

На правах рукописи

Солодков Павел Павлович

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

1.5.3. Молекулярная биология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск, 2026

Работа выполнена в лаборатории иммуногенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск.

Научный руководитель: Таранин Александр Владимирович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией иммуногенетики, Институт молекулярной и клеточной биологии Сибирского отделения РАН, г. Новосибирск

Оппоненты: Локтев Валерий Борисович, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник отдела молекулярной вирусологии флавивирусов и вирусных гепатитов, Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, Новосибирская обл., р.п. Кольцово

Клотченко Сергей Анатольевич, кандидат биологических наук, заведующий лабораторией иммунобиологических технологий, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Санкт-Петербург

Ведущее учреждение: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, г. Москва

Защита состоится: 16 декабря 2026 г. в 10:00 на заседании диссертационного совета 24.1.082.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук при ФГБУН Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН (630090, Новосибирск, пр. академика Лаврентьева, 8/2, тел. (383)-373-02-49, e-mail: ovant@mcb.nsc.ru). С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН: https://www.mcb.nsc.ru/diss_council/autoref

Автореферат разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
кандидат биологических наук

О.В. Антоненко

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. 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), обусловленная коронавирусом-2, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром (SARS-CoV-2), оказала сильное негативное воздействие на социальные и экономические сферы, что подчеркивает необходимость разработки универсальных, быстро адаптируемых биотерапевтических подходов. После окончания пандемии 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). 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) способен взаимодействовать с рецептором организма-хозяина — ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2). 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), которые представляют собой переменные домены (VHH) антител, состоящих только из тяжелых цепей (HCAb). Такие HCAb (IgG2 и IgG3 изотипов) продуцируются В-клетками верблюдовых наряду с полноразмерными антителами (IgG1 изотипа). Однодоменные антитела обладают небольшим размером и эффективным потенциалом для мультимеризации, связывают нестандартные эпитопы и рассматриваются как перспективные кандидаты для профилактики и терапии SARS-CoV-2, а также других высокопатогенных вирусных инфекций.

Степень разработанности проблемы. Появление новых вариантов SARS-CoV-2, прежде всего линии Омикрон, существенно снизило активность терапевтических препаратов, разработанных на ранних этапах

пандемии. В связи с этим особый интерес представляет поиск широко нейтрализующих антител (bnAb), распознающих консервативные эпитопы. Вместе с тем механизмы формирования широко нейтрализующих VHH и подходы к их получению остаются недостаточно изученными, что определяет необходимость дальнейших исследований в данном направлении.

Цель 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 и практическая ценность. 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.

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*.

Апробация работы. Результаты работы были представлены на 59-й Международной научной студенческой конференции. - Новосибирск, 2021; VIII Международной научно-практической конференции молодых ученых: биофизиков, биотехнологов, молекулярных биологов и вирусологов «OpenBio-2021», наукоград Кольцово (Новосибирская область); школе-конференции «Геномные технологии в получении вирус-нейтрализующих антител», г. Новосибирск; X Международной конференции молодых ученых: биоинформатиков, биотехнологов, биофизиков, вирусологов и молекулярных биологов «OpenBio-2023», наукоград Кольцово (Новосибирская область); научной школе-конференции для молодых ученых «BioTop-2024», г. Новосибирск; научно-практической конференции с международным участием «Генетика-2025», г. Москва.

Вклад автора. Автор участвовал во всех этапах исследования, включая планирование и выполнение экспериментальных работ, анализ и интерпретацию полученных результатов, подготовку публикаций. Автором 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, а также исследование кинетики взаимодействия антител с RBD и эпитопное картирование.

Структура диссертации. 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.

Публикации. По результатам и проблематике настоящего исследования опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в Web of Science и Scopus, 5 тезисов и 3 патента РФ.

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).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Обзор литературы содержит 12 разделов и заключение. Приведен анализ современного состояния исследований SARS-CoV-2, а также подходов к профилактике и терапии COVID-19. В первых разделах охарактеризованы структура и организация генома SARS-CoV-2, строение и функциональные особенности S-белка и RBD, взаимодействие RBD с рецептором ACE2, а также основные механизмы проникновения вируса в клетки. Следующие разделы посвящены формированию врожденного и адаптивного иммунного ответа на SARS-CoV-2 и роли антител в противовирусной защите. Рассмотрены инструменты пассивной иммунотерапии COVID-19, а также методы получения mAb. Проанализированы основные мишени гуморального ответа и методы оценки активности антител. Отдельное внимание уделено эволюции SARS-CoV-2 и влиянию мутаций на иммунное ускользание вируса от действия антител. Проанализированы основные классы антител, распознающих различные эпитопы RBD, и закономерности изменения их активности при появлении новых вариантов вируса. Проанализированы зарегистрированные и находящиеся на стадии клинической разработки препараты антител против SARS-CoV-2 и причины снижения их эффективности вследствие эволюции вируса. Последний раздел посвящен однодоменным антителам, или наноантителам (Nb, nanobody). Охарактеризованы их структурные и функциональные особенности. Рассмотрены подходы к получению VHH, известные VHH против SARS-CoV-2, их кластеризация по эпитопам RBD, а также возможности использования VHH в составе мультивалентных конструкций. В заключении обзора сформулированы основные нерешенные проблемы, связанные с продолжающейся эволюцией SARS-CoV-2 и перспективы использования однодоменных антител, ориентированных на консервативные и труднодоступные эпитопы RBD.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали штаммы *E. coli*, фаг VCSM13, клеточные линии HEK293T, а также ламу (*Lama glama*) и сирийских хомячков (*Mesocricetus auratus*). Для функциональных исследований применяли аутентичный вирус SARS-CoV-2 и псевдотипированные лентивирусные частицы, несущие S-белки различных вариантов SARS-CoV-2, а также SARS-CoV. Получение рекомбинантных белков, плазмидных конструкций и клеточных препаратов осуществляли с использованием стандартных методов молекулярного клонирования, экспрессии и очистки белков. Для получения VHH проводили иммунизацию ламы рекомбинантными RBD, выделение РНК периферических В-лимфоцитов, получение библиотек VHH, а также аффинную селекцию по технологии фагового дисплея. Полученные VHH и производные конструкции на их основе, включая тандемные гетеродимеры и Fc-димеры, очищали и характеризовали с использованием ИФА, проточной

