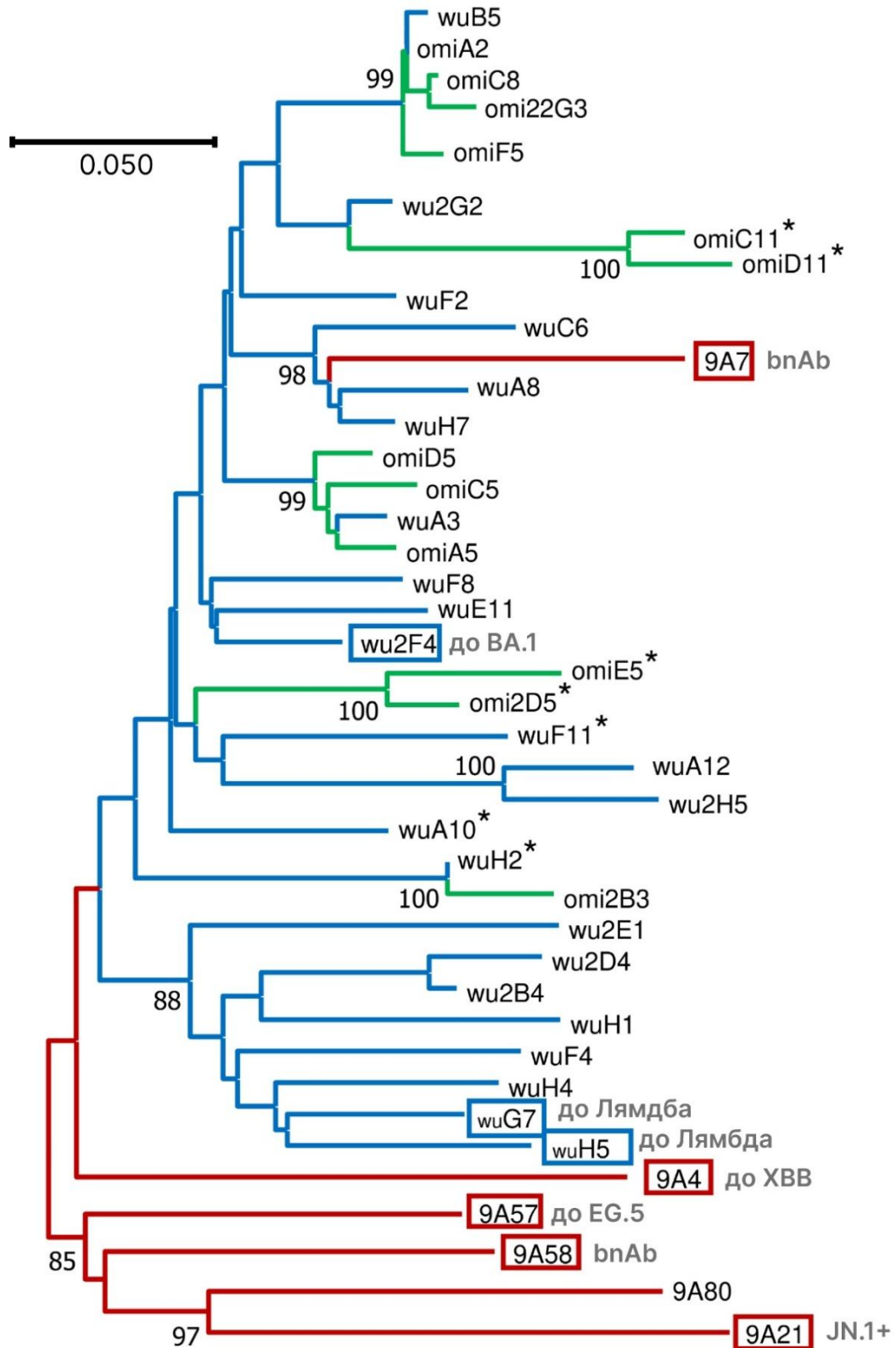


Рисунок 39. Дендрограмма сходства аминокислотных последовательностей VNN. Эффективно нейтрализующие клоны обведены прямоугольниками. Серым шрифтом указана широта нейтрализующей активности (JN.1+ — нейтрализует вариант JN.1, но не проверено против более поздних вариантов). Клоны со слабой или отсутствующей нейтрализующей активностью отмечены звездочкой. Синим и зеленым цветами обозначены клоны библиотеки 1, отобранные против вариантов Ухань и BA.1 соответственно; красным — клоны библиотеки 2. Значения бутстрэп-поддержки указаны в узлах дерева

Два клона VHH из библиотеки 2 — 9A7 и 9D60 (не представлен) — также вошли в кластер VHH-последовательностей библиотеки 1. Клон 9A7 наиболее близок клонам A8, H7 и C6 из библиотеки 1. В области CDR3 9A7 отличаются от A8 и H7 всего двумя АО, что согласуется с их общим происхождением. В то же время клон 9A7 имеет множественные замены в рамочных областях. В целом, последовательности 9A7, A8 и H7 отличаются от своего предполагаемого предка по зародышевой линии на 17, 2 и 2 АО соответственно. Следовательно, можно с высокой степенью уверенности заключить, что клон 9A7 является результатом соматического созревания одного из VHH, индуцированного уханьским вариантом RBD. Остальные клоны из библиотеки 2 структурно не связаны с клонами из библиотеки 1.

Мы не можем точно определить, на какой стадии иммунизации были индуцированы VHH 9A4, 9A21, 9A57, 9A58 и 9A80 из библиотеки 2, но высокий уровень отличий от известных геномных последовательностей VHH-генов ламы (15–31% соматических мутаций) также указывает на их длительное аффинное созревание (Рисунок 40).

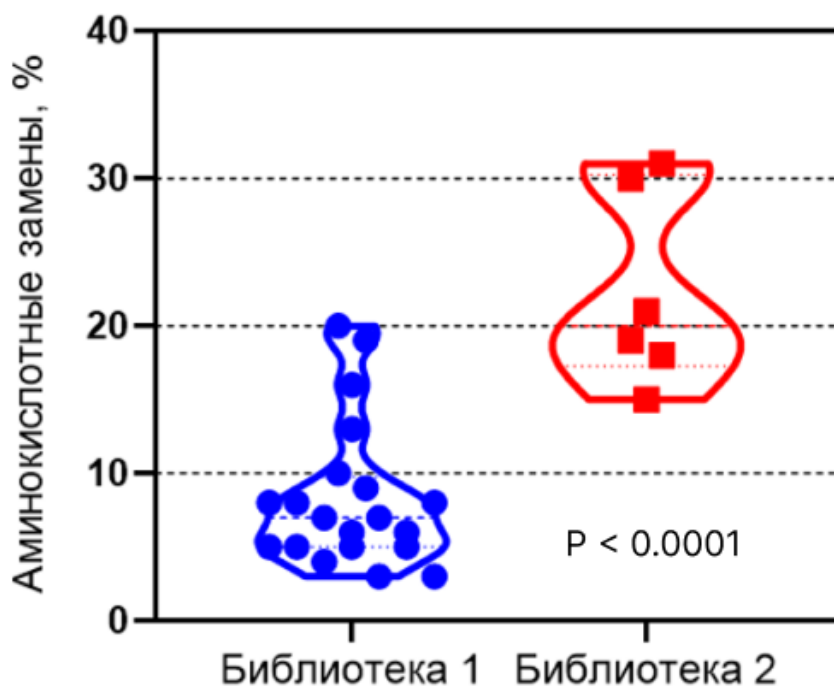


Рисунок 40. Процент аминокислотных замен в идентифицированных VHH в сравнении с последовательностями предсказанных зародышевых предшественников. Сравнение групп VHH-последовательностей библиотеки 1 и 2 производили с использованием непарного t-теста

3.4. Сравнение Fc-димеров наноантител с моноклональными антителами человека

Параллельно с получением VHH ламы в нашей лаборатории методом сортировки индивидуальных В-клеток реконвалесцентов были также получены mAb человека к SARS-CoV-2. Первая панель антител (iB0–iB26) была выделена в 2020 г. из образцов доноров, перенесших инфекцию, вызванную уханьским вариантом вируса [299]. Вторая панель (iC1–iC5) была

получена в 2022 г. от реконвалесцента, ранее вакцинированного препаратом «Спутник V» [300] (Рисунок 41).

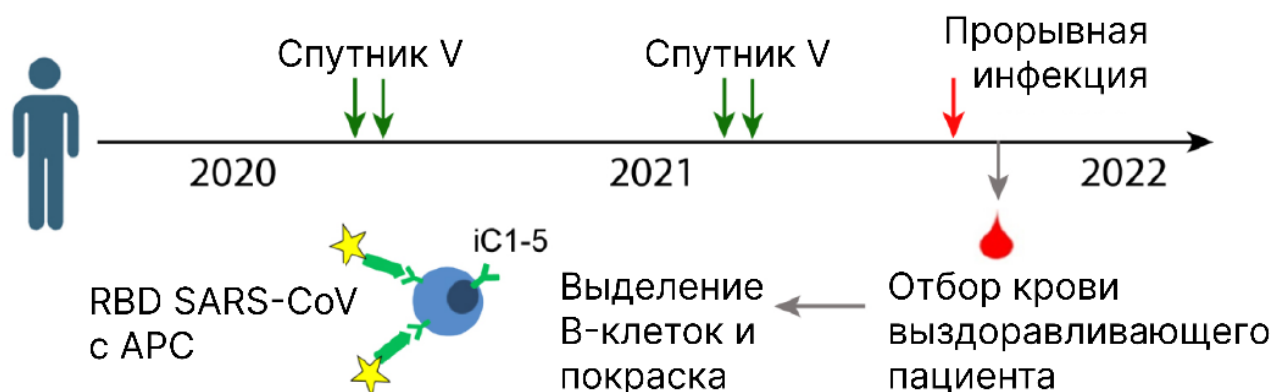


Рисунок 41. Схема получения mAb iC1–iC5 от реконвалесцентного донора, ранее вакцинированного препаратом «Спутник V»

Среди антител первой панели наиболее эффективными являлись iB6, iB12, iB14 и iB20, а во второй — iC1. Аффинность данных антител к RBD находилась в диапазоне от $4,7 \times 10^{-10}$ до $< 1 \times 10^{-12}$ М. Активность в тестах нейтрализации S-псевдовируса варьировала в диапазоне IC_{50} от 0,03 до 5,1 нМ. Следует подчеркнуть, что Fc-форматы полученных нами VHH по своим характеристикам не уступают mAb человека, а в ряде случаев превосходят их.

Активности *in vivo* mAb, а также Fc-димеров на основе VHH оценивали на сирийских хомячках в профилактическом и терапевтическом режимах (Рисунок 42, А). Эксперименты проводили в 2021–2022 гг. с наиболее перспективными на тот момент полученными кандидатами — iB6, iB12, iB14, iB20, H5-Fc, G7-Fc и 2F4-Fc. В связи с ограниченным количеством экспериментальных животных не все исследуемые кандидаты оценивали в обоих режимах.

Профилактическое введение H5-Fc и 2F4-Fc осуществляли внутривенно в дозе 10 мг/кг за 24 ч до инфицирования уханьским вариантом вируса, терапевтическое введение H5-Fc, G7-Fc и 2F4-Fc в той же дозе через 6 ч после заражения. Доза вируса при заражении для всех экспериментов составила 1×10^4 БОЕ. Контрольная группа получила 10 мг/кг общего IgG человека.

В случае полученных mAb человека первый эксперимент включал группы профилактического введения антитела iB12 (1 мг/кг и 10 мг/кг) и коктейля антител iB6 и iB20 против разных эпитопов (0,1 мг/кг и 1 мг/кг суммарно) за 24 ч до заражения, группы терапевтического введения этих же антител в дозе 1 мг/кг, контрольную группу введения общего IgG человека (10 мг/кг), а также группу интактных неинфицированных хомячков.

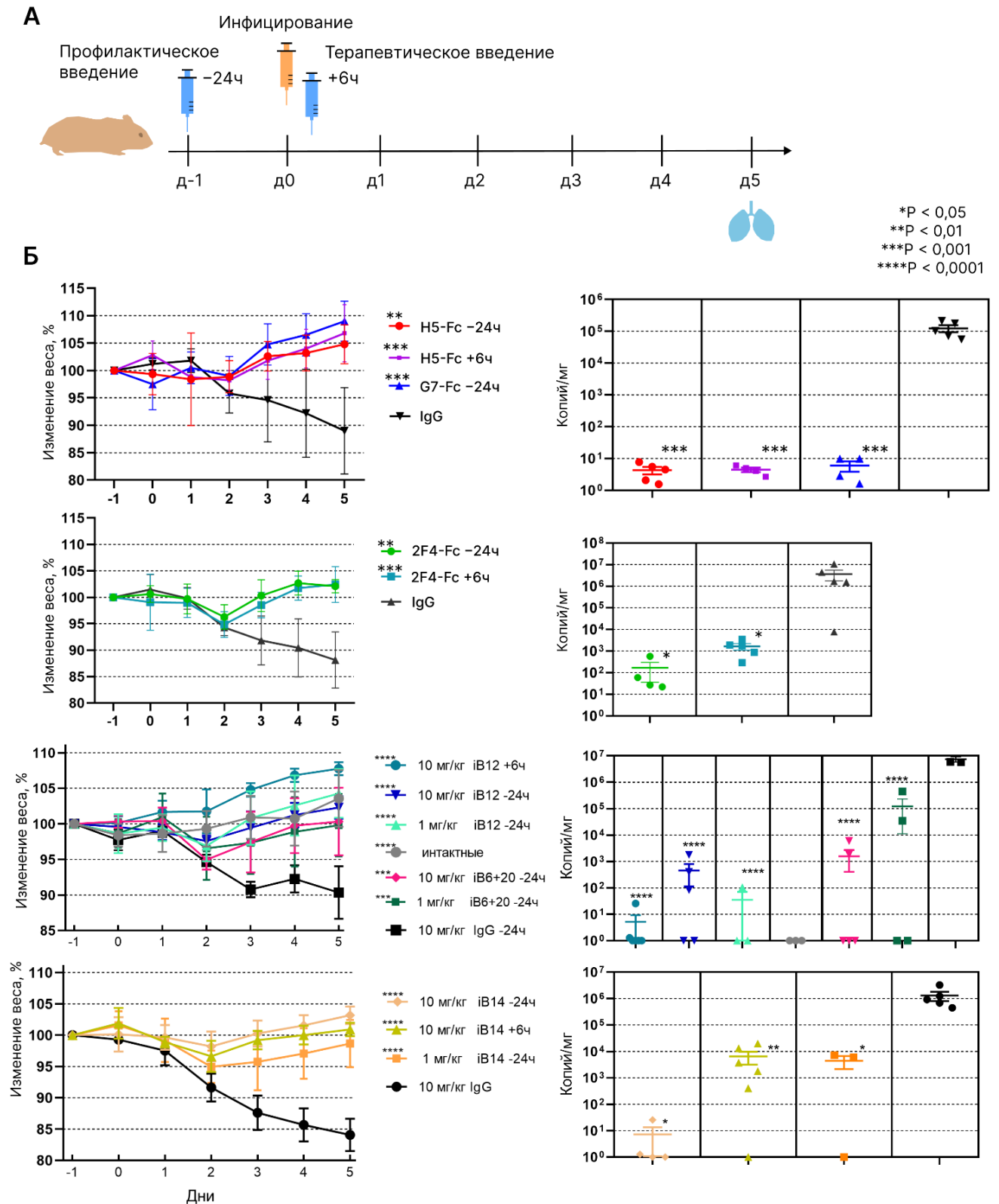


Рисунок 42. Защитная эффективность антител на сирийских хомячках. **А.** Схема эксперимента. **Б.** Динамика относительной массы тела (слева) и уровень вирусной РНК (справа; ОТ-ПЦР-РВ с праймерами, специфичными к гену, кодирующему РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp, RNA-dependent RNA polymerase) в группах профилактики и терапии после введения антител или контрольного общего IgG человека. Планки погрешностей для изменения веса отражают среднее $\pm$ стандартное отклонение (SD), для вирусной нагрузки — среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего (SEM)

Второй эксперимент включал группы профилактики (1 мг/кг и 10 мг/кг) и группу терапии (10 мг/кг) с введением антитела iB14, а также контрольную группу с введением общего IgG человека (10 мг/кг). Количество животных на группу для обоих экспериментов составило 3–7. Забор крови и легких животных проводили на пятые сутки постинфекционного периода. Эффективность защиты оценивали по динамике массы тела и числу копий вирусной РНК в легочных гомогенатах.

Как в профилактическом, так и в терапевтическом режиме введение mAb и димеров VHH-Fc приводило к выраженному защитному эффекту (Рисунок 42, Б). Потеря массы тела у контрольных животных в среднем составляла 11–12% к пятому дню, тогда как у получавших антитела хомяков, напротив, фиксировали прирост массы тела начиная с третьих суток. Количественный ПЦР-анализ позволил выявить снижение вирусной РНК в легких на 3–6 порядков относительно контроля как при профилактике, так и при терапии, за исключением группы введения коктейля антител iB6 и iB20 в дозе 1 мг/кг. Тем не менее в данной группе наблюдалась положительная динамика течения инфекции. Таким образом, профиль защитной активности димеров VHH-Fc *in vivo* сопоставим с mAb человека как при профилактическом, так и при терапевтическом применении. Однако полученные mAb подверглись мутационному ускользанию вируса, утратив нейтрализующую активность с появлением сублиний варианта Омикрон. В то же время три полученных Nb сохраняют нейтрализующую активность против новых вариантов.

