

На правах рукописи

ЩЕБЛЯКОВ
Дмитрий Викторович

**УНИВЕРСАЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКАЯ ПЛАТФОРМА ДЛЯ СОЗДАНИЯ СРЕДСТВ
ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ НА ОСНОВЕ
ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ**

3.2.7 – Иммунология (биологические науки)
1.5.6. – Биотехнология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2024 год

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России)

Научный консультант:

Логунов Денис Юрьевич – доктор биологических наук, академик РАН, заместитель директора ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России

Официальные оппоненты:

Кудлай Дмитрий Анатольевич, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет).

Костинов Михаил Петрович, член-корреспондент РАН, доктор медицинских наук, профессор, заведующий лабораторией вакцинопрофилактики и иммунотерапии аллергических заболеваний Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

Алешкин Андрей Владимирович, член-корреспондент РАН, доктор биологических наук, профессор РАН, заместитель директора Федерального бюджетного учреждения науки “Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Г. Н. Габричевского” Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «28» марта 2025 г. в 11 часов на заседании Диссертационного совета 21.1.018.03 при федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра www.gamaleya.org

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

доктор биологических наук

Ермолаева Светлана Александровна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. Открытие структуры и функций иммуноглобулинов определили развитие целого ряда направлений исследований, посвященных разработке средств диагностики и терапии на основе иммуноглобулинов разных классов и их фрагментов. Научно-технические достижения в областях молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии значительно ускорили разработку и внедрение моноклональных антител в практику. На сегодняшний день не менее 570 терапевтических моноклональных антител прошли клинические испытания, из которых более 80 препаратов получили разрешение Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) на использование в практике [The Antibody Society. In: Approved antibodies. Jun 27, 2019 <https://www.antibodysociety.org/> Accessed 15 Jul 2019.]. Примечательно, что большая часть из представленных препаратов применяется для иммунотерапии рака, аутоиммунных заболеваний (псориаз, болезнь Крона) и/или в качестве противовоспалительных средств (атеросклероз, сепсис и др) [Kaplon H. *et al.*, 2019]. При этом лишь незначительная часть исследований направлена на разработку средств терапии вирусных и бактериальных инфекций на основе моноклональных антител. Очевидно, что в условиях растущего числа сезонных инфекционных заболеваний, вновь возникающих вирусных инфекций, способных вызывать пандемии и изменчивость возбудителей, а также потенциальной возможности использования инфекционного агента в качестве биологического оружия, изучение и использование технологической платформы, позволяющей разрабатывать средства терапии и диагностики на основе моноклональных антител является актуальной задачей.

В начале 1990 годов у представителей семейства Camelidae наряду с иммуноглобулинами канонической структуры были обнаружены антитела, состоящие из димеров только тяжелых цепей иммуноглобулинов класса G и содержащих в вариабельной части один домен (VHH) [Hamers-Casterman *et al.*, 1993]. Дальнейшие исследования показали, что подобные структуры, сформированные в ходе эволюционного процесса и прошедшие аффинное созревание *in vivo*, обладают высокой стабильностью, растворимостью и другими особенными физико-химическими и термодинамическими характеристиками [Dumoulin *et al.*, 2002; Linden R.H. *et al.*, 1999]. Более того, гипервариабельные регионы таких антител (CDR – complementarity determining regions), в среднем содержат большее число аминокислотных остатков (по сравнению с каноническими антителами), что увеличивает площадь контакта с антигеном, компенсируя отсутствие легких цепей без потери в аффинности [Muyldermans *et al.*, 1994]. При этом, протяженная форма CDR3 петли за счет увеличения числа аминокислот обуславливает способность VHH связываться со «скрытыми» эпитопами в структуре антигена, которые могут быть не доступны для более крупных антител, имеющих каноническое строение. Часто, в таких труднодоступных сайтах могут находиться консервативные эпитопы высокоизменчивых вирусных антигенов, представляющих интерес с точки зрения практической разработки средств терапии вирусных инфекций широкого спектра действия.

Подтверждением актуальности использования однодоменных антител в практической медицине служит большое число исследований, направленных на разработку средств диагностики и терапии различных заболеваний, начавшихся в последнее десятилетие во всем мире, ряд из которых в настоящее время проходят клинические исследования [Boulenouar H. *et al.* 2020]. Однако, несмотря на активные исследования в области разработки и применения VHH в качестве средств терапии, изучение возможности использования однодоменных антител и/или молекул на их основе для борьбы с инфекционными заболеваниями, в настоящее время имеет ограниченный характер. В связи с этим проведение комплексных исследований, направленных на разработку универсальной технологической платформы, позволяющей получать специфические однодоменные антитела и изучение возможности ее использования для создания средств терапии

и диагностики инфекционных заболеваний является важной и актуальной задачей для отечественного здравоохранения.

Степень разработанности темы.

Одним из ключевых этапов в использовании моноклональных антител в клинической практике стала разработка гибридомной технологии в 1975г. [Kohler G. *et al.*, 1975], которая позволила получать очищенные препараты моноклональных антител в больших количествах, значительно расширив объем фундаментальных исследований и потенциал для их клинического использования. Десять лет спустя первое, хорошо охарактеризованное моноклональное антитело, ОКТЗ [Ecker D.M. *et al.*, 2015;7:9–14], было одобрено для лечения острого отторжения органов у людей. На сегодняшний день, благодаря открытиям в области иммунологии, биотехнологии и молекулярной генетики, существует целый ряд молекул на основе моноклональных антител и их фрагментов (Fab, scFv, scFv-Fc, Fv и др.), которые активно используются в качестве инструментов в диагностике и терапии.

Наряду с антителами, имеющими каноническую структуру, в последнее десятилетие активно проводятся исследования, направленные на изучение и применение однодоменных антител, найденных у животных семейства верблюдовых (верблюды, ламы, альпака), а позже и у акул, скатов и некоторых других хрящевых рыб [Greenberg и др., 1995] в качестве средств диагностики и терапии различных заболеваний. Так, в 2017 году Xiang Ren с соавторами разработали препарат на основе однодоменных антител, специфически связывающихся с аполипопротеином E (ApoE) и имеющим перспективы использования в диагностике болезни Альцгеймера [Ren *et al.*, 2017]. Благодаря своему небольшому размеру и наличию гидрофильных остатков в каркасном регионе FR2 однодоменные антитела обладают способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер [Farrington *et al.*, 2014]. Эти характеристики делают однодоменные антитела перспективными терапевтическими инструментами, которые следует учитывать при борьбе с неврологическими заболеваниями. В других исследованиях были изучены препараты на основе VHH в фазах I и II клинических испытаний в качестве терапевтических средств. В настоящее время проводится крупное исследование двух бивалентных антител, ALX-0081 и ALX-0061. ALX-0081 связывается с фактором Фон Виллебранда в качестве антитромботического агента для пациентов с острым коронарным синдромом. ALX-0061 блокирует рецептор интерлейкина-6 и исследуется в качестве противовоспалительного средства для пациентов с ревматоидным артритом. Кроме того, проводится ряд исследований, направленных на изучение возможности использования однодоменных антител при создании средств терапии опухолевых заболеваний и диагностики болезни Паркинсона [Roberts *et al.*, 2015]. В исследованиях противоопухолевой активности VHH авторами были получены ряд молекул специфических различным мишеням, таким как VEGF, HER-2, и EGFR [Alibakhshi *et al.*, 2017, Van Audenhove and Gettemans *et al.*, 2016, Guardiola *et al.*, 2018], в которых показана возможность применения однодоменных антител для направленного таргетирования опухолевых клеток. И наконец, в 2019 году впервые FDA одобрило для клинического использования первый препарат на основе однодоменных антител для взрослых с приобретенной тромботической тромбоцитопенической пурпурой (Cablivi®-caplacizumab-yhdp).

Кроме того, в настоящее время активно изучается возможность применения молекул на основе однодоменных антител для борьбы с инфекционными агентами. В частности, в клинических исследованиях 2 фазы было показано, что препарат ALX-071, представляющий собой в качестве активной действующего вещества молекулу тримера VHH, специфически связывающегося с белком слияния респираторно-синцитиального вируса, показал высокую нейтрализующую активность *in vitro* в сравнении с моноклональным антителом павилизумаб, имеющим каноническое строение и применяемым для предотвращения инфекции RSV [Detalle *et al.* др., 2016]. Можно отметить исследования, в котором авторам удалось выделить молекулу однодоменных антител, обладающую нейтрализующей активностью в отношении вируса Денге –

заболевания, широко распространенного на африканском континенте [Morgan S. *et al.*, 2019]. Исследования в области применения однодоменных антител для терапии активно продолжаются и с использованием других инфекционных агентов, таких как вирус гепатита В, ротавирус, полиовирус и др. [Vanlandschoot *et al.* 2011]. Тем не менее, несмотря на ограниченное число исследований, направленных на разработку средств терапии инфекций на основе однодоменных антител, на сегодняшний день большинство разработок ведется в отношении воспалительных заболеваний человека, злокачественных новообразований, нейродегенеративных заболеваний и др. Таким образом, в настоящее время существует необходимость разработки более комплексного подхода, позволяющего эффективно проводить поисковые исследования, направленные на отбор специфических однодоменных антител и создания на их основе препаратов для терапии и диагностики заболеваний, вызванных различными инфекционными агентами, как вирусной так и бактериальной природы.

Целью данной работы явилась разработка универсальной технологической платформы, позволяющей получать специфические однодоменные антитела, и изучение возможности ее использования для создания средств терапии и диагностики инфекционных заболеваний.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Разработать универсальную технологическую платформу, позволяющую создавать иммунные библиотеки неканонических однодоменных антител (характеризующихся большим разнообразием и количеством индивидуальных клонов), эффективно проводить селекцию антител с заданной специфичностью, обеспечивать конструирование разнообразных модифицированных молекул на их основе для усиления специфической активности, а также создавать препараты на их основе для клинического использования.

2. Получить молекулы однодоменных антител, обладающих прямой вируснейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола. Разработать препарат для экстренной профилактики и этиотропной терапии болезни, вызванной вирусом лихорадки Эбола на основе антител.

3. Получить однодоменные антитела, специфические рецептор-связывающему домену (RBD) поверхностного гликопротеина S вируса SARS-Cov-2 и изучить их способность подавлять развитие вирусной инфекции *in vitro* и *in vivo*. Разработать препарат для экстренной профилактики и этиотропной терапии COVID-19 на основе полученных антител.

4. Получить молекулы однодоменных антител и их модификаций специфических ботулотоксину А *C.botulinum* и токсину Б (TcdB) *C.difficile*, а также оценить их терапевтический потенциал в качестве средств экстренной терапии интоксикаций на моделях бактериальной токсинемии.

5. С использованием разработанной технологической платформы получить однодоменные антитела, специфические к бактериальным антигенам (на моделях *M.hominis*, *C.difficile*) и оценить возможности их диагностического использования для обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов.

Научная новизна выполненной работы.

Впервые изучена возможность применения различных методов пассивной иммунизации с использованием рекомбинантных вирусных векторов (rAd5, rVSV) для формирования напряженного гуморального иммунного ответа у верблюдовых с большим разнообразием неканонических иммуноглобулинов. С использованием генетической пассивной иммунизации получены библиотеки однодоменных антител, специфических белку GP вируса Эбола, обладающих высокой нейтрализующей активностью. В результате генетического анализа впервые при создании библиотек однодоменных антител двугорбого верблюда (лат. *Camelus bactrianus*) был использован оригинальный набор олигонуклеотидных праймеров, позволяющих

амплифицировать генетические последовательности, кодирующие переменный домен иммуноглобулинов разных классов, имеющих неканоническое строение. При разработке универсальной платформы впервые изучена роль различных оригинальных модификаций (димеризация мономеров специфических однодоменных антител, слияние с Fc-фрагментом иммуноглобулинов разных классов) в усилении терапевтической активности отобранных молекул антител, их фармакокинетики и иммуногенности в исследованиях на животных и клинических исследованиях на здоровых добровольцах.

Впервые получены оригинальные генетические конструкции, содержащие фрагменты белка GP вируса Эбола. Получены эукариотические продуценты и разработана технология выделения и очистки рекомбинантного белка GP вируса Эбола, с сохраненными иммуногенными свойствами и нативной конформации. Впервые получены оригинальные однодоменные антитела, обладающие высокой нейтрализующей активностью в отношении вируса лихорадки Эбола. С использованием рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного белком GP вируса Эбола впервые продемонстрирована возможность проведения оценки протективной активности нейтрализующих однодоменных антител на модели летальной инфекции мышей линии balb/c. Впервые на модели летальной инфекции макак-резусов вирусом лихорадки Эбола изучена протективная активность оригинальных моноклональных антител и их комбинаций, установлен аддитивный защитный эффект, а также изучено влияние модификаций антител, содержащих Fc-фрагментов различных изотипов, на их защитную эффективность в отношении вируса Эбола.

Впервые получены оригинальные генетические конструкции, содержащие различные фрагменты гена шиповидного белка S вируса SARS-Cov-2, обеспечивающие экспрессию генов и продукцию белков в секретируемой форме. На основе клеток CHO-S впервые получены оригинальные эукариотические продуценты и разработана технология выделения и очистки рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) вируса SARS-Cov-2, с сохраненными иммуногенными свойствами и нативной конформации. Впервые с использованием оригинальных антигенов была получена иммунная библиотека однодоменных антител двугорбого верблюда (лат. *Camelus bactrianus*), специфических RBD SARS-Cov-2. Впервые получены оригинальные однодоменные антитела, обладающие нейтрализующей активностью в отношении вируса SARS-Cov-2. Изучен механизм нейтрализации, а также роль различных модификаций (димеры, биспецифические антитела, Fc-фьюжн однодоменные антитела) для усиления нейтрализующей активности и расширения спектра нейтрализации различных вариантов вируса SARS-Cov-2, вызывающих опасение (VOC). Впервые продемонстрирована возможность использования оригинальных молекул однодоменных антител для предотвращения развития инфекции, вызванной вирусом SARS-Cov-2 на летальной модели с использованием hACE2 трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J.

Впервые получена оригинальная иммунная библиотека однодоменных антител альпака (*Lama Pacos*), специфических ботулотоксину типа А *C.botulinum*. Впервые изучена возможность использования анатоксина *C.botulinum* в различных конформационных состояниях для эффективного отбора однодоменных антител с заданными свойствами. Впервые получены оригинальные однодоменные антитела, обладающие нейтрализующей активностью в отношении ботулотоксина типа А *C.botulinum*. Впервые показана возможность использования рекомбинантных бактериофагов, несущих на поверхности однодоменные антитела, слитые с белком рIII бактериофага M13, для *in vivo* оценки протективной активности однодоменных антител на модели летальной интоксикации мышей ботулотоксином. Методом молекулярного докинга и молекулярной динамики предложена возможная мишень для связывания нейтрализующих антител – ганглиозид связывающий сайт, участвующий в рецептор опосредованном транспорте токсина в клетки. Впервые изучена роль различных модификаций

однодоменных антител (димеры, Fc-фьюжн однодоменные антитела) в усилении их терапевтической активности на модели летальной интоксикации ботулотоксином типа А.

Впервые получены однодоменные антитела, связывающиеся с *M. hominis*, и идентифицирована специфическая мишень – субстрат-связывающий белок ABC-транспортера *M. hominis*. Впервые показано, что молекулы на основе специфических VHH могут быть использованы для детекции *M. hominis*, в том числе методом проточной флуориметрии. Впервые показано, что присоединение к VHH Fc-фрагмента иммуноглобулина G2a мыши, обеспечивает доставку химерных молекул VHH-Fc на поверхность слизистой оболочки уrogenитального тракта. Впервые показано, что генетическая пассивная иммунизация, оказывает защитный эффект на модели экспериментальной уrogenитальной инфекции у мышей, вызванной *M. hominis*.

Впервые были получены оригинальные однодоменные антитела, специфические связывающиеся с CROPS доменом токсина Б *C.difficile* (TcdB). Впервые показано, что молекулы однодоменных антител могут быть использованы для детекции токсина *C.difficile* методом плазмонного резонанса. Впервые проведены сравнительные исследования стабильности полученных биосенсоров, основанных на применении однодоменных антител и антител, имеющих каноническую структуру, при проведении многократных циклов регенерации. Впервые показана способность оригинальных однодоменных антител подавлять цитотоксическое действие TcdB в условиях *in vitro* на культуре клеток Vero.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Разработана технологическая платформа для создания и тестирования препаратов на основе однодоменных антител, позволяющая решать конкретные задачи, встающие перед отечественным здравоохранением в области контроля и терапии инфекционных заболеваний. Комплексные исследования показывают перспективность использования технологической платформы на основе однодоменных антител для разработки средств экстренной профилактики и этиотропной терапии различных инфекционных заболеваний. В клинических исследованиях показано, что однодоменные антитела обладают низкой иммуногенностью (отсутствие образования антител к препарату в течение всего срока наблюдения), длительной фармакокинетикой (за счет применения Fc-фьюжн модификаций), а также благоприятным профилем безопасности.

На основе разработанной платформы получен ряд препаратов, находящихся на разных стадиях клинических испытаний. В том числе:

- препарат «ГамКовиМаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии инфекции, вызванной вирусом SARS-Cov-2, обладающий высокой нейтрализующей активностью, а также широким спектром нейтрализации различных вариантов вируса SARS-Cov-2, вызывающих опасение по классификации ВОЗ (VOC): альфа, бета, гамма, дельта и омикрон. В настоящее время завершены клинические исследования Фазы II «Открытое исследование безопасности и описания параметров эффективности лекарственного препарата для экстренной профилактики и ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, при однократном применении у пациентов с верифицированным диагнозом COVID-19».

- препараты «ГамЭмаб» и «ГамЭзумаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии лихорадки Эбола, созданные на основе полученных моноклональных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола. Проведены доклинические исследования в полном объеме. По результатам исследования были разработаны препараты ГамЭмаб и ГамЭзумаб для экстренной профилактики и этиотропной терапии лихорадки Эбола. Проведенные доклинические исследования препаратов позволили получить разрешение на проведение клинических исследований. В настоящее время завершены клинические исследования 1 фазы [NCT03428347], по результатам которых будет подготовлен и подан пакет документов для получения разрешения на регистрацию препарата для медицинского применения.

Для ряда созданных на основе платформы оригинальных антител завершены доклинические испытания. В том числе,

- Завершены доклинические исследования эффективности и безопасности препарата для терапии ботулизма на основе оригинальных однодоменных антител, обладающих высокой нейтрализующей активностью в отношении ботулотоксина токсина А *C.botulinum*. Использование подходов, направленных на модификацию полученных антител (получение димеров однодоменных антител и молекул, слитых с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека), позволило значительно повысить терапевтический потенциал отобранных антител (терапевтическая доза менее 1 мкг/мышь). В 2024г начались клинические исследования безопасности и эффективности с участием добровольцев.

Показано, что полученные с помощью платформы антитела могут быть использованы для разработки тест-систем для выявления инфекционных агентов. В том числе,

- Получены оригинальные однодоменные антитела, связывающиеся с CROPS доменом токсина TcdV *C.difficile*. Впервые показана возможность их использования для разработки биосенсоров для детекции токсина *Clostridioides difficile* методом плазмонного резонанса. В сравнительном исследовании показана более высокая стабильность биосенсоров на основе однодоменных антител по сравнению с биосенсором на основе канонических антител за счет более высокой устойчивости к регенерации. Разработаны и утверждены ТУ, эскизный и технические проекты, а также проведены испытания тест-системы «Однодомен-Био» на основе разработанных биосенсоров.

Создание платформы основано на ряде оригинальных находок. В том числе

- впервые показана возможность использования метода пассивной иммунизации для получения иммунных библиотек неканонических антител.

- разработан ряд подходов к модификации (мультимеризация, получение Fc-фьюжн вариантов однодоменных антител) полученных однодоменных антител с целью увеличения их терапевтического потенциала, что позволило в десятки раз увеличить нейтрализующую активность антител.

- Разработан метод амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменные участки неканонических антител с использованием оригинальных праймеров.

Кроме того, при выполнении исследования были созданы и зарегистрированы две тест-системы: Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-Cov-2 «SARS-Cov-2-RBD-ИФА-Гамалеи», для которого было получено регистрационное удостоверение на медицинское изделие №РЗН 2020/10393; Набор реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-Cov-2 «ГАМ-COVID-анти-RBD», для которого было получено регистрационное удостоверение на медицинское изделие №РЗН 2021/14488. В результате проведенного исследования также была создана тест-система «ОДНОДОМЕН-БИО» для индикации и идентификации патогенных биологических агентов на основе панели однодоменных антител на основе панели однодоменных антител, которая предназначена для специфической индикации и идентификации патогенных биологических агентов II–IV групп: 3 патогенов бактериальной природы (*Clostridioides difficile*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*) и 1 патогена вирусной природы (вируса бешенства) методом плазмонного резонанса. На тест-систему разработана техническая документация и успешно проведены технические испытания.

При разработке технологической платформы однодоменных антител и изучении возможности ее использования для создания средств диагностики и терапии инфекционных

заболеваний на основе однодоменных антител и молекул на их основе были получены 9 патентов на изобретения (представлены в списке работ, опубликованных по теме диссертации).

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертации используются в учебном процессе в составе лекционных курсов «Основы молекулярной биотехнологии» и «Конструирование лекарственных и диагностических препаратов» кафедры биотехнологии и промышленной фармации ИТХТ им. М.В. Ломоносова, федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «МИРЭА – Российский технологический университет». Также, теоретические и практические результаты, полученные в ходе выполнения работы были внедрены в учебный процесс подготовки научных и научно-педагогических кадров кафедры инфектологии и вирусологии Института профессионального образования Первого московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения РФ.

Положения, выносимые на защиту.

- На основе проведенных исследований разработана универсальная технологическая платформа, позволяющая получать однодоменные антитела заданной специфичности (получать иммунные библиотеки неканонических однодоменных антител, характеризующихся большим разнообразием; эффективно проводить селекцию однодоменных антител, а также обеспечивать создание разнообразных модифицированных молекул на их основе для усиления терапевтического потенциала);
- Универсальность технологической платформы на основе однодоменных антител, а также простота модификаций молекул антител, направленных на увеличение времени циркуляции антител в организме, усиление нейтрализующей активности, а также расширение спектра активности в отношении различных мишеней, позволяет создавать препараты для эффективной борьбы с инфекционными заболеваниями;
- Созданные на основе платформы однодоменные антитела, специфичные поверхностным гликопротеинам вирусов (вирус Эбола, коронавирус SARS-Cov-2) способны блокировать связывание вирусов с клеткой хозяина и как следствие подавлять развития вирусной инфекции;
- Однодоменные антитела, специфические к бактериальным антигенам (на моделях *M.hominis*, *C.difficile*), показывают высокую чувствительность в различных диагностических приложениях (ИФА, иммуноблоттинг, иммуноцитохимическое окрашивание клеток, проточная цитофлуориметрия, а также при создании биосенсоров) и могут быть использованы для создания тест-систем для обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов;
- Однодоменные антитела, специфичные в отношении бактериальных токсинов, могут обладать высокой нейтрализующей активностью и могут быть использованы для терапии летальной интоксикации;
- Разработанные препараты на основе однодоменных антител и их модификаций не обладают токсичностью в доклинических исследованиях на животных, а также обладают хорошим профилем безопасности в клинических исследованиях с участием добровольцев.

Личный вклад автора.

