

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии
имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Воронина Дарья Владимировна

**НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА ДЛЯ ЗАЩИТЫ
ОТ РАЗЛИЧНЫХ ПОДТИПОВ ВИРУСА ГРИППА А**

3.2.7. – Иммунология (биологические науки)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Щебляков Дмитрий Викторович

Москва – 2025

ОГЛАВЛЕНИЕ

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ | 6 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ | 17 |
| 1.1 Вирусы гриппа | 17 |
| 1.1.1 Вирусы гриппа типа А | 18 |
| 1.2 Строение вириона и жизненный цикл ВГА..... | 21 |
| 1.2.1 Строение вириона ВГА | 21 |
| 1.2.2 Жизненный цикл ВГА..... | 25 |
| 1.3 Характеристика поверхностного гликопротеина ВГА – гемагглютинина – и гуморальный иммунный ответ к нему | 27 |
| 1.4 Современная этиотропная терапия гриппа..... | 33 |
| 1.5 Однодоменные антитела | 38 |
| 1.5.1 Молекулярные и биохимические особенности однодоменных антител в сравнении с классическими антителами..... | 38 |
| 1.5.2 Оптимизация структуры однодоменных антител для применения в терапии инфекционных заболеваний..... | 41 |
| 1.5.3 Однодоменные антитела широкого спектра против вирусов гриппа..... | 44 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ | 50 |
| 2.1 Материалы..... | 50 |
| 2.2 Методы | 56 |
| 2.2.1 Бактериологические методы..... | 56 |
| 2.2.2 Методы генетической инженерии | 57 |
| 2.2.3 Иммунологические методы | 61 |
| 2.2.4 Вирусологические методы..... | 64 |
| 2.2.5 Получение однодоменных антител | 67 |
| 2.2.6 Методы работы с лабораторными животными..... | 75 |
| 2.2.7 Биоинформатические методы | 76 |
| 2.2.8 Статистическая обработка результатов..... | 77 |
| 2.2.9 Доклинические исследования безопасности и фармакокинетики кандидатного препарата ГамИнфлюМаб..... | 77 |
| 2.2.10 Клинические исследования безопасности, переносимости и фармакокинетики кандидатного препарата ГамИнфлюМаб | 78 |

| | |
|--|-----|
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ | 80 |
| 3.1 Получение рекомбинантных антигенов гемагглютининов вирусов гриппа типа А | 80 |
| 3.2 Получение однодоменных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1, и характеристика их активности в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> | 83 |
| 3.2.1 Иммунизация животного, получение иммунной библиотеки рекомбинантных бактериофагов и селекция специфических однодоменных антител..... | 85 |
| 3.2.2 Продукция VHH и определение их специфической активности <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> | 89 |
| 3.3 Получение тяжелопепочечных моноклональных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1, и изучение их активности <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> | 94 |
| 3.3.1 Получение слитых с Fc-фрагментом однодоменных антител, связывающихся с НА филогенетической группы 1 | 95 |
| 3.3.2 Изучение кросс-реактивности и нейтрализующих свойств тяжелопепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1 | 97 |
| 3.3.3 Исследование активации FcγR тяжелопепочечными антителами, специфичных к НА филогенетической группы 1..... | 99 |
| 3.3.4 Исследование эффективности тяжелопепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1, <i>in vivo</i> для профилактики инфекции, вызванной ВГА..... | 101 |
| 3.3.5 Исследование <i>in vivo</i> эффективности тяжелопепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1, для терапии инфекции, вызванной ВГА | 104 |
| 3.3.6 Механизм противовирусного действия тяжелопепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1..... | 106 |
| 3.3.7 Характеристика эпитопной специфичности тяжелопепочечных антител, связывающихся с НА филогенетической группы 1 | 108 |
| 3.4 Получение однодоменных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2, и характеристика их активности в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> .. | 112 |
| 3.4.1 Иммунизация животного, получение иммунной библиотеки рекомбинантных бактериофагов и селекция специфических однодоменных антител..... | 112 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.4.2 | Продукция VHH и определение их специфической активности <i>in vitro</i> | 114 |
| 3.5 | Получение тяжелоцепочечных моноклональных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2, и изучение их активности <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> ... | 118 |
| 3.5.1 | Получение слитых с Fc-фрагментом однодоменных антител, связывающихся с НА филогенетической группы 2 | 118 |
| 3.5.2 | Изучение <i>in vitro</i> активности и кросс-реактивности тяжелоцепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2..... | 120 |
| 3.5.3 | Исследование активации FcγR тяжелоцепочечными антителами, специфичными к НА филогенетической группы 2 | 124 |
| 3.5.4 | Исследование эффективности тяжелоцепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2, <i>in vivo</i> для профилактики и терапии инфекции, вызванной ВГА..... | 125 |
| 3.5.5 | Механизм противовирусного действия тяжелоцепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2..... | 128 |
| 3.6 | Получение тяжелоцепочечных биспецифических антител, связывающихся с НА филогенетических групп 1 и 2, и характеристика их активности в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> | 130 |
| 3.6.1 | Получение слитых с Fc-фрагментом гетеродимеров однодоменных антител, специфичных к НА филогенетических групп 1 и 2 | 130 |
| 3.6.2 | Изучение кросс-реактивности и нейтрализующих свойств тяжелоцепочечных биспецифических антител, связывающихся с НА филогенетических групп 1 и 2..... | 132 |
| 3.6.3 | Исследование активации FcγR тяжелоцепочечными биспецифическими антителами, связывающимся с НА филогенетических групп 1 и 2 | 134 |
| 3.6.4 | Исследование эффективности тяжелоцепочечных биспецифических антител <i>in vivo</i> для профилактики и терапии инфекции, вызванной ВГА..... | 137 |
| 3.7 | Доклинические исследования кандидатного лекарственного препарата на основе биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc – ГамИнфлюМаб | 140 |
| 3.7.1 | Разработка технологии получения кандидатного лекарственного препарата ГамИнфлюМаб | 140 |
| 3.7.2 | Исследование функциональной активности Fc-фрагмента антитела D9.2-G2.3-Fc | 143 |
| 3.7.3 | Исследование фармакокинетики кандидатного лекарственного препарата ГамИнфлюМаб | 144 |

| | |
|---|-----|
| 3.7.4 Доклинические исследования безопасности кандидатного лекарственного препарата ГамИнфлюМаб | 146 |
| 3.8 Клиническое исследование безопасности, переносимости и фармакокинетики кандидатного лекарственного препарата ГамИнфлюМаб ... | 151 |
| ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ | 158 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 172 |
| ВЫВОДЫ | 173 |
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ | 175 |
| СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | 179 |

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Вирусы гриппа принадлежат к порядку *Articulavirales*, семейству *Orthomyxoviridae* и включают 4 типа: вирус гриппа типа А (IAV, ВГА), вирус гриппа типа В (IBV, ВГВ), вирус гриппа типа С (ICV, ВГС) и недавно идентифицированный тип D (IDV) [112]. Инфицировать человека способны вирусы гриппа типа А, В и С, среди которых только вирусы типа А и В вызывают ежегодные эпидемии, приводящие к тяжелому течению заболевания у ~5 миллионов и смертельному исходу у 290 000 – 650 000 людей по всему миру [132]. ВГА не только вызывают ежегодный сезонный подъем заболеваемости, но также единственные из всех типов вирусов гриппа обладают пандемическим потенциалом и могут характеризоваться высокой смертностью. Классификация вирусов гриппа А основана на антигенных вариантах основного поверхностного белка вириона – гемагглютинина (НА). В настоящий момент известно о 18 подтипах НА вирусов гриппа А, которые в соответствии с филогенетическим анализом распределяются в две эволюционно обособленные группы. Группа 1 включает НА подтипов Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13, Н16, Н17 и Н18; остальные подтипы формируют группу 2 (Н3, Н4, Н7, Н10, Н14 и Н15) [249]. Известно, что только ВГА подтипов Н1, Н2 и Н3 ранее вызывали пандемии. Также, в связи с недавними вспышками инфекций, вызванных ВГА подтипов Н5, Н7 и Н9, возникла озабоченность относительно их пандемического потенциала [244].

Несмотря на то, что грипп в равной степени может инфицировать любого человека в независимости от его состояния или возраста, определенные группы населения подвержены большему риску заражения или развития тяжелого течения заболевания. К группам высокого риска относятся беременные женщины, дети до 5 лет, взрослые в возрасте ≥ 65 лет, и лица с сопутствующими заболеваниями. Медицинских работников также включают в список групп риска, поскольку вероятность их взаимодействия с инфицированными пациентами выше, чем в

целом в популяции, в результате чего возрастает шанс непосредственного заболевания медработника, а также распространения инфекции среди других лиц.

Основным способом противостояния гриппозной инфекции служит вакцинопрофилактика. Быстрая антигенная эволюция основных поверхностных белков вируса диктует необходимость ежегодного обновления вакцинных штаммов. Множество разнообразных факторов играет роль в эффективности вакцин, в результате чего она сильно варьирует в зависимости от конкретного эпидемиологического сезона. Опубликованные за последние десятилетия систематические обзоры и мета-анализы демонстрируют различия в эффективности вакцинации между типами и подтипами гриппа, между географическими регионами, возрастными группами, и уровнем идентичности антигенного состава вакцины и циркулирующих штаммов [65]. В среднем для всех вирусов гриппа эффективность вакцинации при совпадении штаммов составляет 49%, а при несовпадении – 9% [194]. Принято считать, что эпидемиологическая эффективность вакцинопрофилактики достигается при охвате иммунизацией не менее 60% всего населения и не менее 75% людей, относящихся к группам риска. Однако, как в мире, так и в Российской Федерации, охват вакцинацией недостаточен [15, 43]. Таким образом, ограниченная эффективность вакцинации и/или отказ от нее населения обуславливают необходимость в применении терапевтических средств против вирусов гриппа.

На сегодняшний день, в клинических рекомендациях Минздрава России указаны три лекарственных препарата, направленных на возбудителя гриппозной инфекции: ингибиторы нейраминидазы (NA) осельтамивир и занамивир, а также ингибитор NA умифеновир. Также, на российском фармацевтическом рынке представлены и другие группы противогриппозных средств: ингибитор M2 белка (римантадин) и ингибитор PA субъединицы вирусной полимеразы (балоксавир марбоксил). Вместе с тем вирусы гриппа не перестают изменяться, появляются устойчивые к лекарственным средствам штаммы, которые снижают эффективность противовирусных препаратов. Ингибиторы ионного канала M2 на данный момент не рекомендованы в качестве терапии гриппа по причине развития устойчивости

циркулирующих штаммов вируса к их действию [47, 73]. Кроме того, были выделены штаммы, резистентные к ингибиторам NA [238, 274]. Уже в ходе III фазы клинических исследований балоксавира, в 9,7% изолятов от пациентов, получавших данный препарат, были обнаружены мутации в активном сайте PA [254]. Поэтому на сегодняшний день крайне актуальной задачей является разработка универсальных средств профилактики и терапии гриппозной инфекции, которые сохраняли бы свою эффективность против постоянно изменяющегося патогена. Моноклональные антитела (мАт) могли бы дополнить имеющийся арсенал противовирусных препаратов против гриппа.

За последние годы стремительный прогресс в области биотехнологии и иммунологии привел к тому, что в настоящее время на мировом фармацевтическом рынке существует более 200 препаратов против различных заболеваний на основе мАт и около 1400 экспериментальных препаратов проходят клинические исследования. По состоянию на май 2025 г. среди 229 зарегистрированных препаратов мАт доля противовирусных антител составляет всего 7%, при этом среди них нет ни одного одобренного препарата на основе мАт против вирусов гриппа (по данным The Antibody Society). В последние два десятилетия было изолировано несколько человеческих мАт широкого спектра, которые способны связываться и нейтрализовать множественные штаммы и подтипы вирусов гриппа, в то время как большинство антител против гриппа обладают специфичностью к одному конкретному штамму вируса. Некоторые из мАт широкого спектра в настоящее время проходят или прошли клинические испытания I или II фазы, и на данный момент результаты являются многообещающими как с точки зрения безопасности, так и эффективности [87, 249, 211, 177, 139, 188, 281]. Такие препараты обладают высоким терапевтическим потенциалом при лечении тяжелого течения заболевания, включая зоонозные инфекции, например, вызванные вирусом гриппа H5N1 или H7N9. Кроме того, препараты на основе мАт могут быть актуальны для профилактики уязвимых групп населения (детей, лиц с ослабленным иммунитетом, беременных и пожилых людей) во время сезонных эпидемий гриппа, а также для медицинских работников в случае пандемии.

В 1993 году в сыворотке крови одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) впервые были обнаружены тяжелоцепочечные иммуноглобулины класса G, у которых, в отличие от классических иммуноглобулинов, отсутствуют легкие цепи и константный домен СН1 тяжелой цепи [106]. Таким образом, антигенсвязывающий фрагмент HcAb сформирован только одним доменом (VHH), который соответствует однодоменному антителу (sdAb). Функционально VHH эквивалентен антигенсвязывающему Fab-фрагменту классических IgG. Несмотря на то, что паратоп VHH включает всего три участка CDR, однодоменные антитела не уступают классическим по аффинности взаимодействия с антигеном [186]. Достаточную площадь антигенсвязывающей поверхности sdAb обеспечивает удлинённый CDR3 участок VHH, который также обладает большим аминокислотным и структурным разнообразием в сравнении с CDR3 переменного фрагмента тяжелой цепи классических IgG [179]. Благодаря этим особенностям формируется уникальная архитектура паратопа VHH, которая позволяет однодоменным антителам распознавать труднодоступные для классических МАТ эпитопы. Данное преимущество VHH сделало их привлекательным объектом исследования в качестве основы для разработки препаратов для защиты от инфекций, вызванных высокоизменчивыми вирусами, в том числе вирусами гриппа.

Несмотря на относительную новизну формата VHH, уже четыре препарата на основе однодоменных антител одобрены и успешно применяются в различных странах для терапии аутоиммунных заболеваний и раковых опухолей. Однако, на сегодняшний день не существует ни одного зарегистрированного или проходящего клинические испытания препарата на основе однодоменных антител против вируса гриппа (по данным электронного ресурса [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov)). Поэтому, разработка профилактических и терапевтических средств на основе нейтрализующих однодоменных антител широкого спектра против инфекции, вызванной ВГА, является перспективным направлением исследований, а также имеет как фундаментальное, так и практическое значение.