цитометрии (FACS) и люминометрии. Аффинность взаимодействия антител с RBD и эпитопную конкуренцию оценивали методом биослойной интерферометрии (BLI). Защитную эффективность наиболее перспективных кандидатов оценивали *in vivo* на сирийских хомячках. Полученные экспериментальные данные анализировали с использованием методов статистической обработки. Все исследования с участием человека и животных выполняли в соответствии с утвержденными этическими протоколами.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

В первом разделе результатов описывается иммунизация ламы RBD уханьского варианта (RBD Wu) SARS-CoV-2, получение иммунной библиотеки VHH-последовательностей в фагмидном векторе рHEN4-НН, аффинное обогащение с использованием технологии фагового дисплея, а также оценка кинетических и нейтрализующих свойств полученных VHH и олигомерных конструкций на их основе, включая тандемные гетеродимеры (VHH1-VHH2) и гомодимеры с Fc-фрагментом IgG1 человека (VHH-Fc). С целью отбора VHH, обладающих перекрестной нейтрализующей активностью, были получены две иммунные библиотеки VHH-последовательностей (в 2020 и 2022 гг.). Стратегии иммунизации и селекции для этих библиотек принципиально различались, что отразилось на свойствах сформированных репертуаров (Рисунок 1) (Solodkov et al., 2024).

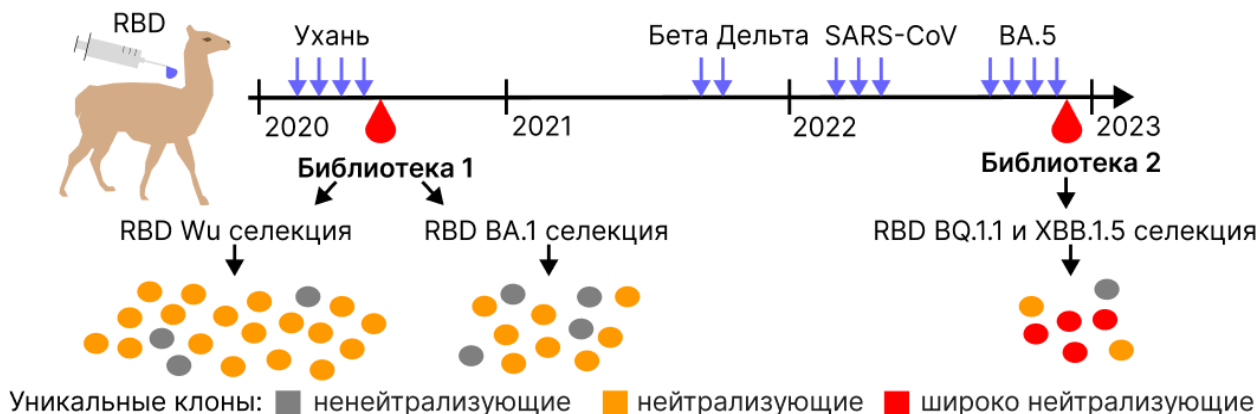


Рисунок 1. Схема последовательной иммунизации ламы различными вариантами RBD SARS-CoV-2

Аффинная селекция библиотеки 1 с использованием дифференциального скрининга привела к отбору 20 уникальных VHH, связывающих RBD Wu (Рисунок 2, А). Из них наиболее эффективными являлись три клон — H5, G7 и 2F4, связывающие две независимые области RBD по результатам BLI-анализа конкурентного связывания. Установлено, что Nb H5, G7 и 2F4 связывают RBD Wu с $K_D < 1$ пМ, 0,17 нМ и 0,39 нМ соответственно (Рисунок 2, Б). На следующем этапе на основе клонов H5, G7,

2F4 были получены олигомерные конструкции VNN1-VNN2 и VNN-Fc (Рисунок 2, В). Анализ их нейтрализующих свойств был проведен с использованием S-псевдотипированной лентивирусной системы на основе уханьского варианта SARS-CoV-2 (Рисунок 2, Г). Использование гомодимеров VNN-Fc показало примерно десятикратное улучшение IC_{50} , а комбинированное применение VNN различной эпитопной специфичности в составе коктейлей, а также использование tandemных гетеродимеров по сравнению с мономерными формами не приводило к существенному изменению значений IC_{50} .