Автором проведен аналитический обзор литературы, а также осуществлялась организация и планирование описанных в исследовании экспериментов, а также проведение аналитической оценки полученных результатов и их рецензирование. Автором были разработаны основные экспериментальные подходы, лежащие в основе технологической платформы, позволяющей получать однодоменные антитела заданной специфичности из иммунных библиотек верблюдовых. Автор отработал наиболее эффективные схемы иммунизации верблюдовых (альпака, двугорбый верблюд) с использованием как рекомбинантных белков, так и рекомбинантных аденовирусных векторов, несущих гены целевого белка мишени и их комбинаций, позволяющих получать

иммунные библиотеки неканонических однодоменных антител, характеризующихся большим разнообразием индивидуальных клонов. Автор непосредственно отработал условия проведения селекции однодоменных антител методом фагового дисплея с применением различных фагопомощников и способов проведения элюции, позволяющих минимизировать содержание неспецифических фагов в библиотеке. Автор применил подход к проведению скрининга специфических однодоменных антител, включающий выполнение двухэтапного анализа способности клонов связываться с белком мишенью в формате фаговых частиц и лизата клеток продуцентов *E.coli*, позволяющий минимизировать возможность получения ложноположительных результатов. Автором были отработаны условия продукции и отстройки препаратов однодоменных антител, позволяющие проводить быструю оценку специфической активности антител.

Автором получен препарат, содержащий липид-ассоциированные мембранные белки (ЛАМБ) *M.hominis*, используемый в качестве мишени для отбора однодоменных антител. Автор разработал ТУ, эскизный и технические проекты тест-системы «ОДНОДОМЕН-БИО» для индикации и идентификации патогенных биологических агентов на основе панели однодоменных антител, а также провел валидационные, технические и клинические испытания зарегистрированных наборов реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-Cov-2 «SARS-Cov-2-RBD-ИФА-Гамалеи» №РЗН 2020/10393 и №РЗН 2021/14488.

Конструирование рекомбинантных вирусов на основе аденовируса человека 5 серотипа, а также вируса везикулярного стоматита rVSV и были выполнены совместно с к.б.н. Зубковой О.В. (лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, зав. лабораторией Щепляков Д.В.). Проведение трансфекции, а также очистка рекомбинантных белков (белок GP вируса Эбола, рецептор-связывающий домен вируса SARS-Cov-2) выполнены совместно с к.б.н. Есмагамбетова И.Б. (лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, зав. лабораторией Щепляков Д.В.). Работа с вирусом SARS-Cov-2 (определение вирус-нейтрализующей активности антител на культуре клеток, а также проведение экспериментов с летальной инфекцией на мышах) выполнены в лаборатории Государственной коллекции вирусов (под руководством к.б.н. Должиковой И.В.). Работа с вирусом Эбола проводилась в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России под руководством академика РАН Борисевича С.В. Получение CROPS домена токсина TcdB *C.difficile* проводилось в лаборатории молекулярных основ патогенности под руководством д.б.н. Белого Ю.Ф. Получение и инактивация ботулотоксина типа А проводилась под руководством д.б.н. Носкова А.Н. (группа клостридиозов лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, зав. лабораторией Щепляков Д.В.). Получение препаратов антител для проведения доклинических и клинических исследований было выполнено совместно с Карповым А.П. (Филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России). Планирование и проведение клинических исследований было выполнено совместно с Лубенец Н.Л.

Автором лично проведены статистическая обработка результатов исследований, их аналитическая оценка и рецензирование.

Степень достоверности. Достоверность результатов исследования подтверждается многократным наблюдением, использованием корректных контролей и методов статистической обработки экспериментальных данных. Используемые статистические методы адекватны поставленным задачам. Проверка статистических гипотез осуществлялась при 95%-ом уровне значимости ($p \leq 0,05$), используемом при проведении иммунологических и биотехнологических исследованиях.

Обсуждение результатов представлено с использованием актуальных исследований в области изучения неканонических антител и их применения в терапии различных заболеваний.

Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

Таким образом, полученные результаты являются достоверными, а выводы обоснованными, исходя из результатов проведенных исследований.

Апробация результатов. Тема диссертации утверждена на ученом совете ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России 29 апреля 2015 г. Апробация диссертации прошла на совместной конференции отделов Иммунологии, Медицинской микробиологии и генетики и Молекулярной биологии бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России 21 марта 2024 года.

Результаты диссертационной работы были представлены на следующих мероприятиях: на III Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013); I Международной молодежной биотехнологической школе-конференции «Биотехнология: от бактериофагов до вакцин» (Барнаул, 2014); на 19-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2015); на Международном конгрессе «Инновационные технологии в иммунологии и аллергологии» (Москва, 2015); на научной сессии НИЯУ МИФИ (Москва, 2015); на III Московском Конгрессе кардиологов (Москва, 2021); на IX Научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии», проведенной в рамках XI всероссийского фестиваля науки (Москва, 2021); на 45 Конгрессе FEBS “Molecules of Life: Towards New Horizons“ (2021, Любляна, Словения); на XI Ежегодной международной цифровой научно-практической конференции «Аллергология-иммунология: от традиции к инновациям» (Москва, 2022г); на IX Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (г. Сочи, 2022); на I Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (2023, Москва); на Первом Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (РКММИ) (г.Москва, 2023г.); на втором Саммите разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех» (г. Сочи, 2024), на VI Международной конференции ПОСТГЕНОМ’2024 (г. Москва, 2024).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют пунктам 6, 7, 9 паспорта специальности 3.2.7 – Иммунология (Биологические науки); и пунктам 1, 4, 8, 16 паспорта специальности 1.5.6. Биотехнология (Биологические науки).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 38 печатных работ, 26 из которых - в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России для публикации основных научных результатов диссертации. Имеется 9 патентов РФ на изобретение: №2768044; №2644202; №2562158; №2777073; №2766348; №2777404; №2769223; №2763001; №2765731.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из следующих основных разделов: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты собственных исследований» и «Обсуждение результатов», «Выводы», «Заключение» и «Список цитируемой литературы» (последний раздел состоит из 315 ссылок, из которых 14 ссылок на публикации отечественных авторов и 301 - зарубежных). Диссертация написана на 358 листах, содержит 85 рисунков, 25 таблиц и 315 источников литературы.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микроорганизмы и рекомбинантные вирусные векторы

В работе использовали различные штаммы бактерий, вирусов, а также рекомбинантных вирусных векторов, необходимых для проведения молекулярно-генетических исследований, проведения иммунизации, используемых в качестве мишени для отбора антител, а также в качестве моделей для исследований *in vivo*, включая: *M. arginini*, *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. arthritidis*, *M. orale*, *U. Urealiticum*, *M. Hominis* (H-34) и клинические изоляты 1, 2, 3, используемые для анализа специфической активности антител были предоставлены Раковской И.В. (лаборатория микоплазм и Л-форм бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ); Клинический изолят *M. hominis* 1862.3 TetR, используемый в *in vivo* экспериментах был предоставлен В.Н. Лазаревым (лаборатория генной инженерии ФГБУН «НИИ физико-химической медицины ФМБА России»); *S. botulinum* штамм A98, используемый для выделения ботулотоксина (BoNT/A), получен из коллекции группы клостридиозов (рук. Носков А.Н.) лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»; *E. coli* TG1 (Lucigen, Middleton, WI, USA), используемый для получения рекомбинантных бактериофагов, был предоставлен Белым Ю.Ф. (лаборатория молекулярных основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ); *E. coli* Rosetta (DE3) pLysSF-ompThsdSB(RB-mB-) galdcmλ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (CamR), используемый для продукции рекомбинантных белков, был предоставлен Белым Ю.Ф. (лаборатория молекулярных основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ); *E. coli* BL21 cells (NEB, Ipswich, MA, USA) используемый для продукции рекомбинантных белков; Штамм *Bacillus megaterium*, используемый для продукции CROPS *C. difficile*, был предоставлен Белым Ю.Ф. (лаборатория молекулярных основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ); Рекомбинантный аденовирус Ad5-GP, несущий ген белка GP вируса Эбола (*H. sapiens*-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1 isolate; GenBank Accession No. KM233056) получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; Вирус Эбола вид Заир (ФГБУ «48 ЦНИИ» Министерства обороны России), используемый для оценки нейтрализующей активности однодоменных антител; Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита rVSV-GP, псевдотипированный белком GP вируса Эбола (*H. sapiens*-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1 isolate; GenBank Accession No. KM233056) получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; Коронавирусы SARS-CoV-2 вариантов B.1.1.1 (hCoV-19/Russia/Moscow_PMV1-1/2020), B.1.351 (hCoV-19/Russia/SPE-RII-27029S/2021), B.1.617.2 (hCoV-19/Russia/SPE-RII-32758S/2021) и B.1.1.529 (hCoV-19/Russia/MOW-Moscow_PMV1016/2021) были выделены из назальных смывов в лаборатории государственной коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ (рук. Должикова И.В.); Коронавирусы SARS-CoV-2 вариантов B.1.1.7 (hCoV-19/Netherlands/NoordHolland_20432/2020) и B.1.1.28/P.1 (hCoV-19/Netherlands/NoordHolland_10915/2021) были получены из Глобального Европейского архива вирусов; Бактериофаг помощник KM13, получен Patrick Chames («Лаборатория разработки средств терапии на основе моноклональных антител и иммунотаргетинг» - the Cancer Research Center of Marseille, France); Бактериофаг помощник M13 Hyperphage M13 K07ΔpIII (Progen, Germany, Cat No. PRHYPE);

Плазмидные ДНК.

pHEN-1 фагмидный вектор, используемый в процедуре фагового дисплея, получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; pAL-TA-aMh06-ILZ и pAL-TA-PLAP-aMh06-FcG2a, содержащие последовательности, кодирующие соответствующие белки были синтезированы на коммерческой основе (ЗАО Евроген, Россия); pSh-CMV и pAd-easy, используемые для получения рекомбинантных аденовирусов получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; pVSV1-GP, pBs-N, pBs-P, pBs-L используемые для получения рекомбинантного вируса везикулярного стоматита; pShuttle-CMV-Mab114HC, pShuttle-CMV-Mab114LC, используемые для продукции контрольного антитела Mab114, получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.

Гамалеи» МЗ РФ; pET28c (Novagen, США), pET30b (Novagen, США), pHis1522 (MoBiTec), используемые для экспрессии рекомбинантных белков были предоставлены Белым Ю.Ф. (лаборатория молекулярных основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ) а также получены на коммерческой основе (ЗАО Евроген, Россия); pET30-B11, pET30-B11-dimer, pET30-G3, pET30-G3-dimer, используемые для продукции однодоменных антител клоны B11 и G3, а также их димерных вариантов, были получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; pFuse-Puro-G3-Fc, pFuse-Puro-B11-Fc, используемые для продукции однодоменных антител клоны B11 и G3, слитых с Fc-фрагментом IgG человека, были получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; pHis1522 TcdB CROPS, используемый для продукции CROPS домена токсина В *C.difficile*, получен Белым Ю.Ф. (лаборатория молекулярных основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ); pHEN1-D6.1-dimer, pHEN1-C7.2-dimer, pHEN1-A3.2-dimer, pHEN1-D6.1-C7.2, pHEN1-D6.1-A3.2, pHEN1- C7.2-A3.2, используемые для продукции димерных молекул однодоменных антител, специфичных CROPS домену токсина В *C.difficile* были получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; pShuttle-CMV-GP, используемый для продукции белка GP вируса Эбола (Макона), получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; pFuse-Puro-aEv6-Fc, используемый для продукции однодоменного антитела aEv6, слитого с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека, получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; pCEP-RBD-SARS-CoV2, используемый для продукции рецептор-связывающего домена вируса SARS-Cov-2 (YP_009724390.1 GenBank), получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; pHEN1-(P2C5)2, pHEN1-(P2G1)2, pHEN1-(P5F8)2, pHEN1-P2C5-P2G1, pHEN1- P2C5-P5F8, pHEN1- P2G1-P2C5, pHEN1-P2G1-P5F8, pHEN1- P5F8-P2C5, pHEN1- P5F8-P2G1, используемые для продукции гомодимеров и гетеродимеров однодоменных антител, специфичных RBD вируса SARS-Cov-2, получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; pFuse-Puro-P2C5-Fc, pFuse-Puro-P2G1-Fc, pFuse-Puro-P5F8-Fc, используемые для продукции однодоменных антител, специфичных RBD вируса SARS-Cov-2, слитых с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека, получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ; pBlu2-Puro-P2C5-Fc, pBlu2-Puro-XR19-NC и pBlu2-Puro-XR19-LC, используемые для получения стабильных продуцентов моноклональных антител клонов P2C2 и XR19, входящих в состав препарата «ГамКовиМаб».

Рекомбинантные белки

Гликопротеин вируса Эбола, вид Zaire, штамм H.sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15 (SinoBiological, Китай); BSA (BSA) – бычий сывороточный альбумин (Sigma, США); hACE2 – рекомбинантный ангиотензин-превращающий фермент человека (Хема, Россия); В работе также использовались рекомбинантные белки, полученные в лаборатории иммунобиотехнологии: белок GP вируса Эбола (H. sapiens-wt/ SLE/2014/Makona-G3735.1), рецептор-связывающий домен вируса SARS-Cov-2 (YP_009724390.1), ЛАМБ *M.hominis* выделены согласно описанной ранее методики [Shimizu T. 2008], нетоксичная субъединица CROPS токсина В *C.difficile* получена в лаборатории молекулярных основ патогенности под руководством д.б.н. Белого Ю.Ф., ботулинический токсин А получали с использованием штамма *C. botulinum* A98 под руководством д.б.н. Носкова А.Н.

Лабораторные методы исследования.

Молекулярно-генетические исследования включали получение плазмидных ДНК, содержащих гены рекомбинантных белков и антител методами молекулярного клонирования, получение рекомбинантного аденовируса 5 серотипа методом гомологичной рекомбинации, получение рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного белком GP вируса Эбола (rVSV-GP) с использованием трансфекции плазмидными ДНК pVSV1-GP, pBs-N,

pBs-P, pBs-L клеток VERO, выделение РНК из лимфоцитов крови альпака и верблюда и синтез кДНК, амплификация последовательностей VHH методом ПЦР с оригинальным набором праймеров, клонирование VHH последовательностей в фагмидный вектор pHEN1 и получение библиотеки клонов-трансформантов, секвенирование по Сэнгеру и секвенирование следующего поколения NGS, продукция и очистка рекомбинантных белков методами аффинной, эксклюзионной, ионо-обменной хроматографии. Культуральные методы включали проведение методов культивирования бактериальных (*E.coli*, *Bacillus megaterium*), эукариотических клеток в адгезионных и суспензионных условиях (HEK293, CHO, VERO), а также работа по получению и выделению бактериофагов. Иммунологические методы включали ИФА, Фаг-ИФА, иммуноблоттинг, иммуноцитохимическое окрашивание колоний, проточная цитофлуориметрия, оценка аффинности антител методом плазмонного резонанса и оптической интерференции. Вирусологические методы включали изоляцию вируса SARS-CoV-2 и культивирование его *in vitro* с использованием культуры клеток VERO, определение вируснейтрализующей активности антител, оценку инфекционного титра вируса с использованием ТЦД50, подсчет количества бляшек и вирусной нагрузки, измеренной количественной ОТ-ПЦР, использование инфекционных животных моделей. Активность антител изучали с использованием реакции вируснейтрализации, в условиях *in vitro* на культурах клеток VERO E6 (вирус Эбола, вирус SARS-Cov-2, токсин B *C.difficile*) и в условии *in vivo* на мышях линии balb/c (ботулотоксин типа А, *M.hominis*), мышях линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J (вирус SARS-Cov-2), сирийских хомяках (вирус SARS-Cov-2), макак-резусах (вирус Эбола). Доклинические исследования безопасности препаратов ГамЭзумаб и ГамКовиМаб, разработанных при выполнении работы были выполнены согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н. Миронова, Часть вторая /. – М.: Гриф и К, 2012, а также согласно Правилам надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств, утв. Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 №81; Правилам проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза, утв. Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 №89 и Руководству по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов, утв. Решением Коллегии ЕЭК от 26.11.2019 №202. Исследования включали: исследование токсичности при однократном введении на мышях и крысах; Исследование токсичности при многократном введении на крысах и кроликах; исследование иммунотоксичности; изучение аллергизирующих свойств; исследование фармакокинетики; исследование репродуктивной токсичности.

Клинические исследования

Клинические исследования 1 Фазы препарата ГамЭзумаб были выполнены согласно протоколу № 01-АТ-2020 «Открытое исследование безопасности и фармакокинетики лекарственного препарата для экстренной профилактики болезни вызванной вирусом Эбола на основе гуманизированных моноклональных антител, раствор для инфузий, при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы». Клинические исследования 1 Фазы препарата ГамКовиМаб были выполнены согласно протоколу № 12-АТ-2021 «Открытое исследование безопасности и фармакокинетики лекарственного препарата для ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы». Клинические исследования II Фазы «Открытое исследование безопасности и описания параметров терапевтической эффективности лекарственного препарата ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, при однократном применении у пациентов с верифицированным диагнозом COVID-19» были выполнены согласно протоколу №2-ГамКовиМаб-2022.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1 Универсальная технологическая платформа, позволяющая разрабатывать препараты для терапии и диагностики инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител

В результате проведенных исследований был разработан комплекс методических подходов, позволяющий проводить эффективный поиск молекул однодоменных антител заданной специфичности, а также создавать препараты на их основе, пригодные для проведения доклинических и клинических исследований. На рисунке 1 представлена схематичное изображение такого комплекса, который можно разделить на 3 основных блока:

1. Получение антигена и разработка оптимальной схемы иммунизации

Этот блок включает получение целевого антигена (мишень) и разработку схем иммунизации. В рамках проведения исследований была продемонстрирована возможность использования для индукции напряженного гуморального иммунного ответа с формированием пула неканонических антител не только антигенов в виде рекомбинантных белков или инактивированного патогена, но методов пассивной иммунизации, основанных на доставке генов, кодирующих вирусные или бактериальные антигены при помощи рекомбинантных аденовирусов или молекул мРНК. В рамках отработки схем иммунизации были исследованы основные показатели, обеспечивающие необходимый уровень ответа в зависимости от типа используемого антигена (кратность, временные интервалы, количество вводимого антигена, тип используемого адъюванта). Описание отдельных схем представлено в разделах 2.2, 2.3, 2.4.

2. Селекция однодоменных антител заданной специфичности

Этот блок включает работу по выделению В-клеток иммунизированного животного, выделение РНК и получения кДНК из В-клеток крови, амплификация последовательностей, кодирующих вариабельные домены неканонических антител, с использованием специальных праймеров, обеспечивающих наибольшее разнообразие клонов. В рамках разработки этапа селекции были проведены исследования по подбору оптимальных условий получения библиотек рекомбинантных бактериофагов, несущих на своей поверхности белок р3, слитый с однодоменным антителом, изучена эффективность применения различных фагов-помощников, а также способов проведения селекции, позволяющих получать панели антител с большим разнообразием по специфичности.

3. Модификация антител и получение препаратов для доклинических и клинических исследований.

3 блок, важный с точки зрения разработки лекарственных препаратов включает модификации однодоменных антител и получение препаратов для доклинических и клинических исследований. Однодоменная структура антител позволяет применять различные подходы по модификации в зависимости от задач. В рамках проводимых исследований применены следующие модификации: для повышения авидности были сконструированы мультимерные или мультивалентные молекулы, сочетающих специфичность к разным эпитопам в рамках одной молекулы; для доставки антител в организм применялись подходы генетической пассивной иммунизации – доставки генов терапевтических антител в составе вирусных векторов или молекул РНК, а также методы, позволяющие существенно увеличить время циркуляции антител в организме, что имеет особое значение при создании средства терапии на основе однодоменных антител, применяемых *in vivo*. В ходе исследований были применены различные подходы, направленные на увеличение фармакокинетики: это получение молекул антител, слитых с Fc-фрагментом, что позволяет увеличить время до нескольких недель, а также способы продукции антител в составе вирусных векторов, значительно увеличивающих время продукции антител. Описание отдельных модификаций представлено в разделах 2.2 и 2.3.

С использованием описанной платформы были проведены исследования возможности ее применения для разработки средств терапии и диагностики как вирусных (вирус Эбола, коронавирус SARS-Cov-2) так и бактериальных инфекций (*C.botulinum*, *C.difficile*, *M.hominis*).

2.2. Получение молекул на основе неканонических однодоменных антител и их модификаций для экстренной профилактики и терапии инфекционных заболеваний

Моноклональные антитела (в том числе однодоменные) могут использоваться как в качестве диагностических молекул, так и как средства нейтрализации различных мишеней, в том числе и бактериальной и вирусной природы.

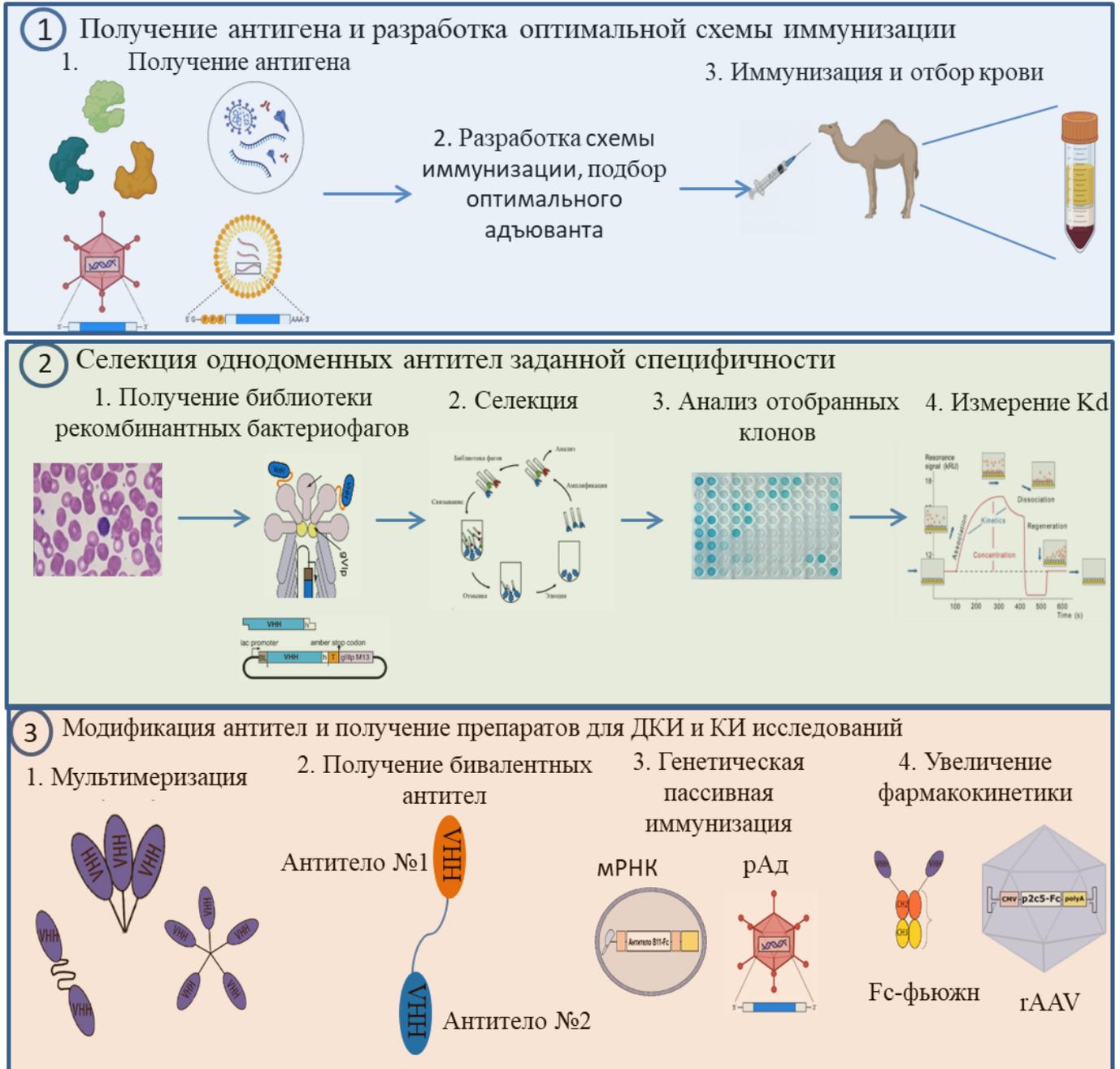


Рисунок 15. Схема универсальной технологической платформы

Однако, в ряде случаев, для их эффективного применения требуется проведение ряда модификаций, направленных на изменение фармакокинетики, увеличение афинности и avidности, управление эффекторными функциями антител, реализуемых через взаимодействие Fc-фрагмента с различными рецепторами и т.д. В частности, перспективный класс неканонических однодоменных антител (наноантител), несмотря на очевидные преимущества, имеет ряд недостатков, существенно снижающих их терапевтический потенциал. Из-за небольшого размера молекул (2-3 нм) время циркуляции однодоменных антител в организме составляет 30-40 минут. При этом отсутствие Fc-фрагмента не позволяет задействовать дополнительные эффекторные защитные свойства антител (АЗЦТ, КЗЦТ и др.). Высокий клиренс молекул однодоменных антител, а также отсутствие дополнительных эффекторных доменов может снижать эффективность препаратов на основе однодоменных антител для терапии инфекционных заболеваний. В связи с этим, для повышения терапевтического потенциала однодоменных антител в исследованиях *in vivo*, можно использовать комплекс подходов, направленных на модификацию молекул антител, повышающих их время циркуляции в организме, а также включение дополнительных эффекторных механизмов нейтрализации патогена (получения рекомбинантных вирусных векторов, несущих гены антител, мультимеризация, получение VHH-Fc-конъюгатов – «fusionbody», создание мультивалентных молекул и т.д.). Применение различных подходов, направленных на усиление терапевтического потенциала однодоменных антител, можно рассмотреть на примере разработки средств терапии вирусных инфекций, а также интоксикаций, вызванных бактериальными токсинами.