Цель и задачи исследования

Целью исследования являлось получение однодоменных антител к консервативным эпитопам гемагглютинина и изучение их защитного потенциала в отношении инфекции, вызванной вирусами гриппа А.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

1. Получить рекомбинантные антигены полноразмерных НА (подтипов Н1 и Н3) и стеблевого домена НА, содержащих консервативные сайты связывания антител широкого спектра;
2. Провести иммунизацию животных семейства Верблюдовые и осуществить селекцию однодоменных антител, специфичных в отношении НА филогенетических групп 1 и 2, методом фагового дисплея;
3. Выбрать наиболее перспективные клоны однодоменных антител на основании исследования спектра их противовирусной активности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*;
4. Получить однодоменные антитела, слитые с Fc-фрагментом IgG1 человека, и изучить их аффинность и нейтрализующую активность в отношении НА филогенетических групп 1 и 2 *in vitro* и *in vivo*;
5. Исследовать механизм противовирусного действия однодоменных антител, слитых с Fc-фрагментом;
6. Получить биспецифическое антитело, на основе выбранных однодоменных антител, активное в отношении НА филогенетических групп 1 и 2, и оценить его защитный потенциал против инфекции, вызванной вирусами гриппа типа А;
7. Изучить безопасность кандидатного препарата на основе полученного биспецифического антитела в доклинических исследованиях на животных, а также в клинических исследованиях I фазы на здоровых добровольцах.

Научная новизна

В результате проведенной работы впервые получены рекомбинантные антигены ВГА: полноразмерные НА штаммов A/Hawaii/70/2019 (H1N1) и A/Hong

Kong/45/2019 (H3N2), а также стеблевой домен НА штамма A/Brisbane/59/2007 (H1N1).

Впервые была получена панель однодоменных антител с широким спектром нейтрализующей активности в отношении НА филогенетической группы 1 и антитела широкого спектра против НА филогенетической группы 2.

Осуществлена модификация НА-специфических VHH с помощью Fc-фрагмента и показано, что данная модификация приводит к увеличению нейтрализующего потенциала, спектра активности и аффинности однодоменных антител.

Впервые показан механизм противовирусного действия для Fc-слитых вариантов однодоменных антител G2.3 и D9.2. Установлено, что G2.3-Fc предотвращает конформационные изменения НА, таким образом ингибируя слияние вирусной и эндосомальной мембран, в то время как протективные свойства D9.2-Fc зависят от Fc-опосредованных эффекторных механизмов.

Впервые были локализованы сайты связывания антител G2.3-Fc и D9.2-Fc в структуре молекулы НА. Для антитела G2.3-Fc был получен эскейп-мутант на основе ВГА штамма A/Victoria/2570/2019 (H1N1) и определены ключевые аминокислотные замены, влияющие на нейтрализующую активность G2.3-Fc.

В рамках данной работы впервые были получены биспецифические антитела, включающие в качестве антигенсвязывающих фрагментов гетеродимеры однодоменных антител G2.3 и D9.2 в различной ориентации относительно Fc-фрагмента. На основе биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc впервые был разработан кандидатный препарат для ранней этиотропной терапии инфекции, вызванной вирусом гриппа типа А – ГамИнфлюМаб. Были проведены доклинические исследования и клинические исследования I фазы кандидатного препарата ГамИнфлюМаб.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в расширении знаний в области получения однодоменных антител с широким спектром специфической активности. Показана возможность использования как полноразмерного НА, так и

его субъединицы (стеблевого домена) для получения однодоменных антител широкого спектра. Оработана методология получения иммунных библиотек и селекции специфических антител, которая позволит использовать этот подход для направленного отбора однодоменных антител широкого спектра.

Полученные данные вносят вклад в понимание механизмов противовирусного действия однодоменных антител против ВГА.

Также в работе продемонстрирован подход к созданию универсальных противовирусных препаратов путем комбинирования однодоменных антител разной специфичности в единую биспецифическую молекулу, таким образом позволяя расширить спектр активности препарата, что крайне важно для высокоизменчивых патогенов.

Практическая значимость работы заключается в том, что полученные однодоменные антитела, специфичные в отношении НА филогенетических групп 1 и 2 (G2.3 и D9.2) позволили создать на их основе кандидатный препарат ГамИнфлюМаб, содержащий биспецифическое тяжелоцепочечное антитело D9.2-G2.3-Fc. В полном объеме проведены доклинические исследования данного препарата и первая фаза клинических исследований. Полученные данные характеризуют разработанный кандидатный препарат ГамИнфлюМаб как перспективное лекарственное средство для специфической терапии гриппозной инфекции и обосновывают целесообразность проведения дальнейших клинических исследований.

Практическая значимость подтверждена Патентом РФ на изобретение RU 2777073 C1 «Однодоменное антитело для нейтрализации вирусов и его модификации, и способ их применения для экстренной профилактики заболеваний, вызываемых вирусом гриппа А» 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..

Внедрение полученных результатов в практику

Научная работа представляет собой законченный вид исследования, имеющий выраженную прикладную направленность. В рамках диссертационной

работы были разработаны методики титрования ВГА на клеточной линии MDCK по методу бляшкообразования и по конечной точке цитопатического действия. Данные методы внедрены на уровне ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, что подтверждается соответствующим актом о внедрении результатов в практику. По основным научным положениям, выводам и рекомендациям научно-исследовательской работы были внедрены лекции в учебный курс аспирантов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, что подтверждается соответствующим актом о внедрении.

Методология и методы исследования

Методологической основой исследования послужили современные подходы, теоретические и экспериментальные исследования по получению препаратов на основе однодоменных антител. В работе использованы актуальные молекулярно-биологические, бактериологические, вирусологические, биохимические, иммунологические и биоинформатические методы, а также методы статистической обработки данных и методы работы с лабораторными животными.

Степень достоверности результатов

Достоверность результатов исследования подтверждается достаточным количеством наблюдений, современными методами исследования, которые соответствуют поставленным в работе цели и задачам. Примененные статистические методы адекватны поставленным задачам. Проверка статистических гипотез осуществлялась при допустимом в медико-биологических исследованиях минимальном уровне значимости 5% ($p < 0,05$). Обсуждение результатов проведено с учетом актуальных данных биологической науки.

Положения, выносимые на защиту

1. Использование консервативного стеблевого домена молекулы НА для селекции специфических VHH, а также использование гетерологичных антигенных мишеней для иммунизации животного и последующего биопаннинга, способствует отбору клонов однодоменных антител, обладающих широким спектром противовирусной активности.

2. Модифицирование однодоменных антител G2.3 и D9.2 с помощью Fc-фрагмента приводит к увеличению аффинности и нейтрализующей активности, а также позволяет Fc-слитым молекулам активировать Fc-зависимые эффекторные функции при связывании с антигеном.

3. Отобранное антитело к стеблевому домену НА G2.3-Fc реализует нейтрализующую активность путем предотвращения конформационных изменений в НА, возникающих при снижении pH в эндосоме, что приводит к ингибированию слияния вирусной и эндосомальной мембран, в то время как противовирусное действие антитела D9.2-Fc, связывающее НА1 субъединицу, зависит от Fc-опосредованных механизмов.

4. Объединение двух антигенсвязывающих фрагментов VHH с различной специфичностью в формате биспецифического антитела позволяет в рамках одной молекулы существенно расширить спектр противовирусной активности, включая НА двух филогенетических групп: H1, H2, H5, H6, H9, H3, H4.

5. Полученное биспецифическое антитело D9.2-G2.3-Fc обеспечивает защиту животных от инфекции, вызванной вирусами гриппа А, относящимися к различным филогенетическим группам.

6. Разработанный кандидатный препарат на основе биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc при доклинических исследованиях показал отсутствие токсического действия, и в рамках клинических исследований на здоровых добровольцах продемонстрировал хороший профиль безопасности и переносимости.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были доложены на международном конгрессе «The 45th FEBS Virtual Congress», 3-8 июля 2021 года, г. Любляна, Словения; Первом Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии, 2-3 марта 2023 года, г. Москва, Россия; IV Международном форуме Дни Вирусологии, 2-4 октября 2023 года, г. Санкт-Петербург, Россия; XI Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2023», 14-16 ноября 2023 года, г. Москва, Россия; VIII Сеченовском

Международном биомедицинском саммите: научно-технологическая кооперация в медицинской отрасли (SIBS-2024), 6-7 ноября 2024 года, г. Москва, Россия; научно-практической конференции с международным участием «Всероссийский дискуссионный клуб все о респираторных инфекциях: диагностика, лечение, профилактика» 8 октября 2025 года, онлайн трансляция; XV Международной научно-практической конференции «Биотехнология и биомедицинская инженерия», 13 ноября 2025 года, г. Курск, Россия.

Апробация диссертации состоялась 12 сентября 2025 года на научной конференции отделов Иммунологии, Генетики и молекулярной биологии бактерий, Медицинской микробиологии и Государственной коллекции вирусов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (Протокол №1).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 3, 6 и 7 паспорта научной специальности 3.2.7. Иммунология.

Публикации

По материалам диссертационной работы опубликовано 6 научных работ, из них: 3 научные статьи, в изданиях, рекомендованных ВАК и/или индексируемых в системах Web of Science, Scopus; 2 работы в сборниках международных конференций и один патент РФ на изобретение.

Личный вклад автора

Автор непосредственно провел эксперименты по получению иммунных библиотек и отбору специфических клонов однодоменных антител методом фагового дисплея, оценке НА-специфической и нейтрализующей активности антител *in vitro*, локализации эпитопов отобранных однодоменных антител и получению эскейп-мутантов ВГА, исследованию эффективности антител *in vivo* по показателям выживаемости и вирусной нагрузке в легких, а также изучению механизмов противовирусного действия отобранных антител, проанализировал и обобщил полученные результаты.

Секвенирование последовательностей VHH и всех полученных в процессе работы генетических конструкций проводилось в лаб. анализа геномов под руководством к.б.н. Ворониной О.Л. Получение стабильных эукариотических клонов-продуцентов рекомбинантных белков и антител, а также транзientная трансфекция клеток линии CHO-S для продукции антител и хроматографическая очистка рекомбинантных белков и антител проводилось совместно с м.н.с. Рябовой Е.И., м.н.с. Деркаевым А.А., лаб.-исслед. Прокофьевым В.В. (лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) под руководством в.н.с., к.б.н. Есмагамбетова И.Б. (лаб. стромальной регуляции иммунитета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Иммунизацию животных проводили совместно с м.н.с. Алексеевой И.А. (лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Исследование способности антител активировать Fc-опосредованные механизмы с помощью репортерных клеточных линий проводили совместно с к.б.н. Джаруллаевой А.Ш. (лаб. клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 215 страницах машинописного текста, включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, список сокращений и условных обозначений и список используемой литературы (300 источников, в том числе 20 отечественных и 280 иностранных публикаций). Работа содержит 10 таблиц и 57 рисунков.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Вирусы гриппа

Вирусы гриппа принадлежат к порядку *Articulavirales* и семейству *Orthomyxoviridae*. Четыре монотипных рода (*Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Gammainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*) включают 4 типа соответственно: вирус гриппа типа А (IAV, ВГА), вирус гриппа типа В (IBV, ВГВ), вирус гриппа типа С (ICV, ВГС) и недавно идентифицированный тип D (IDV) [112]. Это оболочечные вирусы с сегментированным РНК-геномом. Инфицировать человека способны вирусы гриппа типа А, В и С, среди которых только вирусы типа А и В вызывают ежегодные эпидемии, приводящие к смерти 290 000 – 650 000 людей по всему миру [132]. Также ВГА зоонозного происхождения периодически приводят к масштабным пандемиям [244].

Геном вирусов гриппа типа А и В состоит из 8 сегментов одноцепочечной вирусной РНК негативной полярности [(-)оцРНК], кодирующей 11 белков, среди которых гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА) – основные поверхностные гликопротеины [45, 69]. Мутации, накапливаемые в сегментах, соответствующих белкам НА и НА, могут привести к изменению основных антигенов и ускользанию от предсуществующего иммунного ответа. Вирусы гриппа С и D содержат 7 сегментов (-)оцРНК и несут на поверхности один гликопротеин – гемагглютинин-эстеразу, который совмещает в себе функции НА и НА [294].

ВГА классифицируются на различные подтипы, в зависимости от серотипа поверхностных белков НА и НА. На сегодняшний день известно 18 подтипов НА и 11 подтипов НА [252]. Вирусы гриппа типа В разделяют на 2 филогенетически различные эволюционные линии: Ямагатскую и Викторианскую [140]. В настоящее время в человеческой популяции циркулируют два подтипа ВГА (H1N1 и H3N2) и Викторианская линия ВГВ [196].

Наибольшим генетическим разнообразием обладают ВГА, естественным резервуаром которых являются водоплавающие птицы [153]. Принято считать, что ВГВ способны заражать только людей, однако некоторые исследования указывают

на присутствие ВГВ у тюленей [153, 292]. ВГС инфицируют людей (в основном детей) и свиней, IDV выделяются у крупного рогатого скота, а также свиней [112, 172]. Вирусы гриппа А самый многочисленный тип вирусов гриппа, который циркулирует среди многих видов животных, и характеризуется высокой скоростью изменчивости. В прошлом только ВГА приводили к возникновению масштабных пандемий, и, более того, исследователи полагают, что будущие пандемии также могут быть вызваны вирусами типа А.

1.1.1 Вирусы гриппа типа А

Впервые вирус гриппа типа А был открыт в 1933 году британским бактериологом Уилсоном Смитом [236]. На данный момент существует множество различных типов и подтипов ВГА, выделенных от человека, птиц и животных.

Естественным резервуаром ВГА служат водоплавающие птицы, представители данного типа вируса гриппа инфицируют водных млекопитающих, наземных птиц, домашних птиц и скот, домашних животных и людей [153]. К настоящему времени у диких птиц было обнаружено множество подтипов ВГА с различными комбинациями 16 подтипов НА и 9 подтипов NA [120]. Два дополнительных подтипа – H17N10 и H18N11 – изолировали у летучих мышей в 2012 – 2013 гг. [251, 252]. Вирусы гриппа типа А, в настоящее время вызывающие сезонный подъем заболеваемости гриппом среди людей, относятся к подтипам H1N1 и H3N2 [8]. Штаммы вируса гриппа этих подтипов, а также подтипа H2N2, являлись причинами крупных пандемий прошлого столетия [118].