3.5. Картирование эпитопов

Эпитопное картирование является ключевым этапом функциональной характеристики антител, поскольку локализация сайта связывания на поверхности антигена во многом определяет молекулярный механизм нейтрализации. Кроме того, определение эпитопной специфичности необходимо для рационального дизайна терапевтических коктейлей и мультиспецифичных конструкций, прогнозирования устойчивости антител к новым вариантам вируса и объяснения наблюдаемых различий в их нейтрализующей активности.

Картирование эпитопов полученных VHH (в формате Fc-димеров) и mAb осуществляли методом конкурентного BLI-анализа. Исследуемые антитела тестировали на способность конкурировать с панелью референсных антител за связывание с RBD (Рисунок 43, А), для которых другими научными группами ранее были расшифрованы трехмерные структуры комплексов с RBD методами рентгеноструктурного анализа или крио-ЭМ.

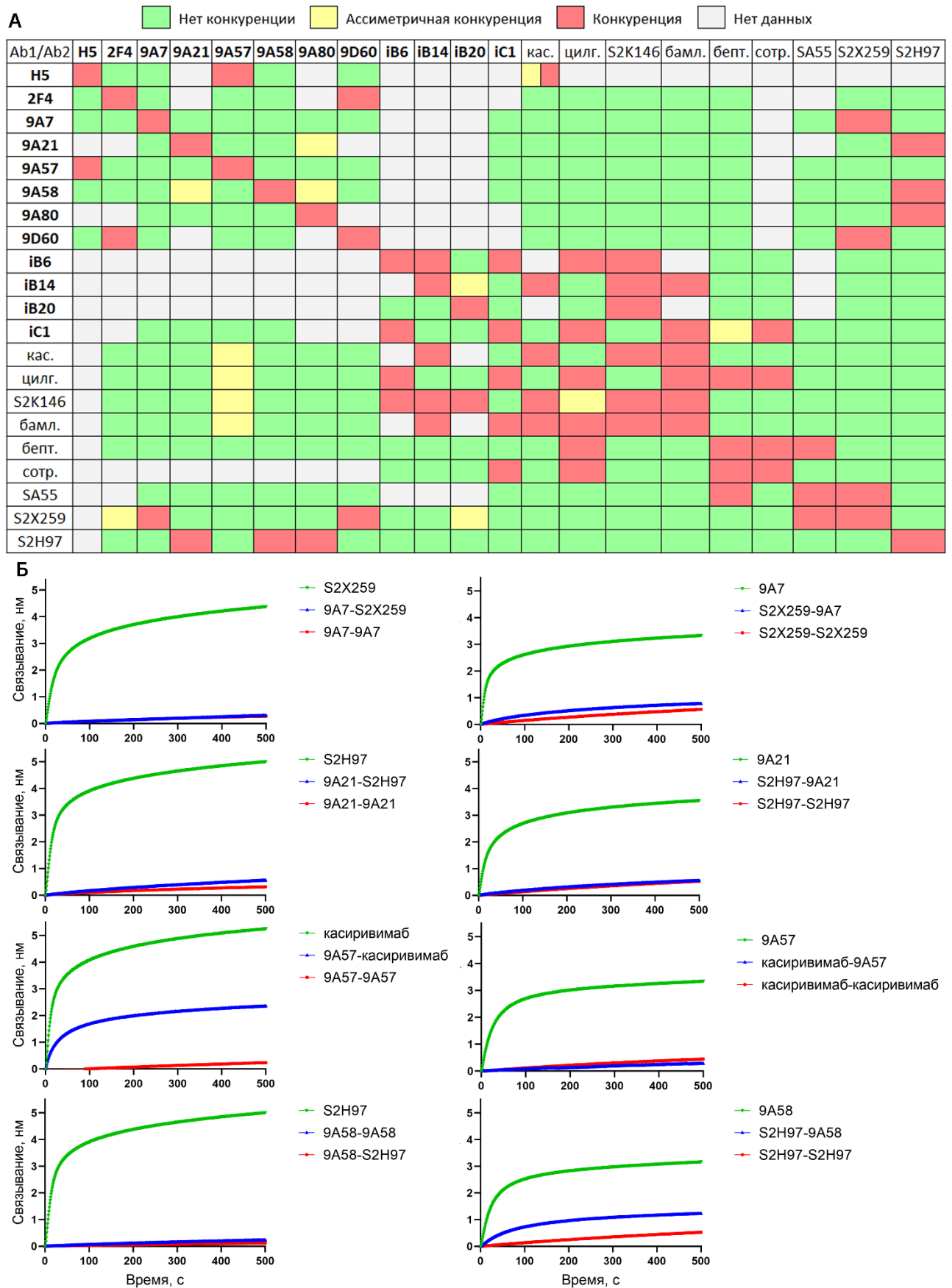


Рисунок 43. А. Матрица конкурентного BLI-анализа полученных VHH-Fc и mAb с референсными антителами. **Б.** Сенсограммы конкурентного BLI-анализа связывания 9A7-Fc и S2X259, 9A21-Fc и S2H97, 9A57-Fc и касиривимаба, 9A58-Fc и S2H97 с RBD

Данный подход позволил отнести каждое из полученных нами антител к одному из известных эпитопных кластеров и локализовать их сайты связывания относительно структурно определенных областей RBD. В качестве референсных антител были выбраны касиривимаб, цилгавимаб и S2K146 (класс 1) [191], бамланивимаб (класс 2) [151], бептеловимаб и сотровимаб (класс 3) [150, 195], SA55 (класс 1/4) [206], S2X259 (класс 4) [202] и S2H97 (класс 5) [187].

VHH 9A57 конкурирует с H5, а H5, в свою очередь, блокировало связывание касиривимаба и mAb iB14. Кроме того, касиривимаб (Рисунок 43, Б), цилгавимаб, S2K146 и бамланивимаб полностью блокировали связывание самого 9A57. Совокупность этих данных свидетельствует о принадлежности VHH H5 и 9A57 к области распознавания, характерной для антител классов 1 и 2 (кластер 2), перекрывающих интерфейс взаимодействия RBD с ACE2. К тем же классам, по всей видимости, относятся человеческие mAb iB6, iB14, iB20 и iC1. При этом для iB20 и iC1 наблюдалась кросс-конкуренция с антителами смежных классов: S2X259 (класс 4) блокировало связывание iB20, а iC1 конкурирует с сотровимабом и блокировало связывание бептеловимаба (класс 3), что может указывать на расположение их эпитопов на границе кластеров. Ни одно из выделенных нами VHH не конкурирует с сотровимабом и бептеловимабом (класс 3). Следовательно, VHH, специфичные к данной области RBD, в нашей панели отсутствуют. VHH 2F4, а также широко нейтрализующие VHH 9A7 и 9D60 конкурируют с S2X259 и, следовательно, относятся к области распознавания, характерной для антител класса 4. При этом 9A7 и 9D60 не конкурируют друг с другом. Наконец, VHH 9A21, 9A80 и широко нейтрализующее VHH 9A58 конкурируют с S2H97, что позволяет отнести их к области распознавания антителами класса 5.

Таким образом, полученные VHH и mAb iB6, iB14 и iB20 связываются с внутренней, скрытой в «down»-состоянии, поверхностью RBD, которая становится доступной только при переходе домена в «up»-положение. В то же время эпитоп iC1 частично перекрывается с эпитопами цилгавимаба и бамланивимаба, а также сотровимаба и бептеловимаба, следовательно, расположен в верхней части внешней поверхности RBD.

Для выяснения механизма нейтрализующего действия отобранных VHH был проведен конкурентный BLI-анализ их связывания с RBD в присутствии рекомбинантного рецептора ACE2 (Рисунок 44).

Показано, что VHH 9A7, 9D60 и 9A58, нацеленные на эпитопы классов 4 и 5, не блокировали взаимодействие RBD-ACE2. В то же время VHH 9A57, специфичное к области эпитопов антител классов 1 и 2, перекрывающих RBM, ожидаемо блокировало данное взаимодействие.

Полученные данные согласуются с результатами эпитопного картирования и указывают на то, что широко нейтрализующие VHH 9A7, 9A58 и 9D60 реализуют свою активность по

механизму, отличному от прямого блокирования взаимодействия RBD-ACE2. Однако определение точного механизма нейтрализации требует дальнейших структурных исследований.

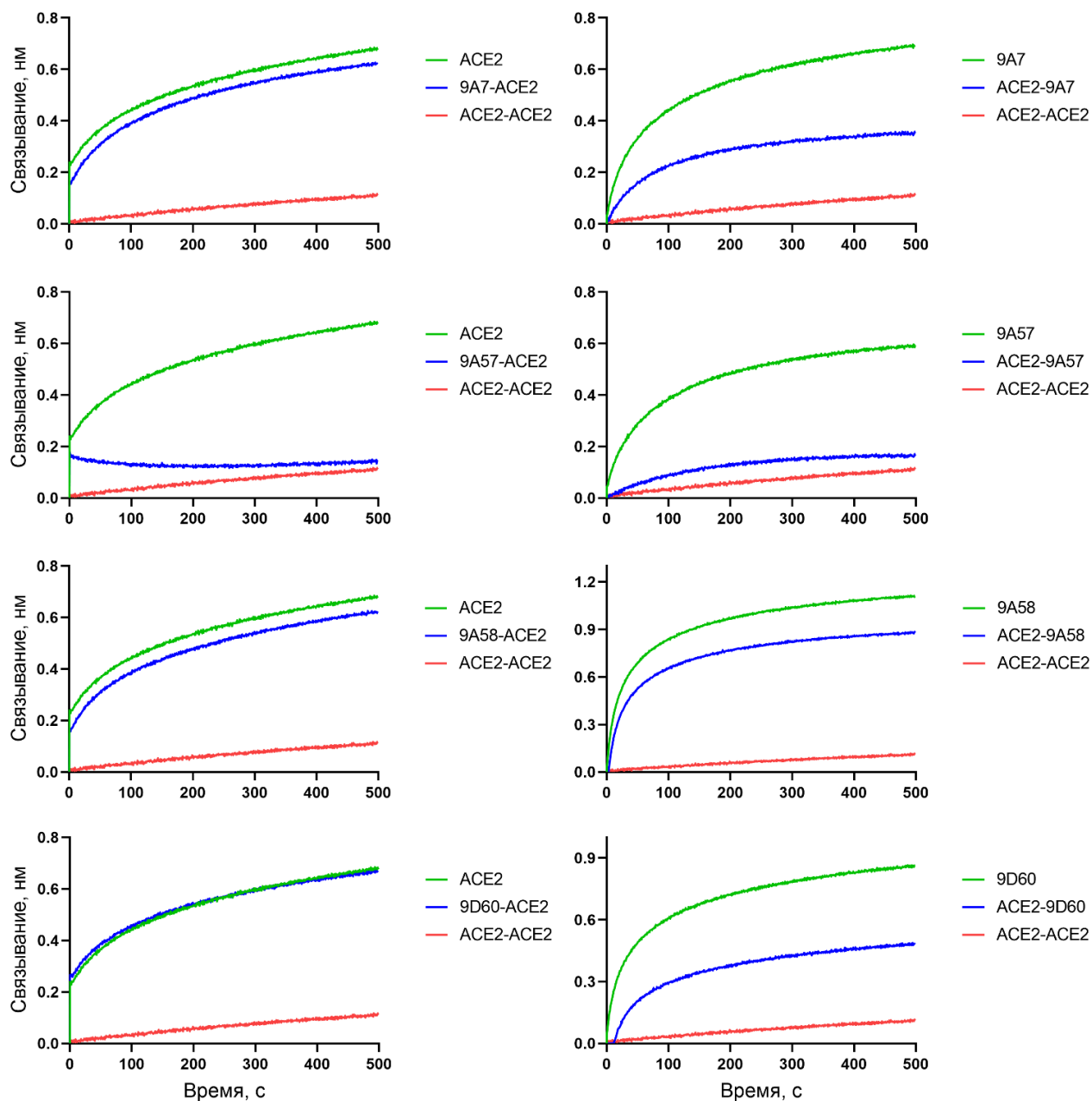


Рисунок 44. Сенсограммы конкурентного BLI-анализа связывания 9A7-Fc, 9A57-Fc, 9A58-Fc и 9D60-Fc с ACE2

Таким образом, в ходе работы были получены две иммунные библиотеки VHH, принципиально различающиеся по широте нейтрализующей активности. Показано, что последовательная иммунизация ламы эволюционно разошедшимися вариантами RBD приводит к формированию репертуара, обогащенного широко нейтрализующими клонами (9A7, 9A58, 9D60) против консервативных эпитопов, относящихся к классам 4 и 5. Эти данные формируют основу для обсуждения механизмов, определяющих широту нейтрализации, и перспектив разработанной платформы.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1. Создание библиотек и дифференциальный скрининг

Первоначальной задачей данной работы являлось получение Nb, способных нейтрализовать SARS-CoV-2. Однако быстрая эволюция вируса и распространение мутантных вариантов выявили необходимость скорректировать задачу в сторону получения Nb, нейтрализующих широкий спектр вариантов вируса, включая высокомутированные линии, ускользающие от действия большинства известных mAb.

Иммунизация ламы уханьским вариантом RBD привела к формированию репертуара (библиотека 1), из которого после двух раундов аффинной селекции было выделено 15 уникальных VHH. Среди них два Nb (H5 и G7) обладали высокой аффинностью и потентностью, однако конкурировали друг с другом за связывание с RBD, что указывает на их специфичность к одному и тому же иммунодоминантному эпитопу. Эпитопное картирование методом конкурентного BLI-анализа с панелью референсных антител подтвердило, что клоны H5 и G7 распознают область RBD, соответствующую антителам классов 1 и 2 (кластер 2), которая перекрывается с RBM. Доминирование антител данной специфичности в репертуаре согласуется с результатами независимых исследований, выполненных в начальный период пандемии [92, 301].

Эффективность терапии с использованием антител может быть повышена путем создания коктейлей и мультиспецифичных конструкций на основе антител, нацеленных на неперекрывающиеся эпитопы. Такой подход позволяет не только усилить нейтрализацию за счет avidности, но и существенно повысить барьер к мутационному ускользанию вируса, поскольку резистентность может возникнуть лишь при одновременном появлении мутаций во всех целевых эпитопах [206, 227]. Для расширения панели VHH и отбора клонов, распознающих альтернативные эпитопы RBD, была применена дополнительная стратегия аффинной селекции, в рамках которой иммунодоминантный эпитоп RBD предварительно блокировали Nb H5. Данный подход позволил выделить пять дополнительных уникальных VHH, четыре из которых не конкурируют с H5 и G7. Этот результат подтверждает, что иммунодоминантные клоны могут маскировать присутствие субдоминантных VHH в библиотеке, и их целенаправленное исключение является эффективным приемом для выявления антител к альтернативным участкам RBD [302].

Показано, что VHH-клоны, полученные из библиотеки 1 (H5, G7 и 2F4) после иммунизации ламы уханьским вариантом RBD, обладают узким спектром нейтрализующей активности. В результате анализа нейтрализации лентивирусов, псевдотипированных S-белками вариантов Ухань, Дельта, Лямбда, Каппа и BA.1 SARS-CoV-2, Nb H5 было активно против вариантов

Ухань, Дельта и Каппа, G7 — против Ухань и Каппа, 2F4 — против всех представленных вариантов кроме BA.1. Более широкий спектр активности Nb 2F4 по сравнению с RBM-специфичными H5 и G7 подтверждает данные об ускользании вируса от действия антител, направленных на иммунодоминантные эпитопы RBD, поскольку RBM является горячей точкой мутагенеза в процессе эволюции SARS-CoV-2 [301]. Таким образом, узкий спектр нейтрализации клонов библиотеки 1 является прямым следствием фокусировки иммунного ответа на вариабельных, а не на консервативных эпитопах RBD.

Стремительное распространение вариантов линии Омикрон, несущих обширный набор мутаций в ключевых антигенных детерминантах RBD, в условиях продолжающейся пандемии COVID-19 выявило острую необходимость поиска стратегий получения широко нейтрализующих антител, направленных на консервативные эпитопы и устойчивых к мутационному ускользанию. Попытка отбора клонов библиотеки 1 против варианта BA.1 не привела к достижению этой цели, что можно объяснить отсутствием в репертуаре антител широкого спектра действия после иммунизации лишь исходным уханьским вариантом RBD [303].

Отслеживая эволюцию SARS-CoV-2, мы провели серию дополнительных иммунизаций мутантными вариантами RBD, а также RBD родственного вируса SARS-CoV, что привело к созданию библиотеки 2, клоны которой демонстрировали существенно более широкий спектр нейтрализации. На первом этапе в результате трех раундов аффинной селекции клонов библиотеки 2 были отобраны шесть Nb (9A4, 9A7, 9A21, 9A57, 9A58, 9A80). Из них три клон (9A7, 9A57 и 9A58) продемонстрировали широкий спектр нейтрализующей активности и, согласно результатам конкурентного BLI-анализа, связывали неперекрывающиеся эпитопы RBD. Таким образом, длительная последовательная иммунизация в сочетании с аффинной селекцией против антигенно разошедшихся вариантов RBD SARS-CoV-2 и родственного вируса SARS-CoV позволила выявить VHH, направленные на различные консервативные эпитопы RBD.

Сообщение о выделении mAb SA55 класса 1/4 [206], обладающего одновременно высокой потентностью и широким спектром перекрестной нейтрализующей активности, побудило нас предпринять попытку отбора VHH, конкурирующих с ним за связывание с RBD. С этой целью был проведен дополнительный этап селекции библиотеки 2, включавший как блокирование эпитопа SA55 (истощение библиотеки), так и элюирование фагов молярным избытком этого антитела (вытеснение клонов). Однако ни одна из стратегий не позволила выделить клоны-конкуренты. Вероятнее всего, такие VHH либо отсутствовали в библиотеке, либо были представлены крайне редко. Нельзя также исключить, что высокие концентрации SA55 способствовали неспецифической элюции фагов, связывающих иные, неперекрывающиеся

эпитопы. Тем не менее данный подход привел к отбору трех дополнительных уникальных Nb (9D48, 9D60 и 9D66). Nb 9D60 проявило активность против актуальных вариантов SARS-CoV-2 (ХЕС, NB.1.8.1, XFG) и, по всей видимости, является широко нейтрализующим, хотя его активность в отношении более ранних вариантов и SARS-CoV на текущий момент остается непроверенной.