В качестве моделей для исследования возможности применения однодоменных антител и их модификаций для создания средств терапии и диагностики инфекций использовали вирусы лихорадки Эбола и коронавирус SARS-Cov-2, а также бактерии *C.botulinum*, *C.difficile* и микоплазма *M.hominis*.

2.2.1. Получение препарата на основе однодоменных антител, обладающего нейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола

Вирус лихорадки Эбола, относящийся к семейству Filoviridae, роду Ebolavirus, вызывает геморрагическую лихорадку у людей и нечеловеческих приматов [Siragam 2018]. Род Ebolavirus состоит из шести видов: Заир эболавирус (EBOV), Судан эболавирус (SUDV), Бундибуге эболавирус (BDBV), эболавирус Тайского леса (TAFV), Рестон эболавирус (RESTV) и Бомбали эболавирус (BOMV) [Zhu W., 2019]. Болезнь, вызванная вирусом Эбола (БВВЭ), сопровождается 60–90% летальностью [Qiu X., 2012]. Последние вспышки БВВЭ зарегистрированы в Конго (2018 г.), Уганде (2019 г.), в Конго и Гвинее (2021 г.) [ECDC, 2019].

В нашем исследовании [Shcheblyakov D. et al 2019] с помощью иммунизации мышей Ad5-GP (компонент Б вакцины ГамЭвак Комби [Dolzhikova I. V. et al. 2017]) нам удалось получить панель рекомбинантных моноклональных антител (включая наноантител) обладающих протективной активностью в отношении рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного гликопротеином вируса Эбола (rVSV-GP), а также показавших высокую нейтрализующую активность в отношении вируса Эбола в эксперименте *in vitro* на культуре клеток и в эксперименте на летальной инфекции приматов вирусом. На основе клонов антител, показавших наибольшую активность, а также их гуманизированных аналогов были разработаны препараты ГамЭмаб и ГамЭзумаб, которые успешно прошли доклинические исследование эффективности и безопасности, а также клинические исследования I фазы безопасности и фармакокинетики на здоровых добровольцах.

Для получения панели однодоменных антител использовали технологию, включающую: (1) иммунизацию альпака Ad5-GP; (2) получение панели наноантител, специфичных к гликопротеину вируса Эбола (EBOV GP); (3) отбор клона с оптимальной активностью *in vitro*; (4) модификацию выбранного клона для улучшения его фармакокинетических и иммунологических

свойств; (5) оценку защитной активности выбранных клонов *in vivo*. Кроме того, методом фагового дисплея также был проведен отбор рекомбинантных антител, имеющих каноническую структуру варибельного фрагмента.

В результате проведенной работы были отобраны и охарактеризованы наиболее перспективные клоны – аЕv6 (тяжелоцепочечное антитело), 2с8 и 6g3 (рекомбинантные антитела, имеющие каноническую структуру варибельного фрагмента). Протективность модифицированных форм этих клонов антител (аЕv6-Fc, h2c8-Fc, h6g3-Fc) оценивали на модели летальной инфекции иммуносупрессивных мышей rVSV-GP, а также на модели летальной инфекции приматов вирусом лихорадки Эбола. Для моделирования иммуносупрессии в случае использования модели летальной инфекции rVSV-GP мышам вводили дексаметазон и циклофосфамид. В нашем исследовании показана способность антител аЕv6-Fc и h6g3-Fc защищать мышей от летальной инфекции rVSV-GP, что может говорить о его потенциальной противовирусной активности в отношении вируса Эбола. В исследовании протективности на модели летальной инфекции приматов вирусом лихорадки Эбола было показано, что совместное введение рекомбинантных антител h2c8-Fc и h6g3-Fc обеспечивает 100% защиту приматов при введении через 24 часа после инфицирования.

Панель однодоменных антител, специфичных к EBOV GP, получали путем иммунизации альпака (*V. pacos*) рекомбинантным аденовирусом Ad5-GP и рекомбинантным белком GP в соответствии со схемой, представленной на рисунок 2. На 5-й день после бустирующей иммунизации отбирали 150 мл крови альпака и выделяли сыворотку, в которой определяли титр антител, специфичных к EBOV GP, для подтверждения эффективности иммунизации. Титр антител к EBOV GP определен в разведении 1:16000, что свидетельствует о высоком иммунном ответе у иммунизированного животного (рисунок 2Б). Для создания иммунной библиотеки однодоменных антител отбирали мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). Нуклеотидные последовательности, кодирующие варибельные фрагменты наноантител, полученных из PBMC альпака, клонировали в фагмидный вектор рНEN1. Специфичные антитела отбирали методом фагового дисплея как описано в [Godakova S. A., 2019]. Результаты отбора анализировали с помощью поликлонального фаг-ИФА (рисунок 2В). В результате анализа идентифицировали 18 клонов неканонических однодоменных антител (аЕ1-18). Анализ библиотеки показал, что отобранные клоны составляют около 51% всех ампликонов библиотеки после селекции, тогда как в стартовой библиотеке число этих клонов было менее 1% (рисунок 3А и 3Б). По результатам непрямого ИФА с EBOV GP в качестве антигена отобрали четыре клона неканонических однодоменных антител (аЕv2, аЕv3, аЕv6, аЕv7) как наиболее специфичные (рисунок 3В).

Помимо неканонических тяжелоцепочечных рекомбинантных антител в нашей работе была получена иммунная библиотека моноклональных антител, содержащих канонические варибельные домены (работа проведена совместно с лабораторией молекулярной диагностики, рук. Гребенникова Т.В.). Для этого использовали отработанную ранее схему иммунизации: самок мышей линии BALB/c в возрасте 8 недель иммунизировали Ad5-GP внутримышечно 3 раза с интервалом в 2 недели. Для буст-иммунизации использовали EBOV GP (*H.sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*) в концентрации 50 мкг/мышь (внутрибрюшинно без адьювантов через 2 недели после последнего введения Ad5-GP). Через 4 дня после последней иммунизации выделяли селезенку и спленоциты. Для гибридизации использовали клеточную линию миеломы Sp2/0-Ag-14 и выделенные спленоциты по Kohler, Milstain, 1976. Для получения панели гибридомных клонов использовали метод ограниченных разведений.

В результате работы было получено 600 индивидуальных клонов. После начального скрининга с помощью непрямого ИФА было отобрано 49 клонов, продуцирующих специфические антитела к GP1 (с OD450 \geq 2,5). Специфичность связывания с эпитопами в структуре GP белка

отобранных антител оценивали методом конкурентного ИФА. В результате исследования было установлено, что только два клона обладают способностью связывать разные эпитопы EBOV GP, поэтому клоны 6g3 и 2c8 показали себя как наиболее перспективными кандидатами для создания молекул, обладающих защитными свойствами в отношении вируса Эбола.

Иммунологические свойства отобранных клонов aEv2, aEv3, aEv6 и aEv7, 2c8 и 6g3 изучали с поверхностного плазмонного резонанса SPR (измерение констант аффинности, KD) и реакции нейтрализации в условиях *in vitro*. Анализ изменений поверхностного плазмонного резонанса оценивали при использовании различных разведений антител в качестве аналитов. Расчет констант связывания проводили с помощью программы BiaEvaluation. KD для антител aEv2, aEv3, aEv6 и aEv7, 2c8 и 6g3 составила 713, 55,3, 0,187, 24, 3,78 и 15,6, соответственно. Далее, была проведена предварительная оценка нейтрализующей активности отобранных клонов антител на двух моделях – подавление цитопатического действия, вызванного добавлением рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного белком GP вируса Эбола на клетках VERO E6 и подавление бляшкообразования, индуцированного добавлением вируса Эбола к культуре клеток GMK-АН-1(D). Для этого около 100 БОЕ вируса (EBOV или VSV-GP) и около 100 мкг МАТ смешивали и добавляли к клеткам GMK-АН-1(D) или Vero E6, соответственно. В результате были выявлены пять антител с выраженной вируснейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола и три антитела с выраженной вируснейтрализующей активностью в отношении VSV-GP. Учитывая результаты аффинности, нейтрализующей активности, а также данные конкурентного ИФА клоны aEV6, 6g3 и 2c8 были отобраны для проведения дальнейшей модификации и оценки протективной активности на летальных моделях инфекции, вызванных вирусом везикулярного стоматита rVSV-GP и вирусом лихорадки Эбола на приматах.

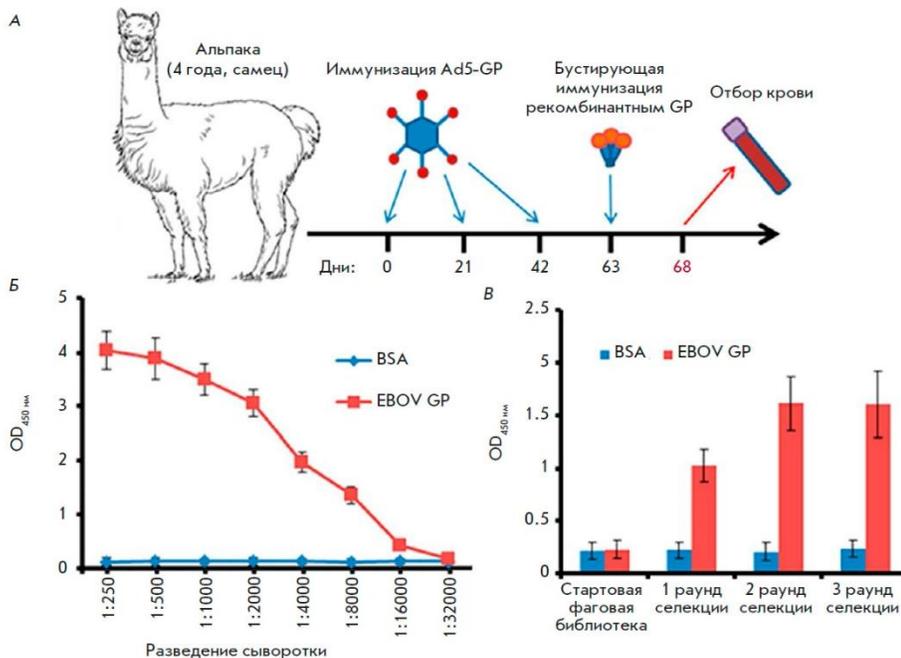


Рисунок 2. Схема иммунизации альпака (*V. pacos*) для получения панели нанокантител

На основе отобранных клонов aEv6, 6g3 и 2c8 были получены модифицированные молекулы моноклональных антител, слитых с Fc-фрагментом IgG1 человека для улучшения их иммунологических и фармакокинетических свойств. Последовательности ДНК, кодирующие антитела aEv6-hFc, h6g3-hFc и h2c8-hFc были получены модификацией исходных последовательностей путем замены константных участков на последовательности ДНК, характерные для человеческих IgG2, а так же внесения дополнительных мутаций, снижающих

аффинность к Fc-рецепторам иммунокомпетентных клеток (E233P, L234V, L235A, A327G, A330S, P331S – где цифра указывает порядковый номер аминокислоты, буквы обозначают исходную и конечную АК при мутации). Мутации использовались для снижения возможного негативного влияния эффекта антитело-зависимого усиления инфекции при использовании *in vivo*. Синтезированные конструкции использовали для получения стабильных продуцентов антител на основе клеток CHO, продукции антител в клетках CHO и их последующей очистки методами аффинной и ионообменной хроматографии.

На первом этапе, методом непрямого ИФА была охарактеризована специфичность клонов aEv6, h2c8 и h6g3 к различным белкам вируса Эбола: белок GP штаммов Kissidouyou, Mayinga, Makona, а также муциноподобному домену GP (MLD) и секретируемой форме sGP. В результате анализа было установлено, что клон h2c8 достоверно связывался с белком GP штаммов Mayinga, Makona, муциноподобным доменом GP в титрах 1 нг/мл, 1 нг/мл, 3,9 нг/мл соответственно, слабо связывался с белком GP штамма Kissidouyou в концентрации 1 мкг/мл и не связывался к секретируемой формой белка GP (sGP). Клон h6g3 связывался с белком GP штаммов Mayinga, Kissidouyou, Makona и секретируемой формой sGP в титрах 250 нг/мл, 1 нг/мл, 1 нг/мл и 3,9 нг/мл соответственно и не связывался с муциноподобным доменом GP.

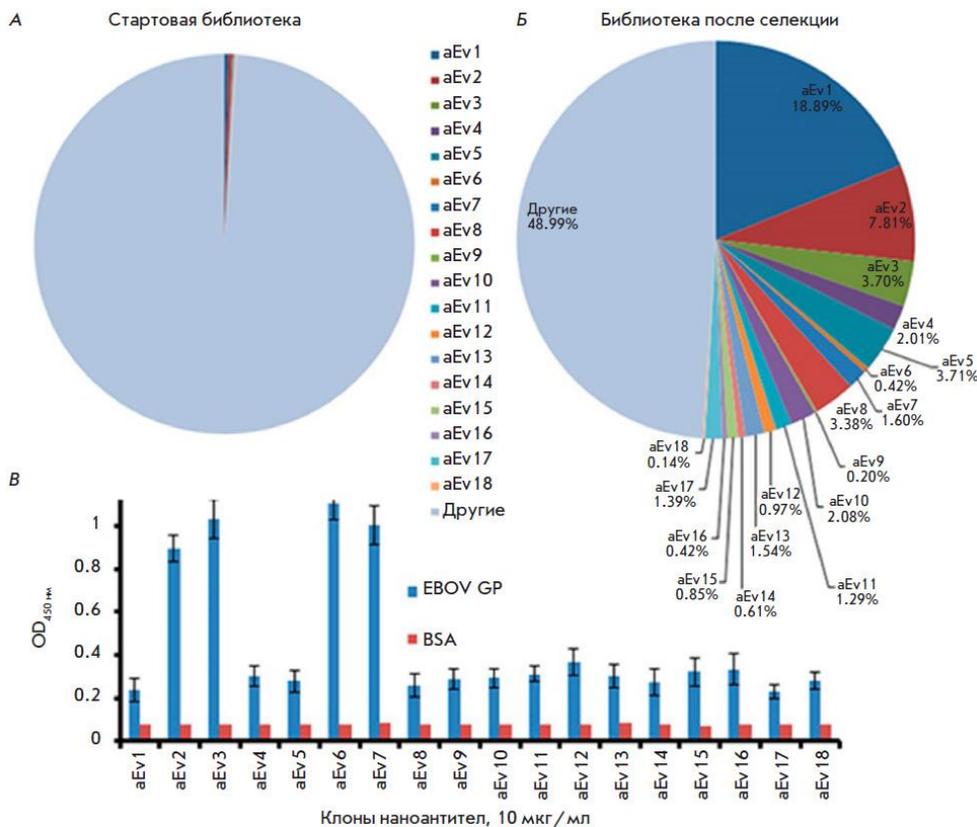


Рисунок 3. Результаты сравнительного анализа соотношения специфических однодоменных антител в библиотеках до и после отбора. *А* – процент клонов в стартовой библиотеке. *Б* – процент клонов в библиотеке после селекции. *В* – скрининг отобранных клонов в непрямом ИФА. aEv1–18 – клоны отобранных наноантител, EBOV GP – рекомбинантный EBOV GP, BSA – бычий сывороточный альбумин (отрицательный контроль).

В свою очередь клон aEv6 показал высокую специфическую активность в отношении белка GP штаммов Kissidouyou и Mayinga (62,5 и 250 нг/мл) и при этом не связывался с MLD и секретируемой формой белка GP вируса Эбола. Далее в реакции вирусной нейтрализации с

использованием rVSV-GP сравнили антитела aEv6-Fc, h2c8-Fc и h6g3-Fc. За титр вирус-нейтрализующих антител принимали максимальное разведение, дающее снижения вирусных бляшек более чем на 50% по сравнению с контрольным вирусом (PRNT50). В результате анализа было установлено, что антитело h2c8-Fc не обладает вируснейтрализующей активностью на модели подавления бляшкообразования rVSV-GP, антитело aEv6-Fc имеет подавляет бляшкообразование в концентрации 8 нг/мл, в то время как антитело h6g3-Fc показало вируснейтрализующую активность до концентрации 1,6 нг/мл. На заключительном этапе была проведена оценка вируснейтрализующей активности моноклональных антител с использованием вируса Эбола. Для этого разведения моноклональных антител: 40, 8, 4, 2,5, 1,25 и 0 мкг/мл смешивали со 110 БОЕ вируса Эбола и добавляли к клеткам GMK-AH-1. Через 7 дней культивирования оценивали результаты. За титр вирус-нейтрализующих антител принимали максимальное разведение, дающее снижения вирусных бляшек более чем на 50% по сравнению с контрольным вирусом (PRNT50). В результате анализа было установлено, что PRNT50 для клона h2c8-Fc составляет не менее 8 мкг/мл, для клона h6g3-Fc не менее 4 мкг/мл, для клона aEv7-Fc не менее 2,5 мкг/мл. Примечательно, что наибольшую нейтрализующую активность показала смесь двух клонов h2c8-Fc и h6g3-Fc, при смешивании которых с вирусом PRNT50 составила не менее 1,25 мкг/мл. На последнем этапе оценивали защитные свойства aEv6-Fc, h2c8-Fc и h6g3-Fc на модели летальной инфекции мышей rVSV-GP. Животных подвергали иммуносупрессивной терапии в течение 10 дней, после чего мышам из первой группы проводили заражение вирусом, а животным из опытных групп вводили смесь вирус и антитела. На 11 день мышам внутривенно вводили 10^9 БОЕ rVSV-GP как в отсутствие, так и в присутствии антител aEv6-Fc, h2c8-Fc или h6g3-Fc в нескольких временных диапазонах. Схема эксперимента показана на рисунке 4А. За мышами наблюдали в течение 5 дней после заражения. Мыши контрольной группы, которым не вводили антитела, погибли на второй день после заражения. Введение антител спустя 5 ч после заражения также не смогло предотвратить или отсрочить гибель животных. Введение антител спустя 2 ч после заражения обеспечило выживание двух из шести мышей. Предварительная инкубация вируса с антителами aEv6-Fc или h6g3-Fc в течение часа, а также смешивание этих антител с rVSV-GP перед введением полностью защитило животных. При этом антитела h2c8-Fc не показали защитной активности. Результаты эксперимента представлены на рисунок 4Б. Для более детальной оценки защитных свойств антител на модели инфекции rVSV-GP у мышей, на примере антитела aEv6-Fc, определяли число БОЕ в крови и органах зараженных животных. Для проведения эксперимента были отобраны три группы животных по четыре особи в каждой. Первая группа иммуносупрессированных мышей оставалась интактной. Мыши второй группы были инфицированы rVSV-GP. Третья группа была инфицирована rVSV-GP, предварительно нейтрализованным aEv6-Fc. Затем, спустя 1 и 2 дня, определяли присутствие rVSV-GP в мозгу, печени, почках, селезенке, кишечнике и крови зараженных мышей, используя культуру клеток Vero E6. Результаты эксперимента показаны в таблице 1. В тканях и органах иммуносупрессированных мышей, не зараженных rVSV-GP (отрицательный контроль), признаки присутствия вируса не обнаружены. У животных второй группы (иммуносупрессированные мыши, инфицированные rVSV-GP) вирус обнаружен в крови, печени, почках, селезенке в первый день после его введения. На второй день титр rVSV-GP стал значительно больше в крови и печени, в то время как в органах и тканях мышей, которым rVSV-GP вводили вместе с антителами aEv6-Fc (группа 3), вирус не был обнаружен.

Таким образом, экспериментальные данные на модели летальной инфекции мышей рекомбинантным вирусом везикулярного стоматита показали, что антитела aEv6-Fc и h6g3-Fc обладали вируснейтрализующей и протективной активностью. В данном исследовании впервые показана принципиальная возможность получения наноантител и их модификаций, специфичных к поверхностному гликопротеину вируса лихорадки Эбола и обладающих выраженной

противовирусной активностью в летальной модели мышей, инфицированных псевдотипированным вирусом везикулярного стоматита. Исследования на макаках-резусах проводились в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Защитную способность клонов aEv6-Fc, h2c8-Fc или h6g3-Fc оценивали с помощью пассивной внутривенной иммунизации самцов макаков-резусов (5 животных в группе), зараженных внутримышечно 15LD50 EBOV за 24 часа до начала терапии. Эксперимент включал группы, которым вводили aEv6-Fc, h2c8-Fc или h6g3-Fc отдельно и группу животных, которым вводили смесь h2c8-Fc и h6g3-Fc, поскольку в эксперименте по изучению вируснейтрализующих свойств антител на модели подавления бляшкообразования смесь этих двух клонов показала большую активность. Интактных животных использовали в качестве положительного контроля, а животных, получавших плацебо (PBS), использовали в качестве отрицательного контроля. Животным из групп aEv6-Fc, h2c8-Fc или h6g3-Fc вводили соответствующие антитела в дозе 50 мг/кг 5 раз на 1, 3, 5, 7 и 9 день после заражения.