Источником инфицирования ВГА как правило служат больные сезонным гриппом в остром периоде заболевания (первые 5-7 дней от начала появления симптомов), иногда реконвалесценты, выделяющие вирус в течение 14 дней с начала заболевания. Также возможна прямая передача вируса птичьего или свиного гриппа от животного к человеку [163, 190, 214]. Механизм передачи вируса гриппа – аэрогенный, преимущественно он реализуется с помощью воздушно-капельного пути, реже воздушно-пылевым и контактно-бытовым путем [46].

Высокая восприимчивость людей к ВГА обусловлена способностью вируса к антигенной изменчивости. Выделяют три механизма антигенной изменчивости вируса гриппа: антигенный дрейф, антигенный шифт (реассортация) и рекомбинацию [268].

Антигенный дрейф заключается в изменении антигенных свойств поверхностных гликопротеинов вируса гриппа (НА и NA) в результате накапливающихся аминокислотных замен в последовательности этих белков. Данный процесс позволяет вирусам гриппа уклоняться от иммунного ответа организма-хозяина и лежит в основе ежегодных сезонных эпидемий гриппа. Причиной антигенного дрейфа является отсутствие у РНК-зависимой РНК-полимеразы корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активности, что приводит к высокой частоте мутаций [192]. Более высокий темп изменчивости, как для основного поверхностного белка вириона, характерен для молекулы НА, поскольку к нему формируется подавляющее большинство нейтрализующих антител в организме [19]. Аминокислотные замены, приводящие к изменению антигенных свойств НА, и, таким образом, несовпадению вакцинных и циркулирующих штаммов ВГА, в результате снижают эффективность вакцинации и противовирусных препаратов [299].

Рекомбинацию генома вируса гриппа разделяют на гомологичную (обмен участком одного сегмента между различными штаммами) и негомологичную (обмен между разными сегментами генома). Считается, что рекомбинация способствует возникновению высокопатогенных штаммов вируса гриппа [58, 201].

Реассортация происходит в результате реструктуризации генома вируса, когда два различных штамма ВГА инфицируют одну клетку-хозяина и новый «дочерний» вариант вируса несет в себе совокупность сегментов генома «родительских» штаммов. В том случае, если реассортация приводит к изменению поверхностного белка вируса, НА или NA, такой процесс называется антигенным шифтом [44]. В результате антигенного шифта возникают пандемические штаммы ВГА, в том числе вызвавшие крупные пандемии 1957, 1968 и 2009 гг. (Рисунок 1)

[189, 234]. Также антигенный шифт способствовал тяжелым эпидемиям 1947, 1951 и 2003 гг. и росту резистентности к противовирусным препаратам [246].

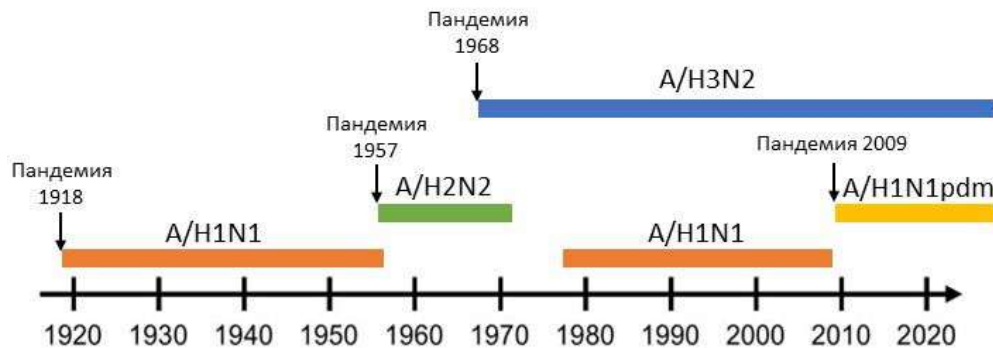


Рисунок 1 – Хронология циркуляции ВГА среди людей с 1918 г.

ВГА подтипа H3N2 циркулирует среди людей с момента пандемии 1968 года, а вирус H1N1 2009 года (A(H1N1)pdm09) появился в человеческой популяции после пандемии 2009 года, заменив сезонный вирус A(H1N1)season1977, который доминировал среди людей в течение 32 лет с 1977 по 2009 год (Рисунок 1) [273].

За более чем 50 лет циркуляции среди человеческой популяции вирусы H3N2 часто подвергались антигенному дрейфу; было зарегистрировано не менее 18 антигенных вариантов ВГА подтипа H3N2 [13, 16]. Аминокислотные замены, связанные с антигенными вариациями, локализованы в пяти сайтах связывания антител в молекуле НА (они пронумерованы от А до Е), но в основном в сайтах А и В. Для существенного изменения антигенности вируса может быть достаточно даже одной аминокислотной замены в НА, тогда как в результате антигенного дрейфа чаще всего происходят замены в нескольких позициях аминокислотных остатков (а.о.) в одном и том же или в двух разных сайтах [2, 9, 11, 18]. Антигенный дрейф также могут вызывать аминокислотные замены в НА, а изменения в гликозилировании а.о. в положениях 245 и 247 (S245N/S247T) N2 привело к сниженной эффективности вакцин против вирусов H3N2 в 2017–2018 гг. [289].

По сравнению с H3N2, вирусы H1N1 относительно реже подвергаются антигенному дрейфу [144]. В период с 1977 по 2009 год зарегистрировано по

меньшей мере шесть антигенных изменений (по сравнению с 10 вариациями для вируса H3N2 за тот же период времени). Для ВГА подтипа H3N2 белок НА мутирует со скоростью 3,6 замены а.о. в год по сравнению с 2,5 заменами а.о. в год для вирусов H1N1 [144]. Циркулирующие в данный момент вирусы A(H1N1)pdm09, и вытесненные из популяции A(H1N1)season1977 являются потомками вируса H1N1, вызвавшего пандемию 1918 года (A(H1N1)pdm1918). Показано, что антигенные различия трех этих вирусов обусловлены аминокислотными заменами в белке НА и изменением сайтов N-гликозилирования в глобулярном домене НА [178].

1.2 Строение вириона и жизненный цикл ВГА

1.2.1 Строение вириона ВГА

Вирион вируса гриппа имеет сферическую форму и диаметр 100-120 нм, однако в свежих вирусных изолятах преимущественно наблюдают нитевидные (филаментоподобные, филаментозные) вирионы, в длину достигающие нескольких микрон [68, 258]. Данная морфологическая форма вириона исчезает в процессе адаптации вируса к росту в эукариотических культурах клеток или куриных эмбрионах [29]. Диаметр длинных нитевидных вирионов составляет 80-100 нм [258]. Считается, что такая структура обеспечивает вирусу преимущество при естественной инфекции, тем не менее до сих пор остается не ясно, в чем именно заключается это преимущество.

Лабораторные адаптированные штаммы вируса гриппа на 65-75% представлены вирионами сферической формы, в меньшей степени – вытянутыми бациллоподобными вирионами длиной не более 250 нм и диаметром ~95 нм [258]. Интересно отметить, что вирионы сферической и бациллоподобной форм проникают в клетки посредством эндоцитоза, в то время как нитевидные вирионы подвергаются макропиноцитозу [218].

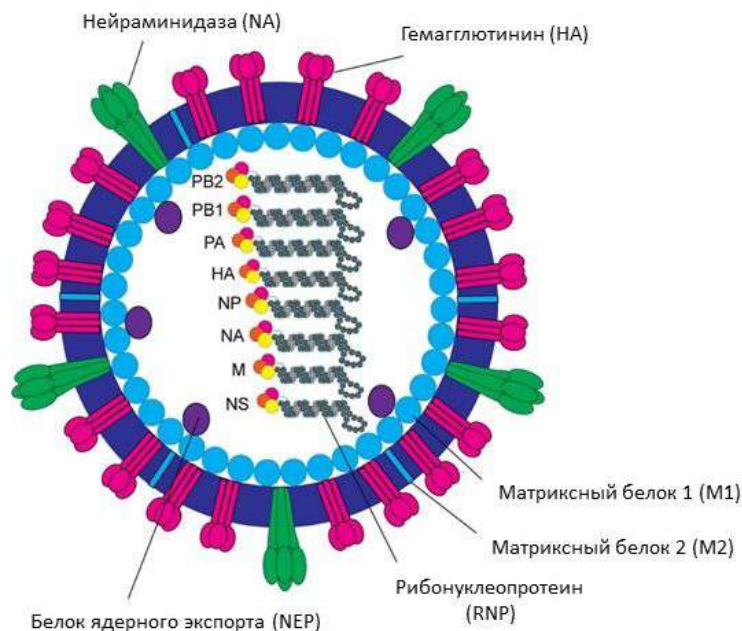


Рисунок 2 – Схематическая структура ВГА. По [53], с изменениями.

Вирус гриппа является оболочечным вирусом, вирион состоит из десяти структурных белков. Белки полимеразного комплекса PB1, PB2 и PA, NP (нуклеопротеин), M1 (матриксный белок) и мультифункциональные белки NS1 (неструктурный белок 1) и NEP (белок ядерного экспорта) располагаются внутри липопротеидной оболочки, тогда как белок ионных каналов M2 и гликопротеины HA и NA закорены на поверхности оболочки и доступны для связывания антителами (Рисунок 2).

Геном ВГА представлен восьмью сегментами вирусного рибонуклеопротеина (РНП), состоящих из одноцепочечной РНК с негативной полярностью. В каждом РНП 3'- и 5'-концы вирусной геномной РНК связаны с комплексом РНК-зависимой РНК-полимеразы, образованным ассоциацией трех белков-полимераз: PB2, PB1 и PA; а остальная часть РНК покрыта молекулами NP [257]. Некоторые сегменты РНП (PB2, HA, NP и NA) кодируют лишь один полипептид, другие могут кодировать два и более полипептидов (Рисунок 3).

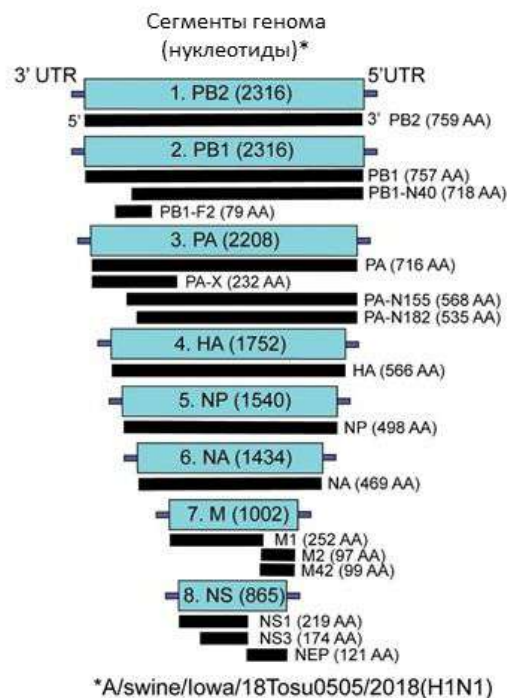


Рисунок 3 – Схема сегментов генома ВГА. По [53], с изменениями.

В общей сложности продуктами трансляции генома ВГА являются 17 белков, каждый из которых выполняет одну или несколько функций, необходимых для успешного инфицирования хозяина [256]. Гликопротеины HA и NA необходимы для инициации инфекции, в то время как белки M1, M2, NS1 и NEP участвуют в цитоплазматическом переносе РНП и сборке вирионов ВГА. Основная информация о функциях структурных и неструктурных белков ВГА представлена в Таблице 1.

Таблица 1 – Функции структурных и неструктурных белков ВГА

| Белок | Функция | Ген (№ сегмента) |
|------------|--|------------------|
| PB2 | Субъединица вирусной полимеразы. Содержит домен, захватывающий 5' кэп РНК клетки-хозяина, что необходимо для эффективной репликации и транскрипции вирусного генома, регулирует жизнеспособность митохондрий [57]. | PB2 (1) |
| PB1 | Каталитическая субъединица вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы. Отвечает за элонгацию вирусной РНК [206, 257]. | PB1 (2) |

| Белок | Функция | Ген (№ сегмента) |
|----------------|---|------------------|
| PB1-F2 | Может усиливать патогенность ВГА за счет повышения активности полимеразы и индуцирования апоптоза, нарушает иммунный ответ хозяина [56, 291]. | PB1 (2) |
| PB1-N40 | Укороченная с N-конца форма белка PB1, принимает участие в репликации ВГА [247]. | PB1 (2) |
| PA | Субъединица вирусной полимеразы с эндонуклеазной активностью: отрезает кэп-структуру от РНК клетки-хозяина [206, 257]. | PA (3) |
| PA-X | Остановка белкового синтеза и индукция апоптоза в клетке-хозяине, регуляция репликации ВГА, модулирование врожденного и приобретенного иммунных ответов хозяина [121, 134]. | PA (3) |
| PA-N155 | Поддерживает эффективную репликацию ВГА [264]. | PA (3) |
| PA-N182 | Поддерживает эффективную репликацию ВГА [264]. | PA (3) |
| HA | Играет ключевую роль в связывании вируса с клеткой, слиянии вирусной и эндосомальной мембран, и проникновении вируса внутрь клетки. Основная антигенная детерминанта и детерминанта патогенности [135]. | HA (4) |
| NP | Инициация транскрипции и репликации в отсутствии 5' кэпа, поддержание стабильности и структуры RNP, регуляция ядерного импорта [60, 191]. | NP (5) |
| NA | Расщепляя терминальные сиаловые кислоты гликоконъюгатов на поверхности клеточной мембраны, обеспечивает отпочкование вирусного потомства из клетки, предотвращает агрегацию вируса, способствует его проникновению через слизистый слой [176, 287]. | NA (6) |
| M1 | Формирует внутреннюю белковую оболочку вириона. Принимает участие в высвобождении РНП в цитоплазму и ядерном экспорте РНП, играет роль в сборке вирионов ВГА [4, 150]. | M (7) |
| M2 | Регулирует pH внутри вириона, участвует в высвобождении РНП в цитоплазму, в сборке и в отшнуровывании вирусных частиц с поверхности клетки [50, 217]. | M (7) |

| Белок | Функция | Ген (№ сегмента) |
|------------------|--|------------------|
| M42 | Результат альтернативного сплайсинга мРНК белка M2, локализуется в аппарате Гольджи и имеет антигенно отличный от M2 эктодомен. Может функционально заменять M2 [256, 278]. | M (7) |
| NS1 | Участвует в регуляции механизмов репликации вируса (ядерный экспорт мРНК), врожденного/адаптивного иммунных ответов хозяина и клеточных сигнальных путей [1, 109]. | NS (8) |
| NEP (NS2) | Регуляция транскрипции и репликации вирусной РНК, опосредует экспорт вновь синтезированных вирусных РНП из ядра в цитоплазму, принимает участие в отпочковывании вирионов [202]. | NS (8) |
| NS3 | Предположительно NS3 может быть вовлечен в межвидовую передачу и адаптацию ВГА [230]. | NS (8) |

1.2.2 Жизненный цикл ВГА

Проникновение ВГА в клетку происходит посредством клатрин/кавеолин-зависимого или -независимого эндоцитоза (в случае нитевидных вирионов – микропиноцитозом) после связывания NA1 субъединицы гемагглютинина с сиаловыми кислотами (СК) гликопротеинов на поверхности клетки (Рисунок 4) [240]. Снижение pH в поздних эндосомах до 4.4 – 5.0 вызывает существенные конформационные изменения белка НА, что приводит в последствии к слиянию мембраны ВГА с эндосомальной мембраной, высвобождению РНП в цитоплазму клетки и их транспортировке в ядро. Ранее было обнаружено, что РНП достигают ядра клетки примерно в течение одного часа после инфицирования ВГА [78].