Следует отметить методологические ограничения данной части работы. Во-первых, размер проанализированной выборки клонов (~250 из библиотеки 1, ~200 из библиотеки 2) относительно невелик, что не исключает присутствия в библиотеках других ценных VHH, не выявленных при данном объеме скрининга. Во-вторых, мы не можем точно определить, на каком именно этапе последовательной иммунизации были индуцированы отобранные клоны библиотеки 2, что ограничивает возможность оптимизации протокола иммунизации. В-третьих, для комплексов RBD с тремя широко нейтрализующими VHH (9A7, 9A58, 9D60) пока не получены структурные данные, которые позволили бы однозначно установить молекулярный механизм нейтрализации.

Полученные результаты демонстрируют, что ключевым фактором, определяющим широту нейтрализующей активности VHH, является схема иммунизации животного-донора, а именно — использование длительной последовательной иммунизации эволюционно разошедшимися вариантами RBD. Выбранная стратегия иммунизации и многоэтапная аффинная селекция с элементами конкурентного обогащения и блокирования иммунодоминантных эпитопов, позволила получить в общей сложности 37 уникальных Nb, специфичных к RBD SARS-CoV-2. Три из них (9A7, 9A58 и 9D60) являются широко нейтрализующими.

4.2. Роль последовательной иммунизации и соматического гипермутагенеза в формировании bnAb

Филогенетический анализ выявил принципиальные различия в иммунных репертуарах, формируемых при иммунизации исходным уханьским вариантом RBD SARS-CoV-2 и длительной последовательной иммунизации разными мутантными вариантами RBD SARS-CoV-2, а также RBD SARS-CoV. Сходство BA.1-селектированных клонов библиотеки 1 с Ухань-селектированными VHH, лишенными нейтрализующей активности, прямо свидетельствует об ограниченности репертуара, индуцированного исходным уханьским вариантом RBD. Иными словами, селекция против варианта BA.1 не привела к выявлению клонов с повышенной широтой нейтрализующей активности, а лишь обеспечила обогащение библиотеки функционально неполноценными вариантами.

Отдельного рассмотрения заслуживает эволюция клона 9A7 библиотеки 2. Его сходство с VHH A8 и H7 библиотеки 1 при минимальных различиях в CDR3 (две аминокислотные замены) и одновременно значительном числе мутаций по отношению к зародышевой линии (17 замен

против двух у А8 и Н7) указывает на то, что данный клон является продуктом длительного аффинного созревания, инициированного уханьским вариантом RBD. Приобретение клоном 9А7 широкого спектра нейтрализующей активности, при том что его ближайшие гомологи из библиотеки 1 таким свойством не обладают, дает основания полагать, что ключевые мутации, обусловившие расширение специфичности, были закреплены на поздних этапах иммунизации мутантными формами RBD. Это наблюдение служит подтверждением гипотезы, согласно которой последовательная иммунизация эволюционно разошедшимися вариантами антигена способна направлять соматическое созревание клонов в сторону консервативных участков, постепенно расширяя спектр их нейтрализующей активности [304–306].

Вместе с тем было показано, что большинство клонов библиотеки 2 не имеют филогенетической связи с клонами библиотеки 1. Это свидетельствует о том, что данные VHH были индуцированы при вовлечении наивных или ранее неэффективных линий В-клеток на более поздних этапах иммунизации, вероятнее всего, в ответ на уникальные для мутантных вариантов RBD эпитопы, либо консервативные эпитопы, экспонированные при иммунизации RBD SARS-CoV. Высокая доля соматических мутаций (15–31%) указывает на то, что эти клоны также прошли через многократные раунды аффинного созревания, прежде чем достигли наблюдаемого уровня аффинности и широты активности [307, 308]. Таким образом, длительная последовательная иммунизация работает по взаимодополняющим механизмам: обеспечивает аффинное созревание преобладающих клонов, а также инициирует индукцию новых VHH, нацеленных на консервативные участки RBD. Мы полагаем, что сочетание этих двух механизмов определяет повышенную широту нейтрализующей активности репертуара библиотеки 2 по сравнению с библиотекой 1.

С практической точки зрения полученные данные обосновывают рациональный дизайн протоколов иммунизации, нацеленных на получение широко нейтрализующих антител. Высокий уровень соматического гипермутагенеза, ассоциированный с широтой нейтрализации, свидетельствует о том, что критическими параметрами являются не только разнообразие используемых антигенов, но и достаточная длительность иммунизации, обеспечивающая реализацию полного цикла аффинного созревания в зародышевых центрах. Полученные результаты согласуются с данными исследований, демонстрирующих, что для индукции bnAb против SARS-CoV-2, равно как и против других быстро эволюционирующих вирусов, необходима продолжительная антигенная стимуляция эволюционно разошедшимися вариантами поверхностных гликопротеинов [206, 303, 309].

4.3. Моноклональные антитела и Fc-димеры однодоменных антител

В рамках настоящей работы параллельно были получены Nb лампы и классические mAb человека, что предоставило уникальную возможность для их прямого сравнительного анализа по ключевым функциональным параметрам. Установлено, что димеры VHH-Fc не уступают mAb человека по аффинности, а также нейтрализующей активности *in vitro* и *in vivo*, однако полученные mAb утратили нейтрализующую активность с появлением сублиний Омикрон. Важно отметить, что iC1, выделенное от донора с гибридным иммунитетом, демонстрировало более широкий спектр нейтрализации (до JN.1) по сравнению с антителами первой панели (до BA.1–BA.5). Этот результат согласуется с многочисленными данными о том, что комбинация естественной инфекции и вакцинации способствует формированию кросс-реактивного гуморального ответа [310, 311]. В то же время три VHH из библиотеки 2 (9A7, 9A58, 9D60) сохранили активность против новых вариантов.

Продemonстрированная в настоящей работе сопоставимая эффективность VHH-Fc и человеческих IgG в сочетании с более высокой устойчивостью ряда VHH к мутационному ускользанию вируса свидетельствует о перспективности данного формата для разработки противовирусных препаратов длительного действия, сохраняющих актуальность при смене доминирующих вариантов вируса. Следует отметить, что классические mAb человека могут быть получены в более короткие сроки. Вместе с тем модульная архитектура VHH и их способность распознавать консервативные и скрытые эпитопы, недоступные для большинства полноразмерных IgG, создают предпосылки для получения антител с широким спектром нейтрализующей активности в условиях продолжающихся эпидемий, вызванных вирусами с повышенной мутационной изменчивостью.

4.4. Эпитопы и широта нейтрализации

Конкурентный BLI-анализ с использованием панели структурно охарактеризованных референсных антител позволил картировать эпитопы полученных антител на поверхности RBD, не прибегая к методам рентгеноструктурного анализа и крио-ЭМ, и установить взаимосвязь между локализацией эпитопа и шириотой нейтрализующей активности.

Антитела, специфичные к эпитопам классов 1 и 2, перекрывающимся с RBM, блокируют взаимодействие RBD с ACE2 и проявляют выраженную нейтрализующую активность, однако слабо противостоят мутационному ускользанию. К данной группе относятся VHH H5, G7 и 9A57, а также человеческие mAb iB6, iB12, iB14, iB20 и iC1. Эпитоп iC1 локализован в верхней части внешней поверхности RBD, на стыке эпитопов антител классов 2 и 3. Такая топология обеспечивает частичное перекрывание с RBM и высокую потентность, а неполная идентичность эпитопам антител классов 1 и 2 обуславливает более широкий спектр нейтрализующей

активности. Вместе с тем данное преимущество оказалось недостаточным для нейтрализации поздних вариантов вируса, что указывает на уязвимость эпитопов, даже частично ассоциированных с RBM.

Однодоменные антитела, нацеленные на консервативные участки RBD, демонстрируют иную картину. VHH 9A7 и 9D60 (класс 4), а также 9A58, 9A21 и 9A80 (класс 5) связываются с областями, которые в «down»-конформации S-белка экранированы внутри тримера и экспонируются при переходе RBD в «up»-положение. Экранированные участки RBD подвергаются меньшему селективному давлению, что определяет их эволюционную консервативность. Соответствующие последовательности сохраняются у всех вариантов SARS-CoV-2, а также у родственных сарбековирусов, включая SARS-CoV [187, 202]. Механизм нейтрализации антител данных классов не ограничивается прямой конкуренцией с ACE2. Связывание со скрытыми эпитопами может приводить к фиксации RBD в «up»-конформации и блокаде конформационных переходов, необходимых для слияния вирусной и клеточной мембран, либо к дестабилизации префузионного состояния тримера S-белка [312]. Для установления точного механизма необходимы структурные данные (рентгеноструктурный анализ или крио-ЭМ комплекса VHH–RBD). Также альтернативным или дополняющим методом могла бы стать микроскопия LLSM (lattice light sheet microscopy, микроскопия светового листа с дискретным освещением), позволяющая напрямую наблюдать конформационные изменения S-белка при связывании с VHH в режиме реального времени [196].

В пределах класса 4 идентифицированы по меньшей мере два независимых эпитопа. VHH 9A7 и 9D60, каждое из которых конкурирует с S2X259, не конкурируют друг с другом. Таким образом, VHH 9A7, 9D60 и 9A58 могут быть одновременно использованы в составе мультиспецифичных конструкций. Наличие нескольких неперекрывающихся участков связывания в пределах одного консервативного региона RBD позволяет конструировать коктейли и мультиспецифичные молекулы, направленные на одну функционально значимую область через различные, взаимно не исключаящие контакты, что повышает барьер к мутационному ускользанию.

Выделенные VHH не конкурируют с антителами класса 3, эпитопы которых расположены на внешней поверхности RBD, доступной как в «up»-, так и в «down»-конформации. Отсутствие VHH класса 3 в полученной панели может объясняться особенностями стратегий селекции, оптимизированных для обогащения библиотек клонами, специфичными к консервативным участкам и блокирующими взаимодействие RBD с ACE2.

Таким образом, высокая потентность человеческих mAb и VHH библиотеки 1 при узком спектре нейтрализации является следствием их направленности против иммунодоминантного, но

высоковариабельного RBM. Широта нейтрализации VHH библиотеки 2 (9A7, 9A58, 9D60) обусловлена их специфичностью к консервативным, структурно-экранированным эпитопам классов 4 и 5, мутации в которых ограничены функциональными требованиями к сохранению нативной конформации S-белка. Идентификация нескольких неконкурирующих VHH в пределах консервативных участков RBD создает основу для конструирования мультиспецифичных терапевтических молекул, одновременно воздействующих на различные эпитопы функционально критичной области, что делает ускользание вируса маловероятным без потери им жизнеспособности.

4.5. Заключение

В ходе настоящего исследования была разработана и экспериментально валидирована комплексная платформа получения VHH широкого спектра действия. Она объединяет длительную последовательную иммунизацию ламы эволюционно разошедшимися вариантами RBD SARS-CoV-2 и RBD родственного вируса SARS-CoV, многоэтапную аффинную селекцию с элементами конкурентного обогащения и блокирования иммунодоминантных эпитопов, а также картирование методом конкурентного BLI-анализа с использованием панели структурно охарактеризованных референсных антител. Применение этой платформы позволило получить три широко нейтрализующих VHH — 9A7, 9A58 и 9D60, сохраняющих активность против актуальных вариантов SARS-CoV-2.

Полученная панель VHH, перекрывающая несколько независимых эпитопов RBD, создает основу для конструирования мультиспецифичных терапевтических молекул нового поколения. Такие форматы потенциально способны обеспечить высокий барьер к мутационному ускользанию и расширить спектр нейтрализации. Дальнейшие перспективы развития платформы включают структурную характеристику широко нейтрализующих клонов, а также адаптацию разработанной стратегии к другим быстро эволюционирующим патогенам.

ВЫВОДЫ

1. Показано, что иммунизация ламы исходным уханьским вариантом RBD S-белка SARS-CoV-2 приводит к генерации высокопотентных VHH, однако формируемый репертуар преимущественно направлен против иммунодоминантных областей RBD и не проявляет нейтрализующую активность в отношении мутантных вариантов вируса.
2. Последовательная иммунизация ламы разными вариантами RBD SARS-CoV-2, а также RBD родственного вируса SARS-CoV обогащает иммунный ответ антителами против консервативных эпитопов, обладающих средней потентностью, но широким спектром действия.
3. С использованием стратегий дифференциального скрининга двух фаговых библиотек VHH выявлены в общей сложности девять нейтрализующих VHH, распознающих четыре независимых области RBD.
4. Полученные широко нейтрализующие антитела отличаются высоким уровнем соматического мутагенеза. Их образование сопряжено как с аффинным созреванием предсуществующих клонов, так и с индукцией новых или не обнаруженных при селекции против уханьского варианта клонов VHH.
5. SARS-CoV-2-нейтрализующие VHH, димеризованные с помощью Fc-фрагмента IgG1 человека, проявляют сопоставимые или превосходящие характеристики по аффинности, нейтрализующей активности и терапевтическим свойствам в сравнении с mAb человека.
6. Однодоменные антитела 9A7, 9A58 и 9D60 распознают эпитопы RBD, сохраняющиеся у всего спектра доминантных вариантов SARS-CoV-2, а также у родственного сарбековируса SARS-CoV. Эти VHH могут быть использованы в качестве элементов мультифункциональных антител нового поколения, устойчивых к мутационному ускользанию SARS-CoV-2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ACE	— angiotensin converting enzyme, ангиотензинпревращающий фермент
ADCC	— antibody-dependent cellular cytotoxicity, антителозависимая клеточная цитотоксичность
ADCP	— antibody-dependent cellular phagocytosis, антителозависимый клеточный фагоцитоз
ADE	— antibody-dependent enhancement, антителозависимое усиление инфекции
BCR	— B-cell receptor, В-клеточный рецептор
BLI	— biolayer interferometry, биослойная интерферометрия
bnAb	— broadly neutralizing antibody, широко нейтрализующее антитело
CD	— connector domain, соединительный домен
CDC	— complement-dependent cytotoxicity, комплементзависимая цитотоксичность
CDR	— complementary determining region; участки, определяющие комплементарность
CH	— central helix, центральная спираль
CH(1–3)	— constant domain of heavy chain, константный домен тяжелой цепи
COVID-19	— coronavirus disease 2019, коронавирусная инфекция 2019 года
CT	— cytoplasmic tail, цитоплазматический хвост
CTD	— C-terminal domain, С-концевой домен
CTL	— cytotoxic T lymphocytes, цитотоксические Т-лимфоциты
EUA	— Emergency Use Authorization, разрешение на экстренное применение
Fab	— fragment antigen binding, антигенсвязывающий фрагмент
FACS	— fluorescence-activated cell sorting, проточная цитофлуориметрия
Fc	— fragment crystallizable, кристаллизуемый фрагмент
FDA	— Food and Drug Administration, Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США
FP	— fusion peptide, пептид слияния
Fr	— framework region, каркасная область
Fv	— fragment variable, вариабельный фрагмент
HC	— heavy chain, тяжелая цепь
HCAb	— heavy-chain only antibody; антитело, состоящее только из тяжелых цепей
hIgG	— human immunoglobulin G, иммуноглобулин G человека
HR	— heptad repeat, гептадный повтор

IC ₅₀	— half-maximal inhibitory concentration; концентрация полумаксимального ингибирования; концентрация антитела, при которой наблюдается 50% нейтрализация вируса
IC ₉₀	— 90% inhibitory concentration; концентрация 90% ингибирования; концентрация антитела, при которой наблюдается 90% нейтрализация вируса
Ig	— immunoglobulin, иммуноглобулин
IL	— interleukin, интерлейкин
IRF	— interferon regulatory factor, интерферон-регуляторный фактор
LC	— light chain, легкая цепь
mAb	— monoclonal antibody, моноклональное антитело
MACS	— magnetic-activated cell sorting, магнитно-активируемая сортировка клеток
MCP	— monocyte chemoattractant protein, моноцитарный хемоаттрактантный белок
MERS-CoV	— middle east respiratory syndrome-related coronavirus; коронавирус, вызывающий ближневосточный респираторный синдром
MIP	— macrophage inflammatory protein, макрофагальный воспалительный белок
nAb	— neutralizing antibody, нейтрализующее антитело
Nb	— nanobody, наноантитело
NGS	— next-generation sequencing; высокопроизводительное секвенирование, секвенирование нового поколения
NK	— natural killer, естественные киллеры
NSP	— non-structural protein, неструктурный белок
NTD	— N-terminal domain, N-концевой домен
ORF	— open reading frame, открытая рамка считывания
PAMP	— pathogen-associated molecular patterns, патоген-ассоциированные молекулярные паттерны
PBL	— peripheral blood lymphocytes, лимфоциты периферической крови
PBMC	— peripheral blood mononuclear cells, мононуклеарные клетки периферической крови
PRR	— pattern recognition receptors, рецепторы распознавания паттернов
RBD	— receptor-binding domain, рецептор-связывающий домен
RBM	— receptor-binding motif, рецептор-связывающий мотив
RSV	— respiratory syncytial virus, респираторно-синцитиальный вирус