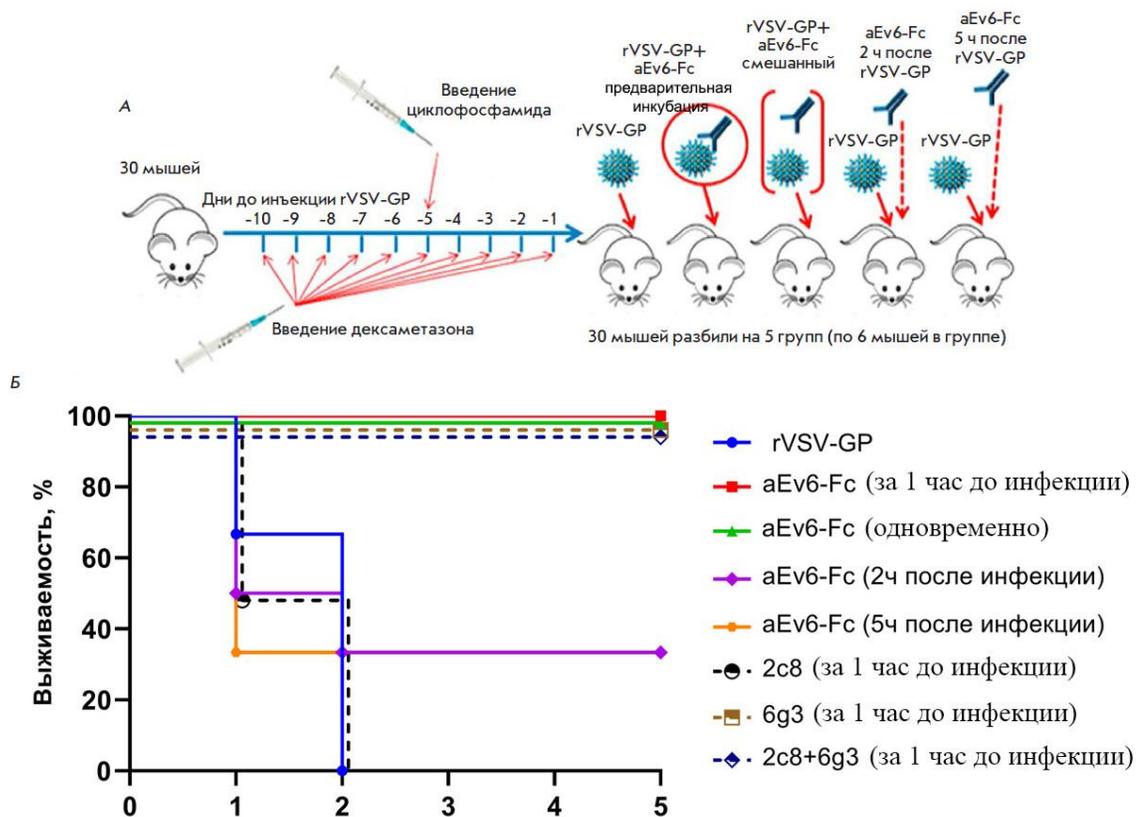


Рисунок 4. Оценка протективной активности антител на модели летальной инфекции rVSV-GP. А – схема эксперимента; Б – результаты эксперимента. А – rVSV-GP – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, псевдотипированный гликопротеином вируса Эбола (*H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1*); Б – rVSV-GP – мыши, инфицированные rVSV-GP (10^9 БОЕ/мышь); aEv6-Fc, 2c8, 6g3, 2c8+6g3 (за 1 час до инфекции) – мыши, получившие rVSV-GP (10^9 БОЕ/мышь), ранее смешанный и инкубированный в течение часа с 300 мкл антител aEv6-Fc, h2c8-Fc, h6g3-Fc или их смеси, соответственно; rVSV-GP+aEv6-Fc (одновременно) – мыши, получившие rVSV-GP (10^9 БОЕ/мышь), смешанный с 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл) перед введением; rVSV-GP+aEv6-Fc (2 ч после заражения) – мыши, получившие 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл) через 2 часа после заражения rVSV-GP (10^9 БОЕ/мышь); rVSV-GP+aEv6-Fc (5 ч после заражения) – мыши, получившие 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл) через 5 часов после заражения rVSV-GP (10^9 БОЕ/мышь).

Таблица 1. Титры rVSV-GP в некоторых органах инфицированных мышей

Группа	День после введения	Средние титры rVSV-GP (две мыши), БОЕ/20 мкг органа					
		кровь	мозг	печень	почка	селезенка	кишечник
Интактные иммуносупрессированные мыши	1	–	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–	–
Иммуносупрессированные мыши, инфицированные rVSV-GP	1	4.44×10^5	–	6.67×10^4	4.14×10^4	3.65×10^4	–
	2	1.7×10^7	–	1.27×10^5	2.44×10^4	3.44×10^4	–
Иммуносупрессированные мыши, получившие rVSV-GP+aEv6-Fc	1	–	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–	–

В результате исследования было установлено, что животные из группы положительного контроля оставались живыми до конца эксперимента. Все животные из групп с контрольной дозой вируса и плацебо умерли на 8 и 10 день соответственно. Все животные, получавшие aEv6-Fc и h2c8-Fc, погибли на 7 и 12-й день, соответственно, тогда как только 2 из 3 животных, получавших h6g3-Fc, погибли. Наилучшие результаты были получены в группе, получавшей смесь h2c8-Fc и h6g3-Fc, в которой ни одно животное не погибло до конца эксперимента, что свидетельствует о синергическом эффекте защитной способности указанных антител. Результаты эксперимента представлены на рисунке 5. Таким образом, в результате эксперимента была продемонстрирована 100% выживаемость инфицированных животных при введении коктейля из 2-х моноклональных антител, одно из которых специфично к муциновому домену белка GP вируса Эбола

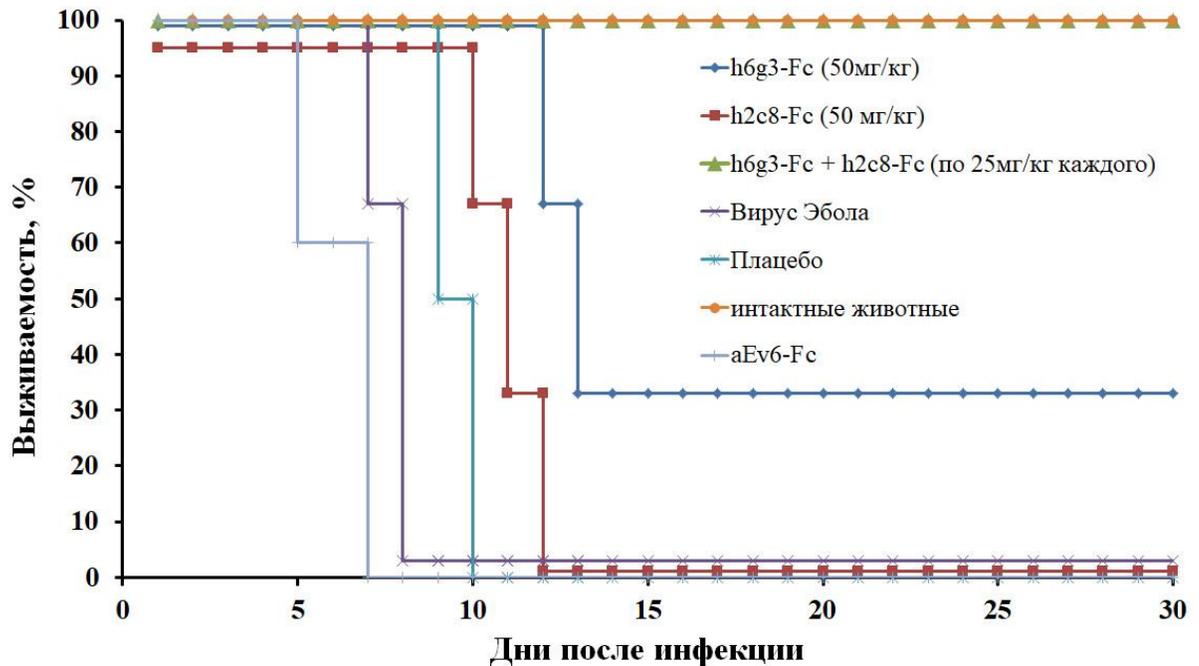


Рисунок 5. Защитная активность моноклональных антител на модели летальной инфекции макак-резусов вирусом лихорадки Эбола.

Специфичность гибели животных определяли по наличию вируса в образцах печени. Отрицательные колонии специфической морфологии, образованные вирусом Эбола в культуре клеток, свидетельствовали о специфичности гибели животных. На основе анализа протективной активности моноклональных антител был разработан препарат для экстренной профилактики и этиотропной терапии лихорадки Эбола на основе смеси 1:1 двух клонов h2c8-Fc и h6g3-Fc. В рамках последующей разработки был проведен полный спектр доклинических исследований

безопасности препарата, включающий: изучение острой и хронической токсичности; иммунотоксичности и аллергизирующих свойств, а также репродуктивной токсичности. Проведенные исследования позволили сделать вывод, что препарат на основе гуманизированных моноклональных антител для терапии болезни вызванной вирусом Эбола не оказывает отрицательного действия на организм животных в дозах, предполагаемых для клинического использования и получить разрешение на проведение исследований безопасности на здоровых добровольцах.

Доклинические исследования фармакокинетики препарата

Задачи доклинического исследования включали оценку фармакокинетических параметров препарата при однократном внутривенном введении лабораторным мышам.

Доза вводимого препарата составляла 50 мг/кг (терапевтическая доза, вводимая приматам на модели летальной инфекции). Фармакокинетика препарата изучалась при однократном внутривенном способе введения. Общий объем распределения препарата (V_{ss_obs}) составил чуть более 1,85 мл/кг (0,00185 (мг/кг)/(мкг/мл)), что подтверждает 100% биодоступность препарата и свидетельствует о том, что он полностью распределен в крови мышей. Константа реакции элиминации (λ_z) составила 0,01/час; метаболический клиренс (Cl_{obs}) - 0,0014 мл/час (0,0000139815 (мг/кг)/(мкг/мл)/час); время полувыведения ($t_{1/2}$) - 65 час; максимальная концентрация в плазме крови (C_{max}) - 529 мкг/мл; среднее время удержания препарата (MRT_{0-inf_obs}) – 132,6 часов; при этом площадь под экспериментальной кривой концентрация-время (AUC_{0-t}) составила 63665,5 мкг/мл*час, что отличается от площади с учетом экстраполяции данных менее чем на 5 % ($AUC_{0-t/0-inf_obs}$). Препарат характеризовался линейной фармакокинетикой, 100% биодоступностью, объемом распределения соответствующим объему циркулирующей крови и периодом полувыведения 65 часов.

Клинические исследования безопасности и фармакокинетики препарата ГамЭзумаб на здоровых добровольцах

В рамках продолжения разработки было проведено «Открытое исследование безопасности и фармакокинетики лекарственного препарата для экстренной профилактики и терапии болезни вызванной вирусом Эбола на основе гуманизированных моноклональных антител, раствор для инфузий, при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы». В рамках исследования изучена безопасность препарата при однократном введении. Терапевтическая доза рассчитана исходя из противовирусной активности моноклональных антител входящих в состав препарата. Для обеспечения безопасности добровольцев введение препарата было начато с 1/10 терапевтической дозы (из расчета 1,4 мг/кг). Эскалация дозы проводилась поэтапно: на первом этапе изучена безопасность препарата в дозе 1/10 от терапевтической дозы у 5 добровольцев, на втором – 1/2 (из расчета 7 мг/кг), у 5 добровольцев, на третьем – полная доза (из расчета 14 мг/кг), у 15 добровольцев. На третьем этапе было включено 15 добровольцев по 5 человек в когорте. Для предотвращения инфузионных реакций, известных нежелательных явлений, типичных для препаратов моноклональных антител, добровольцы по решению главного исследователя могли получать ацетаминофен (парацетамол) 500 мг и дифенгидрамин 50 мг однократно перорально, за 30 мин - 1 час до инфузии. Такая схема премедикации рутинно используется при лечении препаратами моноклональных антител [Coppiе Henke Yarbrow 2005]. Выбор контингента добровольцев обусловлен требованиями Федерального закона от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Руководств по проведению клинических исследований лекарственных средств (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ, том 1, 2), а также рекомендациями ВОЗ (1994 г., 2004 г., 2016 г.)

Предложенный дизайн минимизировал риски для участников исследования, так как позволил осуществлять мониторинг состояния здоровья добровольца в течение 7 суток в условиях стационара с последующим амбулаторным наблюдением в течение 90 дней.

Распределение добровольцев в группы:

	1/10 дозы	½ дозы	1 доза	Итого
Дублиеры	1	1	3	5
Добровольцы	5	5	15	25

Исследование для каждого участника состояло из 3 периодов:

- скрининг (5-7 дней до введения препарата);
- период введения исследуемого препарата и наблюдения в условиях стационара (госпитализация на 7 дней);
- период последующего наблюдения (с 8 по 90 день с момента введения).

Всего состоялось 9 визитов, включая визит скрининга, из которых 1 визит осуществлен в рамках стационарного наблюдения, а 7 визитов являлись амбулаторными. Во время визитов добровольцы проходили обследование в соответствии с планом исследования. Дизайн исследования был одинаковым для всех добровольцев, за исключением режима дозирования.

Популяцию исследования составили 25 здоровых добровольцев мужского и женского пола в возрасте от 19 до 43 лет (включительно), отобранные в соответствии с критериями включения и не имеющие критериев невключения. Все добровольцы завершили участие в исследовании согласно Протоколу, за исключением добровольца №018, который досрочно завершил участие в исследовании по причине «Пациент не соответствует критериям включения/невключения». Далее кратко представлены результаты исследования. У препарата ГамЭзумаб, раствор для инфузий (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) установлен благоприятный профиль безопасности на всех исследуемых уровнях дозирования (1/10 и ½ (из расчета 7 мг/кг) от терапевтической дозы, а также полная доза (из расчета 14 мг/кг)). Основанием послужило отсутствие достоверных различий жизненно-важных показателей (ЖВП), параметров инструментальных (ЭКГ) и лабораторных исследований (ОАК, БхАК, иммунологического анализа крови и ОАМ). Выявленные статистически значимые различия отдельных параметров были отнесены к статистическим ошибкам 1 типа (α - «ложноположительный результат»), поскольку встречались во всех исследуемых группах и носили разнонаправленный характер.

Всего в ходе исследования было зарегистрировано 302 НЯ, связанных с соматическим статусом и изменением лабораторных показателей добровольцев. По степени тяжести 257 из 302 случаев (85,1 %) отнесены к легкой степени тяжести, 40 из 302 случаев (13,2 %) – к умеренной и 5 из 302 случаев (1,7 %) – тяжелой. НЯ были связаны преимущественно с общими нарушениями в месте введения, в 204 случаях (79,5 %), с лабораторными и инструментальными данными, в 3 случаях (1,0 %). Анализ данных показал, что у добровольцев, получавших препарат в дозе 1/10 от терапевтической дозы было зарегистрировано 26 из 302 НЯ (8,6 %), в дозе ½ от терапевтической дозы - 39 из 302 (12,9 %) и 237 из 302 (78,5 %) НЯ зарегистрировано у добровольцев, получавших полную терапевтическую дозу.

За время проведения исследования ни один из добровольцев не прекратил участие в исследовании по причине возникновения НЯ. Также не было выявлено статистически значимых различий между группами по показателям местной и общей переносимости препарата: кожные аллергические реакции (сыпь, зуд и др.); боль в мышцах; боли в спине; боль в суставах; недомогание; потливость; головная боль; тошнота; озноб; нарушения пищеварения; головокружение; боли в грудной клетке; лихорадка; чихание; затруднение дыхания; другие жалобы, а также гиперемия в месте введения препарата; отек; боль; оценка региональных лимфатических узлов, что также свидетельствовало об удовлетворительной переносимости препарата. Значения лабораторных показателей также статистически не различались в исследуемых группах. Исключение составило статистически значимое снижение уровня параметра ОАК количество Лимфоцитов на 7 день ($p=0,043$) в Г3 в сравнении с Г2. При этом статистически значимые различия отдельных параметров ЖВП, ЭКГ и лабораторных показателей

были отнесены к статистическим ошибкам 1 типа (α - «ложноположительный результат»), поскольку встречались во всех исследуемых группах и носили разнонаправленный характер. На основании вышеизложенного сделано заключение об удовлетворительной переносимости препарата ГамЭзумаб, раствор для инфузий (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), у здоровых добровольцев.

2.2.2. Разработка препарата на основе однодоменных антител для экстренной профилактики и этиотропной терапии COVID-19

В январе 2020 года ВОЗ объявила эпидемию, связанную с распространением нового коронавируса SARS-CoV-2 и назвала ее чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения международного значения. В марте 2020 года ВОЗ охарактеризовала распространение болезни как пандемию. Заболевание, вызываемое вирусом SARS-Cov-2 (COVID-19) является острой респираторной инфекцией, которая может протекать как в легкой, так и в тяжелой форме, и сопровождаться такими осложнениями, как пневмония, острый респираторный дистресс-синдром, острая дыхательная недостаточность, острая сердечная недостаточность, острая почечная недостаточность, септический шок, кардиомиопатии, и др. По состоянию на 6 октября 2024 года число зарегистрированных случаев COVID-19 превысило 770 млн и более 7 млн случаев COVID-19 закончились летальным исходом. Очевидно, что в настоящее время сохраняется необходимость в разработке безопасных и эффективных средств профилактики и терапии заболевания, вызванного вирусом SARS-COV-2.

Одним из подходов к разработке эффективного терапевтического средства является получение моноклональных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении вируса SARS-CoV-2. С начала пандемии несколько препаратов на основе моноклональных антител получали разрешение на экстренное использование для лечения COVID-19 и постконтактной профилактики. Однако, в последствии, и по мере накопления мутаций в основных сайтах связывания вирусного гликопротеина, нейтрализующая активность антител начала значительно снижаться. Эволюция вируса SARS-CoV-2 и его адаптация в условиях формирующегося иммунитета человека привела к появлению вариантов вируса, которые стали более трансмиссивными и менее чувствительными к нейтрализующим антителам. Распространение этих новых вариантов вируса снизило эффективность вакцин и некоторых терапевтических антител. Список этих вызывающих опасение вариантов (VOC) состоит из B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), B.1.1.28/P.1 (Gamma), B.1.617.2 (Delta) и Варианты B.1.1.529 (Omicron), ХВВ 1, 1.5., 1.9.1, 1.16, Jn.1, KS.1(октябрь 2024 г., ВОЗ) и продолжает увеличиваться по мере эволюции вируса. Появившийся в 2023 году вариант Омикрон имеет более 30 мутаций в гликопротеине S. А вариант Пироло (Jn.1) содержит 59 аминокислотных замен в S антигене вируса SARS-Cov-2. В связи с этим в настоящее время существует необходимость выделения антител, или получения мультивалентных молекул на их основе, обладающих широким спектром нейтрализующей активности в отношении VOC.

Проведение иммунизации и отбор клонов однодоменных антител, специфических рецептор-связывающему домену (RBD) S-гликопротеина SARS-Cov-2

В качестве мишени для отбора нейтрализующих антител был выбран рецептор-связывающий домен (RBD) поверхностного гликопротеина вируса SARS-Cov-2. RBD участвует в первичном взаимодействии вируса с клеткой хозяина, посредством связывания с рецептором ACE2 и инициирует последующую инвазию вируса в клетку. В ряде исследований было установлено, что более 80- 85% антител, нейтрализующих вирусы семейства коронавирусов, специфичны к рецептор-связывающему домену (RBD) поверхностного гликопротеина S (spike). В связи с этим, получение антител, специфических к RBD и блокирующих взаимодействие вируса с клеточным рецептором ACE2, является перспективным подходом подавления развития вирусной инфекции.

На первом этапе исследования был получен высокоочищенный препарат рекомбинантного рецептор-связывающего домена. Для этого был проведен дизайн генетической конструкции для экспрессии и очистки рецептор-связывающего домена RBD гликопротеина S вируса SARS-CoV2 в клетках млекопитающих. В качестве референсной последовательности был использован сиквенс YP_009724390.1 международной базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). проведена продукция рецептор-связывающего домена RBD трансфицированными клетками в культуральную жидкость с последующей аффинной очисткой. Чистоту и подлинность RBD оценивали методом электрофореза в ПААГ. Полученный белковый препарат был использован для получения иммунной библиотеки наноантител. Кроме того, препарат очищенного RBD применялся при создании «Набора реагентов для иммуоферментного выявления иммуноглобулинов класса G к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» (РЗН 2020/10393 и РЗН 2021/14488). Для получения библиотеки VHH двугорбого верблюда иммунизировали полученным RBD (100мкг на иммунизацию) 5 раз с промежутками в 10-14 дней. Через 5 дней после последней иммунизации определяли титр антител в сыворотке крови верблюда, который составил 1/1638400. Нейтрализующую активность сыворотки измеряли методом микронеutralизации с использованием живого вируса SARS-CoV-2 B.1.1.1, титр нейтрализующих антител составил 1/1280.

Для отбора RBD специфических VHH была сконструирована библиотека фагов путем клонирования последовательностей VHH из В-клеток иммунизированного верблюда в фагмидный вектор pHEN1. Был проведен один раунд селекции методом фагового дисплея с последующим скринингом отдельных клонов методом ИФА (тест-система РЗН2020/10393) для идентификации клонов, специфически связывающихся с RBD. Для проведения ИФА использовали как образцы индивидуальных фагов, несущих на поверхности VHH, так и белковые препараты этих клонов для оценки растворимости и специфической активности. По результатам анализа активности методом ИФА 212 клонов VHH были отобраны для секвенирования нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела. В результате проведенного секвенирования было выделено 39 индивидуальных клонов, имеющих уникальную последовательность вариабельных петель (CDRs) в структуре вариабельного домена. Филогенетический анализ последовательностей позволил изолировать 16 клонов, относящиеся к разным клонотипам, для дальнейшего исследования. Активность связывания RBD каждого антитела анализировали с помощью ELISA. В результате анализа была подтверждена специфическая активность 14 клонов, значения EC50 находились в диапазоне от 1,1 до 313,3 нМ.

Анализ вируснейтрализующей активности однодоменных антител и изучение ее механизма.

Оценка способности однодоменных антител подавлять развитие вирусной инфекции *in vitro* изучали при помощи двух различных методов: оценки способности антител конкурировать с RBD за связывание с ACE2 рецептором и реакцией микронеutralизации с вирусом SARS-CoV-2.

Способность антител нейтрализовать вирус SARS-CoV-2 преимущественно связана с предотвращением проникновения вируса в клетки-мишени в результате блокирования связывания S белка вируса с рецептором ACE2 на клетках. На следующем этапе работы была изучена способность полученных однодоменных антител блокировать взаимодействие RBD с ACE2 с помощью конкурентного ИФА. Анализ выявил снижение сигнала в конкурентном ИФА в случае большинства нейтрализующих антител, что указывает на наличие конкуренции между нейтрализующими антителами и ACE2 за связыванием с RBD. Наиболее выраженное снижение сигнала мы наблюдали в случае антитела P2C5, которое в концентрации 0.5 мкг/мл ингибировало взаимодействие ACE2-RBD более чем на 90%. По результатам анализа, были отобраны клоны p1b2, p5a7, p2c5, p2g1, p1g1, p5c11, p4h1, p5f8 как показавшие наибольший процент

ингибирования, для изучения их активности в реакции вирус-нейтрализации с нативным вирусом.