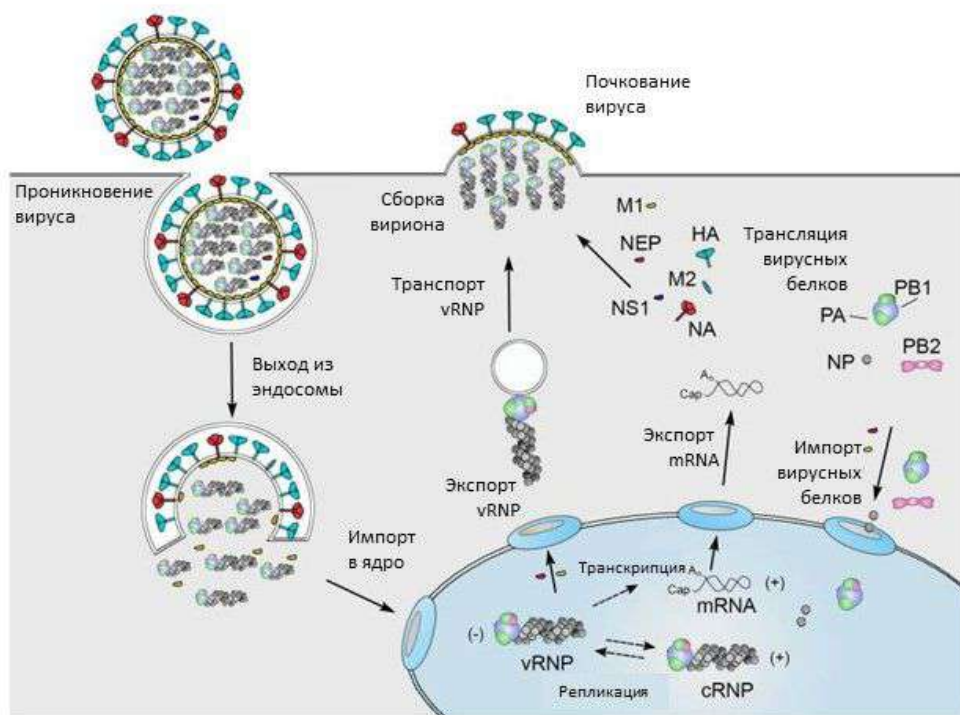


Рисунок 4 – Схематическое изображение жизненного цикла ВГА. По [257], с изменениями.

В ядре клетки-хозяина транскрибируются вирусные мРНК, позже транслируемые в вирусные белки в цитоплазме клетки-хозяина, а также комплиментарные РНК положительной полярности (кРНК) – матрицы для синтеза вирусных РНК [85]. Трансляция мРНК, кодирующих полимеразный комплекс (PB2, PB1 и PA) и NP, NS1, NEP и M1 происходит на свободных рибосомах в цитозоле клетки. Мембранные гликопротеины HA, NA и белок ионных каналов M2 транслируются на рибосомах, ассоциированных с эндоплазматическим ретикулумом, и экспрессируются на поверхности цитоплазматической мембраны [79]. Далее вновь синтезированные вирусные белки PB2, PB1, PA и NP импортируются обратно в ядро клетки, где NP, полимеразы и кРНК вместе образуют активный комплекс комплиментарных РНК (кРНК), который служит матрицей для репликации вирусного генома (РНК).

Белки NEP и M1 играют важную роль в экспорте РНК из ядра в цитоплазму клетки. Недавние исследования продемонстрировали, что РНК транспортируются

через клеточную цитоплазму посредством сети микротрубочек [181]. Взаимодействие белка М1 и цитоплазматического хвоста М2 имеет решающее значение для сборки частиц вириона в месте его отпочкования на плазматической мембране, в то время как экспрессия гликопротеинов НА и NA индуцирует отпочкование вирусного потомства [54]. Далее NA гидролизует гликозидные связи между остатками СК и молекулами сахара, способствуя высвобождению вирионов ВГА во время почкования.

1.3 Характеристика поверхностного гликопротеина ВГА – гемагглютиниона – и гуморальный иммунный ответ к нему

Четыре основных структурных белка вируса гриппа – М1, НА, NP и NA – представлены в составе вириона в молярном соотношении $\sim 100, 26, 22$ и 3 , соответственно [126]. Внутренние белки, несмотря на их относительно большое количество в вирионе, низкоиммуногенны (белок NP) или антительный ответ к ним не детектируется (М1) [23]. При иммунизации наивного организма НА и NA в равном молярном соотношении они демонстрируют сравнимую иммуногенность, однако, по причине большей представленности НА на поверхности вирусной частицы именно белок НА является иммунодоминантным антигеном ВГА [137].

Поверхностный гликопротеин гемагглютинин является интегральным мембранным белком I типа и белком слияния класса I [233]. НА транслируется как неактивный (нерасщепленный) белок-предшественник НА0 и в эндоплазматическом ретикулуме собирается в гомотример и подвергается N-гликозилированию [55]. После транспортировки НА0 на цитоплазматическую мембрану, внеклеточные протеазы (фурин или фурино-подобные протеолитические ферменты) организма-хозяина расщепляют прекурсор НА0 на две субъединицы – НА1 и НА2, связанные дисульфидным мостиком (Рисунок 5А) [133]. Комплекс НА1/НА2, в отличие от неактивного предшественника НА0, способен к рН-зависимому изменению конформации и осуществлению слияния мембран [237].

Важно отметить, что НА вирусов птичьего гриппа и гриппа человека обладают разной специфичностью к СК, в зависимости от того, в каком положении находится углерод галактозы (C3 или C6), с которым связан C2 атом СК (α -2,3 или α -2,6 изомер) [296]. Вирусы птичьего гриппа предпочтительно связывают α -2,3 СК, а вирусы гриппа человека – α -2,6-связанные СК. Несмотря на то, что в организме птиц и людей обнаруживают оба типа СК, их распределение и количество в тканях отличается. Изомер α -2,3 преобладает в кишечнике птиц, где происходит репликация вируса птичьего гриппа в организме зараженной птицы, в то время как в верхних дыхательных путях человека – месте первичной репликации вируса гриппа у людей – наиболее распространены α -2,6 изомеры СК [12, 147]. В связи с распространением в респираторном тракте птиц как α -2,3-, так и α -2,6-связанных СК, считается, что у некоторых видов птиц может происходить рекомбинация между ВГА человека и вирусами птичьего гриппа [64]. Такая рецепторная специфичность является одной из наиболее важных детерминант, влияющих на тропизм вируса гриппа, включая межвидовую адаптацию и трансмиссивность [222].

Стеблевой домен НА состоит из N- и C-терминальных участков НА1, которые формируют домен слияния (F1), и эктодоменного фрагмента НА2 (Рисунок 5). При достижении значения рН в эндосоме критической точки, которая варьирует в зависимости от штамма ВГА, конформация НА претерпевает необратимые изменения, в результате чего обнажается домен F1, опосредующий слияние вирусной и клеточной мембран [5, 10]. Глобулярный домен диссоциирует от «стебля», после чего стволовый домен из сложенной петли преобразуется в вытянутую спираль, высвобождается пептид слияния и заякоривается в мембране эндосомы – формируется структура шпильки (Рисунок 6) [39]. Слияние мембран происходит по пружинному механизму и формируется пора, сквозь которую комплексы РНП высвобождаются в цитозоль клетки.

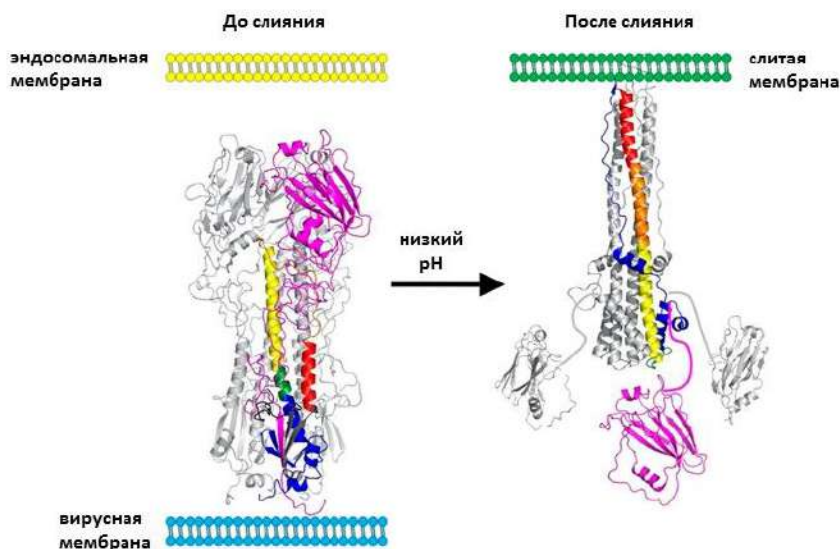


Рисунок 6 – Структура НА в конформации до и после слияния вирусной и эндосомальной мембран. По [221], с изменениями.

Подавляющее большинство антител к НА, формирующиеся в ответ на инфекцию или вакцинацию, узнают глобулярный домен субъединицы НА1, в котором выделяют пять основных антигенных сайтов, обозначаемых Sa, Sb, Ca1, Ca2 и Сb для подтипа Н1; и А, В, С, D и Е для подтипа Н3 (Рисунок 7) [7, 277, 283]. Также, Каверин Н. В. и соавторы из Института вирусологии им. Д. И. Ивановского провели антигенное картирование молекулы НА подтипов Н5 и Н9 [142, 143, 220], а Цуття Э. с коллегами описали сайты связывания антител в НА вируса Н2N2 [253].

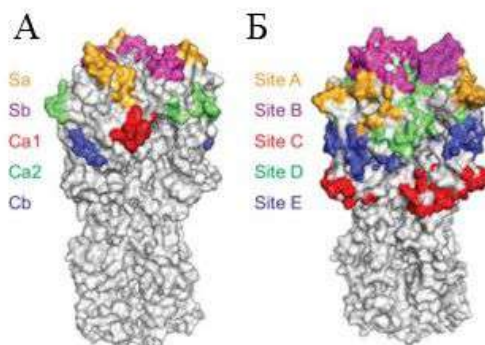


Рисунок 7 – Структура антигенных сайтов глобулярного домена молекулы НА (А) подтипа Н1 (А/California/04/2009) и (Б) подтипа Н3 (А/Aichi/2/1968). По [268], с изменениями.

Аминокислотные остатки трех антигенных сайтов связывания гемагглютинина НЗ – А, В, и D – перекрываются с RBD, при этом сайты А и В располагаются непосредственно вокруг RBS [209]. У подтипа Н1 RBS окружают сайты Sb, Ca2 и Sa; из них только Sb и Sa находятся на дистальном конце мономера НА, тогда как сайт Ca2 занимает боковое положение [24]. Механизм нейтрализующего действия антител, узнающих антигенные сайты глобулы НА основан на предотвращении связывания НА с СК на поверхности клетки-хозяина путем окклюзии RBS: подобные антитела связываются с своим эпитопом в такой ориентации, при которой Fc-фрагмент препятствует взаимодействию НА с рецептором [146, 275]. Стоит отметить, что иммуноглобулины, специфичные к удаленным от рецептор-связывающего домена антигенным сайтам менее эффективно нейтрализуют ВГА, в сравнении с антителами, узнающими эпитопы рядом с участком связывания СК [48]. В подавляющем большинстве антитела к основным сайтам глобулярного домена оказываются штамм-специфичны, так как именно в этих сайтах происходят аминокислотные замены в результате антигенного дрифта, приводящие к изменению антигенных свойств НА [14, 129].

Несмотря на высокую изменчивость глобулярного домена, в его структуре присутствуют и достаточно консервативные участки, антитела к которым способны связывать и нейтрализовать различные подтипы ВГА [136]. Эпитопы антител широкого спектра в глобуле НА в основном локализованы в области RBS, рудиментарного эстеразного домена и «интерфейса» – части поверхности глобулы, где мономеры соприкасаются друг с другом, формируя тример. Антитела к RBS, как было указано ранее, блокируют проникновение вируса в клетку, препятствуя взаимодействию НА с клеточными рецепторами. Помимо этого, возможно ингибирование конформационных изменений НА, посредством перекрестного связывания соседних субъединиц в тримере НА [33]. Антитела, связывающие VE домен, взаимодействуют с НА только в рамках одного подтипа; механизм их противовирусного действия основан на ингибировании связывания вируса с СК или слияния вирусной и эндосомальной мембран, а также на препятствии выходу вирусного потомства из зараженной клетки [31, 127, 136]. Поверхность

«интерфейса» может обнажаться для взаимодействия с антителами в ходе изменения конформации НА при снижении рН или связывании с рецептором [70]. Антитела, специфичные этому региону НА, как правило, связывают различные подтипы НА обеих филогенетических групп; такие антитела разрушают тримерную структуру молекулы НА и нарушают репликацию вируса [30, 32, 269]. Было показано, что для антител к VE домену и «интерфейсу» в экспериментах *in vivo* важную функцию в защите животных от летальной инфекции выполняют Fc-эффекторные функции: антитело-зависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) или комплемент-зависимая цитотоксичность (КЗЦ) [30, 32, 269].