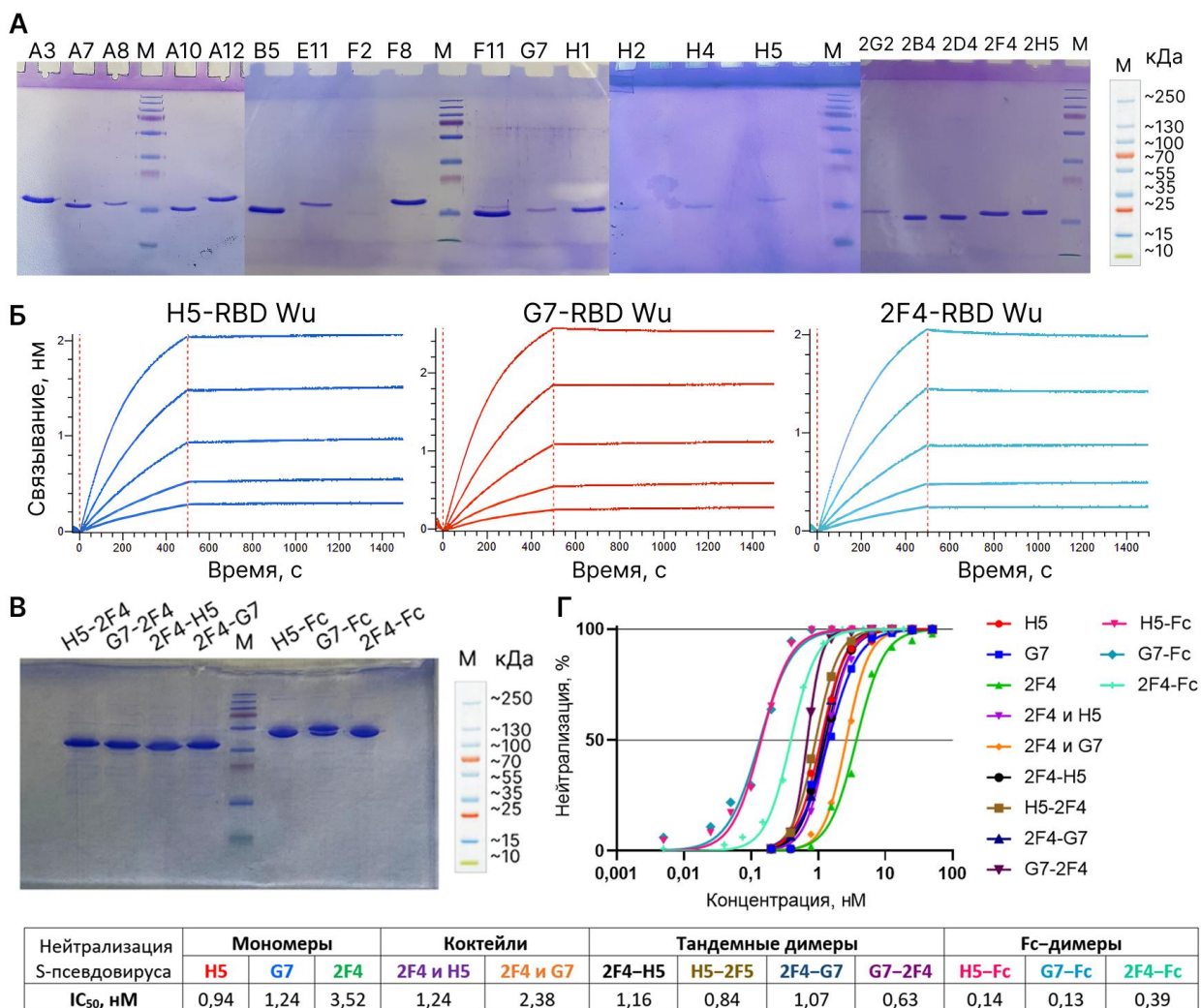


Рисунок 2. **А.** SDS-PAGE Nb библиотеки 1, полученных против RBD Wu. **Б.** Сенсограммы BLI-анализа, отражающие взаимодействие VNN-RBD Wu. Данные констант аффинности были получены с помощью программного обеспечения Data Analysis HT 11.1 Software. **В.** SDS-PAGE полученных белковых конструкций на основе VNN. **Г.** Результаты анализа нейтрализующей активности против псевдотипированного лентивируса на основе уханьского варианта S-белка SARS-CoV-2 с использованием полученных конструкций, содержащих домены VNN

Появление новых мутантных вариантов SARS-CoV-2 потребовало провести оценку спектра действия полученных VNN. В анализе

нейтрализации S-псевдовирусов на основе вариантов SARS-CoV-2, актуальных в период 2021–2022 гг. (Бета, Дельта, Лямбда, Каппа и ВА.1) полученные VHH не проявили широкую активность (Рисунок 3), что согласуется с данными о резком снижении эффективности антител, индуцированных уханьским вариантом вируса, включая одобренные для экстренного применения (Dejnirattisai et al., 2022).

Nb \ Вариант	Вариант					IC ₅₀ , нМ
	Ухань	Дельта	Лямбда	Каппа	ВА.1	
H5	0,94	0,87	Н/Н	2,3	Н/Н	< 1
G7	1,24	10,2	Н/Н	Н/Н	Н/Н	1–3
2F4	3,52	3,58	3,5	2	Н/Н	3–5
						5–15
						Н/Н

Рисунок 3. Нейтрализующая активность Nb H5, G7 и 2F4 в отношении псевдовирусов, несущих S-белки вариантов SARS-CoV-2: Ухань, Дельта, Лямбда, Каппа и ВА.1. Н/Н — нейтрализация не наблюдалась

3.2. Поиск широко нейтрализующих антител

С целью выявления VHH более широкого спектра действия мы провели в библиотеке 1 дополнительный этап аффинной селекции, используя в качестве мишени RBD варианта ВА.1 (Рисунок 1). В результате были отобраны 4 VHH-клона с уникальными последовательностями и широким спектром связывания, однако эти последовательности кодировали VHH со слабой нейтрализующей активностью или вовсе без нее. 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 RBD Wu. Для увеличения частоты таких VHH мы провели дополнительную серию последовательных иммунизаций этой ламы (Рисунок 1).