Для изучения способности анализируемой панели VHH нейтрализовать живой вирус SARS-CoV-2, мы провели анализ микронеutralизации с ингибированием цитопатического эффекта вируса в качестве маркера нейтрализации. Реакцию нейтрализации вируса SARS-CoV-2 ставили в варианте постоянная доза вируса – разведения образца однодоменных антител. Образцы однодоменных антител смешивали со 100 БОЕ вируса SARS-CoV-2, инкубировали 1 час при 37°C и добавляли к клеткам Vero E6. Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO₂. Через 96 часов производили учет развития цитопатического действия вируса на культуру клеток визуально по оценке нарушения монослоя клеток. Мы обнаружили, что 10 из 14 наноантител эффективно нейтрализовали вирус SARS-CoV-2 (B.1.1.1) в диапазоне концентраций от 12 нМ до 1540 нМ. Тремя наиболее сильными антителами были P2C5, P2G1 и P5F8, которые полностью ингибировали цитопатический эффект вируса при 24 нМ, 12 нМ и 48 нМ соответственно. Таким образом, в результате проведенной работы было получено три однодоменных антитела (клоны p2c5, p2g1, p5f8), обладающих высокой вируснейтрализующей активностью, которые были использованы для дальнейших исследований.

Дополнительно, отобранные клоны p2c5, p2g1, p5f8 были охарактеризованы по аффинности к рецептор-связывающему домену S гликопротеина вируса SARS-Cov-2 методом плазмонного резонанса. Константы диссоциации (KD) составляли 3,97 нМ, 5,36 нМ и 1,94 нМ для P2C5, P2G1 и P5F8 соответственно, что свидетельствует о высокой аффинности связывания однодоменных антител с RBD вируса SARS-CoV-2.

Получение молекул VHH, содержащих различные модификации и оценка их противовирусной активности in vitro и in vivo.

Для повышения противовирусной активности отобранных антител на следующем этапе исследования нами были получены различные модификации нейтрализующих клонов P2C5, P2G1 и P5F8: моновалентные молекулы, димеры, гетеровалентные молекулы димеров, а также молекулы VHH, содержащие Fc-фрагмент иммуноглобулина человека. Для получения димеров использовали глицин-сериновый линкер, обеспечивающий гибкое связывание двух мономерных молекул без потери их функциональных свойств, которые экспрессировали в виде единого белкового продукта. Для получения модификаций, содержащих Fc-фрагмент, использовали последовательность иммуноглобулина G человека изотипа IgG1. Способность всех полученных молекул связываться с RBD подтверждали методом ИФА. Анализ нейтрализующей активности молекул методом микронеutralизации показал выраженное усиление нейтрализующей активности некоторых димерных форм (таблица 2), также как их модификация, содержащая Fc-фрагмент. Так, P2C5-димер и P2C5-Fc варианты показали полное ингибирование цитопатического действия вируса SARS-Cov-2 (Ухань) в концентрации 89 пМ, что более чем в 200 раз по сравнению с мономером P2C5. Кроме того, было установлено, что молекула гетеродимера P2C5-P5F8 показала усиление нейтрализующей активности 100 раз по сравнению с мономерные формами этих клонов (178пМ) (Таблица 2).

Таблица 2. Оценка нейтрализующей активности различных модификаций VHH

Антитела		Минимальные нейтрализующие концентрации антител, нМ					
		B1.1.1	Alpha (B.1.1.7)	Beta (B.1.351)	Gamma B1.1.28/P.1)	Delta (B.1.617.2)	Omicron (B.1.1.529)
Мономеры	P2C5	24,04	48,08	96,15	48,08	>1500	24,04
	P2G1	12,02	48,08	96,15	48,08	24,04	>1500
	P5F8	48,08	48,08	96,15	96,15	48,08	>1500
Гомодимеры	(P2C5) ₂	0,089	0,178	0,356	0,356	>1500	0,089
	(P2G1) ₂	11,36	22,73	45,45	45,45	45,45	>1500
	(P5F8) ₂	5,68	5,68	22,72	22,72	11,36	>1500

Гетеродимеры	P2C5-P2G1	0,709	0,356	2,84	2,84	11,36	0,709
	P2C5-P5F8	0,178	0,089	0,356	0,356	2,85	0,709
	P2G1-P2C5	2,84	2,84	11,36	5,68	45,45	2,84
	P2G1-P5F8	45,45	45,45	181,82	45,45	90,91	>1500
	P5F8-P2C5	5,68	11,36	22,73	22,72	90,91	5,68
	P5F8-P2G1	11,36	22,72	90,91	22,72	22,73	>1500
Fc-фьюжн молекулы VHH	P2C5-Fc	0,089	0,178	0,356	0,356	>1500	0,089
	P2G1-Fc	11,36	22,73	45,45	45,45	45,45	>1500
	P5F8-Fc	5,68	5,68	22,72	22,72	11,36	>1500

Таким образом, были отобраны клоны VHH, обладающие высоким сродством к рецептор-связывающему домену RBD гликопротеина S и обладающих нейтрализующей активностью в отношении различных штаммов вируса SARS-Cov-2 за счет блокирования связывания вируса с ACE2 рецептором на поверхности клеток хозяина. Кроме того, на основе отобранных клонов, были получены различные модификации молекул VHH, для ряда из которых продемонстрировано значительное усиление нейтрализующего потенциала молекул. Для дальнейшей работы с целью разработки средства экстренной профилактики и этиотропной терапии COVID-19 была использована молекула P2C5-Fc, показавшая наибольшую нейтрализующую активность *in vitro* на различных штаммах, включая Омикрон вариант B.1.1.529.

Разработка препарата ГамКовиМаб для экстренной профилактики и ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции

Получение гуманизированных аналогов клонов P2C5-Fc и XR19-Fc, входящих в состав препарата

С использованием гибридной технологии (исходный клон получен совместно с лабораторией молекулярной диагностики, рук. Гребенникова Т.В.) было получено моноклональное антитело XR19, обладающее высокой нейтрализующей активностью в отношении вируса SARS-Cov-2 штамма Дельта B.1.617.2. Таким образом, для создания средства экстренной профилактики и ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции было принято решение использовать смесь двух моноклональных антител P2C5-Fc и XR19-Fc после проведения предварительной гуманизации их аминокислотной последовательности, обеспечивающих нейтрализацию всех циркулирующих на данный момент вариантов вируса SARS-Cov-2, включая вариант Дельта.

Аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей антитела GamXRH19 были гуманизированы при помощи биоинформационного ресурса Abysis database (<http://www.abysis.org/abysis/>) с последующим анализом стабильности структуры гуманизированной молекулы методами молекулярной динамики. Далее, был разработан дизайн аминокислотной последовательности полноразмерных тяжелых и легких цепей гуманизированного антитела XRH19. На основе аминокислотных последовательностей были синтезированы гены тяжелой и легкой цепей антитела XRH19 (ЗАО «Евроген»), а также тяжелой цепи клона P2C5 (GamP2C5) с учетом оптимизации экспрессии в клетках CHO. Для продукции тяжелоцепочечного моноклонального антитела GamP2C5 (компонент I препарата ГамКовиМаб) и гуманизированного моноклонального антитела GamXRH19 (компонент II препарата ГамКовиМаб) были получены стабильные продуценты клеток CHO.

Определение нейтрализующей активности моноклональных антител, входящих в состав препарат ГамКовиМаб, с использованием вируса SARS-CoV-2

Нейтрализующую активность моноклональных антител изучали в реакции нейтрализации по эффекту подавления цитопатического действия вируса на культуру клеток. Реакцию нейтрализации ставили в варианте постоянная доза вируса – разведения препарата. Исследование вируснейтрализующей активности антител проводили с использованием различных вариантов

вируса SARS-CoV-2 (variants of concern, VOC): B.1.1.1 (исходный вариант), B.1.1.7 (Альфа), B.1.351 (Бета), B.1.1.28/P.1 (Гамма), B.1.617.2 (Дельта), B.1.1.529 (Омикрон).

Таблица 3. Вируснейтрализующие концентрации моноклональных антител GamP2C5 и GamXRH19, входящих в состав препарат ГамКовиМаб в отношении вируса SARS-CoV-2 различных штаммов.

Штамм вируса SARS-CoV-2	ВНА, клон GamP2C5	ВНА, клон GamXRH19
SARS-CoV-2 вариант B.1.1.1	≤9,8 нг/мл	≤16 нг/мл
SARS-CoV-2 вариант B.1.1.7	≤9,8 нг/мл	>1250 нг/мл
SARS-CoV-2 вариант B.1.351	≤19,5 нг/мл	>1250 нг/мл
SARS-CoV-2 вариант B.1.1.28/P.	≤39,1 нг/мл	>1250 нг/мл
SARS-CoV-2 вариант B.1.617.2	>1250 нг/мл	≤32 нг/мл
SARS-CoV-2 вариант B.1.1.529	≤9,8 нг/мл	>1250 нг/мл

В исследовании продемонстрирована выраженная вируснейтрализующая активность моноклонального антитела GamP2C5 в отношении вируса SARS-CoV-2, в том числе вариантов, вызывающих опасение Alpha, Beta, Gamma и Omicron, а моноклонального антитела GamXRH19 в отношении вируса SARS-CoV-2, в том числе варианта, вызывающего опасение Delta. При этом, их совместное применение обеспечивало нейтрализацию всех используемых штаммов (Таблица 3).

Определение протективной активности моноклональных антител, входящих в состав препарат ГамКовиМаб, на модели инфекции животных вирусом SARS-Cov-2

Протективную активность препарата ГамКовиМаб на основе моноклонального антитела GamP2C5 (компонент I) и моноклонального антитела GamXRH19 (компонент II) определяли в эксперименте *in vivo* на модели летальной инфекции у мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J. Данные животные чувствительны к инфекции SARS-CoV-2 и являются наиболее релевантной моделью для COVID-19. Летальность животных после заражения вирусом SARS-CoV-2 составляет 100%. В работе использовали вирус SARS-CoV-2 исходного варианта B.1.1.1, а также вариантов B.1.617.2 (Delta) и Omicron B.1.1.529, изолированных в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, хранящийся в Государственной коллекции вирусов. Вариант Дельта был использован в связи с широким распространением данного варианта по всему миру и характеризующимся более тяжелым течением заболевания COVID-19 у пациентов, инфицированных данным вариантом вируса SARS-Cov-2 по сравнению со всеми остальными VOC. На момент проведения исследований доля варианта Дельта (и его дочерних линий) среди всех выявляемых вариантов на территории РФ составляла более 96% (май 2021г в Москве).

Для оценки базовой протективности препарата в отношении исходного штамма SARS-CoV-2 Животных заражали интраназально в дозе 10^5 TCID₅₀, далее вводили препарат моноклональных антител или плацебо. На рисунке 6А представлены данные по выживаемости животных исследуемых групп. На рисунке 6Б представлена динамика изменения веса. В контрольной группе животных наблюдалась гибель всех животных к 10 дню после инфицирования. В группе животных, получивших препарат ГамКовиМаб в дозе 10 мг/кг через 1, 6 и 24 часа после заражения, гибели животных не наблюдалось.

Для оценки широты спектра терапевтического действия препарата ГамКовиМаб провели оценку его протективной активности на модели инфекции у ACE2-трансгенных мышей, вызванной другим вариантом вируса SARS-CoV-2 - штаммом B.1.617.2 (Delta), характеризующейся более тяжелым течением инфекции и варианта Omicron B.1.1.529, получившем широкое распространение в следствие высокой контагиозности.

А

Б

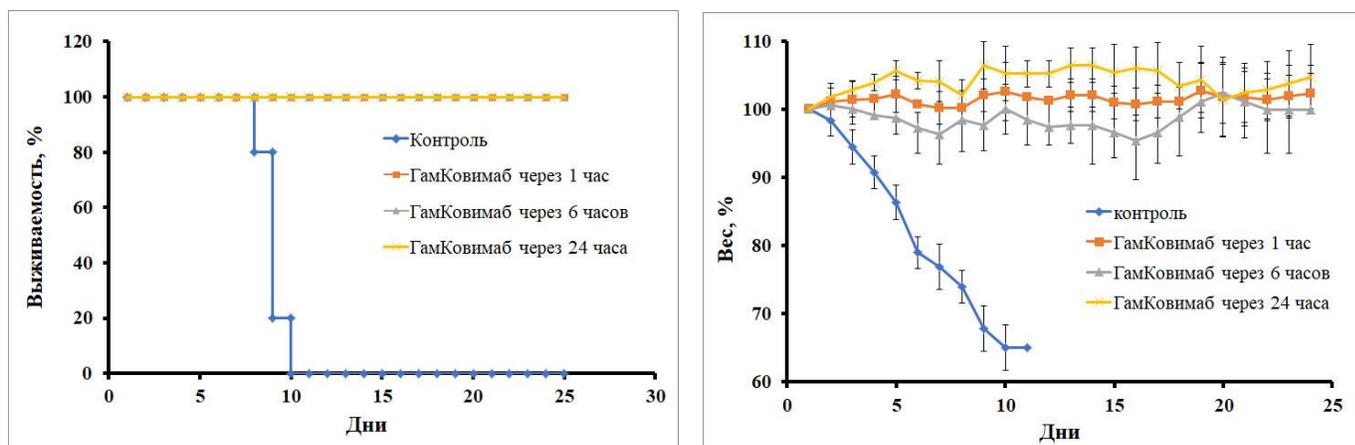


Рисунок 6. А - анализ выживаемости животных в группах, получавших ГамКовиМаб или плацебо, после заражения вирусом SARS-CoV-2 варианта B.1.1.1. Б - анализ изменения веса животных в группах, получавших ГамКовиМаб или плацебо, после заражения вирусом SARS-CoV-2 варианта B.1.1.1.

Инфекционный титр вируса B.1.617.2 (Delta) составил 10^7 TCID₅₀/мл. Животных заражали вирусами SARS-CoV-2 интраназально (и/н) в дозе 10^5 TCID₅₀ на животное, что соответствует ~333 ЛД₅₀. Выживаемость животных оценивали в течение 25 суток после заражения. На рисунке 7А представлены данные по выживаемости животных. На рисунке 7Б представлена динамика изменения веса. В контрольной группе животных, получавших плацебо, отмечалась гибель всех животных к 9 дню после заражения вирусом. В группах животных, получавших препарат ГамКовиМаб в дозе 10 мг/кг спустя 1, 6 или 24 часа после заражения, гибели животных не отмечалось. На заключительном этапе исследования протективность препарата была оценена в отношении вируса SARS-Cov-2 варианта Omicron (B.1.1.529). Указанный вариант, содержит большое количество мутаций в области рецептор-связывающего домена, позволяющего вирусу эффективно ускользать от сформированного ранее защитного гуморального иммунитета в результате перенесенной инфекции или вакцинации.

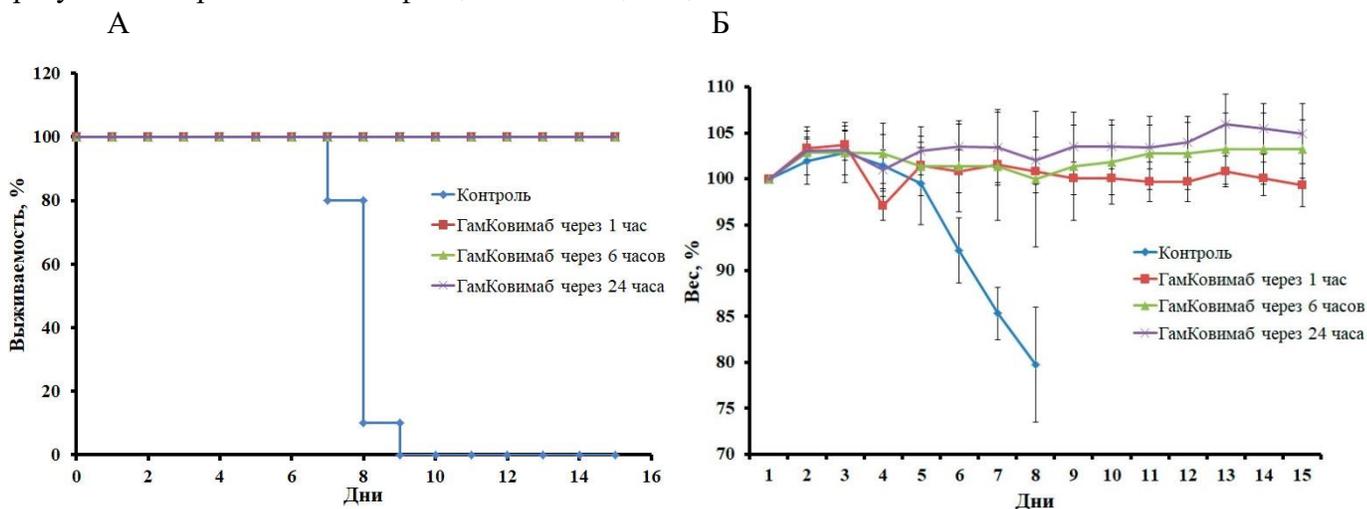


Рисунок 7. Анализ выживаемости изменения веса животных в группах, получавших ГамКовиМаб или плацебо, после заражения вирусом SARS-CoV-2 варианта Delta.

А

Б

препарата начато с 1/10 терапевтической дозы. Эскалация дозы проводилась поэтапно: на первом этапе изучена безопасность препарата в дозе 1/10 от терапевтической дозы у 5 добровольцев, на втором – 1/2, у 5 добровольцев, на третьем – полная доза, у 15 добровольцев. На третьем этапе было включено 15 добровольцев по 5 человек в когорте.

Исследование фармакокинетики и иммуногенности препарата ГамКовиМаб

Количественное определение концентрации исследуемого препарата в биологических образцах выполнено с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). Фармакокинетические параметры были рассчитаны на основании математической модели, которая предполагает внутривенное введение препарата и не учитывает компартментализацию, что обосновано отсутствием в нормальных тканях антигена для антител, входящих в состав препарата. Общий объем распределения препарата (V_{ss_obs}) составил около 0,31 л/кг (0,3117 (мг/кг)/(мкг/мл)) для GamP2C5 и около 0,17 л/кг (0,1694 (мг/кг)/(мкг/мл)) для GamXRH19, что свидетельствует о распределении обоих компонентов препарата в крови и межклеточной жидкости. Константа реакции элиминации (λ_z) составила 0,0060/час для GamP2C5 и 0,0059/час для GamXRH19; метаболический клиренс (Cl_{obs}) - 2,1 мл/час (0,0021 (мг/кг)/(мкг/мл)/час) для GamP2C5 и 1,3 мл/час (0,0013 (мг/кг)/(мкг/мл)/час) для GamXRH19; время полувыведения ($t_{1/2}$) – 114,9 часов в случае GamP2C5 и 117,9 часов в случае GamXRH19; максимальная концентрация в плазме крови (C_{max}) – 70,7 мкг/мл в случае GamP2C5 и 84,5 мкг/мл в случае GamXRH19; среднее время удержания препарата (MRT_{0-inf_obs}) – 145,5 часов в случае GamP2C5 и 130,5 часов в случае GamXRH19; при этом площадь под экспериментальной кривой концентрация-время (AUC_{0-t}) составила 4382,9 мкг/мл*час для GamP2C5 и 7367,4 мкг/мл*час для GamXRH19.

Оцениваемые показатели иммуногенности

Для оценки иммуногенности исследуемого препарата, в биологических образцах количественно определены антитела к лекарственному препарату (ADA) с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA). С этой целью использован коммерческий набор Human Anti-Human Antibody ELISA Kit (Epitope Diagnostics Inc) позволяющий проводить количественную оценку антител IgG и IgM специфичных к Fc-фрагменту IgG человека в сыворотке крови. Процедуру проведения анализа выполняли согласно протоколу фирмы производителя. В результате проведения анализа концентраций антител к антителам GamP2C5 и GamXRH19 в сыворотках крови добровольцев было показано, что статистически достоверное увеличение содержания указанных антител не обнаружено. Таким образом, препарат ГамКовиМаб на основе гуманизированных моноклональных антител не является иммуногенным.

Резюме по оценке нежелательных явлений

Всего в исследовании (FAS-популяция) было зарегистрировано 90 нежелательных явлений у 23 (92%) добровольцев. Все зарегистрированные НЯ были легкой степени тяжести. Из них причинно-следственная связь «вероятно связано» отмечалась в 24 (26,7%) случаях, «возможно связано» – в 30 (33,3%), «неизвестно» – в 2 (2,2%), «сомнительная» – в 20 (22,2%), «условная» – в 14 (15,6%). В Группе 1 (1/10 дозы – 1,0 мг/кг) было зарегистрировано 14 нежелательных явлений у 5 (100%) добровольцев; в Группе 2 (1/2 дозы – 5 мг/кг) – 23 НЯ у 5 (100%) добровольцев; в Группе 3 (10 мг/кг) – 53 НЯ у 13 (86,7%) добровольцев. Во всех группах зарегистрированные НЯ были легкой степени тяжести.

По результатам оценки лабораторных и жизненно важных показателей все зарегистрированные отклонения были классифицированы как нежелательные явления. В ходе исследования летальных случаев и прочих серьезных нежелательных явлений, а также других значимых нежелательных явлений зарегистрировано не было. Переносимость препарата исследователем была признана удовлетворительной. Таким образом, в результате исследования возможности использования технологической платформы однодоменных антител для создания

средств терапии на моделях вирусных инфекций (вирус Эбола и коронавирус SARS-Cov-2) было показано, что разработанные методологические подходы позволяют отбирать молекулы антител, специфичные вирусным мишеням, и создавать на их основе препараты, показывающие высокую терапевтическую эффективность и безопасность в доклинических и клинических исследованиях.

2.2.3. Разработка препарата на основе модифицированных однодоменных антител для терапии интоксикации, вызванной ботулотоксином.

Для иммунизации альпак использовали анатоксин, состоящий из ботулинического токсина и гемагглютининов в небольшом количестве. Иммунизацию альпака проводили пять раз с интервалом 14 дней между первой и второй иммунизацией и 10 дней между последующими инъекциями по схеме, описанной в предыдущих разделах.

Для получения панели однодоменных антител к ботулотоксину ВоNT/A была сконструирована библиотека нуклеотидных последовательностей VHH фрагментов неканонических антител альпака после иммунизации в составе фагмидного вектора рHEN1. Для отбора специфических антител были проведены 2 раунда селекции методом фагового дисплея. Для первого раунда селекции в качестве мишени использовали токсин ВоNT/A. Для второго раунда использовали два независимых подхода: для первого использовали в качестве мишени токсин ВоNT/A; для второго подхода использовали токсин ВоNT/A, обработанный ДТТ. Восстановление токсина при добавлении ДТТ использовали для разделения тяжелой (НС) и легкой (LC) цепей токсина ВоNT/A и их более равномерной адсорбции на поверхности иммунопланшета и для эквивалентного распределения эпитопов на обеих цепях при селекции. Анализ эффективности селекции проводили методом ИФА с использованием поликлональных фаговых библиотек после 1-го и 2-го раундов селекции. Кроме того, для быстрой оценки токсин нейтрализующих свойств антител, входящих в состав исследуемых фаговых библиотек, прошедших селекцию, был использован метод нейтрализации ботулинического токсина при добавлении смеси фаговых библиотек *in vivo*. Ранее, в литературе такой подход описан не был. Для этого мышам линии BALB/c вводили внутрибрюшинно токсин А в количестве 10 ЛД₅₀ или 50 ЛД₅₀ после предварительной инкубации в течение 1 часа с фаговыми частицами. В результате анализа было показано, что библиотеки фагов после 2-х раундов селекции на ботулинической токсине обладают токсин нейтрализующими свойствами и защищают животных от введения 10 и 50 летальных доз ВоNT/A.