В последние годы были изолированы антитела, специфичные к более консервативному СД НА, однако инфицирование или традиционные вакцины не способны индуцировать формирование такого класса антител в высоких титрах, поскольку СД НА экранируется иммунодоминантным глобулярным доменом [21, 26, 171, 187, 224]. В экспериментах на животных показана возможность выработки антител к «стеблю» в ответ на иммунизацию стабилизированным тримером СД НА, либо последовательной вакцинацией химерными гемагглютинидами, несущими глобулярные домены различных подтипов НА и имеющими одинаковый стволовый домен [41, 93, 130]. Благодаря высокой консервативности «стебля», антитела к этому домену обладают более широким спектром нейтрализации, по сравнению с антителами к «глобуле». Эпитопы таких антител в основном сосредоточены в области гидрофобной бороздки и пептида слияния. Протективная активность антител к СД НА обусловлена ингибированием расщепления НА0 клеточными протеазами или предотвращением слияния вирусной и клеточной мембран [61, 87, 95, 96, 139, 199, 239, 245, 265, 281]. Кроме того, некоторые антитела ингибируют высвобождение вирусных частиц из инфицированных клеток [113, 245, 285]. Также, на примере молекулы CR8020, было показано, что антитела могут изменять морфологию вирусного потомства [113]. Решающую роль в защите *in vivo* для антител к СД НА играет активация Fc-опосредованных эффекторных функций [17, 61, 77, 96, 139, 243]. Среди антител, эпитопы которых расположены в области гидрофобной бороздки, некоторые проявляют активность в отношении

всех подтипов НА от H1 до H18 [136]. Наиболее широким спектром реактивности обладает антитело CR9114, способное связывать гемагглютинины 14 подтипов ВГА и обеих линий ВГБ (Викторианской и Ямагатской) [80]. Специфичные к пептиду слияния антитела кросс-реактивны только в отношении НА филогенетической группы 2 [87, 95, 245]. Эти антитела ингибируют репликацию вируса, блокируя слияние мембран, протеазное расщепление НА0, или выход вирусных частиц на поздней стадии инфекции.

Пространственная близость молекул НА и NA на поверхности вириона предоставляет возможность антителам, специфичным к НА, влиять на функционирование NA [59, 151, 200]. При этом, вероятность противоположного эффекта минимальна по причине преобладания НА в молярном соотношении на вирусной мембране [94]. Различные исследования показывают связь между расположением участков связывания анти-НА антител и их ингибирующей NA активностью. Например, антитела, связывающие латерально расположенные эпитопы глобулы НА (Ca, Cb), более эффективно блокируют нейраминидазную активность в отношении ее субстрата фетуина, нежели антитела, специфичные к антигенным сайтам Sa и Sb, окружающим рецептор-связывающий карман глобулярного домена [152]. В тоже время, антитела к СД НА способны ингибировать ферментативную активность NA как относительно фетуина, так и СК [59, 151]. Такой механизм пространственного влияния анти-НА антител на функцию NA объясняет, каким образом антитела к стволу НА предотвращают высвобождение вирусных частиц из инфицированных клеток [285]. Необходимо подчеркнуть, что эффективность ингибирования NA антителами к СД НА обратно пропорциональна высоте «головы» NA [151].

1.4 Современная этиотропная терапия гриппа

Несмотря на то, что основным и наиболее распространенным способом противостояния гриппозной инфекции является вакцинация, противовирусные препараты были и остаются важными инструментами в борьбе с гриппом. Эффективность вакцинации варьируется в зависимости от эпидемического сезона,

исследуемой популяции и вакцинного штамма. На снижение профилактического действия вакцин могут оказывать влияние такие факторы, как несовпадение циркулирующего и вакцинного штаммов, предсуществующий иммунитет к гриппу, возраст, пол, вес и иммунный статус вакцинируемого человека [82, 276]. Противовирусные средства обеспечивают дополнительную защиту при недостаточной эффективности вакцинации.

На сегодняшний день, в клинических рекомендациях Минздрава России присутствуют три препарата, направленных на возбудителя гриппозной инфекции: ингибиторы НА осельтамивир и занамивир, а также ингибитор НА умифеновир. Осельтамивир и занамивир рекомендованы для лечения легких, среднетяжелых неосложненных, тяжелых и осложненных форм гриппа. Ингибиторы НА специфически связываются с каталитическим сайтом НА, его блокировка приводит к формированию вирусных агрегатов и невозможности отпочкования вирусного потомства от инфицированной клетки [197]. Умифеновир показан для терапии легких и среднетяжелых неосложненных форм. Механизм действия умифеновира заключается в предотвращении конформационных изменений НА, таким образом блокируя слияние мембран вируса и эндосомы клетки-хозяина [138]. Важно подчеркнуть, что применение всех противовирусных средств эффективно при раннем начале приема, в течение 48 часов от появления первых симптомов.

Помимо вышеуказанных препаратов, на российском фармацевтическом рынке представлены и другие группы противогриппозных средств: ингибитор М2 белка (римантадин) и ингибитор РА субъединицы вирусной полимеразы (балоксавир марбоксил). Ингибиторы ионного канала М2 использовались с 1960-х годов и на данный момент не рекомендованы в качестве терапии гриппа по причине тотальной устойчивости циркулирующих штаммов вируса к их действию [47, 74]. Лекарственное средство балоксавир марбоксил было зарегистрировано в 2020 году в Российской Федерации для лечения гриппа у людей старше 12 лет. В основе механизма действия данного препарата лежит подавление кэп-зависимой эндонуклеазной активности РА субъединицы полимеразного комплекса вируса гриппа, в результате чего блокируется репликация вирусного генома [84]. Также в

России доступен препарат энисамия йодит, производное изоникотиновой кислоты, который ингибирует вирусную РНК-полимеразу [42].

Вместе с тем вирусы гриппа не перестают изменяться, появляются устойчивые к лекарственным средствам штаммы, которые снижают эффективность противовирусных препаратов. Как было сказано выше, ингибиторы М2 белка больше не рекомендуются для лечения гриппа, в связи с широким распространением мутаций в М2 в 2000-х годах, приведших к устойчивости ВГА к адамантанам. Кроме того, были выделены штаммы и определены мутации, отвечающие за резистентность вирусов гриппа к ингибиторам NA [104, 148]. Уже в ходе III фазы клинических исследований (КИ) балоксавира, в 9,7% изолятов от пациентов, получавших данный препарат, были обнаружены мутации в активном сайте PA [111, 254]. По результатам последнего глобального анализа, проведенного ВОЗ за период 2019-2020 гг., количество образцов вирусов гриппа, устойчивых или со сниженной чувствительностью к ингибиторам NA и балоксавиру составило 0,6% и 0,1%, соответственно [102].

Исследователи по всему миру ведут непрерывную работу по поиску новых противогриппозных препаратов. Совершенствуются старые средства, такие как адамантаны, для получения соединений, активных против устойчивых штаммов [183, 184]. Помимо низкомолекулярных веществ, ведутся разработки и других актуальных соединений для лечения гриппа, например, пептидов и малых интерферирующих РНК.

Важно отметить пассивную иммунизацию в качестве средства терапии и профилактики инфекционных заболеваний. Плазма реконвалесцентов, гипериммунная сыворотка, моноклональные антитела (мАт) применяются в лечении инфекционных заболеваний на протяжении долгого времени. Еще в период пандемии «испанки» 1918 года трансфузия сыворотки переболевших людей больным гриппом позволяла снижать риск летального исхода [168]. Введение внутривенных гипериммунных (специфических) иммуноглобулинов (ВВИГ), фракционированных из плазмы переболевших пандемическим вирусом A(H1N1)pdm09 в 2009 г., пациентам с тяжелой формой гриппа A(H1N1)pdm09

снижало смертность и вирусную нагрузку [125]. Однако, в ходе других КИ, эффективность ВВИГ у госпитализированных пациентов с тяжелым течением гриппа не подтвердилась [36, 71].

Существенный технологический прогресс последних десятилетий облегчил получение рекомбинантных мАт. Исследования репертуара В-клеток переболевших и вакцинированных людей позволили изолировать мАт широкого спектра против различных белков вируса гриппа [188, 235, 242]. Данные антитела решают проблему лекарственной устойчивости штаммов, так как они направлены на высококонсервативные эпитопы вирусных белков. Более того, благодаря усовершенствованию методов биотехнологического производства, в последние годы снижается стоимость мАт [166]. Достижения в области генетической иммунизации и векторной доставки антител в перспективе также могут снизить затраты на производство мАт [266, 286].

В ходе исследований зарубежных авторов были получены мАт к глобуле НА, которые реагируют одновременно с несколькими подтипами ВГА (S139/1, C05, K03.28 и F045-092) или с обоими линиями ВГВ (CR8033 и C12G6) [80, 88, 159, 160, 232]. Более широким спектром активности характеризуются антитела против стеблевого домена НА: к ВГА филогенетической группы 1 (CR8020, C179, F10, CR6261, 3.1, 3E1 и S9-3-3), группы 2 (9H10) или обеих групп (31.a.83, 56.a.09, FI6v3, MEDI8852 и CR9114) [61, 62, 242]. Помимо антител к НА, исследователи занимаются разработкой мАт и к другим вирусным мишеням, таким как поверхностный гликопротеин НА, эктодомен белка М2 и консервативный внутренний белок NP.

В Таблице 2 суммирована информация о человеческих мАт против вирусов гриппа А, находящихся на этапе КИ. В настоящий момент для всех указанных в таблице мАт завершена II фаза КИ.

Таблица 2 – Человеческие мАт против ВГА в КИ

| Антитело | Субкласс IgG | Мишень | Механизм | Активность | Источник |
|--|-----------------|-----------------|---|---------------------|------------|
| CR8020 | IgG1 | СД НА | Блокирует конформационные изменения НА и слияние мембран | Группа 2 ВГА | [87] |
| CR6261 | IgG1 | СД НА | Блокирует конформационные изменения НА и слияние мембран | Группа 1 ВГА | [86, 249] |
| TCN-032 | IgG1 | Эктодомен M2 | Нет данных | Группа 1 и 2 ВГА | [103, 211] |
| VIS410 | IgG1 | СД НА | Блокирует конформационные изменения НА и слияние мембран | Группа 1 и 2 ВГА | [114, 177] |
| MEDI8852 | IgG1 | СД НА | Блокирует расщепление трипсином НА и слияние мембран | Группа 1 и 2 ВГА | [22, 139] |
| MHAA4549A | IgG1 | СД НА | Блокирует конформационные изменения НА и слияние мембран | Группа 1 и 2 ВГА | [35, 188] |
| СТ-P27 (комбинация СТ-P22 и СТ- P23) | IgG1 | СД НА | Блокирует конформационные изменения НА и слияние мембран | Группа 1 и 2 ВГА | [37, 281] |

1.5 Однодоменные антитела

Начиная с 1975 года мАт успешно применяются для диагностики и лечения различных заболеваний. Более 30 лет прошло с момента регистрации в США первого лекарственного средства на основе мАт, и с каждым годом доля подобных препаратов стремительно растет [165]. К настоящему времени в мире одобрено более ста препаратов мАт для терапии раковых, аутоиммунных, воспалительных и инфекционных заболеваний [141]. Гибридные, гуманизированные или полностью человеческие антитела, наряду с меньшими по размеру антигенспецифичными фрагментами, демонстрируют широкие перспективы использования в медицине.

Благодаря успехам генной инженерии и появлению таких технологий, как фаговый дисплей, стало возможным получение производных антител: одноцепочечных вариабельных фрагментов (scFv – single-chain variable fragment) и однодоменных антител (sdAb – single-domain antibody) [27, 52]. ScFv представляют собой два вариабельных домена классического антитела (VL и VH), соединенные глицин-сериновым линкером. Несмотря на определенные преимущества перед каноническими мАт, scFv имеют существенные недостатки, например, низкую термостабильность и склонность к агрегации [34]. В свою очередь, открытые в 1993 году однодоменные антитела благодаря своей уникальной структуре лишены подобных недостатков [185].

1.5.1 Молекулярные и биохимические особенности однодоменных антител в сравнении с классическими антителами

Однодоменные антитела были впервые выделены из сыворотки крови представителей семейства Верблюдовых и представляют собой вариабельный домен тяжелоцепочечных антител (HcAb – heavy-chain antibody) [106]. У иммуноглобулинов HcAb отсутствуют легкие цепи и константный домен тяжелой цепи CH1 (Рисунок 8А). На N-конце HcAb расположен вариабельный домен (VHH), структурно и функционально эквивалентный Fab-фрагменту классических

IgG. Стоит отметить, что подобные HcAb иммуноглобулины, лишенные легких цепей и CH1 домена, обнаруживаются у некоторых хрящевых рыб [173].

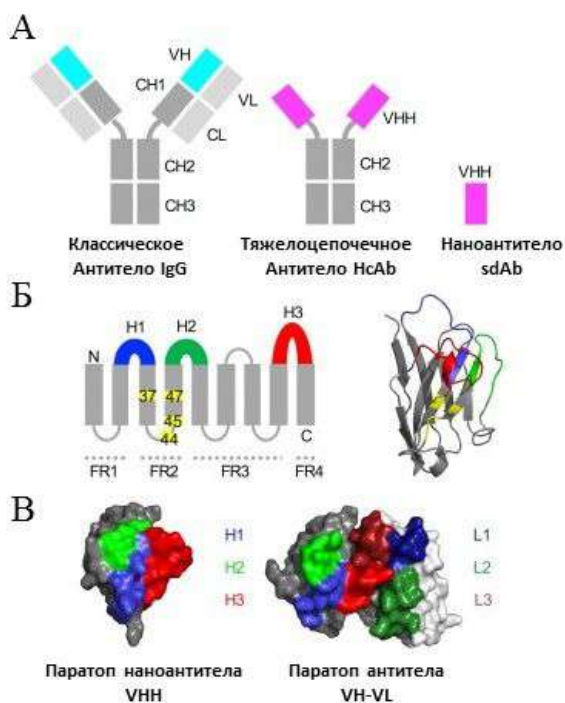


Рисунок 8 — Схематичное изображение структуры классического и тяжелоцепочечного антител: общее строение антител (А); вторичная и третичная структуры VHH (Б); строение паратопа антител (В).