После окончательной иммунизации была создана библиотека 2, которую обогащали клонами, перекрестно-реагирующими с RBD вариантов BQ.1.1 и ХВВ.1.5. В результате было выявлено 11 клонов, шесть из которых имели уникальные последовательности VHH (9A4, 9A7, 9A21, 9A57, 9A58, 9A80). Дополнительно была применена схема альтернативной аффинной селекции для отбора клонов, конкурирующих за связывание RBD с референсным bnAb человека SA55 (Cao et al., 2022), и были выявлены еще 3 уникальных VHH-клона (9D48, 9D60 и 9D66). На основе клонов библиотеки 2 получены рекомбинантные Nb, а также VHH-Fc форматы наиболее эффективных из них (Рисунок 4, А). В BLI-анализе Nb 9A7, 9A21, 9A80 и 9D60 связывали RBD всех протестированных вариантов SARS-CoV-2 (K_D $3,19 \times 10^{-9}$ – $1,37 \times 10^{-10}$ М) (Рисунок 4, Б). Результаты анализа эпитопной конкуренции полученных VHH показали независимое связывание клонов библиотеки 2

друг с другом за исключением ассиметричной конкуренции 9A21 и 9A58 (Рисунок 4, В).

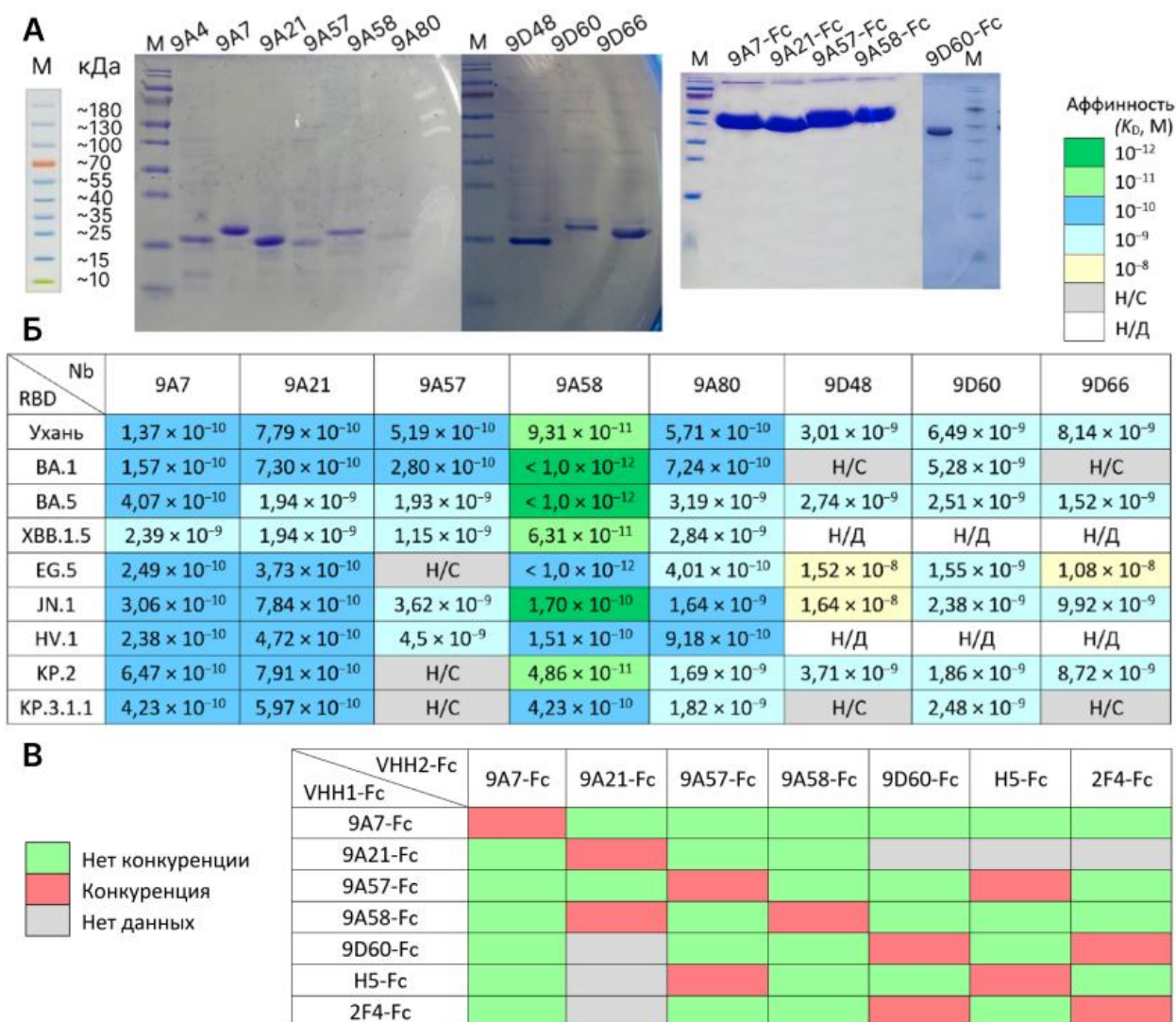


Рисунок 4. А. SDS-PAGE Nb и VHH-Fc библиотеки 2. **Б.** Аффинность Nb библиотеки 2 к RBD различных вариантов SARS-CoV-2. H/C — связывание не наблюдалось, H/D — нет данных. **В.** BLI-анализ конкурентного связывания VHH-Fc на основе клонов библиотеки 2 (9A7, 9A21, 9A57, 9A58 и 9D60), а также двух VHH-Fc на основе клонов библиотеки 1 (H5-Fc и 2F4-Fc)

Оценку потентности полученных Nb библиотеки 2 и димеров VHH-Fc на их основе проводили с использованием широкой панели S-псевдовирuсов на основе вариантов SARS CoV-2, а также SARS-CoV (Рисунок 5). Nb проявили в основном умеренную или слабую нейтрализующую активность. Димеризация VHH с использованием Fc-фрагмента hIgG1 в данных тестах позволила достичь существенного улучшения показателей нейтрализующей активности (по среднему геометрическому отношений: в 2,4 раза для 9A7-Fc, в 2,6 раза для 9A21-Fc, в 37 раз для 9A57-Fc и в 3,9 раза для 9A58 Fc). 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 IC₅₀ 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 ХЕС, NB.1.8.1 и XFG (IC_{50} 2,3–4,9 нМ). Таким образом, было установлено, что 9A7-Fc, 9A58-Fc и 9D60-Fc являются широко нейтрализующими.