Далее, методом ИФА из библиотек, прошедших селекцию, были отобраны 39 индивидуальных Фаг-VHH клонов. По результатам секвенирования для дальнейшей работы были отобраны 15 клонов с уникальными последовательностями CDR. Для оценки токсин нейтрализующих свойств отобранных клонов был использован метод нейтрализации ботулинического токсина при добавлении индивидуальных фаговых клонов. Для этого мышам линии BALB/c вводили внутрибрюшинно токсин А в количестве 10 ЛД₅₀, смешанного с индивидуальными фаговыми клонами в количестве 10¹¹ КОЕ. Для дальнейших исследований были отобраны 4 клон (B10, C10, B11, G3), которые показали 100% протективную эффективность в эксперименте на животных. На втором этапе животных разделили на 4 группы, которым вводили токсин А в количестве 50 ЛД₅₀, смешанного с одним из четырех фаговых клонов. Группы животных, получавших токсин в смеси с клонами B11 и G3, показали 100% выживаемость. Таким образом, в результате исследований было установлено, что фаги, несущие на своей поверхности VHH клоны B11 и G3 обладали наибольшей нейтрализующей активностью и были отобраны для дальнейших исследований. Стоит отметить, что применение для селекции подхода, связанного с предварительной диссоциацией токсина А ДТТ, позволило увеличить разнообразие токсин специфических антител и отобрать клоны, обладающие наибольшей протективной эффективностью.

Для повышения протективности выделенных клонов за счет увеличения времени циркуляции антител в крови и/или использования дополнительных эффекторных функций были синтезированы две модифицированные конструкции. Одна конструкция представляла собой димерную форму каждого клона (димер клона В11 и димер клона G3) за счет использования глицин-серинового линкера (Gly4Ser)³. Вторая конструкция представляла собой мономер каждого клона, связанный с Fc-фрагментом IgG человека (В11-Fc и G3-Fc). Модификации, связанные с использованием Fc фрагмента использовались для увеличения времени циркуляции антител в крови, а также добавления Fc опосредованных эффекторных функций (АЗЦТ, КЗЦТ).

Поиск возможных эпитопов ВоNT/A для связывания с антителом В11-Fc был выполнен путем гомологического моделирования антитела, молекулярного докинга моделей к поверхности антигена и последующей проверки результата методом молекулярной динамики. Из комплексов «антиген-антитело», смоделированных программой SnugDock и отсортированных по значению скоринг-функции, была выбрана модель, в которой область контакта антитела со структурой ВоNT/A находится вблизи сайта связывания ганглиозида GD1a в исходной структуре антигена. Последовательные симуляции молекулярной динамики данного комплекса с использованием программного пакета AMBER показали стабильное поведение данного комплекса, что может свидетельствовать о высокой вероятности корректной идентификации специфического эпитопа. Как известно, ботулинический нейротоксин с высокой афинностью связывается с двумя рецепторами на поверхности нейронов в качестве первого шага инвазии. При этом гликановые мотивы ганглиозидов служат корецепторами для этих белковых комплексов [Hamark S., 2016]. Поэтому в качестве возможного механизма нейтрализующей активности В11-Fc можно предположить способность отобранных антител подавлять инвазию ВоNT/A в клетки посредством блокирования сайта связывания ганглиозида и нарушении его корецепторных функций.

Дополнительно была проанализирована аффинность связывания клонов В11 и G3 с ботулиническим токсином методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Константы диссоциации (KD), которая составила 26.5 и 30.1нМ соответственно. Для оценки протективной активности *in vivo* различные количества антител в мономерной, димерной или Fc-фьюжн модификациях смешивали с ботулотоксином в дозе 5 ЛД₅₀ и вводили внутривенно мышам линии BALB/c (Рисунок 9А). В результате исследования было установлено, что антитела в мономерной форме обладают частичной протективностью даже в максимальной дозе 100мкг/мышь и отсутствием защитного эффекта при введении антител в дозе 10 мкг/мышь. Димеризация антител позволила усилить защитные свойства молекул. В частности, клон В11-димер в дозе 100мкг/мышь показал 100% протективность и частичную защиту в дозе 10 мкг/мышь. Модификация антител с Fc-фрагментом IgG человека позволила добиться наилучших результатов. Так, введение животным антитела G3-Fc обеспечивало защиту животных вплоть до дозы 0,1мкг/мышь, в то время как антитело В11-Fc показало защиту от интоксикации ботулотоксином в дозе 1нг/мышь. Анализ фармакокинетики антител показал, что через 1 час после введения мономеров и димеров антител В11, G3 сыворотке крови животных обнаруживается только 10% от начального количества антител сразу после введения (0 часов), в то время как модификация антител с Fc-фрагментом позволила существенно увеличить их время циркуляции в крови. Через 2 недели после введения в сыворотке крови обнаруживались антитела в количестве 1% от начального уровня (рисунок 9Б).

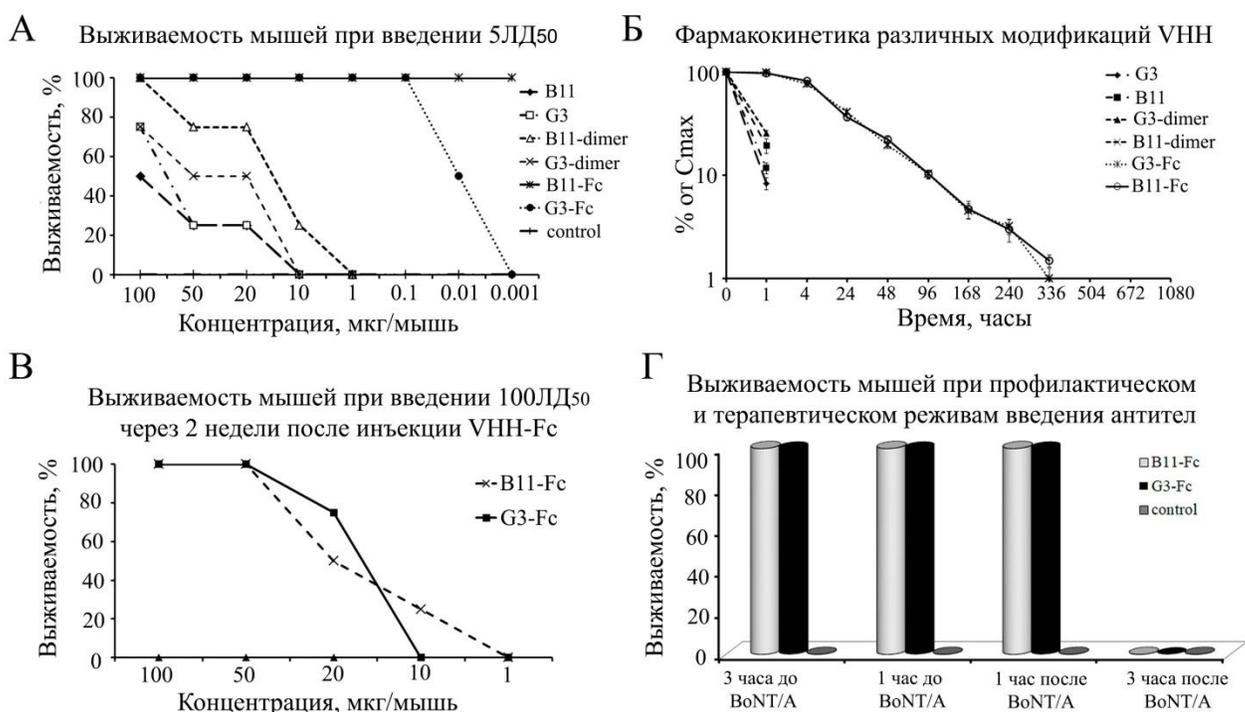


Рисунок 9. А - выживаемость мышей при заражении летальной дозой ботулотоксина (5 LD₅₀), предварительно смешанного с мономерами VHHs, димерами VHH или модификациями VHH, содержащими Fc-фрагмент; Б – клиренс различных модификаций антител из кровяного русла при однократной внутривенной (в.в.) инъекции 100 мкг. Концентрации молекул в сыворотке в указанные моменты времени измеряли с помощью ELISA; В - выживаемость мышей после введения ботулотоксина в дозе 100 LD₅₀ через две недели после инъекции антител; Г - выживаемость мышей после введения антител с разным режимом дозирования.

Более того, в последующем эксперименте *in vivo* было показано, что животные, ранее получившие препараты антител B11-Fc и G3-Fc в дозе 100-50 мкг/мышь через две недели после введения были полностью защищены от повторной летальной интоксикации ботулотоксином к количеству 100LD₅₀ (Рисунок 9В). Дополнительно, было установлено, что антитела, содержащие модификацию с Fc-фрагментом, обеспечивают защиту животных и при терапевтическом режиме использования. Так, введение антител через 1 час после интоксикации также обеспечивало полную защиту животных (рисунок 19Г). Таким образом, в результате исследования была получена панель однодоменных антител, специфичных ботулотоксину. Из 15 отобранных клонов были выбраны два клон (B11 и G3) с лучшими предварительными результатами по нейтрализации. На основе клонов были сконструированы их различные модификации путем димеризации через линкер (Gly4Ser)₃ или слияния с Fc-фрагментом IgG человека. В исследовании *in vivo* на модели летальной интоксикации ботулотоксином было показано, что модификация нейтрализующих VHH, содержащая Fc-фрагмент значительно увеличивала время циркуляции антител в крови, а также позволяла увеличить защитную активность клонов VHH более чем в 1000 раз по сравнению с мономерными формами.

На основе клон B11-Fc был получен препарат для терапии интоксикации ботулотоксином. В 2021 году завершены доклинические исследования его эффективности и безопасности в полном объеме. В 2024 году начались клинические исследования по Протоколу № 01- B11-Fc -2024 «Исследование безопасности, переносимости, иммуногенности, фармакокинетики и фармакодинамики лекарственного препарата B11-Fc при однократном применении у взрослых».

2.2.4 Получение однодоменных антител и их модификаций, специфичных к токсину В *Clostridioides difficile* и обладающих нейтрализующей активностью

Clostridioides difficile – является причиной заболеваний кишечника, которые объединяют общим термином «*Clostridioides difficile* инфекция» (CDI), к которым относят, в том числе клостридиальный колит или псевдомембранозный энтероколит – тяжелое воспалительное заболевание толстого кишечника. Помимо неблагоприятного эпидемиологического прогноза данной группы заболеваний следует отметить также существующие трудности в области терапии. Антибиотикотерапия остается одним из основных инструментов в терапии данной патологии. Однако данный подход стремительно теряет свою эффективность вследствие появления новых резистентных к антибиотикам штаммов *C. difficile*, а также увеличению частоты выявления данных штаммов у пациентов с АОД и ПМК. В таких условиях крайне актуальным является поиск принципиально иных подходов в борьбе с заболеваниями, вызванными *C. difficile*. В связи с этим, получение моноклональных однодоменных антител против токсина В, как основного фактора патогенности *Clostridioides difficile* с последующей оценкой их нейтрализующего действия *in vitro* и протективного действия *in vivo*, отличается актуальностью и новизной, а также высокой значимостью для современной медицинской науки. В связи с этим, в рамках поставленных задач в качестве второй бактериальной мишени для изучения возможности использования технологической платформы однодоменных антител для получения молекул, обладающих нейтрализующей активностью был выбран токсин В *C.difficile*.

Для иммунизации альпак использовали нетоксичный CROPs домен токсина В *C. difficile*, полученный в бактериальных клетках *B. megaterium* WH320. Полученный препарат использовали для проведения иммунизации альпака (*Vicugna pacos*). Иммунизацию альпаки проводили три раза с интервалом 14 дней между первой и второй иммунизацией и 10 дней между 2,3,4 и 5 инъекцией. Оценку специфического иммунного ответа оценивали методом ИФА титра антител в сыворотке крови альпака, связывающихся с CROPs доменом токсина В *C. difficile*. Для получения панели однодоменных антител к CROPs домене токсина В *C. difficile* была сконструирована библиотека нуклеотидных последовательностей VHH фрагментов неканонических антител альпака после иммунизации рекомбинантным белком CROPS в составе фагмидного вектора pHEN1. Для отбора специфических антител были проведены 3 раунда селекции методом фагового дисплея. Эффективность проводимой селекции оценивали методом поликлонального Фаг-ИФА с последующей оценкой специфической активности индивидуальных фаговых клонов. Фагмидная библиотека после второго раунда селекции была подвергнута секвенированию с целью определения нуклеотидной последовательности специфических однодоменных антител. Анализ сиквенсов нуклеотидных последовательностей VHH, а также удельная активность индивидуальных клонов VHH методом ИФА позволили отобрать 9 клонов однодоменных антител, имеющих уникальную структуру CDR 1,2 и 3 регионов, ответственных за связывание с антигеном, а также обладающих высоким сродством к CROPs домену токсина В *C. difficile*. Способность отобранных клонов антител связываться с полноразмерным рекомбинантным токсином TcdV *C.difficile* оценивали иммуноблотингом. Дополнительно, отобранные клоны антител были охарактеризованы по их аффинности к токсину *C.difficile* методом плазмонного резонанса. Полученные характеристики выбранных девяти клонов однодоменных антител представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Константы скорости ассоциации (K_a) и диссоциации (K_d), максимальная связывающая способность аналита (Rmax), константа равновесной ассоциации (K_A), константа равновесной диссоциации (K_D) и распределение (Chi^2) связывания однодоменных антител с TcdV *C. difficile* измеренные методом плазмонного резонанса

Клон	K_a (1/Ms)	K_d (1/s)	Rmax (RU)	K_A (1/M)	K_D (M)	Chi^2
------	--------------	-------------	-----------	-------------	-----------	----------------

A3.2	$8.4 \cdot 10^4$	$5.91 \cdot 10^{-3}$	18.8	$1.42 \cdot 10^7$	$7.03 \cdot 10^{-8}$	0.145
C7.2	$9.46 \cdot 10^6$	$9.44 \cdot 10^{-4}$	18.2	$1 \cdot 10^{10}$	$9.96 \cdot 10^{-10}$	0.111
C11.1	$3.34 \cdot 10^3$	$1.52 \cdot 10^{-3}$	30.5	$2.2 \cdot 10^6$	$4.54 \cdot 10^{-7}$	0.071
D6.1	$2.76 \cdot 10^4$	0.0125	17.2	$2.21 \cdot 10^6$	$4.52 \cdot 10^{-7}$	0.0879
D10.1	$3.71 \cdot 10^6$	$1.71 \cdot 10^{-3}$	20.3	$2.17 \cdot 10^9$	$4.6 \cdot 10^{-10}$	0.169
F1.1	$9.04 \cdot 10^4$	$4.73 \cdot 10^{-5}$	18.2	$1.91 \cdot 10^9$	$5.22 \cdot 10^{-9}$	0.203
F10.2	$1.73 \cdot 10^5$	$1.3 \cdot 10^{-3}$	22.9	$1.33 \cdot 10^8$	$7.52 \cdot 10^{-10}$	0.201
F11.1	$2.43 \cdot 10^5$	$1.89 \cdot 10^{-4}$	18.8	$1.28 \cdot 10^9$	$7.78 \cdot 10^{-10}$	0.291
H9.1	$5.79 \cdot 10^4$	$1.54 \cdot 10^{-4}$	13	$3.75 \cdot 10^8$	$2.66 \cdot 10^{-8}$	0.0625

Согласно полученным результатам, ряд клонов однодоменных антител имели константу диссоциации (C7.2, D10.1, F1.1, F11.1, F10.2, H9.1) находящуюся в нМ диапазоне.

Важнейшей характеристикой антител, определяющей их терапевтический потенциал, помимо их общей способности распознавать антиген в ИФА, является способность нейтрализовать действие токсина. Нейтрализующую активность отобранных клонов однодоменных антител определяли *in vitro*, используя культуру клеток линии VERO E6. Клетки были посеяны в лунки 96-ти луночного планшета в концентрации 10^4 клеток/лунку. На следующий день к клеткам добавляли токсин TcdB (в концентрации 250нг/мл) предварительно смешанный с белковыми препаратами однодоменных антител в стандартной концентрации 100нг/мл. В качестве положительно контроля использовали токсин TcdB без добавления однодоменных антител. В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки. Учет токсигенной активности проводили методом микроскопии через 24 часа после добавления токсина к клеткам. В результате исследования было установлено, что клоны D6.1, A3.2, C7.2 показали наибольшую нейтрализующую активность в отношении TcdB *C.difficile*, выраженную в снижении числа нежизнеспособных клеток. Указанные клоны однодоменных антител были отобраны для проведения дальнейших модификаций с целью усиления их нейтрализующих свойств. Модификация трех отобранных клонов включала получение гомодимеров и гетеродимеров антител. Каждый димер был разделен 15-аминокислотным линкером (Gly4Ser)₃ и содержал His6 участок для проведения очистки белковых молекул методом металлоаффинной хроматографии. Очищенные препараты гомодимеров и гетеродимеров антител были использованы для проведения оценки токсин нейтрализующей способности на культуре клеток Vero. Результат тестирования представлен на рисунке 10. Таким образом, в результате исследования была получена иммунная библиотека, произведен отбор однодоменных антител, специфично распознающих TcdB и исследована нейтрализующая активность отобранных клонов антител на культуре клеток *in vitro*. Для клонов, показавших наибольшую нейтрализующую активность, проведена модификация, позволившая значительно улучшить терапевтический потенциал отобранных молекул. Максимальная активность наблюдалась у гомодимеров C7.2 и A3.2, гетеродимера A3.2-C7.2. Полученные результаты могут быть использованы для создания средства терапии инфекции, вызванной *C. difficile*.

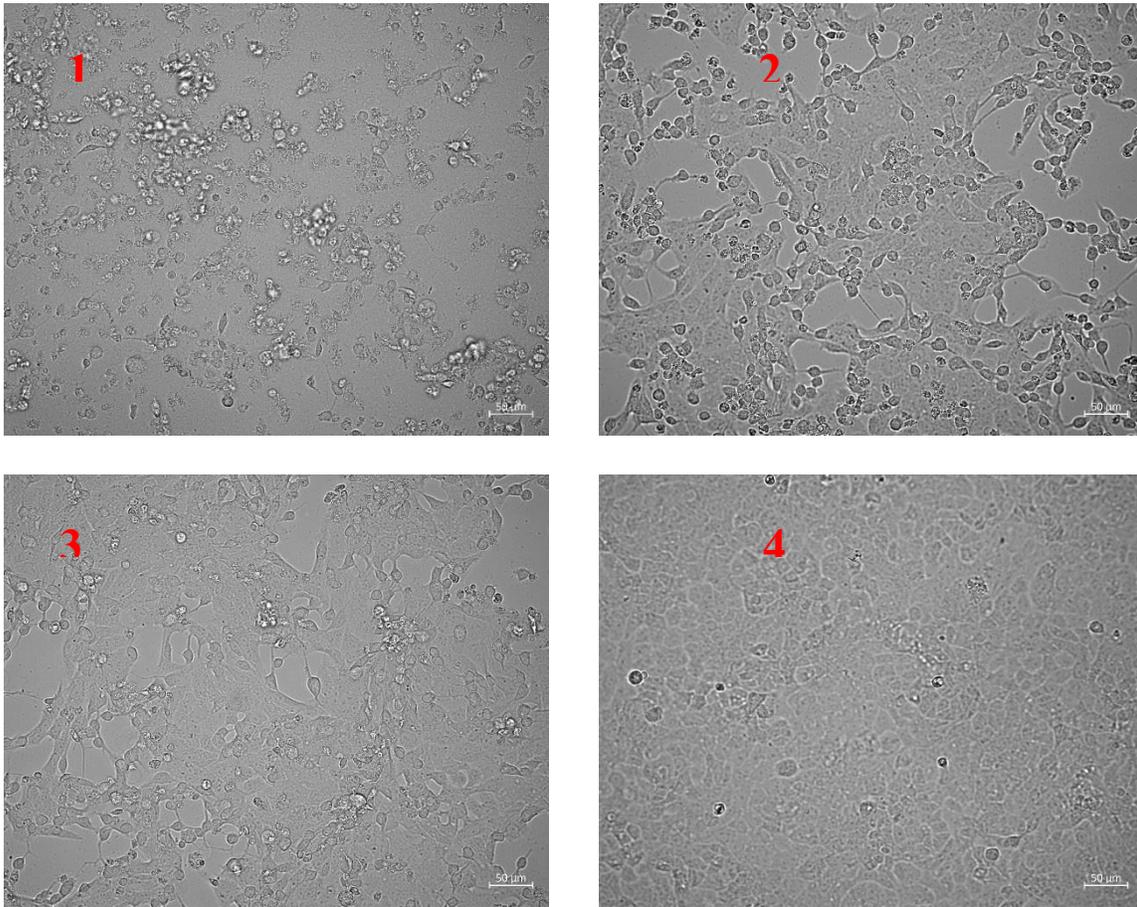


Рисунок 10. Анализ нейтрализующей активности модифицированных однодоменных антител в отношении токсина *C.difficile*. 1 - положительный контроль (токсин без предварительного смешивания с однодоменными антителами); 2 – Смесь TcdB с гомодимером A3.2-A3.2; 3 - Смесь TcdB с гомодимером C7.2-C7.2; 4 – контрольные клетки Vero E6.

2.3 Получение молекул на основе неканонических однодоменных антител и их модификаций для обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов

В настоящее время проводятся исследования возможности применения однодоменных антител как для терапии различных заболеваний, так и для целей диагностики. В данном научном исследовании была проведена работа по изучению возможности использования разработанной технологической платформы для отбора однодоменных антител, пригодных для детекции различных инфекционных агентов. В связи с этим, целью второго этапа исследования являлось изучение возможности применения технологии однодоменных антител для получения оригинальных молекул, специфичных антигенам микроорганизмов и анализа их диагностического потенциала. Работа была проведена на двух бактериальных моделях: липид-ассоциированные мембранные белки *M.hominis* (для оценки диагностического применения в методах ИФА, иммуноблоттинга, цитофлуориметрии и иммуноцитохимии) и токсин Б *C.difficile* (биосенсоры).

2.3.1 Получение и характеристика неканонических однодоменных антител для детекции *M.hominis* различными методами

Для оценки возможности использования однодоменных антител для детекции патогенных микроорганизмов и/или их антигенов были получены антитела, специфически связывающиеся с поверхностным антигеном *M.hominis*. Работа по получению иммунной библиотеки и селекции выполнялись совместно с С.В.Тиллибом на базе лаборатории НИИ Биологии Гена РАН. Основные теоретические положения и практические результаты исследования в этой части были описаны в

диссертационной работе Бурмистровой Д.А., которая была выполнена под руководством Щеблякова Д.В. В качестве антигенного материала для иммунизации была использована фракция липид-ассоциированных мембранных белков (ЛАМБ) *M. hominis*, полученных путем разделения гидрофильных и гидрофобных фаз в детергенте Тритон X-114. Полученный препарат ЛАМБ был использован для иммунизации двугорбого верблюда согласно описанной ране схеме иммунизации.