Размер sdAb, состоящих из примерно 120 а.о., не превышает 2,5 нм в диаметре и 4 нм в длину. Молекулярная масса однодоменных антител в среднем составляет 12-15 кДа, что в разы меньше классических мАт (~150 кДа), Fab-фрагментов (~55 кДа) и scFv (~30 кДа).

В структуре VHH выделяют три гипервариабельные области и четыре консервативные каркасные области (FR — framework regions) (Рисунок 8Б). Петли гипервариабельных областей (H1, H2, H3), соответствующие поверхности эпитопа, носят название участков, определяющих комплементарность (CDR — complementarity-determining regions; CDR1-CDR3) (Рисунок 8Б). В отличие от классических мАт, у которых паратоп сформирован шестью CDR (L1-L3 в VL и H1-H3 в VH), VHH необходимо всего три CDR для связывания антигена (Рисунок

8В). При этом VHH по своей аффинности не уступают, а иногда и превосходят традиционные антитела [186, 262]. С целью компенсировать отсутствие легкой цепи и сохранить достаточную площадь антигенсвязывающей поверхности, VHH имеют удлиненную петлю CDR3 участка и задействуют для формирования паратопа в среднем 50 а.о., тогда как паратоп VH состоит из ~35 а.о., а паратоп VL – из 22 а.о. [179]. Также, CDR3 VHH более разнообразен как по аминокислотному составу, так и по структуре, в сравнении с CDR3 VH. Кристаллографический анализ VHH в комплексе с антигеном показал, что благодаря такой особенности, формирующей уникальную выпуклую архитектуру паратопа, VHH способны распознавать скрытые, труднодоступные для классических мАт эпитопы [100]. Однако, увеличенная длина петли способствует и увеличению ее гибкости, что энтропически не выгодно; для решения данной проблемы в VHH существуют дополнительные дисульфидные связи, стабилизирующие антигенсвязывающие петли [101]. Было показано, что петли CDR1 и CDR2 демонстрируют большее структурное разнообразие при идентичном аминокислотном составе, нежели аналогичные структуры классических мАт [179].

Сравнение аминокислотных последовательностей VHH тяжелоцепочечных антител и VH классических иммуноглобулинов показало их высокую гомологичность, однако в структуре областей FR2 и CDR были найдены существенные отличия. Как было отмечено выше, петля CDR3 VHH в сравнении с VH более длинная, а CDR1 и CDR3 содержат остатки цистеина. FR2 традиционных антител содержит большое количество гидрофобных аминокислот, необходимых для взаимодействия VH и VL. В свою очередь, в FR2 области VHH эти а.о. заменены на меньшие по размеру и/или гидрофильные, что улучшает растворимость VHH в водных растворах и снижает их агрегационную активность [185]. Помимо хорошей растворимости, VHH обладают и другими отличительными биохимическими свойствами, такими как высокая термостабильность, устойчивость к действию денатурирующих агентов, протеаз и экстремальных значений pH [3, 203]. Более того, благодаря высокой степени гомологии с аминокислотным составом человеческого VH фрагмента, VHH

низкоиммуногенны [215]. Дополнительными факторами, в совокупности обеспечивающими низкую иммуногенность VHH, являются их небольшой размер, высокая стабильность и быстрый клиренс из кровотока [185].

1.5.2 Оптимизация структуры однодоменных антител для применения в терапии инфекционных заболеваний

Несмотря на то, что механизм действия и спектр реактивности антитела определяются эпитопом и силой взаимодействия с антигеном, не маловажным аспектом функциональности является и формат антитела. Однодоменные антитела благодаря своей простой структуре могут быть легко переформатированы в различные конструкции с целью повышения эффективности или придания дополнительных функций: повышения авидности, добавления эффекторных функций, увеличения широты связывающей способности, снижения вероятности возникновения эскейп-мутантов или улучшения фармакокинетических параметров (Рисунок 9).

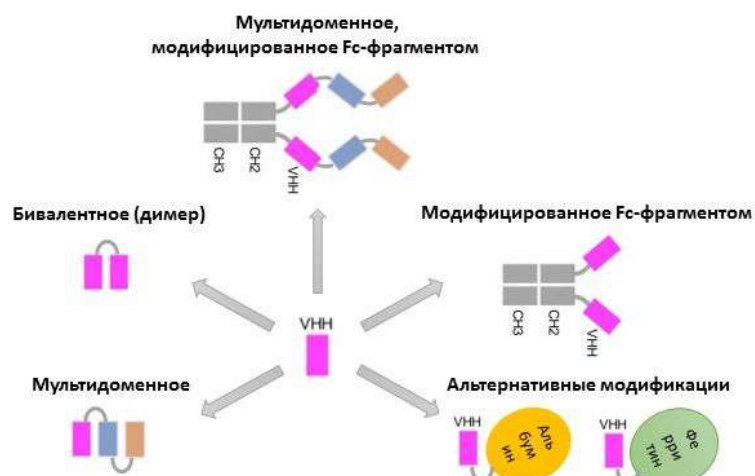


Рисунок 9 – Схематичное изображение основных вариантов модификации однодоменных антител.

Увеличение валентности

В некоторых случаях sdAb сами по себе обладают высокой связывающей и нейтрализующей активностью, однако их эффективность можно значительно

повысить за счет мультимеризации. Увеличение авидности не только приводит к повышению аффинности и нейтрализующей способности VHH, но дополнительно может расширить спектр узнаваемых штаммов патогена и снизить вероятность появления эскейп-мутантов. Мультивалентные конструкции на основе VHH можно разделить на три типа: 1) моноспецифические, в которых две или более молекул одного и того же sdAb соединены линкером; 2) би- или мультиспецифичные (мультидоменные), где объединены два или более различных sdAb, распознающие отличающиеся эпитопы в пределах одного или нескольких антигенов; 3) VHH могут быть слиты с другим белком или молекулой небелковой природы, определяющими ди- или мультимеризацию.

Многочисленные исследования подтверждают связь авидности и аффинности VHH [92, 97, 108, 123, 124, 158, 170, 174]. Более того, Паломо К. с соавт. на примере респираторно-синцитиального вируса (РСВ) показали, что РСВ значительно сложнее избежать нейтрализации тримером VHH, чем мономерной формы [198]. Помимо повышения активности *in vitro*, влияние авидности на эффективность sdAb было продемонстрировано и в экспериментах *in vivo*. Бивалентные VHH, специфичные к ВГА H5N1, РСВ или вирусу бешенства, показали более выраженную противовирусную активность *in vivo* в сравнении с их мономерами [128, 226, 248].

Другой модификацией, способной расширить спектр узнаваемых патогенов и предотвратить быстрое возникновение эскейп-мутантов, является слияние двух или более VHH, нацеленных на неперекрывающиеся эпитопы [98]. Также, как и в случае с мультивалентными конструкциями соединение нескольких sdAb в одну молекулу, как правило, осуществляется с помощью гибкого глицин-серинового линкера (G4S) различной длины. Примечательно, что длина G4S влияет на активность как моно-, так и би/мультиспецифических sdAb против ВГА [124, 158]. Вероятно, степень данного влияния во многом зависит от структурных особенностей антигена и конкретного эпитопа на его поверхности, поскольку для РСВ-специфичных антител не было обнаружено воздействия длины G4S на нейтрализующую активность [124]. Дополнительно на потенциал

биспецифической молекулы sdAb может оказывать влияние расположение VHH друг относительно друга [38, 174].

Также, увеличить аффинность и нейтрализующую способность sdAb позволяет слияние молекулы VHH с другими белками или их фрагментами, имеющими тенденцию к формированию олигомеров [91, 250]. Другим привлекательным способом для создания би- и мультивалентных, а также мультиспецифических sdAb является слияние VHH с Fc-фрагментом классического антитела – IgG, IgA или IgM [158, 162, 164, 219]. Такая конструкция обладает всеми вышеперечисленными преимуществами, такими как увеличение аффинности и расширение спектра нейтрализующей активности за счет авидности, увеличение времени полувыведения. Однако главное преимущество и отличительная особенность химеры VHH-Fc – способность задействовать эффекторные функции, опосредованные взаимодействием Fc-фрагмента и Fc-рецепторов.

Добавление эффекторных функций

Неоднократно было показано, что Fc-опосредованные функции иммуноглобулинов, наряду с прямой вируснейтрализацией, являются важным механизмом элиминации инфекций, вызываемых вирусами гриппа, РСВ, вирусом лихорадки Западного Нила, вирусом Эбола, Дэнге или ВИЧ [80, 99, 116, 225, 279]. Fc-фрагмент антитела, связанного с инфицированной клеткой, способен привлекать эффекторные иммунные клетки, несущие на своей поверхности Fc-рецепторы (такие как макрофаги и естественные киллеры), и активировать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ), комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ) и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (АЗКФ) [255]. Домен VHH лишен Fc-фрагмента и, соответственно, эффекторных функций, однако sdAb могут быть легко слиты с Fc при помощи молекулярно-генетических методов.

Существует ряд работ, касающихся изучения влияния добавления Fc-фрагмента на функциональность противовирусных VHH *in vitro* и *in vivo*. Как было обозначено выше, слияние с Fc увеличивает время циркуляции sdAb в организме и

улучшает связывающую и нейтрализующую способность VHH за счет авидности. В том случае, когда антитело не обладает нейтрализующей активностью, либо не способно непосредственно блокировать взаимодействие вируса и его рецептора, роль Fc-зависимых функций выходит на первый план в защите от инфекции [261, 297]. Это было продемонстрировано на примере sdAb против NA ВГА, которое в слитом с Fc формате, несмотря на отсутствие противовирусного действия *in vitro*, защищало животных от летальной инфекции ВГА [51]. В работе Лаурсена и соавт., посвящённой мультивалентному VHH-Fc MD3606 против вирусов гриппа А и В, исследователи показали, что при внесении в Fc-фрагмент мутаций, нарушающих связывание Fc с FcγR, протективность MD3606 *in vivo* значительно снижается в сравнении с MD3606 с функциональным вариантом Fc [158].

Увеличение времени полувыведения

Молекулярная масса однодоменных антител в среднем составляет 15-20 кДа, из-за чего несвязанные sdAb быстро выводятся из организма через почки посредством клубочковой фильтрации; время полувыведения не превышает 90 минут [117]. Для применения в качестве терапевтического или профилактического препарата против вирусной инфекции, необходимо поддерживать в системном кровообращении достаточно высокие концентрации антител, следовательно, необходимо улучшать фармакокинетические параметры sdAb. Этого можно достичь путем определенных модификаций, большинство из которых были указаны в разделах выше. Другим методом является изменение способа доставки однодоменных антител, в частности, векторная доставка при помощи плазмидных, лентивирусных, аденовирусных или аденоассоциированных вирусных векторов [72].

1.5.3 Однодоменные антитела широкого спектра против вирусов гриппа

Учитывая все изложенные в п. 1.3.1 свойства и преимущества однодоменных антител, особенно способность узнавать сложные конформационные эпитопы и простота их модификации, становится очевидно, почему sdAb стали популярным объектом исследования в качестве потенциальных препаратов для борьбы с

вирусными инфекциями [122, 259, 282, 293]. Не исключением стала и разработка на основе VHH средств для диагностики, профилактики и терапии гриппа [290].

Все три белка оболочки вируса гриппа (НА, NA и М2), а также внутренний структурный белок NP являются потенциальными мишенями для противовирусных терапевтических средств на основе антител. Структурно, на поверхности этих белков присутствует множество эпитопов, представляющих собой щелевидные углубления, что может представлять проблему их доступности для классических мАт, которые предпочтительно узнают более крупные и плоские эпитопы [100, 145, 216]. Однодоменные антитела способны эффективнее распознавать такие «углубления» и труднодоступные эпитопы [100, 293]. Механизмы, лежащие в основе противовирусного действия VHH, как и в случае классических человеческих мАт, тесно связаны с функцией таргетного белка и соответствующим эпитопом [280].

НА, как основной поверхностный белок вириона, привлекает наибольшее внимание исследователей в качестве мишени для sdAb. В течение нескольких десятилетий считалось, что антитела к ВГА связываются только с одним или с узким диапазоном штаммов. Однако, наличие у некоторых людей иммунитета к штаммам ВГА, с которыми они никогда не сталкивались, позволило предположить существование перекрестного иммунитета и, соответственно, эпитопов, его обеспечивающих [89, 90]. В 1993 г. эти предположения подтвердились: ученые из Университета Осаки изолировали первое кросс-нейтрализующее мАт С179 [195]. Данное антитело не обладало активностью в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), из чего авторы сделали вывод, что эпитоп С179 располагается вдали от RBS, вероятнее всего в области высококонсервативного СД НА, что объясняет широту нейтрализации С179 [81]. И только в 2008 г., после сообщений о других антителах, связывающихся с «стеблем», стала очевидна значимость открытия мАт С179 [86, 239, 249]. Высокая степень консервативности а.о. СД НА между различными штаммами ВГА позволяет мАт, имеющим перекрывающийся или близкий к С179 эпитоп, обладать крайне широкой перекрестной реактивностью, включая все подтипы ВГА или даже захватывающие

ВГВ [61, 63, 80]. Наиболее консервативными а.о. «стебля» являются те, которые катализируют его значительные конформационные изменения, спровоцированные снижением рН, включая пептид слияния, который заякоривается в эндосомальную мембрану (Рисунок 11). Функция этих а.о. консервативна у всех вирусов гриппа А и В; было показано, что человеческие мАт, связывающиеся с этой областью, блокируют конформационные изменения, тем самым ингибируя слияние мембран [80, 86, 223, 233, 239]. Были описаны кросс-реактивные sdAb, связывающиеся со стеблевым доменом, механизм нейтрализации которых состоит в ингибировании рН-зависимых конформационных изменений в «стебле» НА. Анализ эпитопной специфичности sdAb, нейтрализующего широкий спектр ВГА группы 1, R1a-B6, и SD83, специфичного к ВГВ, показал, что их эпитопы расположены в области пептида слияния; эпитопы других VHH против ВГА, SD38 и SD36, частично перекрываются с эпитопами кросс-реактивных человеческих мАт (CR9114, CR6261 и FI6v3) и связываются с А-спиралью «стебля» НА [98, 123, 158].