Luminoskan													
Вариант	SARS-CoV	Wu	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
Ab													
9A4	Н/Д	8	Н/Д	Н/Д	0,5	14,9	Н/Н	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
9A7	Н/Д	3,3	9	14,7	5,1	14,1	11,4	16,8	9,2	35,7	27,4	2,8	Н/Д
9A21	3,9	16,9	3,6	12,6	4,1	9,2	15,2	50	18	43,5	57,5	5	Н/Д
9A57	Н/Н	29,4	Н/Д	Н/Д	4,4	11,2	22,5	Н/Д	7,1	Н/Н	Н/Д	Н/Д	Н/Д
9A58	10,5	10,2	1,8	6,7	3,9	21,2	12,5	15,9	13,5	42,4	16,5	5,1	Н/Д
9A80	Н/Д	Н/Н	Н/Н	Н/Н	Н/Н	Н/Н	Н/Н	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д
9A7-Fc	0,2	1	2	6,4	3,9	13,1	5,9	5,3	5,9	8,4	7,9	1,2	0,9
9A21-Fc	1	1,9	1,2	2,6	3,7	18,9	18,1	10,2	9,5	25,8	11,1	0,9	Н/Д
9A57-Fc	Н/Н	7,9	1	0,8	0,01	0,05	1,7	0,4	0,5	Н/Н	2	0,1	Н/Н
9A58-Fc	0,3	1	1	1,3	1,4	17,7	8,1	6,6	5,4	9,2	3	1	0,9
SA55	1,3	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	0,07	0,08	0,09	0,08	Н/Д	0,07	Н/Д

FACS							
Вариант	EG.5	JN.1	KP.2	KP.3.1.1	ХЕС	NB.1.8.1	XFG
Ab							
9A7-Fc	7,11	1,1	1,3	1,4	2,7	2,3	0,9
9A57-Fc	Н/Н	0,1	Н/Н	Н/Н	Н/Н	Н/Н	Н/Н
9A58-Fc	8,5	1,5	0,8	1,7	1,3	0,7	1,7
9D60-Fc	Н/Д	Н/Д	Н/Д	Н/Д	2,3	4,9	3,1
SA55	0,1	0,05	0,05	0,05	0,03	0,05	Н/Д

IC_{50} , нМ
< 1,1
1,1–3
3,1–5
5,1–15
> 15
Н/Н
Н/Д

Рисунок 5. Активность Nb, VHH-Fc и референсного mAb SA55 в тесте на нейтрализацию S-псевдовирuses на основе вариантов SARS-CoV-2, а также SARS-CoV. Н/Н — нейтрализация не наблюдалась, Н/Д — нет данных

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

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей SARS-CoV-2-специфичных VHH в библиотеках 1 и 2 показал, что BA.1-селектированные VHH из библиотеки 1 имели 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 6, А; стр. 10). Два клона VHH из библиотеки 2 — 9A7 и 9D60 (не представлен) — также вошли в кластер VHH последовательностей библиотеки 1 и, вероятно, являются результатом соматического созревания VHH, индуцированных 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 они были индуцированы, но высокий уровень отличий от известных геномных последовательностей VHH-генов ламы (15–31% соматических мутаций) указывает на их длительное аффинное созревание (Рисунок 6, Б; стр. 10).

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 (Gorchakov et al., 2021). Вторая панель (iC1–iC5) была получена в 2022 г. от реконвалесцента, ранее вакцинированного препаратом «Спутник V» (Guselnikov et al., 2024).