SARS-CoV	— severe acute respiratory syndrome-related coronavirus; коронавирус, вызывающий тяжелый острый респираторный синдром
scFv	— single-chain variable fragment, одноцепочечный вариабельный фрагмент
sdAb	— single-domain antibody, однодоменное антитело
SDS-PAGE	— sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия
SH	— stem helix, стеблевая спираль
SPR	— surface plasmon resonance, поверхностный плазмонный резонанс
TF	— transcription factors, транскрипционные факторы
Tfh	— T follicular helper cells, фолликулярные Т-хелперы
Th	— T helper cells, Т-хелперы
TLR	— toll-like receptors, толл-подобные рецепторы
TM	— transmembrane domain, трансмембранный домен
TNF	— tumor necrosis factor, фактор некроза опухоли
VH	— variable domain of heavy chain, вариабельный домен тяжелой цепи
VHH	— variable domain of heavy-chain only antibody; вариабельный домен антитела, состоящего только из тяжелых цепей
VL	— variable domain of light chain, вариабельный домен легкой цепи
VNAR	— variable new antigen receptor, вариабельный домен нового антигенного рецептора
АО	— аминокислотный остаток
АПК	— антигенпрезентирующие клетки
БОЕ	— бляшко-образующая единица
ВИЧ	— вирус иммунодефицита человека
ДНК	— дезоксирибонуклеиновая кислота
ИФА	— иммуноферментный анализ
крио-ЭМ	— криоэлектронная микроскопия
мРНК	— матричная рибонуклеиновая кислота
ОТ-ПЦР	— обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией
ОТ-ПЦР-РВ	— обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией в реальном времени
п.н.	— пара нуклеотидов
РНК	— рибонуклеиновая кислота
т.п.н.	— тысяча пар нуклеотидов

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cui, J. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses / J. Cui, F. Li, Z.-L. Shi // *Nature Reviews Microbiology*. — 2019. — Vol. 17. — № 3. — P. 181-192. DOI: 10.1038/s41579-018-0118-9.
2. Львов, Д. К. Истоки пандемии COVID-19: экология и генетика корона-вирусов (Betacoronavirus: Coronaviridae) SARS-CoV, SARS-CoV-2 (подрод Sarbecovirus), MERS-CoV (подрод Merbecovirus) / Д. К. Львов, С. В. Альховский // *Вопросы вирусологии*. — 2020. — Т. 65. — № 2. — С. 62-70. DOI: 10.36233/0507-4088-2020-65-2-62-70.
3. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China / F. Wu, S. Zhao, B. Yu [et al.] // *Nature*. — 2020. — Vol. 579. — № 7798. — P. 265-269. DOI: 10.1038/s41586-020-2008-3.
4. A SARS-CoV-2 protein interaction map reveals targets for drug repurposing / D. E. Gordon, G. M. Jang, M. Bouhaddou [et al.] // *Nature*. — 2020. — Vol. 583. — № 7816. — P. 459-468. DOI: 10.1038/s41586-020-2286-9.
5. Structural basis of ribosomal frameshifting during translation of the SARS-CoV-2 RNA genome / P. R. Bhatt, A. Scaiola, G. Loughran [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. — 2021. — Vol. 372. — № 6548. — P. 1306-1313. DOI: 10.1126/science.abf3546.
6. Genomic characterization of the 2019 novel human-pathogenic coronavirus isolated from a patient with atypical pneumonia after visiting Wuhan / J. F.-W. Chan, K.-H. Kok, Z. Zhu [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. — Vol. 9. — № 1. — P. 221-236. DOI: 10.1080/22221751.2020.1719902.
7. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor / J. Lan, J. Ge, J. Yu [et al.] // *Nature*. — 2020. — Vol. 581. — № 7807. — P. 215-220. DOI: 10.1038/s41586-020-2180-5.
8. Marian, A. J. The discovery of the ACE2 gene / A. J. Marian // *Circulation Research*. — 2013. — Vol. 112. — № 10. — P. 1307-1309. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301271.
9. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis / I. Hamming, W. Timens, M. L. C. Bulthuis [et al.] // *The Journal of Pathology*. — 2004. — Vol. 203. — № 2. — P. 631-637. DOI: 10.1002/path.1570.
10. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9 / M. Donoghue, F. Hsieh, E. Baronas [et al.] // *Circulation Research*. — 2000. — Vol. 87. — № 5. — P. E1-9. DOI: 10.1161/01.res.87.5.e1.

11. Molecular basis of binding between novel human coronavirus MERS-CoV and its receptor CD26 / G. Lu, Y. Hu, Q. Wang [et al.] // *Nature*. — 2013. — Vol. 500. — № 7461. — P. 227-231. DOI: 10.1038/nature12328.
12. Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E / C. L. Yeager, R. A. Ashmun, R. K. Williams [et al.] // *Nature*. — 1992. — Vol. 357. — № 6377. — P. 420-422. DOI: 10.1038/357420a0.
13. Receptor and viral determinants of SARS-coronavirus adaptation to human ACE2 / W. Li, C. Zhang, J. Sui [et al.] // *The EMBO journal*. — 2005. — Vol. 24. — № 8. — P. 1634-1643. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600640.
14. A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus-induced lung injury / K. Kuba, Y. Imai, S. Rao [et al.] // *Nature Medicine*. — 2005. — Vol. 11. — № 8. — P. 875-879. DOI: 10.1038/nm1267.
15. Chen, B. SARS-CoV-2 spike protein: structure, viral entry and variants / B. Chen, M. Farzan, H. Choe // *Nature Reviews Microbiology*. — 2025. — Vol. 23. — № 7. — P. 455-468. DOI: 10.1038/s41579-025-01185-8.
16. A SARS-CoV-2 Spike Receptor Binding Motif Peptide Induces Anti-Spike Antibodies in Mice and Is Recognized by COVID-19 Patients / F. Pratesi, F. Errante, L. Pacini [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2022. — Vol. 13. — Art. 879946. DOI: 10.3389/fimmu.2022.879946.
17. The inherent flexibility of receptor binding domains in SARS-CoV-2 spike protein / H. M. Dokainish, S. Re, T. Mori [et al.] // *eLife*. — 2022. — Vol. 11. — Art. e75720. DOI: 10.7554/eLife.75720.
18. A glycan gate controls opening of the SARS-CoV-2 spike protein / T. Sztain, S.-H. Ahn, A. T. Bogetti [et al.] // *Nature Chemistry*. — 2021. — Vol. 13. — № 10. — P. 963-968. DOI: 10.1038/s41557-021-00758-3.
19. SARS-CoV-2 spike opening dynamics and energetics reveal the individual roles of glycans and their collective impact / Y. T. Pang, A. Acharya, D. L. Lynch [et al.] // *Communications Biology*. — 2022. — Vol. 5. — № 1. — P. 1170. DOI: 10.1038/s42003-022-04138-6.
20. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2 / Q. Wang, Y. Zhang, L. Wu [et al.] // *Cell*. — 2020. — Vol. 181. — № 4. — P. 894-904.e9. DOI: 10.1016/j.cell.2020.03.045.
21. Distinct conformational states of SARS-CoV-2 spike protein / Y. Cai, J. Zhang, T. Xiao [et al.] // *Science*. — 2020. — Vol. 369. — № 6511. — P. 1586-1592. DOI: 10.1126/science.abd4251.
22. Omicron SARS-CoV-2 mutations stabilize spike up-RBD conformation and lead to a non-RBM-binding monoclonal antibody escape / Z. Zhao, J. Zhou, M. Tian [et al.] // *Nature*

- Communications. — 2022. — Vol. 13. — № 1. — Art. 4958. DOI: 10.1038/s41467-022-32665-7.
23. Structural dynamics in the evolution of SARS-CoV-2 spike glycoprotein / V. Calvaresi, A. G. Wrobel, J. Toporowska [et al.] // *Nature Communications*. — 2023. — Vol. 14. — № 1. — Art. 1421. DOI: 10.1038/s41467-023-36745-0.
 24. Free fatty acid binding pocket in the locked structure of SARS-CoV-2 spike protein / C. Toelzer, K. Gupta, S. K. N. Yadav [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. — 2020. — Vol. 370. — № 6517. — P. 725-730. DOI: 10.1126/science.abd3255.
 25. A comparative analysis of remdesivir and other repurposed antivirals against SARS-CoV-2 / A. Simonis, S. J. Theobald, G. Fätkenheuer [et al.] // *EMBO Molecular Medicine*. — 2021. — Vol. 13. — № 1. — Art. e13105. DOI: 10.15252/emmm.202013105.
 26. SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development / N. Murgolo, A. G. Therien, B. Howell [et al.] // *PLoS Pathogens*. — 2021. — Vol. 17. — № 2. — Art. e1009225. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009225.
 27. Millet, J. K. Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells / J. K. Millet, G. R. Whittaker // *Virology*. — 2018. — Vol. 517. — P. 3-8. DOI: 10.1016/j.virol.2017.12.015.
 28. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells / C. B. Jackson, M. Farzan, B. Chen, H. Choe // *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. — 2022. — Vol. 23. — № 1. — P. 3-20. DOI: 10.1038/s41580-021-00418-x.
 29. Rokni, M. Immune responses and pathogenesis of SARS-CoV-2 during an outbreak in Iran: Comparison with SARS and MERS / M. Rokni, V. Ghasemi, Z. Tavakoli // *Reviews in Medical Virology*. — 2020. — Vol. 30. — № 3. — Art. e2107. DOI: 10.1002/rmv.2107.
 30. Immunology, immunopathogenesis and immunotherapeutics of COVID-19; an overview / L. Mohamed Khosroshahi, M. Rokni, T. Mokhtari, F. Noorbakhsh // *International Immunopharmacology*. — 2021. — Vol. 93. — Art. 107364. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.107364.
 31. Prompetchara, E. Immune responses in COVID-19 and potential vaccines: Lessons learned from SARS and MERS epidemic / E. Prompetchara, C. Ketloy, T. Palaga // *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. — 2020. — Vol. 38. — № 1. — P. 1-9. DOI: 10.12932/AP-200220-0772.
 32. An Updated Understanding of the Current Emerging Respiratory Infection: COVID-19 / H. Yuan, X. Cao, X. Ji [et al.] // *BioMed Research International*. — 2020. — Vol. 2020. — Art. 6870512. DOI: 10.1155/2020/6870512.

33. A tug-of-war between severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 and host antiviral defence: lessons from other pathogenic viruses / S.-Y. Fung, K.-S. Yuen, Z.-W. Ye [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. — Vol. 9. — № 1. — P. 558-570. DOI: 10.1080/22221751.2020.1736644.
34. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps / B. J. Barnes, J. M. Adrover, A. Baxter-Stoltzfus [et al.] // *The Journal of Experimental Medicine*. — 2020. — Vol. 217. — № 6. — Art. e20200652. DOI: 10.1084/jem.20200652.
35. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study / N. Chen, M. Zhou, X. Dong [et al.] // *Lancet* (London, England). — 2020. — Vol. 395. — № 10223. — P. 507-513. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30211-7.
36. Neutrophil-to-lymphocyte ratio as an independent risk factor for mortality in hospitalized patients with COVID-19 / Y. Liu, X. Du, J. Chen [et al.] // *The Journal of Infection*. — 2020. — Vol. 81. — № 1. — P. e6-e12. DOI: 10.1016/j.jinf.2020.04.002.
37. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China / C. Huang, Y. Wang, X. Li [et al.] // *Lancet* (London, England). — 2020. — Vol. 395. — № 10223. — P. 497-506. DOI: 10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
38. MERS-CoV infection in humans is associated with a pro-inflammatory Th1 and Th17 cytokine profile / W. H. Mahallawi, O. F. Khabour, Q. Zhang [et al.] // *Cytokine*. — 2018. — Vol. 104. — P. 8-13. DOI: 10.1016/j.cyto.2018.01.025.
39. Plasma inflammatory cytokines and chemokines in severe acute respiratory syndrome / C. K. WONG, C. W. K. LAM, A. K. L. WU [et al.] // *Clinical and Experimental Immunology*. — 2004. — Vol. 136. — № 1. — P. 95-103. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2004.02415.x.
40. Complex Immune Dysregulation in COVID-19 Patients with Severe Respiratory Failure / E. J. Giamarellos-Bourboulis, M. G. Netea, N. Rovina [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2020. — Vol. 27. — № 6. — P. 992-1000.e3. DOI: 10.1016/j.chom.2020.04.009.
41. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China / C. Qin, L. Zhou, Z. Hu [et al.] // *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. — 2020. — Art. ciae248. DOI: 10.1093/cid/ciae248.
42. Hyperinflammatory Response in COVID-19: A Systematic Review / M. J. A. Silva, L. R. Ribeiro, M. I. M. Gouveia [et al.] // *Viruses*. — 2023. — Vol. 15. — Hyperinflammatory Response in COVID-19. — № 2. — Art. 553. DOI: 10.3390/v15020553.
43. Garcia, K. C. Dual Arms of Adaptive Immunity: Division of Labor and Collaboration between B and T Cells / K. C. Garcia // *Cell*. — 2019. — Vol. 179. — № 1. — P. 3-7. DOI: 10.1016/j.cell.2019.08.022.

44. Coronavirus infections and immune responses / G. Li, Y. Fan, Y. Lai [et al.] // *Journal of Medical Virology*. — 2020. — Vol. 92. — № 4. — P. 424-432. DOI: 10.1002/jmv.25685.
45. T-cell immunity of SARS-CoV: Implications for vaccine development against MERS-CoV / W. J. Liu, M. Zhao, K. Liu [et al.] // *Antiviral Research*. — 2017. — Vol. 137. — P. 82-92. DOI: 10.1016/j.antiviral.2016.11.006.
46. Rokni, M. Cytokines and COVID-19: friends or foes? / M. Rokni, M. R. Hamblin, N. Rezaei // *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. — Vol. 16. — № 10. — P. 2363-2365. DOI: 10.1080/21645515.2020.1799669.
47. Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death / W. J. Grossman, J. W. Verbsky, W. Barchet [et al.] // *Immunity*. — 2004. — Vol. 21. — № 4. — P. 589-601. DOI: 10.1016/j.immuni.2004.09.002.
48. A longitudinal study of SARS-CoV-2-infected patients reveals a high correlation between neutralizing antibodies and COVID-19 severity / V. Legros, S. Denolly, M. Vogrig [et al.] // *Cellular & Molecular Immunology*. — 2021. — Vol. 18. — № 2. — P. 318-327. DOI: 10.1038/s41423-020-00588-2.
49. Anti-SARS-CoV IgG response in relation to disease severity of severe acute respiratory syndrome / N. Lee, P. K. S. Chan, M. Ip [et al.] // *Journal of Clinical Virology*. — 2006. — Vol. 35. — № 2. — P. 179-184. DOI: 10.1016/j.jcv.2005.07.005.
50. Antibody-mediated neutralization of SARS-CoV-2 / H. Gruell, K. Vanshylla, T. Weber [et al.] // *Immunity*. — 2022. — Vol. 55. — № 6. — P. 925-944. DOI: 10.1016/j.immuni.2022.05.005.
51. Imkeller, K. Assessing human B cell repertoire diversity and convergence / K. Imkeller, H. Wardemann // *Immunological Reviews*. — 2018. — Vol. 284. — № 1. — P. 51-66. DOI: 10.1111/imr.12670.
52. Akkaya, M. B cell memory: building two walls of protection against pathogens / M. Akkaya, K. Kwak, S. K. Pierce // *Nature Reviews. Immunology*. — 2020. — Vol. 20. — B cell memory. — № 4. — P. 229-238. DOI: 10.1038/s41577-019-0244-2.
53. Victora, G. D. Germinal Centers / G. D. Victora, M. C. Nussenzweig // *Annual Review of Immunology*. — 2022. — Vol. 40. — P. 413-442. DOI: 10.1146/annurev-immunol-120419-022408.
54. Röltgen, K. Antibody and B cell responses to SARS-CoV-2 infection and vaccination / K. Röltgen, S. D. Boyd // *Cell Host & Microbe*. — 2021. — Vol. 29. — № 7. — P. 1063-1075. DOI: 10.1016/j.chom.2021.06.009.
55. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: A Detailed Protocol for a Serological Assay, Antigen Production, and Test Setup / D. Stadlbauer, F. Amanat, V. Chromikova [et al.] // *Current Protocols in Microbiology*. — 2020. — Vol. 57. — № 1. — Art. e100. DOI: 10.1002/cpmc.100.

56. Human neutralizing antibodies elicited by SARS-CoV-2 infection / B. Ju, Q. Zhang, J. Ge [et al.] // *Nature*. — 2020. — Vol. 584. — № 7819. — P. 115-119. DOI: 10.1038/s41586-020-2380-z.
57. Immune cell profiling of COVID-19 patients in the recovery stage by single-cell sequencing / W. Wen, W. Su, H. Tang [et al.] // *Cell Discovery*. — 2020. — Vol. 6. — P. 31. DOI: 10.1038/s41421-020-0168-9.
58. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2–Specific Antibody Responses in Coronavirus Disease Patients / N. M. A. Okba, M. A. Müller, W. Li [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. — 2020. — Vol. 26. — № 7. — P. 1478-1488. DOI: 10.3201/eid2607.200841.
59. Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019 / R. Wölfel, V. M. Corman, W. Guggemos [et al.] // *Nature*. — 2020. — Vol. 581. — № 7809. — P. 465-469. DOI: 10.1038/s41586-020-2196-x.
60. Antibody Responses to SARS-CoV-2 in Patients With Novel Coronavirus Disease 2019 / J. Zhao, Q. Yuan, H. Wang [et al.] // *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. — 2020. — Vol. 71. — № 16. — P. 2027-2034. DOI: 10.1093/cid/ciaa344.
61. Yang, O. O. The immunopathogenesis of SARS-CoV-2 infection: Overview of lessons learned in the first 5 years / O. O. Yang // *The Journal of Immunology*. — 2025. — Vol. 214. — № 6. — P. 1095-1104. DOI: 10.1093/jimmun/vkaf033.
62. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19 / C. Lucas, P. Wong, J. Klein [et al.] // *Nature*. — 2020. — Vol. 584. — № 7821. — P. 463-469. DOI: 10.1038/s41586-020-2588-y.
63. Delayed specific IgM antibody responses observed among COVID-19 patients with severe progression / L. Shen, C. Wang, J. Zhao [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. — 2020. — Vol. 9. — № 1. — P. 1096-1101. DOI: 10.1080/22221751.2020.1766382.
64. Delayed neutralizing antibody response in the acute phase correlates with severe progression of COVID-19 / H. Kawasuji, Y. Morinaga, H. Tani [et al.] // *Scientific Reports*. — 2021. — Vol. 11. — № 1. — Art. 16535. DOI: 10.1038/s41598-021-96143-8.
65. Tracking Changes in SARS-CoV-2 Spike: Evidence that D614G Increases Infectivity of the COVID-19 Virus / B. Korber, W. M. Fischer, S. Gnanakaran [et al.] // *Cell*. — 2020. — Vol. 182. — № 4. — P. 812-827.e19. DOI: 10.1016/j.cell.2020.06.043.
66. Spike mutation D614G alters SARS-CoV-2 fitness / J. A. Plante, Y. Liu, J. Liu [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 592. — № 7852. — P. 116-121. DOI: 10.1038/s41586-020-2895-3.
67. Evolution of the SARS-CoV-2 spike protein in the human host / A. G. Wrobel, D. J. Benton, C. Roustan [et al.] // *Nature Communications*. — 2022. — Vol. 13. — № 1. — Art. 1178. DOI: 10.1038/s41467-022-28768-w.