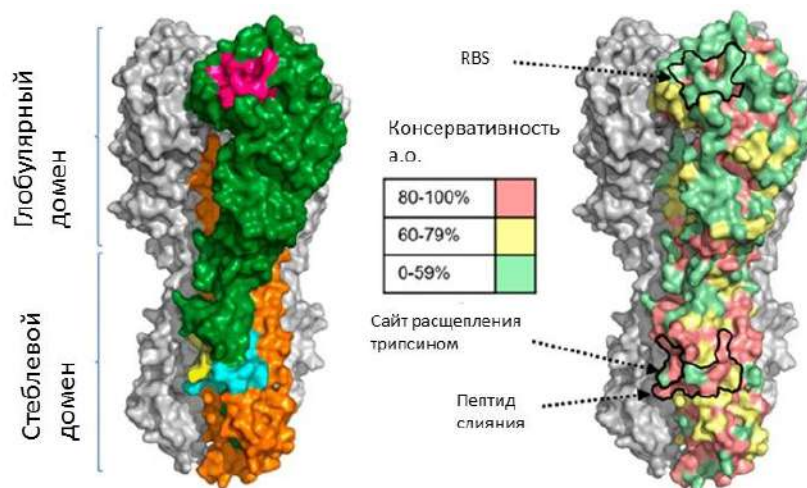


Рисунок 11 – Структура НА и степень консервативности его аминокислот.

Также, сравнительно высокой консервативностью обладают а.о. в области RBS, формирующие рецептор-связывающий карман и непосредственно участвующие во взаимодействии с сиаловыми кислотами (Рисунок 11). Однако, получение кросс-реактивных антител к данному участку представляет собой сложную задачу. Как было описано в разделе 1.2.3, глобулярный домен НА

является основной мишенью иммунной системы, что способствует постоянным изменениям в этой области, особенно на периферии RBS [149, 204, 295]. Зачастую RBS-специфичные антитела в сравнении с HA2-специфичными, имеют более узкий диапазон реактивности в пределах одного подтипа [156]. На сегодняшний день описаны однодоменные антитела, которые связываются с эпитопами в глобулярном домене HA1 субъединицы ВГА подтипов H1, H5, H3, H7 и ВГБ. В основном все они имеют диапазон связывания, ограниченный одним подтипом [98, 123, 128, 210, 250]. Только для одного из них, SD84, показано точное расположение эпитопа в структуре HA: оно связывается непосредственно с RBS и нейтрализует вирус, предотвращая его связывание с клеткой [158].

Нейраминидаза, хоть и менее представлена на поверхности вируса, но играет не менее важную роль в инфекционном процессе: ферментативная активность NA позволяет вирионам отпочковаться с поверхности инфицированной клетки. При ингибировании NA лекарственными средствами или антителами наблюдается накопление вирусного потомства на мембране зараженной клетки-хозяина [279]. Энзиматическая функция NA делает ее привлекательной мишенью для sdAb, так как известно, что VHN эффективно связываются с активными сайтами ферментов [100]. Исследователями были изолированы несколько sdAb, подавляющих активность NA, в том числе одно sdAb, перекрестно связывающееся с 8 подтипами NA, что позволяет предположить нахождение его консервативного эпитопа в области активного сайта NA или вокруг него [51, 110].

Активация проницаемости M2 для протонов приводит к снижению pH внутри вирусной частицы, что индуцирует процесс распаковки генома при подготовке к высвобождению содержимого вириона в цитоплазму [207, 284]. Эктодомен M2, M2e, состоит всего из 23 аминокислот, каждая из которых высококонсервативна [267]. В 2011 г. китайские ученые сообщили о VHN к M2e, M2-7A, которое без привлечения эффекторных функций Fc обеспечивало защиту мышей от летальной гриппозной инфекции. По-видимому, механизм его противовирусного действия заключается в прямой блокировке протонного канала, что предотвращает декапсидацию вируса [270]. Другими исследователями была

получена биспецифическая конструкция из двух sdAb, одно из которых специфично к M2e, а другое – к FcγRVI, таким образом позволяя рекрутировать макрофаги к инфицированным клеткам. Эта молекула также продемонстрировала свою эффективность *in vivo* [115, 260].

Также были идентифицированы sdAb против NP, которые способны нарушать репликацию вируса, ингибируя ядерный импорт vRNP [28, 107, 229].

В п. 1.3.2 обсуждались различные способы модификаций однодоменных антител и их преимущества. В Таблице 3, на конкретных примерах противогриппозных sdAb, рассмотрено влияние модификаций на активность антител *in vitro*.

Таблица 3 – Однодоменные антитела против вирусов гриппа и их модификации

| Мишень | sdAb | Специфичность | Модификации | Изменение активности* | Источник |
|---------------------------|---------|-----------------|--|--|----------|
| НА (глобулярный домен) | Infl-C8 | H5N1 | Би- и тривалентные с G ₄ S | ↓IC ₅₀ >150 раз для штамма A/chicken/Korea/ES/03 H5 | [124] |
| | H5-VNH | H5N1 | Бивалентная с G ₄ S | ↓IC ₅₀ 1000 раз для H5N1 (NIBRG-14) | [128] |
| | SD84 | ВГБ | Гетеробивалентная (SD83-SD84) с G ₄ S | ↓IC ₅₀ 100 раз для штамма B/Florida/04/06 | [158] |
| | NB7-14 | H7N9 | Бивалентная с G ₄ S | ↓IC ₅₀ 130 раз для A/Shanghai/02/2013(H7N9) | [97] |
| СД НА | SD38 | H1, H2, H5 | Гетеробивалентная (SD36-SD38) с G ₄ S | ↓IC ₅₀ >100 раз для A/Hong Kong/1/68(H3N2) | [158] |
| | SD36 | H3, H4, H7, H10 | Гетеробивалентная (SD36-SD38) с G ₄ S | ↓IC ₅₀ >1000 раз для A/California/07/09(H1N1) | [158] |
| | SD83 | ВГБ | Гетеробивалентная (SD83-SD84) с G ₄ S | ↓IC ₅₀ >1000 раз для штамма B/Lee/1940 | [158] |

| Мишень | sdAb | Специфичность | Модификации | Изменение активности* | Источник |
|--------|--------|----------------|--|---|----------|
| | R1a-B6 | H1, H5, H2, H9 | Бивалентная с G ₄ S | ↓IC ₅₀ >100 раз для A/Singapore/1/57(H2N2) | [123] |
| NA | N1-VNH | H5N1 | Бивалентная, линкер – шарнирный участок IgG2c ламы | ↓IC ₅₀ 240 раз для H5N1 NIBRG-14 | [51] |

* – изменение нейтрализующей активности sdAb *in vitro* после модификации в сравнении с моновалентной формой. IC₅₀ – полумаксимальная ингибирующая концентрация. G₄S – глицин-сериновый линкер.

Таким образом, учитывая вышеизложенные данные, получение новых, универсальных препаратов для профилактики и терапии инфекции, вызванной ВГА, является актуальной задачей. Однодоменные антитела ввиду своей уникальной структуры, позволяющей им связываться с труднодоступными эпитопами на поверхности вирусных белков, представляются привлекательным объектом для получения препаратов широкого спектра против ВГА. В контексте разработки терапевтических средств, немаловажное значение отводится модификации однодоменных антител с целью увеличения валентности и времени циркуляции антител в крови, а также придания VNH дополнительных функций.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

Клеточные линии

CHO-S – клетки яичника китайских хомячков (Thermo Scientific, кат. № R80007). MDCK – эпителиальные клетки почки собаки (получены из Российской коллекции клеточных линий позвоночных). Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 – Т-лимфоциты человека, несущие ген люциферазы под контролем NFAT-зависимого промотора и экспрессирующие кластер дифференцировки CD16 (InvivoGen, кат. № jktnl-nfat-cd16). Jurkat-Lucia™ NFAT-CD32 – Т-лимфоциты человека, несущие ген люциферазы под контролем NFAT-зависимого промотора и экспрессирующие кластер дифференцировки CD32 (InvivoGen, кат. № jktnl-nfat-cd32).

Рекомбинантные белки и вирусы

Список использованных в работе белков и вирусов гриппа А представлен в Таблице 4. Все рекомбинантные белки были получены из Sino Biological (Китай), за исключением H3 HA1 Vic (Immune Technology, США). H3 Darwin представляет собой инактивированный стандартный антиген для проведения РТГА и был получен из International Reagent Resource (США).

ВГА и рекомбинантные репликативно-дефектные аденовирусы человека 5 типа, несущие гены HA подтипа H1 или H3 (Ad5-swH1opt/California и Ad5-tet-swH3glic) были любезно предоставлены д.б.н. Шмаровым М.М. (лаб. клеточной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России). Вирус H3N2 Darwin был предоставлен к.б.н. Тимофеевой Т.А. (лаб. физиологии вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского). Вирус H3N2 Moscow был выделен в лаб. иммунобиотехнологии, полногеномное секвенирование проводили под руководством к.б.н. Ворониной О.Л. в лаб. анализа геномов и депонировали в лаб. государственной коллекции вирусов под руководством Должиковой И.В. (номера сегментов в GenBank: PQ632955-PQ632962; инвентарный номер штамма в коллекции: ГКВ№ 3052).

Таблица 4 – Список использованных в работе рекомбинантных НА и вирусов гриппа

| Группа | Аббревиатура | Штамм ВГА | Подтип | Кат. № |
|----------|----------------------------|---|--------|---------------|
| 1 | H1 PR 1934 | A/Puerto Rico/8/1934 | H1N1 | 11684-V08B |
| | H1N1 1977* | A/USSR/90/77 | H1N1 | - |
| | H1 1999 | A/New Caledonia/20/1999 | H1N1 | 11683-V08B1 |
| | H1N1 2007* | A/Brisbane/59/2007 | H1N1 | - |
| | H1 2009, H1N1 2009* | A/California/04/2009 (*A/California/07/2009) | H1N1 | 11085-V08B |
| | H1N1 2018* | A/Duck/mallard/Moscow/4970/2018 | H1N1 | - |
| | H1 2019 | A/Hawaii/70/2019 | H1N1 | 40717-V08B |
| | H1N1 2019* | A/Victoria/2570/2019 | H1N1 | - |
| | H1 Swine | A/Swine/Jiangsu/J004/2018 | H1N1 | 40649-V08B |
| | H2N3* | A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 | H2N3 | - |
| | H5 Hubei | A/Hubei/1/2010 | H5N1 | 40015-V08H |
| | H5N2* | A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84 | H5N2 | - |
| | H6 | A/mallard/Ohio/217/1998 | H6N8 | 40168-V08B |
| | H9 | A/Hong Kong/35820/2009 | H9N2 | 40174-V08B |
| | H9N2* | A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 | H9N2 | - |
| | H2 | A/Canada/720/2005 | H2N2 | 11688-V08B |
| | H5 Vietnam | A/Vietnam/1194/2004 | H5N1 | 11062-V08B |
| | H8 | A/pintail duck/Alberta/114/1979 | H8N4 | 11722-V08H |
| | H12 | A/mallard duck/Alberta/342/1983 | H12N1 | 40029-V08B |
| 2 | H3N2 Aichi* | A/Aichi/2/1968 | H3N2 | - |
| | H3 Aichi | A/Aichi/2/1968 | H3N2 | 11707-V08H |
| | H3 HA1 Vic | A/Victoria/210/2009 | H3N2 | IT-003-00421p |
| | H3 Swiz | A/Switzerland/9715293/2013 | H3N2 | 40497-VNAB |
| | H3 HA1 Swiz | A/Switzerland/9715293/2013 | H3N2 | 40497-V08H1 |
| | H3 Perth | A/Perth/16/2009 | H3N2 | 40043-VNAB |
| | H3 HK | A/Hong Kong/45/2019 | H3N2 | - |
| | H3 Darwin | A/Darwin/9/2021 | H3N2 | FR-1846 |
| | H3N2 Darwin* | A/Darwin/6/2021 | H3N2 | - |

| Группа | Аббревиатура | Штамм ВГА | Подтип | Кат. № |
|--------|---------------------|-----------------------------|--------|-------------|
| 2 | H3N2 Moscow* | A/Moscow/V-01/2023 | H3N2 | - |
| | H4 | A/mallard/Ohio/657/2002 | H4N6 | 11714-V08H1 |
| | H7 Anhui | A/Anhui/1/2013 | H7N9 | 40103-V08H |
| | H7N2* | A/Chicken/NJ/294598-12/2004 | H7N2 | - |

Звездочкой «*» отмечены ВГА.

Для процедуры фагового дисплея использовали бактериофаг-помощник KM13, полученный от Patrick Chames (Cancer Research Center of Marseille, France).

Бактериальные штаммы и плазмидные векторы

Для процедур молекулярного клонирования использовали штамм *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α (New England Biolabs, США).

Для процедур фагового дисплея использовали штамм *E. coli* TG1 (Lucigen, Великобритания).

Для продукции однодоменных антител применяли штамм *E. coli* Rosetta (DE3), предоставленный д.б.н. Белым Ю.Ф. (лаб. молекулярных основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России).

В работе использовали следующие плазмидные векторы:

- рHEN1 – фагмидный вектор, используемый в процедуре фагового дисплея, получен в лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России;

- рFUSE – плазмидный вектор для экспрессии рекомбинантных белков в эукариотической системе экспрессии (InvivoGen, Франция).

Реактивы

В работе использовали специфические эндонуклеазы рестрикции и другие ферменты, а также соответствующие им буферные растворы производства фирм Thermo Scientific (США), New England Biolabs (США), Invitrogen (США), Евроген (Россия).

Для определения молекулярного веса фрагментов ДНК были использованы маркеры молекулярного веса GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (Thermo Scientific,

США), GeneRuler 100 bp+ DNA Ladder (Thermo Scientific, США) и 1 kb DNA Ladder (Евроген, Россия).