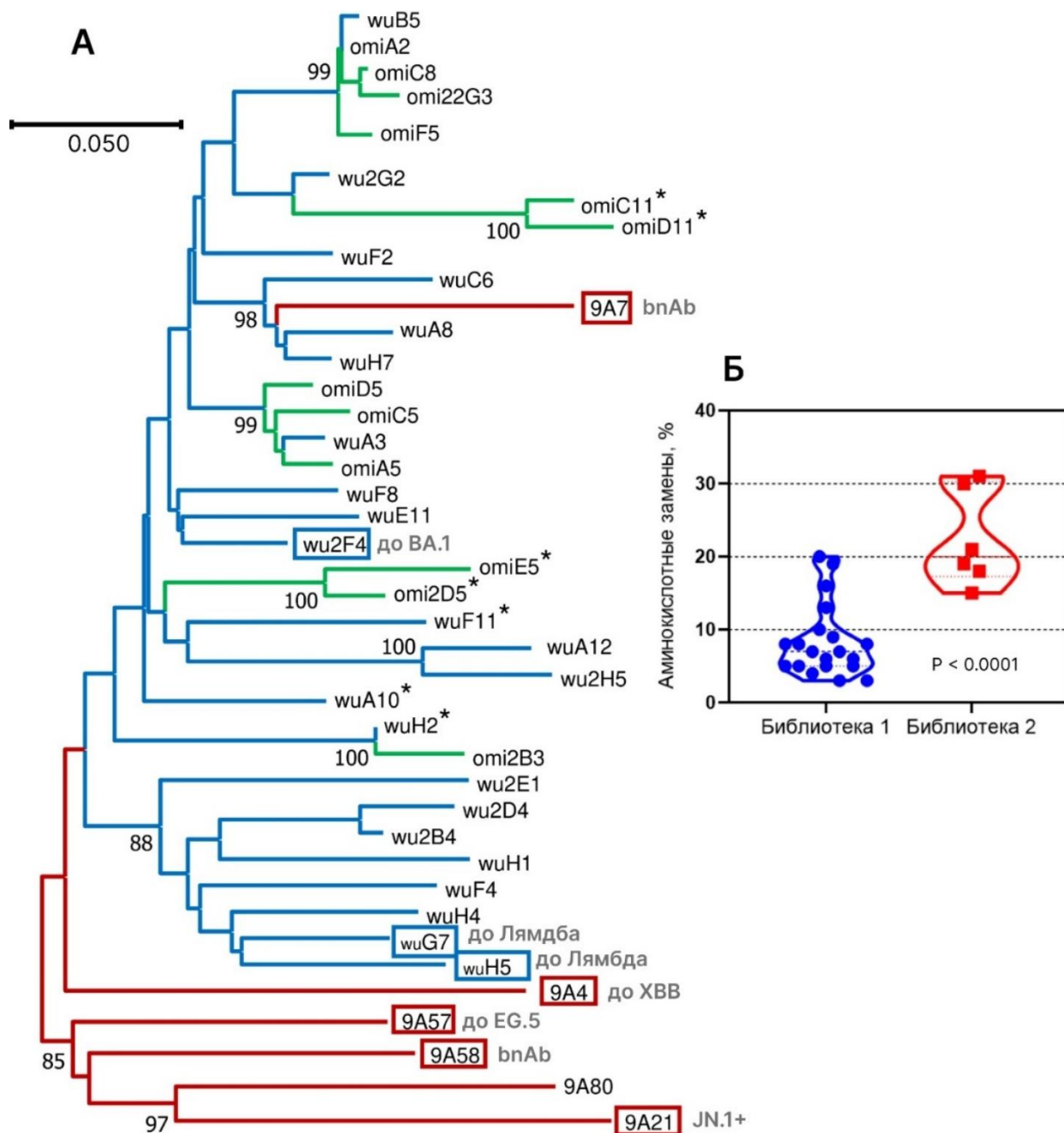


Рисунок 6. А. Дендрограмма сходства нуклеотидных последовательностей VNN. Эффективно нейтрализующие клоны обведены прямоугольниками. Клоны со слабой или отсутствующей нейтрализующей активностью отмечены звездочкой. Синим и зеленым цветами обозначены клоны библиотеки 1 против вариантов Ухань и BA.1 соответственно; красным — клоны библиотеки 2. **Б.** Процент аминокислотных замен в идентифицированных VNN в сравнении с последовательностями предсказанных зародышевых предшественников

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. Fc-форматы полученных нами VHH по своим характеристикам не уступают mAb человека, а в ряде случаев превосходят их.

Активность *in vivo* mAb, а также Fc-димеров на основе VHH оценивали на сирийских хомячках в профилактическом и терапевтическом режимах введения (Рисунок 7, А).