68. SARS-CoV-2 Omicron-B.1.1.529 leads to widespread escape from neutralizing antibody responses / W. Dejnirattisai, J. Huo, D. Zhou [et al.] // *Cell*. — 2022. — Vol. 185. — № 3. — P. 467-484.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2021.12.046.
69. GISAID's Role in Pandemic Response / S. Khare, C. Gurry, L. Freitas [et al.] // *China CDC Weekly*. — 2021. — Vol. 3. — № 49. — P. 1049-1051. DOI: 10.46234/ccdcw2021.255.
70. Omicron escapes the majority of existing SARS-CoV-2 neutralizing antibodies / Y. Cao, J. Wang, F. Jian [et al.] // *Nature*. — 2022. — Vol. 602. — № 7898. — P. 657-663. DOI: 10.1038/s41586-021-04385-3.
71. Yuan, M. Structural Immunology of SARS-CoV-2 / M. Yuan, I. A. Wilson // *Immunological Reviews*. — 2025. — Vol. 329. — № 1. — Art. e13431. DOI: 10.1111/imr.13431.
72. SARS-CoV-2 Omicron XBB lineage spike structures, conformations, antigenicity, and receptor recognition / Q. E. Zhang, J. Lindenberger, R. J. Parsons [et al.] // *Molecular cell*. — 2024. — Vol. 84. — № 14. — P. 2747-2764.e7. DOI: 10.1016/j.molcel.2024.06.028.
73. N501Y mutation of spike protein in SARS-CoV-2 strengthens its binding to receptor ACE2 / F. Tian, B. Tong, L. Sun [et al.] // *eLife*. — Vol. 10. — Art. e69091. DOI: 10.7554/eLife.69091.
74. Imprinted SARS-CoV-2 humoral immunity induces convergent Omicron RBD evolution / Y. Cao, F. Jian, J. Wang [et al.] // *Nature*. — 2023. — Vol. 614. — № 7948. — P. 521-529. DOI: 10.1038/s41586-022-05644-7.
75. Enhanced transmissibility, infectivity, and immune resistance of the SARS-CoV-2 omicron XBB.1.5 variant / K. Uriu, J. Ito, J. Zahradnik [et al.] // *The Lancet. Infectious Diseases*. — 2023. — Vol. 23. — № 3. — P. 280-281. DOI: 10.1016/S1473-3099(23)00051-8.
76. Katoh, K. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7: Improvements in Performance and Usability / K. Katoh, D. M. Standley // *Molecular Biology and Evolution*. — 2013. — Vol. 30. — MAFFT Multiple Sequence Alignment Software Version 7. — № 4. — P. 772-780. DOI: 10.1093/molbev/mst010.
77. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. / P. Gouet, E. Courcelle, D. I. Stuart, F. M. V. ©toz // *Bioinformatics*. — 1999. — Vol. 15. — № 4. — P. 305-308. DOI: 10.1093/bioinformatics/15.4.305.
78. Structural and functional ramifications of antigenic drift in recent SARS-CoV-2 variants / M. Yuan, D. Huang, C.-C. D. Lee [et al.] // *Science*. — 2021. — Art. eabh1139. DOI: 10.1126/science.abh1139.
79. Shifting mutational constraints in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain during viral evolution / T. N. Starr, A. J. Greaney, W. W. Hannon [et al.] // *Science*. — Vol. 377. — № 6604. — P. 420-424. DOI: 10.1126/science.abo7896.

80. Structural and molecular basis of the epistasis effect in enhanced affinity between SARS-CoV-2 KP.3 and ACE2 / L. Feng, Z. Sun, Y. Zhang [et al.] // *Cell Discovery*. — 2024. — Vol. 10. — № 2. — Art. 123. DOI: 10.1038/s41421-024-00752-2.
81. Protective mechanisms of nonneutralizing antiviral antibodies / T. L. Chandler, A. Yang, C. E. Otero [et al.] // *PLOS Pathogens*. — 2023. — Vol. 19. — № 10. — Art. e1011670. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011670.
82. Evidence for antibody as a protective correlate for COVID-19 vaccines / K. A. Earle, D. M. Ambrosino, A. Fiore-Gartland [et al.] // *Vaccine*. — 2021. — Vol. 39. — № 32. — P. 4423-4428. DOI: 10.1016/j.vaccine.2021.05.063.
83. García, L. F. Immune Response, Inflammation, and the Clinical Spectrum of COVID-19 / L. F. García // *Frontiers in Immunology*. — 2020. — Vol. 11. — Art. 1441. DOI: 10.3389/fimmu.2020.01441.
84. The spike protein of SARS-CoV — a target for vaccine and therapeutic development / L. Du, Y. He, Y. Zhou [et al.] // *Nature Reviews. Microbiology*. — 2009. — Vol. 7. — № 3. — P. 226-236. DOI: 10.1038/nrmicro2090.
85. Jost, S. Control of Human Viral Infections by Natural Killer Cells / S. Jost, M. Altfeld // *Annual Review of Immunology*. — 2013. — Vol. 31. — P. 163-194. DOI: 10.1146/annurev-immunol-032712-100001.
86. Human neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 require intact Fc effector functions for optimal therapeutic protection / E. S. Winkler, P. Gilchuk, J. Yu [et al.] // *Cell*. — 2021. — Vol. 184. — № 7. — P. 1804-1820.e16. DOI: 10.1016/j.cell.2021.02.026.
87. Antibody-dependent enhancement and SARS-CoV-2 vaccines and therapies / W. S. Lee, A. K. Wheatley, S. J. Kent, B. J. DeKosky // *Nature Microbiology*. — 2020. — Vol. 5. — № 10. — P. 1185-1191. DOI: 10.1038/s41564-020-00789-5.
88. Deep immunoglobulin repertoire sequencing depicts a comprehensive atlas of spike-specific antibody lineages shared among COVID-19 convalescents / Q. Yan, Y. Zhang, R. Hou [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. — Vol. 13. — № 1. — Art. 2290841. DOI: 10.1080/22221751.2023.2290841.
89. Dai, L. Viral targets for vaccines against COVID-19 / L. Dai, G. F. Gao // *Nature Reviews. Immunology*. — 2021. — Vol. 21. — № 2. — P. 73-82. DOI: 10.1038/s41577-020-00480-0.
90. SARS-CoV-2 mRNA vaccination induces functionally diverse antibodies to NTD, RBD, and S2 / F. Amanat, M. Thapa, T. Lei [et al.] // *Cell*. — 2021. — Vol. 184. — № 15. — P. 3936-3948.e10. DOI: 10.1016/j.cell.2021.06.005.

91. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein / A. C. Walls, Y.-J. Park, M. A. Tortorici [et al.] // *Cell*. — 2020. — Vol. 181. — № 2. — P. 281-292.e6. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.058.
92. Mapping Neutralizing and Immunodominant Sites on the SARS-CoV-2 Spike Receptor-Binding Domain by Structure-Guided High-Resolution Serology / L. Piccoli, Y.-J. Park, M. A. Tortorici [et al.] // *Cell*. — 2020. — Vol. 183. — № 4. — P. 1024-1042.e21. DOI: 10.1016/j.cell.2020.09.037.
93. Structural basis for neutralization of SARS-CoV-2 and SARS-CoV by a potent therapeutic antibody / Z. Lv, Y.-Q. Deng, Q. Ye [et al.] // *Science*. — 2020. — Art. eabc5881. DOI: 10.1126/science.abc5881.
94. Potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies directed against spike N-terminal domain target a single supersite / G. Cerutti, Y. Guo, T. Zhou [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2021. — Vol. 29. — № 5. — P. 819-833.e7. DOI: 10.1016/j.chom.2021.03.005.
95. Broad betacoronavirus neutralization by a stem helix-specific human antibody / D. Pinto, M. M. Sauer, N. Czudnochowski [et al.] // *Science*. — 2021. — Vol. 373. — № 6559. — P. 1109-1116. DOI: 10.1126/science.abj3321.
96. Dutta, N. K. The Nucleocapsid Protein of SARS-CoV-2: a Target for Vaccine Development / N. K. Dutta, K. Mazumdar, J. T. Gordy // *Journal of Virology*. — 2020. — Vol. 94. — № 13. — Art. e00647-20. DOI: 10.1128/JVI.00647-20.
97. M protein ectodomain-specific immunity restrains SARS-CoV-2 variants replication / Y. Tang, K. Tang, Y. Hu [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2024. — Vol. 15. — Art. 1450114. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1450114.
98. Functional convalescent plasma antibodies and pre-infusion titers shape the early severe COVID-19 immune response / J. D. Herman, C. Wang, C. Loos [et al.] // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12. — № 1. — P. 6853. DOI: 10.1038/s41467-021-27201-y.
99. Assays for the assessment of neutralizing antibody activities against Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) associated coronavirus (SCV) / S. Wang, P. Sakhatskyy, T.-H. W. Chou, S. Lu // *Journal of Immunological Methods*. — 2005. — Vol. 301. — № 1. — P. 21-30. DOI: 10.1016/j.jim.2005.03.008.
100. Establishment and validation of a pseudovirus neutralization assay for SARS-CoV-2 / J. Nie, Q. Li, J. Wu [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. — Vol. 9. — № 1. — P. 680-686. DOI: 10.1080/22221751.2020.1743767.
101. Protocol and Reagents for Pseudotyping Lentiviral Particles with SARS-CoV-2 Spike Protein for Neutralization Assays / K. H. D. Crawford, R. Eguia, A. S. Dingens [et al.] // *Viruses*. — 2020. — Vol. 12. — № 5. — Art. 513. DOI: 10.3390/v12050513.

102. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans / F. Amanat, D. Stadlbauer, S. Strohmeier [et al.] // *Nature Medicine*. — 2020. — Vol. 26. — № 7. — P. 1033-1036. DOI: 10.1038/s41591-020-0913-5.
103. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2–spike protein–protein interaction / C. W. Tan, W. N. Chia, X. Qin [et al.] // *Nature Biotechnology*. — 2020. — Vol. 38. — № 9. — P. 1073-1078. DOI: 10.1038/s41587-020-0631-z.
104. A simple protein-based surrogate neutralization assay for SARS-CoV-2 / K. T. Abe, Z. Li, R. Samson [et al.] // *JCI Insight*. — Vol. 5. — № 19. — Art. e142362. DOI: 10.1172/jci.insight.142362.
105. Post-exposure protection of SARS-CoV-2 lethal infected K18-hACE2 transgenic mice by neutralizing human monoclonal antibody / R. Rosenfeld, T. Noy-Porat, A. Mechaly [et al.] // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12. — № 1. — Art. 944. DOI: 10.1038/s41467-021-21239-8.
106. Isolation of potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies and protection from disease in a small animal model / T. F. Rogers, F. Zhao, D. Huang [et al.] // *Science*. — 2020. — Vol. 369. — № 6506. — P. 956-963. DOI: 10.1126/science.abc7520.
107. Casadevall, A. The convalescent sera option for containing COVID-19 / A. Casadevall, L. Pirofski // *The Journal of Clinical Investigation*. — Vol. 130. — № 4. — P. 1545-1548. DOI: 10.1172/JCI138003.
108. Early safety indicators of COVID-19 convalescent plasma in 5000 patients / M. J. Joyner, R. S. Wright, D. Fairweather [et al.] // *The Journal of Clinical Investigation*. — Vol. 130. — № 9. — P. 4791-4797. DOI: 10.1172/JCI140200.
109. Early Convalescent Plasma for High-Risk Outpatients with Covid-19 / F. K. Korley, V. Durkalski-Mauldin, S. D. Yeatts [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. — 2021. — Vol. 385. — № 21. — P. 1951-1960. DOI: 10.1056/NEJMoa2103784.
110. Convalescent plasma for hospitalized patients with COVID-19: an open-label, randomized controlled trial / P. Bégin, J. Callum, E. Jamula [et al.] // *Nature Medicine*. — 2021. — Vol. 27. — № 11. — P. 2012-2024. DOI: 10.1038/s41591-021-01488-2.
111. Safety Update: COVID-19 Convalescent Plasma in 20,000 Hospitalized Patients / M. J. Joyner, K. A. Bruno, S. A. Klassen [et al.] // *Mayo Clinic Proceedings*. — 2020. — Vol. 95. — № 9. — P. 1888-1897. DOI: 10.1016/j.mayocp.2020.06.028.
112. Convalescent plasma in patients admitted to hospital with COVID-19 (RECOVERY): a randomised controlled, open-label, platform trial // *Lancet (London, England)*. — 2021. — Vol. 397. — № 10289. — P. 2049-2059. DOI: 10.1016/S0140-6736(21)00897-7.

113. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives / H. A. Parray, S. Shukla, S. Samal [et al.] // *International Immunopharmacology*. — 2020. — Vol. 85. — Art. 106639. DOI: 10.1016/j.intimp.2020.106639.
114. SMITH, S. A. Use of Human Hybridoma Technology To Isolate Human Monoclonal Antibodies / S. A. SMITH, J. E. CROWE // *Microbiology spectrum*. — 2015. — Vol. 3. — № 1. — Art. AID-0027-2014. DOI: 10.1128/microbiolspec.AID-0027-2014.
115. Mitra, S. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects / S. Mitra, P. C. Tomar // *Journal of Genetic Engineering & Biotechnology*. — 2021. — Vol. 19. — Art. 159. DOI: 10.1186/s43141-021-00264-6.
116. Zhang, C. Hybridoma technology for the generation of monoclonal antibodies / C. Zhang // *Methods in Molecular Biology*. — 2012. — Vol. 901. — P. 117-135. DOI: 10.1007/978-1-61779-931-0_7.
117. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface / G. P. Smith // *Science*. — 1985. — Vol. 228. — № 4705. — P. 1315-1317. DOI: 10.1126/science.4001944.
118. Parmley, S. F. Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes / S. F. Parmley, G. P. Smith // *Gene*. — 1988. — Vol. 73. — № 2. — P. 305-318. DOI: 10.1016/0378-1119(88)90495-7.
119. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains / J. McCafferty, A. D. Griffiths, G. Winter, D. J. Chiswell // *Nature*. — 1990. — Vol. 348. — № 6301. — P. 552-554. DOI: 10.1038/348552a0.
120. Winter, G. Man-made antibodies / G. Winter, C. Milstein // *Nature*. — 1991. — Vol. 349. — № 6307. — P. 293-299. DOI: 10.1038/349293a0.
121. Huang, J. X. Development of Anti-Infectives Using Phage Display: Biological Agents against Bacteria, Viruses, and Parasites / J. X. Huang, S. L. Bishop-Hurley, M. A. Cooper // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2012. — Vol. 56. — № 9. — P. 4569-4582. DOI: 10.1128/AAC.00567-12.
122. O'Callaghan, R. The effect of M13 phage infection upon the F pili of *E. coli* / R. O'Callaghan, R. Bradley, W. Paranchych // *Virology*. — 1973. — Vol. 54. — № 1. — P. 220-229. DOI: 10.1016/0042-6822(73)90131-1.
123. Wezenbeek, P. M. G. F. van. Nucleotide sequence of the filamentous bacteriophage M13 DNA genome: comparison with phage fd / P. M. G. F. van Wezenbeek, T. J. M. Hulsebos, J. G. G. Schoenmakers // *Gene*. — 1980. — Vol. 11. — № 1. — P. 129-148. DOI: 10.1016/0378-1119(80)90093-1.

124. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications / J. Rakonjac, N. J. Bennett, J. Spagnuolo [et al.] // *Current Issues in Molecular Biology*. — 2011. — Vol. 13. — № 2. — P. 51-76.
125. Bates, A. David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments / A. Bates, C. A. Power // *Antibodies*. — 2019. — Vol. 8. — № 2. — Art. 28. DOI: 10.3390/antib8020028.
126. Functional Interrogation and Mining of Natively-Paired Human VH:VL Antibody Repertoires / B. Wang, B. J. DeKosky, M. R. Timm [et al.] // *Nature biotechnology*. — 2018. — Vol. 36. — № 2. — P. 152-155. DOI: 10.1038/nbt.4052.
127. Lerner, R. A. Combinatorial antibody libraries: new advances, new immunological insights / R. A. Lerner // *Nature Reviews Immunology*. — 2016. — Vol. 16. — № 8. — P. 498-508. DOI: 10.1038/nri.2016.67.
128. Boder, E. T. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries / E. T. Boder, K. D. Wittrup // *Nature Biotechnology*. — 1997. — Vol. 15. — № 6. — P. 553-557. DOI: 10.1038/nbt0697-553.
129. Isolating and engineering human antibodies using yeast surface display / G. Chao, W. L. Lau, B. J. Hackel [et al.] // *Nature Protocols*. — 2006. — Vol. 1. — № 2. — P. 755-768. DOI: 10.1038/nprot.2006.94.
130. Antibody display technologies: selecting the cream of the crop / B. Valldorf, S. C. Hinz, G. Russo [et al.] // *Biological Chemistry*. — 2022. — Vol. 403. — № 5-6. — P. 455-477. DOI: 10.1515/hsz-2020-0377.
131. Mattheakis, L. C. An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. / L. C. Mattheakis, R. R. Bhatt, W. J. Dower // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1994. — Vol. 91. — № 19. — P. 9022-9026. DOI: 10.1073/pnas.91.19.9022.
132. Hanes, J. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display / J. Hanes, A. Plückthun // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 1997. — Vol. 94. — № 10. — P. 4937-4942. DOI: 10.1073/pnas.94.10.4937.
133. Ribosome Display Technology: Applications in Disease Diagnosis and Control / A. Kunamneni, C. Ogaugwu, S. Bradfute, R. Durvasula // *Antibodies*. — 2020. — Vol. 9. — № 3. — Art. 28. DOI: 10.3390/antib9030028.
134. A comprehensive search of functional sequence space using large mammalian display libraries created by gene editing / K. Parthiban, R. L. Perera, M. Sattar [et al.] // *mAbs*. — 2019. — Vol. 11. — № 5. — P. 884-898. DOI: 10.1080/19420862.2019.1618673.

135. Isolation of engineered, full-length antibodies from libraries expressed in *Escherichia coli* / Y. Mazor, T. Van Blarcom, R. Mabry [et al.] // *Nature Biotechnology*. — 2007. — Vol. 25. — № 5. — P. 563-565. DOI: 10.1038/nbt1296.
136. Epitope mapping of antibodies using bacterial surface display / J. Rockberg, J. Löfblom, B. Hjelm [et al.] // *Nature Methods*. — 2008. — Vol. 5. — № 12. — P. 1039-1045. DOI: 10.1038/nmeth.1272.
137. Discovery and characterization of high-affinity, potent SARS-CoV-2 neutralizing antibodies via single B cell screening / J. S. Schardt, G. Pornnoppadol, A. A. Desai [et al.] // *Scientific Reports*. — 2021. — Vol. 11. — Art. 20738. DOI: 10.1038/s41598-021-99401-x.
138. A facile technology for the high-throughput sequencing of the paired VH:VL and TCR β :TCR α repertoires / H. Tanno, J. R. McDaniel, C. A. Stevens [et al.] // *Science Advances*. — 2020. — Vol. 6. — № 17. — Art. eaay9093. DOI: 10.1126/sciadv.aay9093.
139. In-depth determination and analysis of the human paired heavy- and light-chain antibody repertoire / B. J. DeKosky, T. Kojima, A. Rodin [et al.] // *Nature Medicine*. — 2015. — Vol. 21. — № 1. — P. 86-91. DOI: 10.1038/nm.3743.
140. High-throughput sequencing of the paired human immunoglobulin heavy and light chain repertoire / B. J. DeKosky, G. C. Ippolito, R. P. Deschner [et al.] // *Nature biotechnology*. — 2013. — Vol. 31. — № 2. — P. 166-169. DOI: 10.1038/nbt.2492.
141. Potent and broad HIV-neutralizing antibodies in memory B cells and plasma / L. D. Williams, G. Ofek, S. Schätzle [et al.] // *Science immunology*. — 2017. — Vol. 2. — № 7. — Art. eaal2200. DOI: 10.1126/sciimmunol.aal2200.
142. Characterization of potent RSV neutralizing antibodies isolated from human memory B cells and identification of diverse RSV/hMPV cross-neutralizing epitopes / X. Xiao, A. Tang, K. S. Cox [et al.] // *mAbs*. — 2019. — Vol. 11. — № 8. — P. 1415-1427. DOI: 10.1080/19420862.2019.1654304.
143. Rapid isolation and immune profiling of SARS-CoV-2 specific memory B cell in convalescent COVID-19 patients via LIBRA-seq / B. He, S. Liu, Y. Wang [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. — 2021. — Vol. 6. — № 1. — Art. 195. DOI: 10.1038/s41392-021-00610-7.
144. High-throughput mapping of B-cell receptor sequences to antigen specificity / I. Setliff, A. R. Shiakolas, K. A. Pilewski [et al.] // *Cell*. — 2019. — Vol. 179. — № 7. — P. 1636-1646.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2019.11.003.
145. Functional HIV-1/HCV cross-reactive antibodies isolated from a chronically co-infected donor / K. A. Pilewski, S. Wall, S. I. Richardson [et al.] // *Cell Reports*. — 2023. — Vol. 42. — № 2. — Art. 112044. DOI: 10.1016/j.celrep.2023.112044.

146. Discovery of neutralizing SARS-CoV-2 antibodies enriched in a unique antigen specific B cell cluster / S. S. F. Lende, N. M. Barnkob, R. W. Hansen [et al.] // PLOS ONE. — 2023. — Vol. 18. — № 9. — Art. e0291131. DOI: 10.1371/journal.pone.0291131.
147. TRAPnSeq allows high-throughput profiling of antigen-specific antibody-secreting cells / S. Asrat, J. C. Devlin, A. Vecchione [et al.] // Cell Reports Methods. — 2023. — Vol. 3. — № 7. — Art. 100522. DOI: 10.1016/j.crmeth.2023.100522.
148. Assuring Clonality on the Beacon Digital Cell Line Development Platform / K. Le, C. Tan, H. Le [et al.] // Biotechnology Journal. — 2020. — Vol. 15. — № 1. — Art. e1900247. DOI: 10.1002/biot.201900247.
149. Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein / S. J. Zost, P. Gilchuk, R. E. Chen [et al.] // Nature Medicine. — 2020. — Vol. 26. — № 9. — P. 1422-1427. DOI: 10.1038/s41591-020-0998-x.
150. LY-CoV1404 (bebtelovimab) potently neutralizes SARS-CoV-2 variants / K. Westendorf, S. Žentelis, L. Wang [et al.] // Cell Reports. — 2022. — Vol. 39. — № 7. — Art. 110812. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110812.
151. The neutralizing antibody, LY-CoV555, protects against SARS-CoV-2 infection in nonhuman primates / B. E. Jones, P. L. Brown-Augsburger, K. S. Corbett [et al.] // Science Translational Medicine. — 2021. — Vol. 13. — № 593. — Art. eabf1906. DOI: 10.1126/scitranslmed.abf1906.
152. Versatile and rapid microfluidics-assisted antibody discovery / R. Gaa, E. Menang-Ndi, S. Pratapa [et al.] // mAbs. — Vol. 13. — № 1. — Art. 1978130. DOI: 10.1080/19420862.2021.1978130.
153. Ma, H. Antibody stability: A key to performance - Analysis, influences and improvement / H. Ma, C. Ó'Fágáin, R. O'Kennedy // Biochimie. — 2020. — Vol. 177. — P. 213-225. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.08.019.
154. FLUIDOT: A Modular Microfluidic Platform for Single-Cell Study and Retrieval, with Applications in Drug Tolerance Screening and Antibody Mining / J. Breukers, K. Ven, C. Struyfs [et al.] // Small Methods. — 2023. — Vol. 7. — № 3. — Art. e2201477. DOI: 10.1002/smt.202201477.
155. Fischer, N. Sequencing antibody repertoires / N. Fischer // mAbs. — 2011. — Vol. 3. — № 1. — P. 17-20. DOI: 10.4161/mabs.3.1.14169.
156. Broadly neutralizing SARS-CoV-2 antibodies through epitope-based selection from convalescent patients / R. Rouet, J. Y. Henry, M. D. Johansen [et al.] // Nature Communications. — 2023. — Vol. 14. — № 1. — Art. 687. DOI: 10.1038/s41467-023-36295-5.
157. A SARS-CoV-2 neutralizing antibody selected from COVID-19 patients binds to the ACE2-RBD interface and is tolerant to most known RBD mutations / F. Bertoglio, V. Fühner, M. Ruschig [et

- al.] // Cell Reports. — 2021. — Vol. 36. — № 4. — Art. 109433. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109433.
158. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail / J. Hansen, A. Baum, K. E. Pascal [et al.] // Science (New York, N.y.). — 2020. — Vol. 369. — № 6506. — P. 1010-1014. DOI: 10.1126/science.abd0827.
 159. Broad neutralization of SARS-related viruses by human monoclonal antibodies / A. Z. Wec, D. Wrapp, A. S. Herbert [et al.] // Science. — 2020. — Vol. 369. — № 6504. — P. 731-736. DOI: 10.1126/science.abc7424.
 160. Monoclonal antibody therapies against SARS-CoV-2 / D. Focosi, S. McConnell, A. Casadevall [et al.] // The Lancet. Infectious Diseases. — 2022. — Vol. 22. — № 11. — P. e311-e326. DOI: 10.1016/S1473-3099(22)00311-5.
 161. Neutralizing monoclonal antibodies for treatment of COVID-19 / P. C. Taylor, A. C. Adams, M. M. Hufford [et al.] // Nature Reviews Immunology. — 2021. — Vol. 21. — № 6. — P. 382-393. DOI: 10.1038/s41577-021-00542-x.
 162. Monoclonal Antibodies for the Prevention and Treatment of COVID-19 Disease in Patients With Hematological Malignancies: Two Case Reports and a Literature Review / D. Klank, M. Hoffmann, B. Claus [et al.] // HemaSphere. — 2021. — Vol. 5. — № 11. — Art. e651. DOI: 10.1097/HS9.0000000000000651.
 163. SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody LY-CoV555 in Outpatients with Covid-19 / P. Chen, A. Nirula, B. Heller [et al.] // The New England Journal of Medicine. — 2021. — Vol. 384. — № 3. — P. 229-237. DOI: 10.1056/NEJMoa2029849.
 164. Bamlanivimab plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid-19 / M. Dougan, A. Nirula, M. Azizad [et al.] // The New England Journal of Medicine. — 2021. — Vol. 385. — № 15. — P. 1382-1392. DOI: 10.1056/NEJMoa2102685.
 165. Casirivimab and Imdevimab for the Treatment of Hospitalized Patients With COVID-19 / S. Somersan-Karakaya, E. Mylonakis, V. P. Menon [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. — 2022. — Vol. 227. — № 1. — P. 23-34. DOI: 10.1093/infdis/jiac320.
 166. REGEN-COV Antibody Combination and Outcomes in Outpatients with Covid-19 / D. M. Weinreich, S. Sivapalasingam, T. Norton [et al.] // The New England Journal of Medicine. — 2021. — P. NEJMoa2108163. DOI: 10.1056/NEJMoa2108163.
 167. Early Treatment for Covid-19 with SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab / A. Gupta, Y. Gonzalez-Rojas, E. Juarez [et al.] // The New England Journal of Medicine. — 2021. — Vol. 385. — № 21. — P. 1941-1950. DOI: 10.1056/NEJMoa2107934.
 168. U.S. Food and Drug Administration. Emergency Use Authorization--Archived Information. — URL: <https://www.fda.gov/emergency-preparedness-and-response/mcm-legal-regulatory-and->

- policy-framework/emergency-use-authorization-archived-information (дата обращения: 10.09.2026). — Текст : электронный.
169. Syed, Y. Y. Regdanvimab: First Approval / Y. Y. Syed // *Drugs*. — 2021. — Vol. 81. — № 18. — P. 2133-2137. DOI: 10.1007/s40265-021-01626-7.
 170. Syed, Y. Y. Correction to: Regdanvimab: First Approval / Y. Y. Syed // *Drugs*. — 2021. — T. 81. — Correction to. — № 18. — Art. 2139. DOI: 10.1007/s40265-021-01641-8.
 171. Hoy, S. M. Amubarvimab/Romlusevimab: First Approval / S. M. Hoy // *Drugs*. — 2022. — Vol. 82. — № 12. — Art. 1327. DOI: 10.1007/s40265-022-01759-3.
 172. Keam, S. J. Sipavibart: First Approval / S. J. Keam // *Drugs*. — 2025. — Vol. 85. — № 8. — P. 1049-1054. DOI: 10.1007/s40265-025-02186-w.
 173. U.S. Food and Drug Administration. FACT SHEET FOR HEALTHCARE PROVIDERS: EMERGENCY USE AUTHORIZATION OF PEMGARDA (PEMIVIBART) / U.S. Food and Drug Administration. — 2024. — URL: <https://www.fda.gov/media/177067/download> (дата обращения: 10.09.2026). — Текст : электронный.
 174. A First-in-Human Randomized Study to Assess the Safety, Tolerability, Pharmacokinetics, and Neutralization Profile of Two Investigational Long-Acting Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Antibodies / N. Moullan, J. Asiago, K. Stecco [et al.] // *Infectious Diseases and Therapy*. — 2024. — Vol. 13. — № 1. — P. 173-187. DOI: 10.1007/s40121-023-00908-9.
 175. Sinovac Life Sciences Co., Ltd. A Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Phase II Clinical Trial to Evaluate the Efficacy and Safety of Novel Coronavirus Broad-spectrum Neutralizing Antibody SA55 Injection in the Treatment of Mild/Moderate COVID-19 Patients / Sinovac Life Sciences Co., Ltd. — 2023. — URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06042764> (дата обращения: 04.09.2026). — Текст : электронный.
 176. Invivyd, Inc. A Phase 3, Randomized, Triple-Blind, Placebo-Controlled Study to Evaluate the Efficacy and Safety of VYD2311 for the Prevention of COVID-19 in Adults and Adolescents / Invivyd, Inc. — 2026. — URL: <https://clinicaltrials.gov/study/NCT07298434> (дата обращения: 04.09.2026). — Текст : электронный.
 177. Intramuscular AZD7442 (Tixagevimab–Cilgavimab) for Prevention of Covid-19 / M. J. Levin, A. Ustianowski, S. De Wit [et al.] // *The New England Journal of Medicine*. — 2022. — P. NEJMoa2116620. DOI: 10.1056/NEJMoa2116620.
 178. A therapeutic neutralizing antibody targeting receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein / C. Kim, D.-K. Ryu, J. Lee [et al.] // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12. — № 1. — Art. 288. DOI: 10.1038/s41467-020-20602-5.
 179. Preclinical characterization of amubarvimab and romlusevimab, a pair of non-competing neutralizing monoclonal antibody cocktail, against SARS-CoV-2 / Y. Ji, Q. Zhang, L. Cheng [et

- al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2022. — Vol. 13. — Art. 980435. DOI: 10.3389/fimmu.2022.980435.
180. Efficacy of Antiviral Agents against Omicron Subvariants BQ.1.1 and XBB / M. Imai, M. Ito, M. Kiso [et al.] // *New England Journal of Medicine*. — 2023. — Vol. 388. — № 1. — P. 89-91. DOI: 10.1056/NEJMc2214302.
 181. Pathogenicity, virological features, and immune evasion of SARS-CoV-2 JN.1-derived variants including JN.1.7, KP.2, KP.3, and KP.3.1.1 / J. Shi, X. Zhao, X. Jin [et al.] // *Nature Communications*. — 2025. — Vol. 16. — № 1. — Art. 11002. DOI: 10.1038/s41467-025-66018-x.
 182. Antibody evasion and receptor binding of SARS-CoV-2 LP.8.1.1, NB.1.8.1, XFG, and related subvariants / I. A. Mellis, M. Wu, H. Hong [et al.] // *Cell Reports*. — 2025. — Vol. 44. — № 10. — Art. 116440. DOI: 10.1016/j.celrep.2025.116440.
 183. Dynamics of SARS-CoV-2 variants and mutations in Central Sweden between 2023 and 2024 and their potential implications on monoclonal antibodies pemivibart and sipavibart as PrEP in the region / J. Haars, F. Wallin, K. Elfving [et al.] // *Infectious Diseases*. — 2025. — Vol. 57. — № 10. — P. 956-965. DOI: 10.1080/23744235.2025.2509011.
 184. A phase 2a double-blind, placebo-controlled randomized trial of the SARS-CoV-2-specific monoclonal antibody AER002 in people with Long COVID / M. J. Peluso, D. Ryder, T. Dalhuisen, [et al.]. — medRxiv, 2026. — URL: <https://www.medrxiv.org/content/10.64898/2026.03.07.26347857v1> (дата обращения: 11.09.2026). — Текст: электронный.
 185. The monoclonal antibody VYD2311 potently neutralizes dominant and emerging SARS-CoV-2 variants / I. A. Mellis, M. Wu, K. Daniel [et al.] // *JCI insight*. — 2026. — Art. e208557. DOI: 10.1172/jci.insight.208557.
 186. SARS-CoV-2 neutralizing antibody structures inform therapeutic strategies / C. O. Barnes, C. A. Jette, M. E. Abernathy [et al.] // *Nature*. — 2020. — Vol. 588. — № 7839. — P. 682-687. DOI: 10.1038/s41586-020-2852-1.
 187. SARS-CoV-2 RBD antibodies that maximize breadth and resistance to escape / T. N. Starr, N. Czudnochowski, Z. Liu [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 597. — № 7874. — P. 97-102. DOI: 10.1038/s41586-021-03807-6.
 188. A global collaboration for systematic analysis of broad-ranging antibodies against the SARS-CoV-2 spike protein / S. L. Schendel, X. Yu, P. J. Halfmann [et al.] // *Cell Reports*. — 2025. — Vol. 44. — № 4. — Art. 115499. DOI: 10.1016/j.celrep.2025.115499.
 189. Ultrapotent human antibodies protect against SARS-CoV-2 challenge via multiple mechanisms / M. A. Tortorici, M. Beltramello, F. A. Lempp [et al.] // *Science*. — 2020. — Vol. 370. — № 6519. — P. 950-957. DOI: 10.1126/science.abe3354.

190. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2 / R. Shi, C. Shan, X. Duan [et al.] // *Nature*. — 2020. — Vol. 584. — № 7819. — P. 120-124. DOI: 10.1038/s41586-020-2381-y.
191. Antibody-mediated broad sarbecovirus neutralization through ACE2 molecular mimicry / Y.-J. Park, A. De Marco, T. N. Starr [et al.] // *Science*. — 2022. — Vol. 375. — № 6579. — P. 449-454. DOI: 10.1126/science.abm8143.
192. Infection with wild-type SARS-CoV-2 elicits broadly neutralizing and protective antibodies against omicron subvariants / B. Ju, Q. Zhang, Z. Wang [et al.] // *Nature Immunology*. — 2023. — Vol. 24. — № 4. — P. 690-699. DOI: 10.1038/s41590-023-01449-6.
193. The neutralization potency of anti-SARS-CoV-2 therapeutic human monoclonal antibodies is retained against viral variants / E. Makdasi, A. Zvi, R. Alcalay [et al.] // *Cell Reports*. — 2021. — Vol. 36. — № 10. — Art. 109679. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109679.
194. Cross-neutralization of SARS-CoV-2 by a human monoclonal SARS-CoV antibody / D. Pinto, Y.-J. Park, M. Beltramello [et al.] // *Nature*. — 2020. — Vol. 583. — № 7815. — P. 290-295. DOI: 10.1038/s41586-020-2349-y.
195. Targeted escape of SARS-CoV-2 in vitro from monoclonal antibody S309, the precursor of sotrovimab / C. L. Magnus, A. Hiergeist, P. Schuster [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2022. — Vol. 13. — Art. 966236. DOI: 10.3389/fimmu.2022.966236.
196. An antibody from single human VH-rearranging mouse neutralizes all SARS-CoV-2 variants through BA.5 by inhibiting membrane fusion / S. Luo, J. Zhang, A. J. B. Kreutzberger [et al.] // *Science Immunology*. — 2022. — Vol. 7. — № 76. — P. eadd5446. DOI: 10.1126/sciimmunol.add5446.
197. An antibody that neutralizes SARS-CoV-1 and SARS-CoV-2 by binding to a conserved spike epitope outside the receptor binding motif / Y. Fang, P. Sun, X. Xie [et al.] // *Science Immunology*. — 2022. — Vol. 7. — № 76. — Art. eabp9962. DOI: 10.1126/sciimmunol.abp9962.
198. Imprinted antibody responses against SARS-CoV-2 Omicron sublineages / Y.-J. Park, D. Pinto, A. C. Walls [et al.] // *Science*. — 2022. — Vol. 378. — № 6620. — P. 619-627. DOI: 10.1126/science.adc9127.
199. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV / M. Yuan, N. C. Wu, X. Zhu [et al.] // *Science*. — 2020. — Vol. 368. — № 6491. — P. 630-633. DOI: 10.1126/science.abb7269.
200. Neutralization of SARS-CoV-2 by Destruction of the Prefusion Spike / J. Huo, Y. Zhao, J. Ren [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2020. — Vol. 28. — № 3. — Art. 497. DOI: 10.1016/j.chom.2020.07.002.

201. Broad and potent activity against SARS-like viruses by an engineered human monoclonal antibody / C. G. Rappazzo, L. V. Tse, C. I. Kaku [et al.] // *Science*. — 2021. — Vol. 371. — № 6531. — P. 823-829. DOI: 10.1126/science.abf4830.
202. Broad sarbecovirus neutralization by a human monoclonal antibody / M. A. Tortorici, N. Czudnochowski, T. N. Starr [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 597. — № 7874. — P. 103-108. DOI: 10.1038/s41586-021-03817-4.
203. In vitro and in vivo functions of SARS-CoV-2 infection-enhancing and neutralizing antibodies / D. Li, R. J. Edwards, K. Manne [et al.] // *Cell*. — 2021. — Vol. 184. — № 16. — P. 4203-4219.e32. DOI: 10.1016/j.cell.2021.06.021.
204. An antibody class with a common CDRH3 motif broadly neutralizes sarbecoviruses / L. Liu, S. Iketani, Y. Guo [et al.] // *Science Translational Medicine*. — 2022. — Vol. 14. — № 646. — Art. eabn6859. DOI: 10.1126/scitranslmed.abn6859.
205. Increased memory B cell potency and breadth after a SARS-CoV-2 mRNA boost / F. Muecksch, Z. Wang, A. Cho [et al.] // *Nature*. — 2022. — Vol. 607. — № 7917. — P. 128-134. DOI: 10.1038/s41586-022-04778-y.
206. Rational identification of potent and broad sarbecovirus-neutralizing antibody cocktails from SARS convalescents / Y. Cao, F. Jian, Z. Zhang [et al.] // *Cell Reports*. — 2022. — Vol. 41. — № 12. — Art. 111845. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.111845.
207. Safety and Intranasal Retention of a Broad-Spectrum Anti-SARS-CoV-2 Monoclonal Antibody SA55 Nasal Spray in Healthy Volunteers: A Phase I Clinical Trial / C. Hu, Y. Zhou, X. Meng [et al.] // *Pharmaceutics*. — 2024. — Vol. 17. — № 1. — Art. 43. DOI: 10.3390/pharmaceutics17010043.
208. Deep Mutational Scanning of SARS-CoV-2 Receptor Binding Domain Reveals Constraints on Folding and ACE2 Binding / T. N. Starr, A. J. Greaney, S. K. Hilton [et al.] // *Cell*. — 2020. — Vol. 182. — № 5. — P. 1295-1310.e20. DOI: 10.1016/j.cell.2020.08.012.
209. Targeting the Spike Receptor Binding Domain Class V Cryptic Epitope by an Antibody with Pan-Sarbecovirus Activity / J. L. Jensen, R. S. Sankhala, V. Dussupt [et al.] // *Journal of Virology*. — 2023. — Vol. 97. — № 7. — Art. e01596. DOI: 10.1128/jvi.01596-22.
210. Three SARS-CoV-2 antibodies provide broad and synergistic neutralization against variants of concern, including Omicron / S. Wang, H. Sun, Y. Zhang [et al.] // *Cell Reports*. — 2022. — Vol. 39. — № 8. — Art. 110862. DOI: 10.1016/j.celrep.2022.110862.
211. Cross-Reactive SARS-CoV-2 Neutralizing Antibodies From Deep Mining of Early Patient Responses / G. Bullen, J. D. Galson, G. Hall [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2021. — Vol. 12. — Art. 678570. DOI: 10.3389/fimmu.2021.678570.

212. Uncovering a conserved vulnerability site in SARS-CoV-2 by a human antibody / T. Li, H. Cai, Y. Zhao [et al.] // *EMBO Molecular Medicine*. — 2021. — Vol. 13. — № 12. — Art. e14544. DOI: 10.15252/emmm.202114544.
213. Affinity maturation endows potent activity onto class 6 SARS-CoV-2 broadly neutralizing antibodies / O. Mazigi, D. B. Langley, J. Y. Henry [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — Vol. 122. — № 1. — Art. e2417544121. DOI: 10.1073/pnas.2417544121.
214. Amanna, I. J. Duration of humoral immunity to common viral and vaccine antigens / I. J. Amanna, N. E. Carlson, M. K. Slifka // *The New England Journal of Medicine*. — 2007. — Vol. 357. — № 19. — P. 1903-1915. DOI: 10.1056/NEJMoa066092.
215. Seasonal coronavirus protective immunity is short-lasting / A. W. D. Edridge, J. Kaczorowska, A. C. R. Hoste [et al.] // *Nature Medicine*. — 2020. — Vol. 26. — № 11. — P. 1691-1693. DOI: 10.1038/s41591-020-1083-1.
216. SARS-CoV-2 Omicron boosting induces de novo B cell response in humans / W. B. Alsoussi, S. K. Malladi, J. Q. Zhou [et al.] // *Nature*. — 2023. — Vol. 617. — № 7961. — P. 592-598. DOI: 10.1038/s41586-023-06025-4.
217. Evolving antibody response to SARS-CoV-2 antigenic shift from XBB to JN.1 / F. Jian, J. Wang, A. Yisimayi [et al.] // *Nature*. — 2025. — Vol. 637. — № 8047. — P. 921-929. DOI: 10.1038/s41586-024-08315-x.
218. Rapid epidemic expansion of the SARS-CoV-2 Omicron variant in southern Africa / R. Viana, S. Moyo, D. G. Amoako [et al.] // *Nature*. — 2022. — Vol. 603. — № 7902. — P. 679-686. DOI: 10.1038/s41586-022-04411-y.
219. Conserved epitope on influenza-virus hemagglutinin head defined by a vaccine-induced antibody / D. D. Raymond, G. Bajic, J. Ferdman [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2018. — Vol. 115. — № 1. — P. 168-173. DOI: 10.1073/pnas.1715471115.
220. A New Glycan-Dependent CD4-Binding Site Neutralizing Antibody Exerts Pressure on HIV-1 In Vivo / N. T. Freund, J. A. Horwitz, L. Nogueira [et al.] // *PLoS Pathogens*. — 2015. — Vol. 11. — № 10. — Art. e1005238. DOI: 10.1371/journal.ppat.1005238.
221. Insights on the mutational landscape of the SARS-CoV-2 Omicron variant receptor-binding domain / N. L. Miller, T. Clark, R. Raman, R. Sasisekharan // *Cell Reports Medicine*. — 2022. — Vol. 3. — № 2. — Art. 100527. DOI: 10.1016/j.xcrm.2022.100527.
222. Biophysical Fitness Landscape of the SARS-CoV-2 Delta Variant Receptor Binding Domain / C. Patrick, V. Upadhyay, A. Lucas, K. M. G. Mallela // *Journal of Molecular Biology*. — 2022. — Vol. 434. — № 13. — Art. 167622. DOI: 10.1016/j.jmb.2022.167622.

223. Structural basis for potent antibody neutralization of SARS-CoV-2 variants including B.1.1.529 / T. Zhou, L. Wang, J. Misasi [et al.] // *Science*. — Vol. 376. — № 6591. — Art. eabn8897. DOI: 10.1126/science.abn8897.
224. Antibody evasion properties of SARS-CoV-2 Omicron sublineages / S. Iketani, L. Liu, Y. Guo [et al.] // *Nature*. — 2022. — Vol. 604. — № 7906. — P. 553-556. DOI: 10.1038/s41586-022-04594-4.
225. Broadly neutralizing antibodies to SARS-CoV-2 and other human coronaviruses / Y. Chen, X. Zhao, H. Zhou [et al.] // *Nature Reviews Immunology*. — 2023. — Vol. 23. — № 3. — P. 189-199. DOI: 10.1038/s41577-022-00784-3.
226. Sok, D. SnapShot: Broadly Neutralizing Antibodies / D. Sok, B. Moldt, D. R. Burton // *Cell*. — 2013. — Vol. 155. — № 3. — P. 728-728.e1. DOI: 10.1016/j.cell.2013.10.009.
227. Antibody cocktail to SARS-CoV-2 spike protein prevents rapid mutational escape seen with individual antibodies / A. Baum, B. O. Fulton, E. Wloga [et al.] // *Science (New York, N.Y.)*. — 2020. — Vol. 369. — № 6506. — P. 1014-1018. DOI: 10.1126/science.abd0831.
228. Bispecific antibodies targeting distinct regions of the spike protein potentially neutralize SARS-CoV-2 variants of concern / H. Cho, K. K. Gonzales-Wartz, D. Huang [et al.] // *Science Translational Medicine*. — Vol. 13. — № 616. — Art. eabj5413. DOI: 10.1126/scitranslmed.abj5413.
229. Alexander, E. Discovery of nanobodies: a comprehensive review of their applications and potential over the past five years / E. Alexander, K. W. Leong // *Journal of Nanobiotechnology*. — 2024. — Vol. 22. — № 1. — Art. 661. DOI: 10.1186/s12951-024-02900-y.
230. Nguyen, V. K. Functional heavy-chain antibodies in Camelidae / V. K. Nguyen, A. Desmyter, S. Muyldermans // *Advances in Immunology*. — 2001. — Vol. 79. — P. 261-296. DOI: 10.1016/s0065-2776(01)79006-2.
231. Naturally occurring antibodies devoid of light chains / C. Hamers-Casterman, T. Atarhouch, S. Muyldermans [et al.] // *Nature*. — 1993. — Vol. 363. — № 6428. — P. 446-448. DOI: 10.1038/363446a0.
232. Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity / J. Wesolowski, V. Alzogaray, J. Reyelt [et al.] // *Medical Microbiology and Immunology*. — 2009. — Vol. 198. — № 3. — P. 157-174. DOI: 10.1007/s00430-009-0116-7.
233. Henry, K. A. Antigen recognition by single-domain antibodies: structural latitudes and constraints / K. A. Henry, C. R. MacKenzie // *mAbs*. — 2018. — Vol. 10. — № 6. — P. 815-826. DOI: 10.1080/19420862.2018.1489633.
234. Muyldermans, S. Nanobodies: natural single-domain antibodies / S. Muyldermans // *Annual Review of Biochemistry*. — 2013. — Vol. 82. — P. 775-797. DOI: 10.1146/annurev-biochem-063011-092449.

235. Bannas, P. Nanobodies and Nanobody-Based Human Heavy Chain Antibodies As Antitumor Therapeutics / P. Bannas, J. Hambach, F. Koch-Nolte // *Frontiers in Immunology*. — 2017. — Vol. 8. — Art. 1603. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01603.
236. Camelid immunoglobulins and nanobody technology / S. Muyldermans, T. N. Baral, V. C. Retamozzo [et al.] // *Veterinary Immunology and Immunopathology*. — 2009. — Vol. 128. — № 1-3. — P. 178-183. DOI: 10.1016/j.vetimm.2008.10.299.
237. Тиллиб, С. В. Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине / С. В. Тиллиб // *Молекулярная Биология*. — 2020. — Т. 54. — № 3. — С. 362-373. DOI: 10.31857/S0026898420030167.
238. The use of nanobodies in a sensitive ELISA test for SARS-CoV-2 Spike 1 protein / G. C. Girt, A. Lakshminarayanan, J. Huo [et al.] // *Royal Society Open Science*. — 2021. — Vol. 8. — № 9. — Art. 211016. DOI: 10.1098/rsos.211016.
239. Trivalency of a Nanobody Specific for the Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein Drastically Enhances Virus Neutralization and Impacts Escape Mutant Selection / C. Palomo, V. Mas, L. Detalle [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2016. — Vol. 60. — № 11. — P. 6498-6509. DOI: 10.1128/AAC.00842-16.
240. Caplacizumab reduces the frequency of major thromboembolic events, exacerbations and death in patients with acquired thrombotic thrombocytopenic purpura / F. Peyvandi, M. Scully, J. A. Kremer Hovinga [et al.] // *Journal of thrombosis and haemostasis: JTH*. — 2017. — Vol. 15. — № 7. — P. 1448-1452. DOI: 10.1111/jth.13716.
241. Keam, S. J. Ozoralizumab: First Approval / S. J. Keam // *Drugs*. — 2023. — Vol. 83. — № 1. — P. 87-92. DOI: 10.1007/s40265-022-01821-0.
242. Markham, A. Envafohimab: First Approval / A. Markham // *Drugs*. — 2022. — Vol. 82. — № 2. — P. 235-240. DOI: 10.1007/s40265-022-01671-w.
243. FDA Approval Summary: Ciltacabtagene Autoleucel for Relapsed or Refractory Multiple Myeloma / K. Natrajan, M. Kaushal, B. George [et al.] // *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. — 2024. — Vol. 30. — № 14. — P. 2865-2871. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-24-0378.
244. Wu, Y. Single-Domain Antibodies As Therapeutics against Human Viral Diseases / Y. Wu, S. Jiang, T. Ying // *Frontiers in Immunology*. — 2017. — Vol. 8. — Art. 1802. DOI: 10.3389/fimmu.2017.01802.
245. Holliger, P. Engineered antibody fragments and the rise of single domains / P. Holliger, P. J. Hudson // *Nature Biotechnology*. — 2005. — Vol. 23. — № 9. — P. 1126-1136. DOI: 10.1038/nbt1142.

246. Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications / Y. Wang, Z. Fan, L. Shao [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. — 2016. — Vol. 11. — P. 3287-3303. DOI: 10.2147/IJN.S107194.
247. Basics of Antibody Phage Display Technology / L. Ledsgaard, M. Kilstrup, A. Karatt-Vellatt [et al.] // *Toxins*. — 2018. — Vol. 10. — № 6. — Art. 236. DOI: 10.3390/toxins10060236.
248. Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies / C. McMahon, A. S. Baier, R. Pascolutti [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2018. — Vol. 25. — № 3. — P. 289-296. DOI: 10.1038/s41594-018-0028-6.
249. A rapid and simple pipeline for synthesis of mRNA-ribosome-V(H)H complexes used in single-domain antibody ribosome display / E. Bencurova, L. Pulzova, Z. Flachbartova, M. Bhide // *Molecular bioSystems*. — 2015. — Vol. 11. — № 6. — P. 1515-1524. DOI: 10.1039/c5mb00026b.
250. The breadth of cross sub-type neutralisation activity of a single domain antibody to influenza hemagglutinin can be increased by antibody valency / S. E. Hufton, P. Risley, C. R. Ball [et al.] // *PloS One*. — 2014. — Vol. 9. — № 8. — Art. e103294. DOI: 10.1371/journal.pone.0103294.
251. Llama antibody fragments with cross-subtype human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1)-neutralizing properties and high affinity for HIV-1 gp120 / A. Forsman, E. Beirnaert, M. M. I. Aasa-Chapman [et al.] // *Journal of Virology*. — 2008. — Vol. 82. — № 24. — P. 12069-12081. DOI: 10.1128/JVI.01379-08.
252. A Novel Nanobody Targeting Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus (MERS-CoV) Receptor-Binding Domain Has Potent Cross-Neutralizing Activity and Protective Efficacy against MERS-CoV / G. Zhao, L. He, S. Sun [et al.] // *Journal of Virology*. — 2018. — Vol. 92. — № 18. — Art. e00837-18. DOI: 10.1128/JVI.00837-18.
253. Potent single-domain antibodies that arrest respiratory syncytial virus fusion protein in its prefusion state / I. Rossey, M. S. A. Gilman, S. C. Kabeche [et al.] // *Nature Communications*. — 2017. — Vol. 8. — № 1. — Art. 14158. DOI: 10.1038/ncomms14158.
254. Intracellular expression of camelid single-domain antibodies specific for influenza virus nucleoprotein uncovers distinct features of its nuclear localization / J. Ashour, F. I. Schmidt, L. Hanke [et al.] // *Journal of Virology*. — 2015. — Vol. 89. — № 5. — P. 2792-2800. DOI: 10.1128/JVI.02693-14.
255. A stably expressed llama single-domain intrabody targeting Rev displays broad-spectrum anti-HIV activity / E. Boons, G. Li, E. Vanstreels [et al.] // *Antiviral Research*. — 2014. — Vol. 112. — P. 91-102. DOI: 10.1016/j.antiviral.2014.10.007.

256. De Meyer, T. Nanobody-based products as research and diagnostic tools / T. De Meyer, S. Muyldermans, A. Depicker // *Trends in Biotechnology*. — 2014. — Vol. 32. — № 5. — P. 263-270. DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.03.001.
257. Structural Basis for Potent Neutralization of Betacoronaviruses by Single-Domain Camelid Antibodies / D. Wrapp, D. De Vlieger, K. S. Corbett [et al.] // *Cell*. — 2020. — Vol. 181. — № 5. — P. 1004-1015.e15. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.031.
258. Breadth and function of antibody response to acute SARS-CoV-2 infection in humans / K.-Y. A. Huang, T. K. Tan, T.-H. Chen [et al.] // *PLoS Pathogens*. — 2021. — Vol. 17. — № 2. — Art. e1009352. DOI: 10.1371/journal.ppat.1009352.
259. A potent SARS-CoV-2 neutralising nanobody shows therapeutic efficacy in the Syrian golden hamster model of COVID-19 / J. Huo, H. Mikolajek, A. Le Bas [et al.] // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12. — № 1. — Art. 5469. DOI: 10.1038/s41467-021-25480-z.
260. Structures of synthetic nanobody-SARS-CoV-2 receptor-binding domain complexes reveal distinct sites of interaction / J. Ahmad, J. Jiang, L. F. Boyd [et al.] // *The Journal of Biological Chemistry*. — 2021. — Vol. 297. — № 4. — Art. 101202. DOI: 10.1016/j.jbc.2021.101202.
261. Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape / P.-A. Koenig, H. Das, H. Liu [et al.] // *Science*. — 2021. — Vol. 371. — № 6530. — Art. eabe6230. DOI: 10.1126/science.abe6230.
262. NeutrobodyPlex-monitoring SARS-CoV-2 neutralizing immune responses using nanobodies / T. R. Wagner, E. Ostertag, P. D. Kaiser [et al.] // *EMBO reports*. — 2021. — Vol. 22. — № 5. — Art. e52325. DOI: 10.15252/embr.202052325.
263. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants / J. Xu, K. Xu, S. Jung [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 595. — № 7866. — P. 278-282. DOI: 10.1038/s41586-021-03676-z.
264. Nanobody cocktails potentially neutralize SARS-CoV-2 D614G N501Y variant and protect mice / P. Pymm, A. Adair, L.-J. Chan [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2021. — Vol. 118. — № 19. — Art. e2101918118. DOI: 10.1073/pnas.2101918118.
265. A cell-free nanobody engineering platform rapidly generates SARS-CoV-2 neutralizing nanobodies / X. Chen, M. Gentili, N. Hacohen, A. Regev // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12. — № 1. — Art. 5506. DOI: 10.1038/s41467-021-25777-z.
266. Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2 / J. Huo, A. Le Bas, R. R. Ruza [et al.] // *Nature Structural & Molecular Biology*. — 2020. — Vol. 27. — № 9. — P. 846-854. DOI: 10.1038/s41594-020-0469-6.

267. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike / M. Schoof, B. Faust, R. A. Saunders [et al.] // *Science*. — 2020. — Vol. 370. — № 6523. — P. 1473-1479. DOI: 10.1126/science.abe3255.
268. Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2 / Y. Xiang, S. Nambulli, Z. Xiao [et al.] // *Science (New York, N.y.)*. — 2020. — Vol. 370. — № 6523. — P. 1479-1484. DOI: 10.1126/science.abe4747.
269. Selection, biophysical and structural analysis of synthetic nanobodies that effectively neutralize SARS-CoV-2 / T. F. Custódio, H. Das, D. J. Sheward [et al.] // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11. — Art. 5588. DOI: 10.1038/s41467-020-19204-y.
270. An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction / L. Hanke, L. Vidakovics Perez, D. J. Sheward [et al.] // *Nature Communications*. — 2020. — Vol. 11. — Art. 4420. DOI: 10.1038/s41467-020-18174-5.
271. The development of Nanosota-1 as anti-SARS-CoV-2 nanobody drug candidates / G. Ye, J. Gallant, J. Zheng [et al.] // *eLife*. — Vol. 10. — Art. e64815. DOI: 10.7554/eLife.64815.
272. A synthetic nanobody targeting RBD protects hamsters from SARS-CoV-2 infection / T. Li, H. Cai, H. Yao [et al.] // *Nature Communications*. — 2021. — Vol. 12. — Art. 4635. DOI: 10.1038/s41467-021-24905-z.
273. Tang, Q. Structural Biology of Nanobodies against the Spike Protein of SARS-CoV-2 / Q. Tang, R. J. Owens, J. H. Naismith // *Viruses*. — 2021. — Vol. 13. — № 11. — Art. 2214. DOI: 10.3390/v13112214.
274. Engineered Multivalent Nanobodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Omicron Subvariants BA.1, BA.4/5, XBB.1 and BQ.1.1 / J. Wang, B. Shi, H. Chen [et al.] // *Vaccines*. — 2024. — Vol. 12. — № 4. — Art. 417. DOI: 10.3390/vaccines12040417.
275. An affinity-enhanced, broadly neutralizing heavy chain-only antibody protects against SARS-CoV-2 infection in animal models / B. Schepens, L. van Schie, W. Nerinckx [et al.] // *Science Translational Medicine*. — Vol. 13. — № 621. — Art. eabi7826. DOI: 10.1126/scitranslmed.abi7826.
276. Potent Neutralization of SARS-CoV-2 by Hetero-Bivalent Alpaca Nanobodies Targeting the Spike Receptor-Binding Domain / H. Ma, W. Zeng, X. Meng [et al.] // *Journal of Virology*. — 2021. — Vol. 95. — № 10. — Art. e02438-20. DOI: 10.1128/JVI.02438-20.
277. Biparatopic nanobodies protect mice from lethal challenge with SARS-CoV-2 variants of concern / T. R. Wagner, D. Schnepf, J. Beer [et al.] // *EMBO Reports*. — 2022. — Vol. 23. — № 2. — Art. e53865. DOI: 10.15252/embr.202153865.

278. Development of multi-specific humanized llama antibodies blocking SARS-CoV-2/ACE2 interaction with high affinity and avidity / J. Dong, B. Huang, Z. Jia [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. — Vol. 9. — № 1. — P. 1034-1036. DOI: 10.1080/22221751.2020.1768806.
279. Inhalable Nanobody (PiN-21) prevents and treats SARS-CoV-2 infections in Syrian hamsters at ultra-low doses / S. Nambulli, Y. Xiang, N. L. Tilston-Lunel [et al.] // *Science Advances*. — 2021. — Vol. 7. — № 22. — Art. eabh0319. DOI: 10.1126/sciadv.abh0319.
280. Development of a bispecific nanobody conjugate broadly neutralizes diverse SARS-CoV-2 variants and structural basis for its broad neutralization / J. Yang, S. Lin, Z. Chen [et al.] // *PLOS Pathogens*. — 2023. — Vol. 19. — № 11. — Art. e1011804. DOI: 10.1371/journal.ppat.1011804.
281. A non-ACE2 competing human single-domain antibody confers broad neutralization against SARS-CoV-2 and circulating variants / Z. Yang, Y. Wang, Y. Jin [et al.] // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. — 2021. — Vol. 6. — № 1. — Art. 378. DOI: 10.1038/s41392-021-00810-1.
282. An engineered bispecific nanobody in tetrameric secretory IgA format confers broad neutralization against SARS-CoV-1&2 and most variants / W. Zeng, X. Jia, X. Chi [et al.] // *International Journal of Biological Macromolecules*. — 2023. — Vol. 253. — № Pt 3. — Art. 126817. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2023.126817.
283. Warren, D. J. Preparation of highly efficient electrocompetent *Escherichia coli* using glycerol/mannitol density step centrifugation / D. J. Warren // *Analytical Biochemistry*. — 2011. — Vol. 413. — № 2. — P. 206-207. DOI: 10.1016/j.ab.2011.02.036.
284. Baral, T. N. Single-domain antibodies and their utility / T. N. Baral, R. MacKenzie, M. Arbabi Ghahroudi // *Current Protocols in Immunology*. — 2013. — Vol. 103. — 2.17.1-2.17.57. DOI: 10.1002/0471142735.im0217s103.
285. Chomczynski, P. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction / P. Chomczynski, N. Sacchi // *Analytical Biochemistry*. — 1987. — Vol. 162. — № 1. — P. 156-159. DOI: 10.1016/0003-2697(87)90021-2.
286. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology / E. Pardon, T. Laeremans, S. Triest [et al.] // *Nature protocols*. — 2014. — Vol. 9. — № 3. — P. 674-693. DOI: 10.1038/nprot.2014.039.
287. High affinity nanobodies block SARS-CoV-2 spike receptor binding domain interaction with human angiotensin converting enzyme / T. J. Esparza, N. P. Martin, G. P. Anderson [et al.] // *Scientific Reports*. — 2020. — Vol. 10. — № 1. — Art. 22370. DOI: 10.1038/s41598-020-79036-0.

288. Laemmli, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature*. — 1970. — Vol. 227. — № 5259. — P. 680-685. DOI: 10.1038/227680a0.
289. Efficient generation of monoclonal antibodies from single human B cells by single cell RT-PCR and expression vector cloning / T. Tiller, E. Meffre, S. Yurasov [et al.] // *Journal of Immunological Methods*. — 2008. — Vol. 329. — № 1-2. — P. 112-124. DOI: 10.1016/j.jim.2007.09.017.
290. Calcium phosphate transfection generates mammalian recombinant cell lines with higher specific productivity than polyfection / S. Chenuet, D. Martinet, N. Besuchet-Schmutz [et al.] // *Biotechnology and Bioengineering*. — 2008. — Vol. 101. — № 5. — P. 937-945. DOI: 10.1002/bit.21972.
291. Serial Llama Immunization with Various SARS-CoV-2 RBD Variants Induces Broad Spectrum Virus-Neutralizing Nanobodies / P. P. Solodkov, A. M. Najakshin, N. A. Chikaev [et al.] // *Vaccines*. — 2024. — Vol. 12. — № 2. — Art. 129. DOI: 10.3390/vaccines12020129.
292. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of *Lama glama* / R. van der Linden, B. de Geus, W. Stok [et al.] // *Journal of Immunological Methods*. — 2000. — Vol. 240. — № 1. — P. 185-195. DOI: 10.1016/S0022-1759(00)00188-5.
293. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs) / D. R. Maass, J. Sepulveda, A. Pernthaner, C. B. Shoemaker // *Journal of immunological methods*. — 2007. — Vol. 324. — № 1-2. — P. 13-25. DOI: 10.1016/j.jim.2007.04.008.
294. A single-step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers / D. Kastelic, S. Frković-Grazio, D. Baty [et al.] // *Journal of Immunological Methods*. — 2009. — Vol. 350. — № 1. — P. 54-62. DOI: 10.1016/j.jim.2009.08.016.
295. Antibody repertoire development in camelids : Antibody repertoire development / E. De Genst, D. Saerens, S. Muyldermans, K. Conrath // *Developmental & Comparative Immunology*. — 2006. — Vol. 30. — № 1. — P. 187-198. DOI: 10.1016/j.dci.2005.06.010.
296. Saerens, D. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics : Anti-infectives/New technologies / D. Saerens, G. H. Ghasabeh, S. Muyldermans // *Current Opinion in Pharmacology*. — 2008. — Vol. 8. — № 5. — P. 600-608. DOI: 10.1016/j.coph.2008.07.006.
297. Fusion of the mouse IgG1 Fc domain to the VHH fragment (ARP1) enhances protection in a mouse model of rotavirus / G. Günaydin, S. Yu, T. Gräslund [et al.] // *Scientific Reports*. — 2016. — Vol. 6. — № 1. — Art. 30171. DOI: 10.1038/srep30171.
298. Tamura, K. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11 / K. Tamura, G. Stecher, S. Kumar // *Molecular Biology and Evolution*. — 2021. — Vol. 38. — № 7. — P. 3022-3027. DOI: 10.1093/molbev/msab120.

299. Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern / A. A. Gorchakov, S. V. Kulemzin, S. V. Guselnikov [et al.] // *Cell Discovery*. — 2021. — Vol. 7. — № 1. — Art. 96. DOI: 10.1038/s41421-021-00340-8.
300. A potent, broadly neutralizing human monoclonal antibody that efficiently protects hACE2-transgenic mice from infection with the Wuhan, BA.5, and XBB.1.5 SARS-CoV-2 variants / S. V. Guselnikov, K. O. Baranov, S. V. Kulemzin [et al.] // *Frontiers in Immunology*. — 2024. — Vol. 15. — Art. 1442160. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1442160.
301. Comprehensive mapping of mutations in the SARS-CoV-2 receptor-binding domain that affect recognition by polyclonal human plasma antibodies / A. J. Greaney, A. N. Loes, K. H. D. Crawford [et al.] // *Cell Host & Microbe*. — 2021. — Vol. 29. — № 3. — P. 463-476.e6. DOI: 10.1016/j.chom.2021.02.003.
302. Walker, L. M. Passive immunotherapy of viral infections: “super-antibodies” enter the fray / L. M. Walker, D. R. Burton // *Nature Reviews. Immunology*. — 2018. — Vol. 18. — № 5. — P. 297-308. DOI: 10.1038/nri.2017.148.
303. Vaccine-Induced Antibody Responses against SARS-CoV-2 Variants-Of-Concern Six Months after the BNT162b2 COVID-19 mRNA Vaccination / P. Jalkanen, P. Kolehmainen, A. Haveri [et al.] // *Microbiology Spectrum*. — Vol. 10. — № 2. — Art. e02252-21. DOI: 10.1128/spectrum.02252-21.
304. Affinity maturation of SARS-CoV-2 neutralizing antibodies confers potency, breadth, and resilience to viral escape mutations / F. Muecksch, Y. Weisblum, C. O. Barnes [et al.] // *Immunity*. — 2021. — Vol. 54. — № 8. — P. 1853-1868.e7. DOI: 10.1016/j.immuni.2021.07.008.
305. Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2 / C. Gaebler, Z. Wang, J. C. C. Lorenzi [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 591. — № 7851. — P. 639-644. DOI: 10.1038/s41586-021-03207-w.
306. Maturation and persistence of the anti-SARS-CoV-2 memory B cell response / A. Sokal, P. Chappert, G. Barba-Spaeth [et al.] // *Cell*. — 2021. — Vol. 184. — № 5. — P. 1201-1213.e14. DOI: 10.1016/j.cell.2021.01.050.
307. Anti-SARS-CoV-2 receptor-binding domain antibody evolution after mRNA vaccination / A. Cho, F. Muecksch, D. Schaefer-Babajew [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 600. — № 7889. — P. 517-522. DOI: 10.1038/s41586-021-04060-7.
308. Naturally enhanced neutralizing breadth against SARS-CoV-2 one year after infection / Z. Wang, F. Muecksch, D. Schaefer-Babajew [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 595. — № 7867. — P. 426-431. DOI: 10.1038/s41586-021-03696-9.
309. Burton, D. R. Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design / D. R. Burton, L. Hangartner // *Annual review of immunology*. — 2016. — Vol. 34. — P. 635-659. DOI: 10.1146/annurev-immunol-041015-055515.

310. Crotty, S. Hybrid immunity / S. Crotty // *Science*. — 2021. — Vol. 372. — P. 1392-1393. DOI: 10.1126/science.abj2258.
311. mRNA vaccine-elicited antibodies to SARS-CoV-2 and circulating variants / Z. Wang, F. Schmidt, Y. Weisblum [et al.] // *Nature*. — 2021. — Vol. 592. — № 7855. — P. 616-622. DOI: 10.1038/s41586-021-03324-6.
312. Broadly neutralizing antibodies targeting a conserved silent face of spike RBD resist extreme SARS-CoV-2 antigenic drift / G. Song, M. Yuan, H. Liu [et al.] // *Cell Reports*. — 2025. — Vol. 44. — № 7. — Art. 115948. DOI: 10.1016/j.celrep.2025.115948.