Селекцию специфических рекомбинантных бактериофагов методом фагового дисплея проводили с использованием фракции ЛАМБ в качестве мишени. В результате проведения селекции и последующего отбора был выбран 1 клон (VНН06), показавший положительные результаты во всех вариантах ИФА и который, по данным секвенирования оказался встречающимся в библиотеке, прошедшей селекцию. На следующем этапе исследования была проведена работа по идентификации мишени, специфической для отобранных антител. Для этого аMh06 были ковалентно иммобилизованы на поверхности магнитных частиц. Магнитные частицы с иммобилизованными на поверхности антителами аMh06 использовали для иммунопреципитации антигена из раствора ЛАМБ. Дальнейшая пробоподготовка и масс-спектрометрическая идентификация проводилась Серебряковой М.В. в НИИ Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского. Результаты MALDI-времетраjectory масс-спектрометрии показали, что полученный образец обогащен белком *M. hominis* «P37-like (*Mycoplasma hyorhinis*) ABC transporter substrate-binding lipoprotein» (МНО_3620). Таким образом, была идентифицирована специфическая мишень для аMh06 в составе ЛАМБ, который представляет собой субстрат-связывающий белок ABC-транспортера.

Изучение диагностического потенциала препаратов на основе аMh06 для детекции M. hominis

Подтверждение функциональной активности очищенного белкового препарата **аMh06** и проверку специфичности его взаимодействия с антигенами *M. hominis* проводили методом твердофазного непрямого ИФА с сорбированными на поверхность иммунологического планшета ЛАМБ различных видов микоплазм. В результате проведенных исследований было установлено, что аMh06 специфически взаимодействуют с антигенами *M. hominis* и при этом не взаимодействуют с эукариотическими антигенами, антигенами других бактерий и антигенами других видов микоплазм, в том числе близкородственного вида *M. arginini* (на основании выравнивания последовательности 16S РНК). Дополнительно, специфическая активность антител была оценена методом иммуноблоттинга с использованием ЛАМБ *hominis*. Для тестирования возможности применения препаратов на основе аMh06 для идентификации разных штаммов микоплазм принадлежащих к виду *M. hominis*, была проведена оценка специфичности связывания аMh06 с использованием клинических изолятов *M. hominis* (клинические изоляты были предоставлены Раковской И.В.). В результате анализа было установлено, что препараты на основе аMh06 могут быть использованы для идентификации микоплазмы в клинических изолятах *M. hominis*, в том числе у мини-форм *M. hominis*.

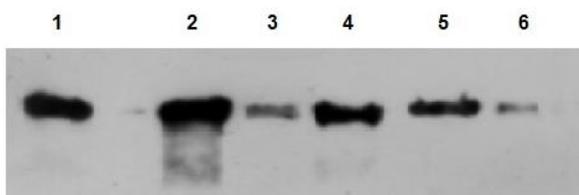


Рисунок 11. Взаимодействие аMh06 с ЛАМБ выделенных из различных клинических изолятов. Иммуноблоттинг лизатов клеток клинических изолятов (нагрузка по белку 10мкг на пробу). 1 – «мини-формы» *M. hominis*, 2-6 – различные клинические изоляты. В качестве вторичных антител использовали анти НА-tag, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Далее, нами была разработана тест-система для идентификации антигеном *M. hominis* методом иммуноферментного анализа. В работе была исследована возможность применения антител аMh06 в варианте сэндвич-ИФА. Для этого на поверхности лунок иммунологических планшетов иммобилизовали препарат аMh06, а для детекции связавшегося антигена (клеток *M. hominis*, присутствующих в биологическом материале) использовали препарат аMh06-Biotin, полученный с помощью биотинилирования белковых молекул аMh06. В качестве биологических образцов были использованы вагинальные смывы, полученные от мышей, предварительно (за 2 часа до забора образцов) инокулированных суспензией *M. hominis* Н-34 (количество КОЕ во вводимом мышам инокуляте составляло $5 \cdot 10^5$). Данные ИФА представлены на рисунке 12.

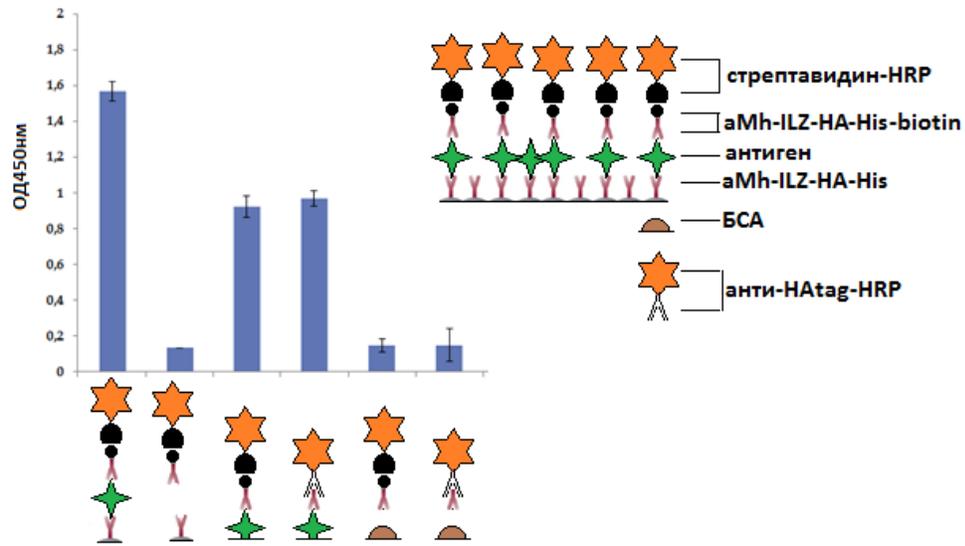


Рисунок 12. Прототип «сэндвич ИФА» тест-системы для определения наличия *M. hominis* в образцах вагинальных смывов. Инфографика представлена на рисунке.

Полученные результаты подтверждают применимость пары препаратов аMh06 и аMh06-Biotin для создания прототипа тест системы для детекции *M. hominis* в биологических образцах.

Одним из распространенных методов лабораторной микробиологической диагностики микоплазменной инфекции и видовой идентификации патогена является окраска отпечатков колоний микроорганизмов на стеклах с использованием поликлональной гипериммунной сыворотки (метод прямой иммунофлуоресценции - ПИФ). Использование моноклональных антител, которые можно нарабатывать в препаративных количествах, вместо иммунных поликлональных сывороток является актуальной задачей. Для проверки возможности использования аMh06 для этих целей было проведено окрашивание отпечатков колоний микоплазм на стеклах. Фотографии окрашенных отпечатков представлены на рисунке 13А.

А

Б

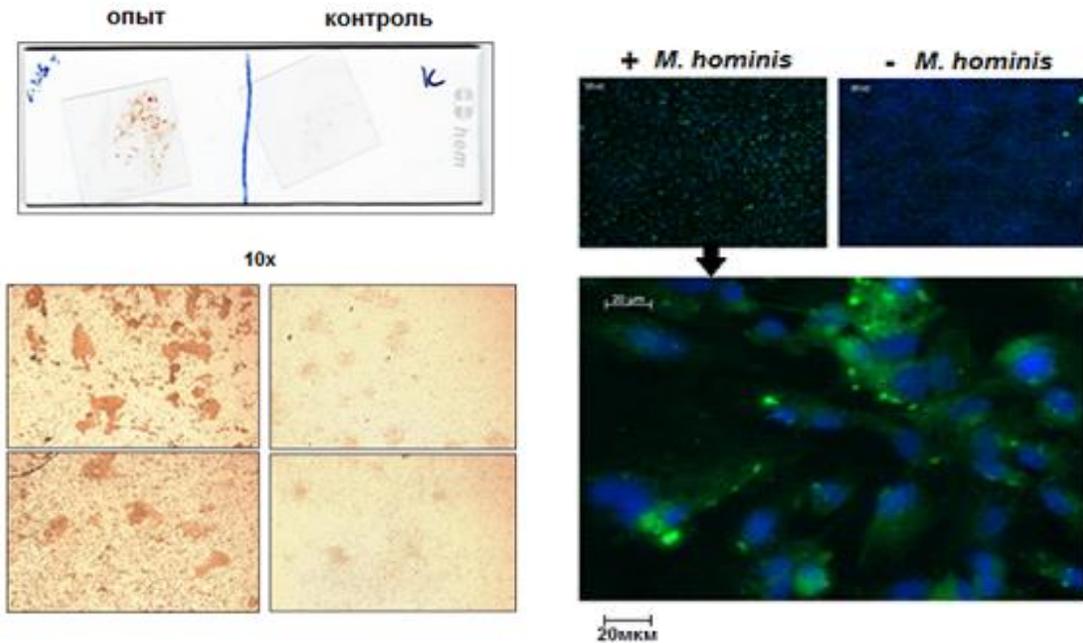


Рисунок 13. А - Окрашивание отпечатков колоний микоплазм на стеклах с использованием аMh06-His. Б - детекция *M. hominis* в культуре эукариотических клеток. А – иммуноцитохимическое исследование зараженных клеток линии А549

Проблема контаминации эукариотических клеточных культур, используемых для лабораторных исследований, а также на биотехнологических производствах, микоплазмами – одна из самых распространенных среди исследовательских лабораторий, работающих с культурами клеток млекопитающих. Поэтому актуальной задачей является быстрая оценка наличия микоплазм в культуре эукариотических клеток. В данном исследовании антитела аMh06 были протестированы на способность идентифицировать *M. hominis* в зараженной культуре клеток А549, фиксированной 4% параформальдегидом методом иммуноцитохимического окрашивания. Результаты исследования представлены на рисунке 13Б. Внедрение новых методов для детекции инфекционных агентов или отдельных антигенов является актуальной задачей. К таким методам относится проточная цитофлуориметрия. В данном исследовании был проведен анализ возможности использования антител аMh06 для детекции клеток *M. hominis* методом проточной цитофлуориметрии. Таким образом, было показано, что препараты на основе аMh06 могут успешно применяться для создания диагностических тест-систем, работающих на различных методологиях, таких как: ИФА, иммуноблоттинг, иммуноцитохимическое исследование, окрашивание отпечатков колоний, проточная цитофлуориметрия.

Кроме того, в данном исследовании было продемонстрировано, что полученные антитела также можно использовать для борьбы с урогенитальной инфекцией, вызванной *M. hominis*, в формате генетической пассивной иммунизации. Для проведения генетической пассивной иммунизации был получен рекомбинантный аденовирус человека 5 серотипа, несущий ген однодоменного антитела аMh06 слитого с Fc фрагментом мыши – rAd5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a (конструкция получена по руководством Зубковой О.В.). Для оценки способности генетической пассивной иммунизации обеспечивать ингибирующее действие был проведен эксперимент на мышах с терапевтической схемой введения рекомбинантного аденовируса. На 5 день после инокуляции *M. hominis* 1864.3 мышам вводили в глазной синус препараты Ad5-CMV-PLAP-aMh06-ILZ-NA и Ad5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a в количестве 10^7 БОЕ на мышь. На 3, 7 и 14 дни отбирали образцы вагинальных смывов. В отобранных образцах проводили оценку количества микоплазм методом ПЦР в реальном времени, который подтверждали микробиологическим

высевом с оценкой роста разведений культуры по изменению рН среды. Полученные результаты представлены на рисунке 14.

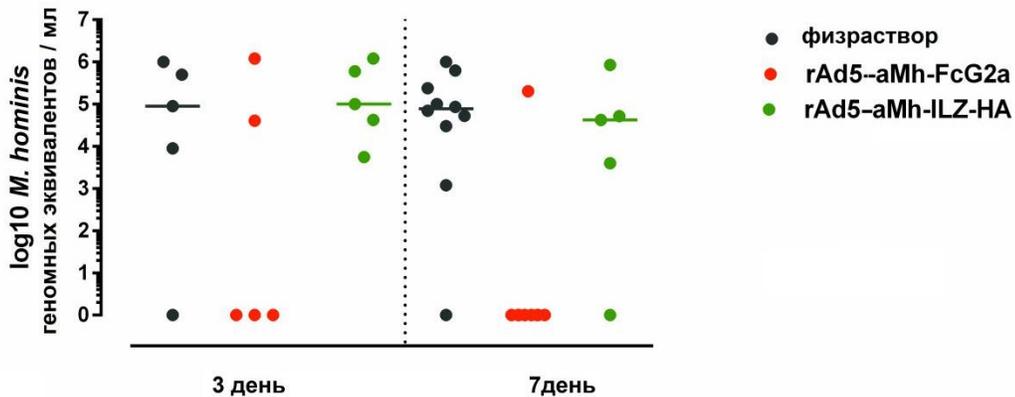


Рисунок 14. Результаты *in vivo* эксперимента при терапевтической схеме введения рекомбинантных аденовирусных препаратов. * точный тест Фишера $\phi^* = 3.959$ ($\phi_{0.05} = 1.64$; $\phi_{0.01} = 2.31$). Оценка содержания *M. hominis* в урогенитальных смывах животных методом ПЦР; Б – количество животных в каждой группе, у которых обнаружена *M. hominis* в урогенитальных смывах.

Таким образом, в результате исследования *in vivo* было установлено, что введение препарата рекомбинантного аденовируса Ad5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a как за сутки до заражения, так и через 5 дней после инфицирования приводит к достоверному снижению количества *M. hominis* в урогенитальных смывах.

2.3.2. Разработка биосенсоров на основе неканонических однодоменных антител для детекции токсина *Clostridioides difficile* методом плазмонного резонанса

В разделе 2.2.4 представлены результаты исследования оценки нейтрализующих свойств однодоменных антител, специфичных токсину В *C. difficile*. Ниже приведены результаты возможностей, полученных молекул антител для диагностического использования в формате биосенсоров, работающих на принципе плазмонного резонанса. Токсин В (TcdB) был выбран в качестве диагностической мишени при создании таких биосенсоров.

Полученный белок использовали для получения иммунной библиотеки и селекции однодоменных антител. В результате проведенной работы были отобраны 7 клонов однодоменных антител (B7, G8, F3, G5, C3, A3, H7) специфически связывающихся с токсином В *C. difficile*. Для проверки специфической активности отобранных клонов антител, плазмидные ДНК, соответствующие каждому уникальному однодоменному антителу, трансформировали в клетки *Escherichia coli* BL21, оптимизированные для продукции рекомбинантных белков. Полученные трансформанты использовали для наращивания биомассы и выделения однодоменных антител методом аффинной хроматографии. Предварительный анализ характеристик однодоменных антител проводился с использованием метода ИФА для детекции токсина В *C. difficile*. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) проводили характеристику специфических свойств однодоменных антител в этом типе анализа. В результате иммуноферментного анализа было установлено, что однодоменные антитела B7, F3, G5, H7 способны связывать токсина TcdB.

Дальнейший анализ характеристик однодоменных антител проводился с использованием метода иммуноблоттинга. Для этого по 100 нг токсина В *C. difficile* разделяли в полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану, а затем проводили гибридизацию с однодоменными антителами и последующую визуализацию результата. В результате анализа данных вестерн-блот гибридизации было установлено, что однодоменное антитело клон H7 способны связывать токсин TcdB и показывает сигнал большей интенсивности в сравнении с

остальными клонами. В связи с полученными результатами клон Н7 был выбран для дальнейших исследований в качестве основной молекулы для создания тест-системы на основе метода плазмонного резонанса (SPR). Для этого однодоменные антитела клон Н7 были охарактеризованы по кинетическим параметрам взаимодействия с TcdB (константа диссоциации KD). Константа реакции взаимодействия однодоменных антител Н7 с токсином TcdB, иммобилизованном на поверхности чипа, составила 7 нМ. Охарактеризованный клон Н7 использовали для создания тест-системы для индикации токсина В *C.difficile* в различных образцах методом плазмонного резонанса.

При использовании, полученных в исследовании однодоменных антител клон Н7, был сконструирован биосенсор, предназначенный для детекции токсина В TcdB *C.difficile*. Макет биосенсора и принцип его работы показан на рисунке 15.

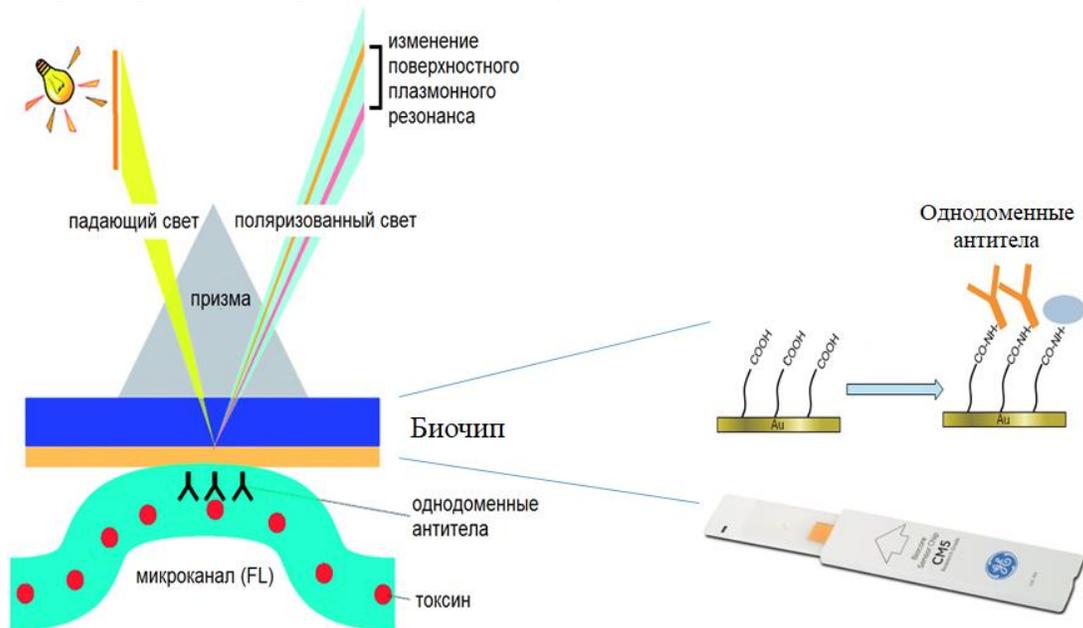


Рисунок 15. Принцип работы биосенсоров, основанных на плазмонном резонансе.

Однодоменные антитела клон Н7, специфичные токсину В *C.difficile*, были использованы для иммобилизации на поверхности чипа CM5. Иммобилизацию однодоменных антител на поверхности чипа проводили с использованием N-гидроксисукцинимид и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодиимид гидрохлорида. В качестве положительного контрольного образца использовали рекомбинантную субъединицу токсина TcdB, обладающую способностью связываться со специфическими однодоменными антителами, но не обладающий токсической активностью из-за отсутствия активной части молекулы, отвечающей за эту функцию. Исследования по созданию биосенсоров были выполнены в рамках опытно-конструкторской работы «Создание тест-системы индикации и идентификации патогенных биологических агентов на основе однодоменных антител» при реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015-2022 годы)». В результате исследования была создана тест-система «ОДНОДОМЕН-БИО» для индикации и идентификации патогенных биологических агентов на основе панели однодоменных антител, которая предназначена для специфической индикации и идентификации патогенных биологических агентов II–IV групп: 3 патогенов бактериальной природы (*Clostridioides difficile*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*) и 1 патогена вирусной природы (вируса бешенства) методом плазмонного резонанса. На тест-систему разработана техническая документация и успешно проведены технические испытания. В

исследовании было установлено, что при регенерации биосенсора, основанного на однодоменных антителах (клон Н7), не происходит падение сигнала при повторном определении токсина В *C.difficile* в образцах за счет высокой стабильности однодоменных антител. Уровень сигнала сохраняется как минимум в течение 15-20 циклов измерение-регенерация (Рисунок 16). При этом, при использовании биосенсора с полноразмерными каноническими иммуноглобулинами наблюдается падение сигнала после регенерации и его полное отсутствие после двух циклов регенерации.

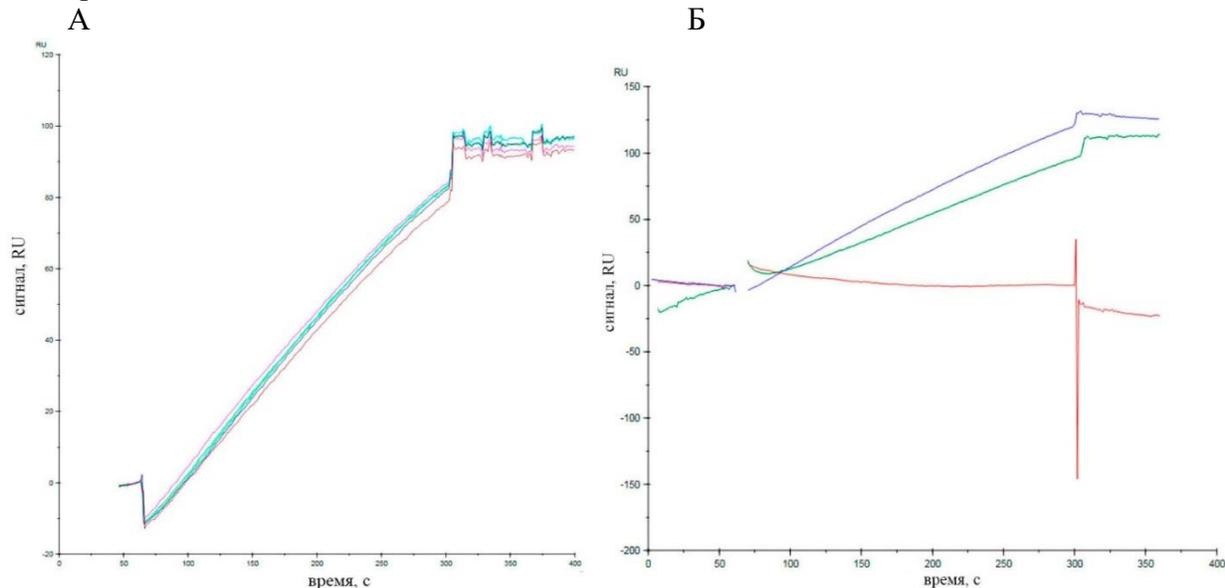


Рисунок 16. Определение токсина В *C.difficile* методом плазмонного резонанса. А – биосенсор с однодоменными антителами, клон Н7; Б – биосенсор с поликлональными иммуноглобулинами мыши, выделенными из сыворотки крови.

ВЫВОДЫ

1. Разработана универсальная технологическая платформа, позволяющая создавать иммунные библиотеки неканонических однодоменных антител (характеризующихся большим разнообразием и количеством индивидуальных клонов), эффективно проводить селекцию антител с заданной специфичностью, а также обеспечивать конструирование разнообразных модифицированных молекул на их основе для усиления терапевтического потенциала.

2. На модели инфекции, вызванной вирусом лихорадки Эбола, показана возможность получения молекул однодоменных антител, обладающих прямой вируснейтрализующей активностью. Разработан препарат «ГамЭзумаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии болезни, вызванной вирусом лихорадки Эбола. В доклинических и клинических исследованиях Фазы I показаны высокая эффективность и безопасность препарата.