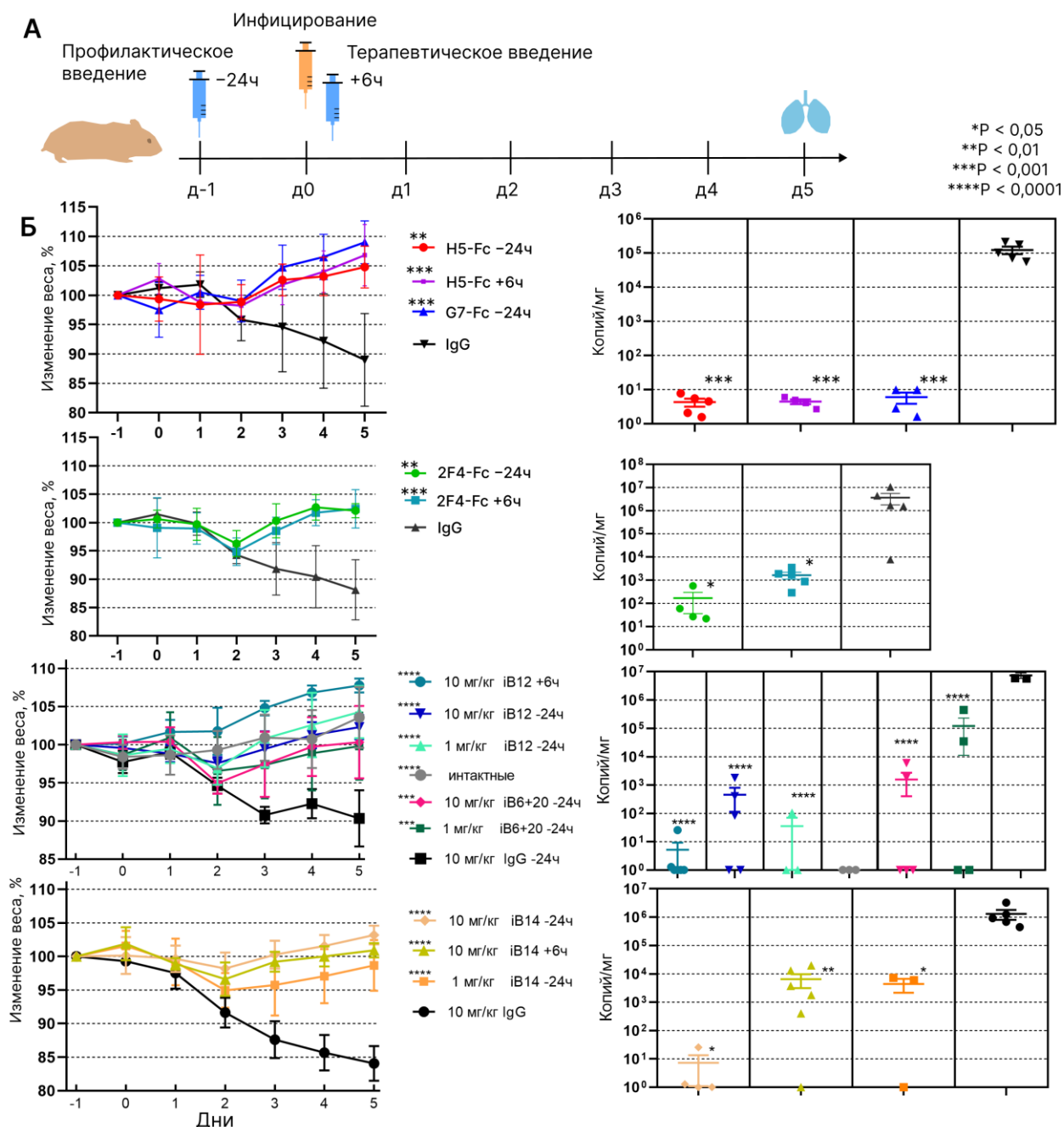


Рисунок 7. Защитная эффективность антител на сирийских хомячках. **А.** Схема эксперимента. **Б.** Динамика относительной массы тела (слева) и уровень вирусной РНК (справа) в группах профилактики и терапии

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. Доза вируса при заражении для всех экспериментов составила 1×10^4 БОЕ. Введение mAb и VHH-Fc приводило к выраженному защитному эффекту (Рисунок 7, 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 также наблюдалась положительная динамика течения инфекции. Таким образом, профиль защитной активности VHH-Fc *in vivo* сопоставим с mAb человека.

3.5. Картирование эпитопов

Картирование эпитопов полученных VHH и mAb человека осуществляли методом конкурентного BLI-анализа. Исследуемые антитела тестировали на способность конкурировать с панелью референсных mAb за связывание с RBD, для которых другими научными группами ранее были расшифрованы трехмерные структуры комплексов с RBD (Рисунок 8). 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) (Park et al., 2022), бамланивимаб (класс 2) (Jones et al., 2021), бептеловимаб и сотровимаб (класс 3) (Magnus et al., 2022; Westendorf et al., 2022), SA55 (класс 1/4) (Cao et al., 2022), S2X259 (класс 4) (Tortorici et al., 2021) и S2H97 (класс 5) (Starr et al., 2021).

VHH H5 и 9A57 относятся к области распознавания, характерной для антител классов 1 и 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. VHH, специфичные к области класса 3, 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

(классы 1/2, 4 и 5). В то же время, эпитоп iC1 частично перекрывается с эпитопами антител классов 1, 2 и 3.

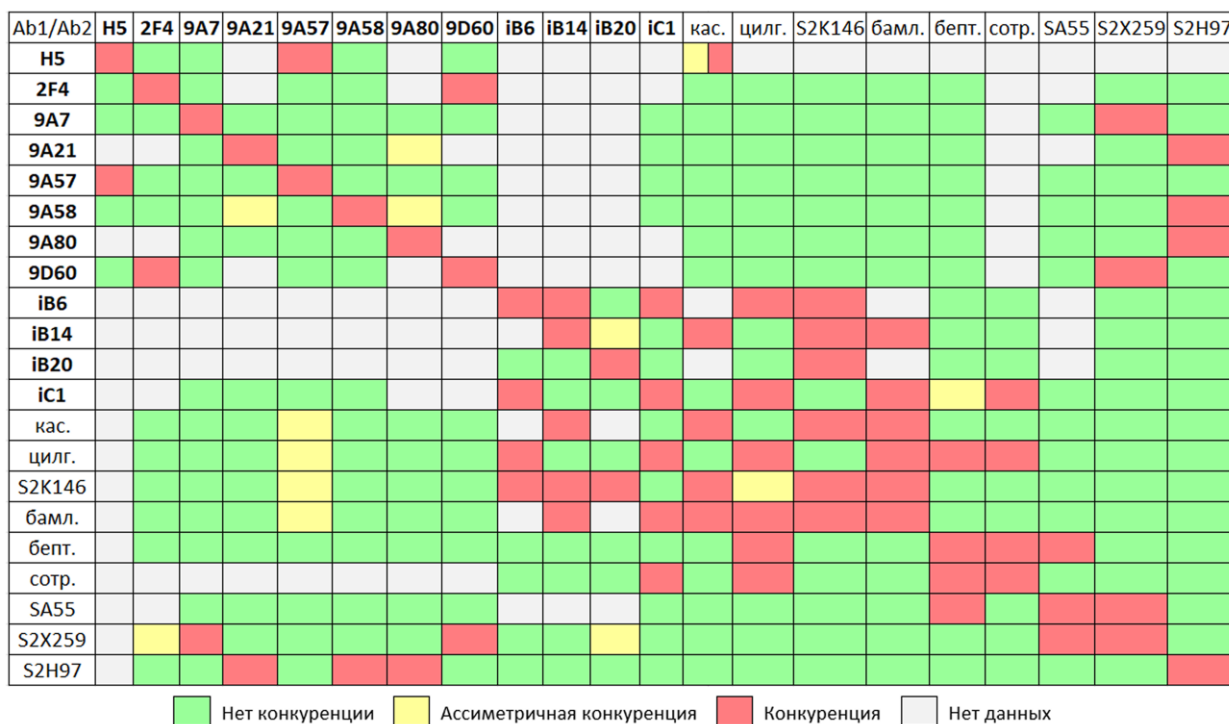


Рисунок 8. Матрица конкурентного BLI-анализа полученных VHH-Fc и mAb человека с референсными антителами

Конкурентный BLI-анализ связывания VHH с RBD в присутствии рекомбинантного рецептора ACE2 позволил установить, что VHH 9A7, 9D60 и 9A58, нацеленные на эпитопы классов 4 и 5, не блокируют взаимодействие RBD-ACE2 (Рисунок 9).

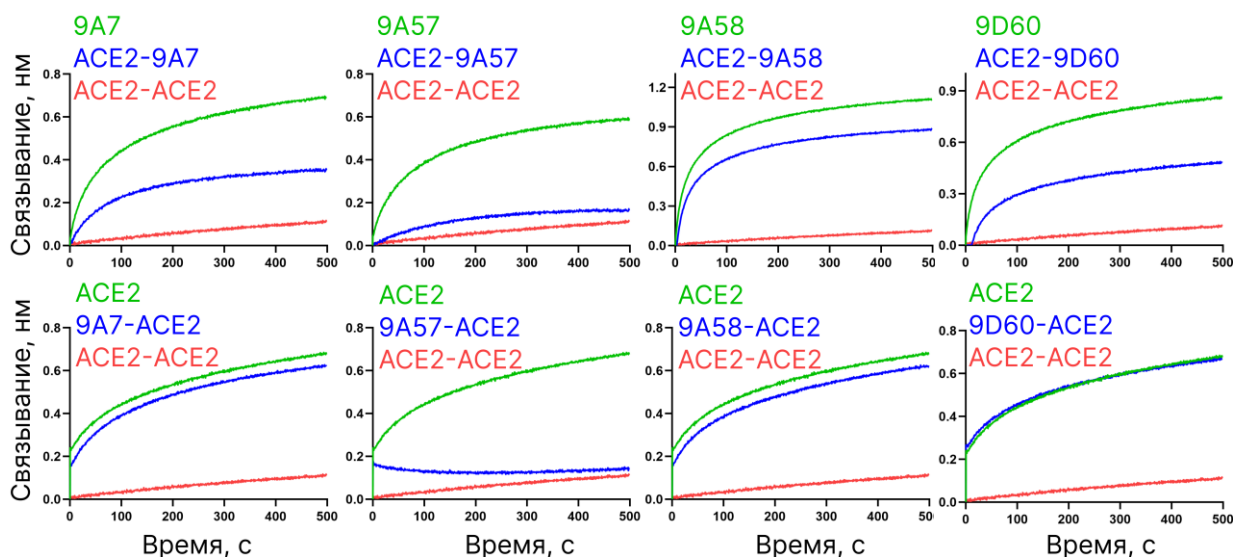


Рисунок 9. Сенсограммы конкурентного BLI-анализа связывания 9A7-Fc, 9A57-Fc, 9A58-Fc и 9D60-Fc с ACE2

В то же время VHH 9A57, специфичный к области эпитопов антител классов 1 и 2, перекрывающих рецептор-связывающий мотив (RBM),

блокировал 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. Таким образом, 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.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В главе обсуждены результаты разработки стратегии получения однодоменных антител широкого спектра действия против SARS-CoV-2, основанной на последовательной иммунизации и дифференциальном скрининге.

В разделе 4.1 показано, что иммунизация исходным уханьским вариантом RBD преимущественно формировала ответ против иммунодоминантных эпитопов RBM, что обеспечивало высокую нейтрализующую активность, но ограничивало широту действия антител. Целенаправленное блокирование доминирующего эпитопа при селекции позволило выявить дополнительные VHH. Последовательная иммунизация эволюционно разошедшимися вариантами RBD SARS-CoV-2 и SARS-CoV привела к формированию репертуара с более широкой нейтрализующей активностью и позволила получить три широко нейтрализующих VHH против независимых эпитопов — 9A7, 9A58 и 9D60.

В разделе 4.2 рассмотрена роль последовательной иммунизации и соматического гипермутагенеза. Полученные данные свидетельствуют о том, что длительная антигенная стимуляция способствует как дальнейшему аффинному созреванию уже индуцированных клонов, так и формированию новых линий, направленных на консервативные участки RBD.

В разделе 4.3 обсуждено, что VHH-Fc способны проявлять сопоставимую с mAb аффинность и нейтрализующую активность *in vitro* и *in vivo*. При этом широко нейтрализующие VHH библиотеки 2 сохранили активность против поздних вариантов SARS-CoV-2, тогда как подавляющее большинство классических mAb человека, в том числе классы 4 и 5, в значительной степени утратили ее с появлением вариантов линии Омикрон. Полученные результаты подтверждают перспективность VHH для разработки препаратов широкого спектра действия.

В разделе 4.4 установлена связь между эпитопной специфичностью и широтой нейтрализации. Антитела, направленные на иммунодоминантные эпитопы RBM, характеризовались высокой активностью, но большей чувствительностью к мутационному ускользанию. В то же время VHH 9A7, 9A58 и 9D60 распознавали консервативные участки RBD, соответствующие эпитопам классов 4 и 5. Наличие нескольких неконкурирующих VHH создает

основу для разработки мультиспецифичных конструкций с повышенным барьером к появлению резистентных вариантов вируса.

В разделе 4.5 сформулировано основное заключение. Используемая в работе стратегия позволила получить широко нейтрализующие VHH, сохраняющие активность против актуальных вариантов SARS-CoV-2. Полученная панель VHH, перекрывающая несколько независимых эпитопов RBD, создает основу для конструирования мультиспецифичных терапевтических молекул нового поколения и адаптации предложенного подхода к другим быстро эволюционирующим вирусным 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.

ОСНОВНЫЕ ПУБЛИКАЦИИ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

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 Н5 и его производное Н5-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 рецепторсвязывающий 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.