3. На модели инфекции, вызванной коронавирусом SARS-Cov-2, показана способность однодоменных антител, специфических рецептор-связывающему домену (RBD) поверхностного гликопротеина S, подавлять развитие вирусной инфекции *in vitro* и *in vivo*. Разработан препарат ГамКовиМаб для терапии заболевания COVID-19. В доклинических исследованиях показана защитная эффективность препарата в отношении различных вариантов вируса SARS-Cov-2. В клинических исследованиях на здоровых добровольцах показана хорошая переносимость и низкая иммуногенность.

4. На моделях бактериальной токсинемии показана возможность получения молекул однодоменных антител и их модификаций, обладающих нейтрализующей активностью в отношении ботулотоксина типа А *C.botulinum* и токсина Б (TcdB) *C.difficile*. Получены

модифицированные молекулы, обладающие высокой терапевтической активностью в качестве средств экстренной терапии интоксикаций на моделях *in vivo* и *in vitro*.

5. С использованием разработанной технологической платформы получены однодоменные антитела, специфические к бактериальным антигенам (на моделях *M.hominis*, *C.difficile*). Проведена оценка возможности их диагностического использования для обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов различными методами (ИФА, иммуноблоттинг, проточная цитофлуориметрия, иммуноцитохимическое окрашивание, биосенсоры).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Щебляков Д.В.** Микоплазменная инфекция (*M.arginini*) ведет к конститутивной активации NF-κB и подавлению апоптоза в клетках, экспрессирующих Толл-подобные рецепторы TLR2/6 / Щебляков Д.В., Логунов Д.Ю., Зубкова О.В., Шмаров М.М., Раковская И.В., Народицкий Б.С. Гинцбург А.Л., Гудков А.В. // **Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.** - 2008. - №4. - с. 6-9. IF = 0.4.

2. Logunov D. Mycoplasma infection suppresses p53, activates NF-κB and cooperates with oncogenic Ras in rodent fibroblast transformation / Logunov D., **Scheblyakov D.**, Zubkova O., Shmarov M., Rakovskaya I., Gurova K., Tararova N., Burdelya L., Naroditsky B., Ginzburg A., Gudkov A. // **Oncogene.** – 2008. - Vol. 27. - p.4521–4531. IF = 6.9.

3. Логунов Д.Ю. Липид-ассоциированные мембранные белки *M. arginini* активируют NF-κB, взаимодействуя с TLR2/1, TLR2/6 и TLR2/CD14 / Логунов Д.Ю., **Щебляков Д.В.**, Зубкова О.В., Шмаров М.М., Раковская И.В., Гинцбург А.Л., Гудков А.В., Народицкий Б.С. // **Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.** - 2009 г. - №2. - С. - 25-28. IF = 0.4.

4. Бурмистрова Д.А. Использование химерных миниантител к *M.hominis*, экспрессируемых в составе рекомбинантного аденовируса, для борьбы с урогенитальными микоплазменными инфекциями / Бурмистрова Д.А., **Щебляков Д.В.**, Грибова И.Ю., Рутовская М.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А., Раковская И.В., Тиллиб С.В. // **Российский иммунологический журнал.** - 2013. - №3. IF = 0,318.

5. Бурмистрова Д.А. Инновационный подход использования высокопроизводительного секвенирования для идентификации и анализа специфических наноантител / Бурмистрова Д.А., Щербинин Д.Н., О.Л. Воронина, Семенов А.Н., **Щебляков Д.В.** // Материалы международного конгресса «Инновационные технологии в иммунологии и аллергологии» **Аллергология и иммунология.** – 2015. - №4. - том 16. – с.404.

6. Бурмистрова Д.А. Получение панели наноантител, специфичных к нейротоксину teNT (tetanus neurotoxin) / Бурмистрова Д.А., Усупжанова Д.Ю., Табакова И.В., **Щебляков Д.В.** // Материалы международного конгресса «Инновационные технологии в иммунологии и аллергологии» **Аллергология и иммунология.** – 2015. - №4. - том 16. – с.405.

7. Фаворская И.А. Получение панели однодоменных антител, специфически связывающихся с токсином В *Clostridium difficile*, и их модификация для усиления потенциального нейтрализующего действия / Фаворская И.А., Бурмистрова Д.А., Табакова И.В., **Щебляков Д.В.** // Материалы международного конгресса «Инновационные технологии в иммунологии и аллергологии» **Аллергология и иммунология.** – 2015. - №4. - том 16. – с.387.

8. Burmistrova D.A. Genetic passive immunization with adenoviral vector expressing chimeric nanobody-Fc molecules as therapy for genital infection caused by *Mycoplasma hominis* / Burmistrova D.A., Tillib S. V., **Shcheblyakov D.V.**, Dolzhikova I. V., Shcherbinin D. N., Zubkova O. V., Ivanova T. I., Tikhvatulin A. I., Shmarov M. M., Logunov D. Y., Naroditsky B. S., Gintsburg A. L. // **PLoS One.** – 2016. – Vol. 11. – №. 3. IF = 2.9.

9. Dolzhikova, I. V. Safety and immunogenicity of GamEvac-Combi, a heterologous VSV- and Ad5-vectored Ebola vaccine: an open phase I/II trial in healthy adults in Russia. *Human vaccines & immunotherapeutics* / Dolzhikova, I. V., Zubkova, O. V., Tukhvatulin, A. I., Dzharrullaeva, A. S., Tukhvatulina, N. M., **Shcheblyakov**, D. V., Shmarov M.M., Tokarskaya E.A., Simakova Y.V., Egorova D.A., Scherbinin D.N., Tutykhina I.L., Lysenko A.A., Kostarnoy A.V., Gancheva P.G., Ozharovskaya T.A., Belugin B.V., Kolobukhina L.V., Pantyukhov V.B., Syromyatnikova S.I., Shatokhina I.V., Sizikova T.V., Rumyantseva I.G., Andrus A.F., Boyarskaya N.V., Voytyuk A.N., Babira V.F., Volchikhina S.V., Kutaev D.A., Bel'skih A.N., Zhdanov K.V., Zakharenko S.M., Borisevich S.V., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // **Human Vaccines & Immunotherapeutics**. - 2017. Vol. 13, № 3. - P.613-620. IF = 4.1.
10. Sizikova, T. E. The use of monoclonal antibodies for the treatment of Ebola virus disease / Sizikova, T. E., Borisevich, G. V., **Shcheblyakov**, D. V., Burmistrova, D. A., & Lebedev, V. N. // **Problems of Virology**. - 2018. – Vol. 63, № 6. - P.245-249. IF = 0.21.
11. Godakova S. A. Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice / Godakova S. A., Noskov A. N., Vinogradova I.D., Ugriumova G. A., Solovyev A. I., Esmagambetov I. B., Tukhvatulin A. I., Logunov D. Y., Naroditsky B. S., **Shcheblyakov** D.V. and A. L. Gintsburg // **Toxins**. – 2019. – Vol. 11, № 8. – C. 464. IF = 3.9.
12. **Shcheblyakov** D. Development and characterization of two GP-specific monoclonal antibodies, which synergistically protect non-human primates against Ebola lethal infection / Shcheblyakov D., Esmagambetov I., Simakin P., Kostina L., Kozlov A., Tsibezov V., Grebennikova T., Zubkova O., Tuhvatulin A., Logunov D., Naroditsky B., Gintsburg A., Chifanov D., Rumyantseva I., Boyarskaya N., Sizikova T., Shagarova N., Andrus A., Shatohina I., Syromyatnikova S., Kovalchuk A., Pantyukhov V., Borisevich S. // **Antiviral Research**. – 2019. – Vol. 172. – C. 104617. IF = 4.5.
13. Logunov, D. Y. Safety and immunogenicity of an rAd26 and rAd5 vector-based heterologous prime-boost COVID-19 vaccine in two formulations: two open, non-randomised phase 1/2 studies from Russia / Logunov, D. Y., Dolzhikova, I. V., Zubkova, O. V., Tukhvatulin, A. I., **Shcheblyakov**, D. V., Dzharrullaeva, A. S., Grousova D. M., Erokhova A. S., Kovyrshina A. V., Botikov A. G., Izhaeva F. M., Popova O., Ozharovskaya T. A., Esmagambetov I. B., Favorskaya I. A., Zrelkin D. I., Voronina D. V., Shcherbinin D. N., Semikhin A. S., Simakova Y. V., Tokarskaya E. A., Lubenets N. L., Egorova D. A., Shmarov M. M., Nikitenko N. A., Morozova L. F., Smolyarchuk E. A., Kryukov E. V., Babira V. F., Borisevich S. V., Naroditsky B. S., Gintsburg A. L. // **The Lancet**. – 2020. – T. 396. – №. 10255. – C. 887-897. IF = 98.4.
14. Kostin A. I. Impact of pathogen reduction methods on immunological properties of the COVID-19 convalescent plasma / Kostin A. I., Lundgren M. N, Bulanov A. Y., Ladygina E. A., Chirkova K. S., Gintsburg A. L., Logunov D. Y., Dolzhikova I. V., **Shcheblyakov** D. V., Borovkova N. V., Godkov M. A., Bazhenov A. I., Shustov V.V., Bogdanova A. S., Kamalova A. R., Ganchin V. V., Dombrovskiy E. A., Volkov S. E., Drozdova N. E., Petrikov S.S. // **Vox Sanguinis**. – 2021. – T. 116. – №. 6. – C. 665-672. IF = 1.8.
15. Esmagambetov I.B. Nanobodies are potential therapeutic agents for the Ebola virus infection / Esmagambetov I.B., **Shcheblyakov** D.V., Egorova D.A., Voronina O.L., Derkaev A.A., Voronina D.V., Popova O., Ryabova E.I., Shcherbinin D.N., Aksenova E.I., Semenov A.N., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Logunov D.Yu., Naroditsky B.S., Borisevich S.V., Gintsburg A.L. // **Acta Naturae**. - 2021. - Vol. 13, № 4. - C. 53-63. IF = 2.0.
16. Gushchin, V.A. Neutralizing Activity of Sera from Sputnik V-Vaccinated People against Variants of Concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants / Gushchin, V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., Odintsova A.S., Siniavin A.E., Nikiforova M.A., Pochtovyi A.A., Shidlovskaya E.V., Kuznetsova N.A., Burgasova O.A., Kolobukhina L.V., Iliukhina A.A., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., Kuzina A.V., Grousova D.M., Tukhvatulin A.I.,

Shcheblyakov D.V., Zubkova O.V., Karpova O.V., Voronina O.L., Ryzhova N.N., Aksenova E.I., Kunda M.S., Lioznov D.A., Danilenko D.M., Komissarov A.B., Tkachuck A.P., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. // **Vaccines**. – 2021. – Vol. 9, № 7. – P. 779. IF = 4,961.

17. Vzorov, A. N. Modification of the Spike Protein for Vaccines against Enveloped RNA Viruses / Vzorov, A. N., Samokhvalov, E. I., Chebanenko, V. V., **Shcheblyakov, D. V.**, & Gintsburg, A. L. // **Molecular Biology**. – 2021. - Т.55. – с. 538-547. IF = 1.5.

18. Favorskaya, I. A. Single-domain antibodies efficiently neutralize sars-cov-2 variants of concern / Favorskaya, I. A., **Shcheblyakov, D. V.**, Esmagambetov, I. B., Dolzhikova, I. V., Alekseeva, I. A., Korobkova, A. I., Voronina D. V., Ryabova E. I., Derkaev A. A., Kovyrshina A. V., Pliukhina A. A., Botikov A. G., Voronina O. L., Egorova D. A., Zubkova O. V., Ryzhova N. N., Aksenova E. I., Kunda M. S., Logunov D. Y., Naroditsky B. S., Gintsburg A. L. // **Frontiers in Immunology**. – 2022. – Т. 13. IF = 5.7.

19. Derkaev, A. A. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type a prophylaxis / Derkaev, A. A., Ryabova, E. I., Esmagambetov, I. B., **Shcheblyakov, D. V.**, Godakova, S. A., Vinogradova, I. D., Noskov A. N., Logunov D. Y., Naroditsky B. S., Gintsburg A. L. // **Frontiers in Microbiology**. – 2022. – Т. 13. – С. 960937. IF = 4.0.

20. Есмагамбетов И.Б. Разработка лекарственного препарата гамковимаб для экстренной профилактики и ранней этиотропной терапии короновиральной инфекции вызываемой вирусом SARS-COV-2 на основе гуманизированных моноклональных антител / Есмагамбетов И.Б., **Щебляков Д.В.**, Фаворская И.А., Лебедин Ю.С., Должикова И.В., Воронина О.Л., Деркаев А.А., Алексеева И.А., Рябова Е.И., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // В сборнике: Социально значимые и особо опасные инфекционные заболевания. Материалы IX Всероссийской междисциплинарной научнопрактической конференции с международным участием. Краснодар. - 2022. - С. 83-85.

21. Бойко К.М. Получение и кристаллографический анализ комплекса рецепторсвязывающего домена SARS-COV-2 и вируснейтрализующего наноантитела / Бойко К.М., Варфоломеева Л.А., Егоркин Н.А., Миняев М.Е., Алексеева И.А., Фаворская И.А., Рябова Е.И., Прокофьев В.В., Есмагамбетов И.Б., **Щебляков Д.В.**, Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л., Попов В.О., Случанко Н.Н. // **Кристаллография**. - 2023. - Т. 68. - № 6. - С. 866-873. IF = 0,839.

22. Esmagambetov I. B. rAAV expressing recombinant antibody for emergency prevention and long-term prophylaxis of COVID-19 / Esmagambetov I. B., Ryabova E. I., Derkaev A. A., **Shcheblyakov D. V.**, Dolzhikova I. V., Favorskaya I. A., Grousova D. M., Dovgiy M. A., Prokofiev V. V., Gosudarev A. I., Byrikhina D. V., Zorkov I. D., Pliukhina A. A., Kovyrshina A. V., Shelkov A. Y., Naroditsky B. S., Logunov D. Y., Gintsburg A. L. // **Frontiers in Immunology**. – 2023. – Т. 14. IF = 5.7.

23. Derkaev, A. A. Production and characterisation of a SARSCoV-2 S-protein RBD homodimer with increased avidity for specific antibodies / Derkaev, A. A., Ryabova, E. I., Prokofiev, V. V., Favorskaya, I. A., Grousova, D. M., Esmagambetov, I. B., Dolzhikova I. V., **Shcheblyakov, D. V.** // **BIOPreparations**. – 2023. – С. 76-89. IF = 0.860.

24. Panova, E. A. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A / Panova, E. A., Kleymenov, D. A., **Shcheblyakov, D. V.**, Bykonina, E. N., Mazunina, E. P., Dzharullaeva, A. S., Zolotar A. N., Derkaev A. A., Esmagambetov I. B., Sorokin I. I., Usachev E. V., Noskov A. N., Ivanov I. A., Zatsepin T. S., Dmitriev S. E., Gushchin V. A., Naroditsky B. S., Logunov D. Y., Gintsburg A. L. // **Frontiers in Immunology**. – 2023. – Т. 14. – С. 551. IF = 5.7.

25. Lebedkina M. S. Real-world clinical effectiveness of Tixagevimab/Cilgavimab and Regdanvimab monoclonal antibodies for COVID-19 treatment in Omicron variant-dominant period / Lebedkina M. S., Fomina D., Pliukhina A. A., Kovyrshina A. V., Shelkov A. Y., Andreev S., Chernov A. A., Dolzhikova I. V., Kruglova T. S., Andrenova G. V., Tikhvatulin A., **Shcheblyakov D. V.**, Karaulov

A. V., Lysenko, M. A. Logunov D. Y., Gintsburg A. L. // **Frontiers in Immunology**. – 2023. – Т. 14. – С. 1259725. IF = 5.7.

26. Polyansky D.S. Development of technology for culturing a cell line producing a single-domain antibody fused with the Fc fragment of human IgG1 / Polyansky D.S., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Starkov N.S., Kashapova I.S., **Shcheblyakov D.V.**, Karpov A.P., Esmagambetov I.B. // **ТОНКИЕ ХИМИЧЕСКИЕ ТЕХНОЛОГИИ**. – 2024. – С. 384. IF = 0.71.

27. Sluchanko N. N. Structural Basis for Evasion of New SARS-CoV-2 Variants from the Potent Virus-Neutralizing Nanobody Targeting the S-Protein Receptor-Binding Domain. / Sluchanko N. N., **Shcheblyakov D. V.**, Varfolomeeva L. A., Favorskaya I. A., Dolzhikova I. V., Korobkova A. I., Alekseeva I. A., Esmagambetov I. B., Derkaev A. A., Prokofiev V. V., Zorkov I. D., Logunov D. Y., Gintsburg A. L., Popov V. O., Boyko K. M. // **Biochemistry (Moscow)**. - 2024. - Т.89, №7. – с.1260-1272. IF = 2.908.

28. **Shcheblyakov D. V.** Broadly Reactive Nanobody Targeting the H3 Hemagglutinin of the Influenza A Virus / Shcheblyakov D. V., Voronina D. V., Favorskaya, I. A., Esmagambetov I. B., Alekseeva I. A., Korobkova A. I., Gintsburg A. L. // *Acta Naturae*. – 2024. – Т. 16. – №. 1. – С. 101. IF = 2.0.

29. Sluchanko N. N. Structural insight into recognition of *Clostridioides difficile* toxin A by novel neutralizing nanobodies targeting QTIN-like motifs within its receptor-binding domain // *International Journal of Biological Macromolecules*. / Sluchanko N. N., Sokolova I. V., Favorskaya I. A., Esmagambetov I. B., Tukhvatulin A. I., Alekseeva I. A., Ungur A. S., Varfolomeeva L. A., Boyko K. M., Logunov D. Y., Gintsburg A. L., Popov V. O., **Shcheblyakov D. V.**, Belyi Y. F. // **International Journal of Biological Macromolecules**. – 2024. – Т.263. - С. 137910. IF = 7.7.

Список патентов

30. Экспрессионный вектор на основе аденоассоциированного вируса, обладающий защитными свойствами против интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А: пат. №2768044 Российская Федерация / Есмагамбетов И.Б., Рябова Е. И., Деркаев А.А., Довгий М.А., Бырихина Д. В., Носков А. Н., Чемоданова И. П., Государев А. И., **Щебляков Д. В.**, Народицкий Б. С., Логунов Д. Ю., Гинцбург А. Л. - № 2021139434; заявл. 28.12.2021; опубл. 23.03.2022 Бюл. № 9.

31. Однодоменные антитела к белку GP вируса Эбола для иммунотерапии лихорадки Эбола: пат. №2644202 Российская Федерация / **Щебляков Д. В.**, Егорова Д. А., Логунов Д. Ю., Шмаров М. М., Белый Ю. Ф., Зубкова О. В., Фаворская И. А., Щербинин Д. Н., Должикова И. В., Тухватулин А. И., Сыромятникова С. И., Пантюхов В. Б., Шатохина И. В., Воронина О. Л., Борисевич С. В., Народицкий Б. С., Гинцбург А. Л.; - № 2015152866; заявл. 15.06.2017; опубл. 08.02.2018 Бюл. № 4.

32. Рекомбинантная псевдоаденовирусная частица, продуцирующая модифицированные наноантитела, узнающие микоплазму *M.hominis*, фармацевтическая композиция на ее основе и способ ее использования для терапии микоплазмозов: пат. №2562158 Российская Федерация / Бурмистрова Д. А., **Щебляков Д. В.**, Раковская И. В., Тиллиб С. В., Шмаров М. М., Логунов Д. Ю., Народицкий Б. С., Гинцбург А. Л. - №2013153331/10; заявл. 10.06.2015; опубл. 10.09.2015 Бюл. № 25.

33. Однодоменное антитело для нейтрализации вирусов и его модификации, и способ их применения для экстренной профилактики заболеваний, вызываемых вирусом гриппа А: пат. №2777073 Российская Федерация / **Щебляков Д. В.**, Воронина Д. В., Есмагамбетов И. Б., Деркаев А. А., Щербинин Д. Н., Попова О., Фаворская И. А., Рябова Е. И., Зубкова О. В., Шмаров М. М., Народицкий Б. С., Логунов Д. Ю., Гинцбург; А.Л. - № 2021132365; завл. 08.11.2021; опубл. 01.08.2022 Бюл. № 22.

34. Однодоменное антитело и его модификации, специфически связывающиеся с ботулиническим нейротоксином типа А, и способ их применения для терапии или экстренной профилактики интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А: пат. №2766348 Российская Федерация / Есмагамбетов И. Б., **Щебляков Д. В.**, Деркаев А. А., Годакова С. А., Носков А. Н., Виноградова И. Д., Рябова Е. И., Алексеева И. А., Фаворская И. А., Логунов Д. Ю., Народицкий Б. С., Гинцбург А. Л. - №2021122677; заявл. 29.07.2021; опубл. 15.03.2022 Бюл. № 8.

35. Экспрессионный вектор на основе аденоассоциированного вируса и способ его применения для экстренной профилактики и профилактики заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV-2 (варианты): пат. №2777404 Российская Федерация / Гинцбург А.Л., Народицкий Б. С., Логунов Д. Ю., **Щебляков Д. В.**, Должикова И. В., Есмагамбетов И. Б., Фаворская И. А., Деркаев А.А., Алексеева И.А., Рябова Е. И., Прокофьев В. В., Зорков И. Д., Довгий М. А., Бырихина Д. В., Государев А.И. - №2022112413; заявл. 06.05.2022; опубл. 03.08.2022 Бюл. № 22.

36. Средство и способ терапии и экстренной профилактики заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного антитела и гуманизованного моноклонального антитела: пат. №2769223 Российская Федерация / **Щебляков Д.В.**, Есмагамбетов И. Б., Фаворская И. А., Должикова И. В., Лебедин Ю. С., Деркаев А. А., Рябова Е. И., Прокофьев В. В., Алексеева И. А., Воронина Д. В., Зорков И. Д., Ковыршина А. В., Илюхина А. А., Ботиков А. Г., Карпов А. П., Лубенец Н. Л., Зубкова О. В., Семихин А. С., Народицкий Б. С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А. Л. - №2021138330; заявл. 22.12.2021; опубл. 29.03.2022 Бюл. № 10.

37. Однодоменное антитело и его модификации, специфически связывающиеся с RBD S белка вируса SARS-CoV-2, и способ их применения для терапии и экстренной профилактики заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV-2: пат. №2763001 Российская Федерация / Фаворская И. А., **Щебляков Д.В.**, Есмагамбетов И. Б., Деркаев А. А., Алексеева И. А., Рябова Е. И., Воронина Д. В., Прокофьев В. В., Должикова И.В., Зорков И. Д., Илюхина А. А., Ботиков А.Г., Гроусова Д. М., Егорова Д. А., Народицкий Б. С., Логунов Д. Ю., Гинцбург А. Л. - № 2021122686; заявл. 29.07.2021; опубл. 24.12.2021 Бюл. № 36.

38. Гуманизованное моноклональное антитело, специфически связывающиеся с RBD S белка вируса SARS-CoV-2, средство и способ для терапии и экстренной профилактики заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV-2: пат. №2765731 Российская Федерация / Есмагамбетов И. Б., Щебляков Д.В., Лебедин Ю.С., Фаворская И. А., Должикова И.В., Деркаев А. А., Рябова Е. И., Прокофьев В. В., Алексеева И.А., Воронина Д.В., Зорков И. Д., Ковыршина А. В., Илюхина А. А., Ботиков А. Г., Карпов А. П., Лубенец Н. Л., Зубкова О.В., Семихин А. С., Народицкий Б. С., Логунов Д. Ю., Гинцбург А. Л. - №2021138328; заявл. 22.12.2021; опубл. 02.02.2022 Бюл. № 4.