Для определения молекулярного веса белков были использованы маркеры молекулярного веса Unstained Precision Plus Protein Standards, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards (Bio-Rad, США).

Выделение плазмидной ДНК проводили с использованием коммерческих наборов: Plasmid Miniprep, Plasmid Midiprep (Евроген, Россия) и QIAGEN® Plasmid Midi Kit (QIAGEN, Германия) согласно протоколам производителей.

Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли набором Cleanup Standart (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя.

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови проводили с помощью раствора Фиколла плотностью 1,077 г/см³ (ПанЭко, Россия).

Выделение тотальной РНК проводили с использованием реагента TRIzol™ (Invitrogen, США).

Постановка реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием набора «SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System» (Invitrogen, США) и ezDNase™ Enzyme (Invitrogen, США).

Полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили с использованием набора ScreenMix-HS (Евроген, Россия) и Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, США).

Синтез праймеров был выполнен в Евроген (Россия). Секвенирование генов проводилось в лаборатории анализа геномов в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России под руководством к.б.н., доцента Ворониной О.Л.

Лизис бактериальных клеток осуществляли ферментативным лизисом, холодовым осмотическим шоком или с помощью реагента BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, США).

Для приготовления буферных и других растворов использовали соли и другие реактивы фирм Invitrogen (Франция), Merck (Германия), Serva (Германия),

Sigma (США), AppliChem (США), Thermo Scientific (США), Hyclone (США), Difco (США), Диа-М (Россия), ПанЭко (Россия) и Реахим (Россия).

При работе с *E. coli* использовали жидкие и агаризованные питательные среды с добавлением селективных антибиотиков: 2хУТ производства Sigma (США) или Диа-М (Россия), SOC (триптон 10 г/л, дрожжевой экстракт 5 г/л, NaCl 0,5 г/л, 20 мМ Mg^{2+} , 20 мМ глюкозы).

Для культивирования клеточных линий использовали следующие питательные среды:

- DMEM – минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко (Hyclone, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота (Hyclone, США), 25 мл бикарбоната натрия (ПанЭко, Россия), 146 мг L-глутамина (ПанЭко, Россия) и смеси пенициллина (25000 МЕ) и стрептомицина (25000 мг) (ПанЭко, Россия);

- DMEM 0% для титрования ВГА – минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко (Hyclone, США) с добавлением 25 мл бикарбоната натрия (ПанЭко, Россия), 146 мг L-глутамина (ПанЭко, Россия) и смеси пенициллина (25000 МЕ) и стрептомицина (25000 мг) (ПанЭко, Россия), а также трипсина, обработанного L-(тозиламидо-2-фенил)этилхлорметилкетонм (трипсин-ТРСК) (Sigma, США);

- 2×DMEM для титрования ВГА – двукратная минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко (Hyclone, США) с добавлением 50 мл бикарбоната натрия (ПанЭко, Россия), 292 мг L-глутамина (ПанЭко, Россия) и смеси пенициллина (50000 МЕ) и стрептомицина (50000 мг) (ПанЭко, Россия), а также трипсина-ТРСК (Sigma, США);

- MegaVir для титрования ВГА и постановки реакции нейтрализации – среда SFM4MegaVir (Hyclone, США) с добавлением 35 мМ бикарбоната натрия (ПанЭко, Россия), смеси пенициллина (25000 МЕ) и стрептомицина (25000 мг) (ПанЭко, Россия), 146 мг L-глутамина (ПанЭко, Россия), а также трипсина-ТРСК (Sigma, США).

Для проведения иммуноферментного анализа использовали: - карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ) в капсулах производства Sigma (США); - фосфатно-солевой буфер (ФСБ) производства Эко-Сервис (Россия); - промывочный буфер (ФСБ-Т) – ФСБ с добавлением 0,05% Tween-20 (AppliChem, США); - блокирующий буфер – буфер S012 (Хема, Россия) или ФСБ-Т с добавлением 5% обезжиренного сухого молока (AppliChem, США); - тетраметилбензидин 3,3',5,5' (ТМБ) производства НИИОПиК (Россия) или Bio-Rad (США); - 1М серная кислота (Химмед, Россия).

Для иммуноферментного и вестерн-блот анализа применяли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP): anti-Llama IgG (A160-100P, Bethyl, США), anti-с-Мус (ab1326, Abcam, Великобритания), anti-human IgG (A8667, Sigma, США), anti-mouse IgG (A9044, Sigma, США), anti-M13 (11973-MM05T-H, Sino Biological, Китай).

Лабораторные животные

В экспериментах использовали SPF мышей линии BALB/c в возрасте 6-8 недель, вес 18-20 г, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН. Лабораторные животные содержались в соответствии с Директивой 2010/63/EU и рекомендациями FELASA. Животные имели свободный доступ к воде и пище. Все эксперименты были одобрены этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 19 от 2022 г.).

Лабораторное оборудование

В данной работе использовали следующее оборудование: автоматические дозаторы переменного объема, в том числе многоканальные, фирм Thermo Scientific (США), Eppendorf (Германия), Sartorius (Германия); дозаторы электронные для серологических пипеток производства Sartorius (Германия) и Thermo Scientific (США); ламинарный бокс класс II/тип А2 (ЗАО «Ламинарные системы», Россия); бокс биологической безопасности второго класса Esco SC-2-4A1 (Esco, Сингапур); CO₂-инкубатор MCO-18AC (Sanyo, Япония); термостат воздушный RS 422 (Binder, Германия); термостат твердотельный с термостатируемой крышкой «Гном» (ДНК-Технология, Россия); инкубатор-

шейкер термостатируемый с охлаждением Ecotron (Infors, США); аналитические весы (Ohaus, США); система для очистки воды Elix (Millipore, Германия); счетчик клеток TC20 (Bio-Rad, США); автоклав 2340МК (Tuttnauer, Израиль); магнитная мешалка MMS-3000 (BioSan, Латвия); водяная баня WB-4MS (BioSan, Латвия); УФ-бокс для работы с нуклеиновыми кислотами UVC/T-AR (BioSan, Латвия); центрифуги с охлаждением (Eppendorf, Германия); планшетный шейкер (Thermo Scientific США); планшетный фотометр для иммуноферментного анализа Multiskan FC (Thermo Scientific США); ПЦР-амплификатор T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США); ротатор для пробирок Multi Bio RS-24 (BioSan, Латвия); спектрофотометр NanoDrop 2000с (Thermo Scientific, США); камеры для горизонтальных электрофорезов (Bio-Rad, США); камера для вертикальных электрофорезов Mini-PROTEAN® Tetra (Bio-Rad, США); источники питания PowerPac™ (Bio-Rad, США) и «Эльф-8» (ДНК-Технология, Россия); система для полусухого переноса белков Trans-Blot® Turbo (Bio-Rad, США); pH-метр Seven Compact S220 (Mettler Toledo, Германия); электропоратор MicroPulser (Bio-Rad, США); инвертированный микроскоп (Olympus, Япония); система гель-документирования Gel Doc EZ (Bio-Rad, США); хроматографическая система АКТА Start (GE Healthcare, Швеция); анализатор биомолекулярный Biacore 3000 (GE Healthcare, Швеция); станция вестерн-блоттинга Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Швеция); гомогенизатор органов и тканей FastPrep-24 (MP Biomedicals, США).

2.2 Методы

2.2.1 Бактериологические методы

Культивирование бактерий

Для культивирования используемых в работе бактериальных штаммов *E. coli* использовали жидкие и агаризованные питательные среды с добавлением селективных антибиотиков: ампициллин в конечной концентрации 100 мкг/мл или канамицин 50 мкг/мл. В жидкой среде культивирование проводили в термостат-шейкере при скорости вращения платформы 210-230 об/мин при +37°C или +30°C.

Культивирование на твердых средах осуществляли в воздушном термостате при +37°C.

Подготовка и трансформация компетентных клеток *E. coli*

Для получения компетентных клеток *E. coli* штаммов DH5α и Rosetta (DE3) использовали метод SEM [131]. Трансформацию клеток плазмидной ДНК или лигазной смесью осуществляли также по методу SEM.

Подготовка электрокомпетентных клеток *E. coli* штамма TG1 проходила согласно протоколу из руководства «MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide» (Bio-Rad, США).

Для трансформации клеток *E. coli* штамма TG1 использовали метод электропорации согласно руководству «MicroPulser™ Electroporation Apparatus Operating Instructions and Applications Guide» (Bio-Rad, США).

2.2.2 Методы генетической инженерии

Полимеразная цепная реакция (ПЦР)

ПЦР проводили в автоматическом режиме на термоциклере T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Реакцию проводили с использованием специфических праймеров, указанных в Таблице 5. Программа амплификации для анализа наличия вставки в бактериальных колониях, а также контроля выделения кДНК состояла из трех стадий:

I этап. Предварительная денатурация – 95°C - 1 мин.

II этап. Непосредственно ПЦР, 25 циклов:

-денатурация ДНК – 95°C - 20 сек,

-отжиг праймеров на матрице – 58-64°C - 20 сек (температуру отжига варьировали в зависимости от используемой пары праймеров),

-элонгация – 72°C – 20-90 сек (время элонгации выбирали в зависимости от длины амплифицируемого фрагмента).

III этап. Финальная элонгация – 72°C - 3 мин.

Таблица 5 – Нуклеотидные последовательности использованных в работе праймеров

| Название | Матрица | Последовательность 5'→3' |
|-----------------|---------------------------------|---|
| VH1-SfiI | VHH | CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG |
| VH2-SfiI | | CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGG |
| VH3-SfiI | | CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG |
| VH4-SfiI | | CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG |
| CH2FO RTA4 | CH2 домен IgG | CGCCATCAAGGTACCAGTTGA |
| VHH-NotI | VHH | CCACGATTCTGCGGCCGCTGAGGAGACRGTGACCTGGGTCC |
| GAPDH alp-F2 | Ген «домашнего хозяйства» | CATCTTCCAGGAGCGAG |
| GAPDH alp-R2 | | GACTTGTCATACTTCTCGTGG |
| pHEN-F | вектор | CACACAGGAAACAGCTATGAC |
| pIII-R | pHEN1 | CTTTCCAGACGTTAGTAAATG |
| EF1a_F | вектор pFUSE | TCTTCCATTTCAAGGTGTCGT |
| Hcs-R | сигнальный | AGACAGCACTCTGGTGGC |
| Hcs-B12g-Vh-F | пептид IgG | GCCACCAGAGTGCTGTCTGAGGTGCAGCTGGTGGA |
| VHH-hinge-R | VHH и IgG1 человека | GTCTTGTCACAGGACTTAGGTTCTGAGGAGACRGTGACCTGGG |
| hHinge-F | IgG1 человека | GAACCTAAGTCCTGTGACAAGAC |

| Название | Матрица | Последовательность 5' → 3' |
|----------------|------------------------------------|--|
| bGH-PA_term-R | вектор pFUSE | GGCAACTAGAAGGCACAGTC |
| VHH-20R | VHH | GCCTGAGCCGCCGCCGAGATCCACCTCCACCTGATCCGCCA CCACCTGAGGAGACRGTGACCTGGGTC |
| VHH3-15F | | TCTGGCGGCGGCGGCTCAGGCGGAGGAGGTTCGAGGTGCAG CTGGTGGAGTCT |
| Bm-HA1-F | HA BГА | TATTCGTCTCAGGGAGCAAAAGCAGGGG |
| Bm-HA-1778-R | | ATATCGTCTCGTATTAGTAGAAACAAGGGTGTTTT |
| H1-Vic-F | HA A/Victoria/2 570/2019 (H1N1) | GGCAGCATGTCCTCACGC |
| H1-Vic-R | | GTCCAGGAAACCATCATCAAC |
| Vhh-mhinge2a-F | VHH и IgG2a мыши | GTCACCGTCTCCTCAGAGCCTAGGGGCCCCACA |
| Vhh-mhinge2a-R | | GCCCCTAGGCTCTGAGGAGACGGTGACCTG |
| mLALA-F | Fc-фрагмент IgG2a мыши | CAAATGCAGCTGGTGGACCATCCGTCTTCAT |
| mLALA-R | | CCACCAGCTGCATTTGGAGCGGGGCATTTACA |
| mPG-F | | CCTCGGTGCCCCCATCGAGAGAACCATCTC |
| mPG-R | | GGGGCACCGAGGTCCTTGTTGTTGACCTT |

Гидролиз ДНК специфическими эндонуклеазами рестрикции

ДНК обрабатывали специфическими эндонуклеазами рестрикции в буферных смесях согласно рекомендациям фирм-производителей. Реакцию

проводили в объеме 20-50 мкл. Инкубировали смесь в течение 1 часа при температуре, оптимальной для соответствующей эндонуклеазы рестрикции.

Дефосфорилирование векторов

Для дефосфорилирования векторов была использована термочувствительная щелочная фосфатаза FastAP (Thermo Scientific, США). В рестрикционную смесь добавляли FastAP из расчета 1 мкл фермента на 1 мкг плазмидной ДНК. Инкубировали 10 мин при +37°C, затем инактивировали фермент, прогревая смесь при 65°C 5 мин.

Разделение фрагментов ДНК методом электрофореза в агарозном геле

Разделение фрагментов ДНК проводили методом электрофореза в горизонтальном агарозном геле с концентрацией агарозы 1-1,5% и содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия. Образцы для электрофореза окрашивали красителем GelPilot Loading Dye, 5x (QIAGEN, Германия). Электрофорез проводили при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере TAE (40 mM трис-ацетат pH 8.1 и 2 mM ЭДТА). Детекцию фрагментов ДНК осуществляли с помощью системы Gel-Doc EZ Imager (Bio-Rad, США). Для определения молекулярного веса фрагментов ДНК были использовали маркеры молекулярного веса ДНК, указанные в разделе 2.1 Материалы.

Выделение фрагментов ДНК из геля

Фрагменты ДНК элюировали из геля набором Cleanup Standart (Евроген, Россия) согласно протоколу производителя. Концентрацию элюированной ДНК определяли с помощью спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США).

Лигирование фрагментов ДНК

Для лигирования фрагментов ДНК использовали ДНК-лигазу бактериофага T4 (Thermo Scientific, США). Реакцию проводили согласно протоколу производителя. Вектор и вставку брали в молярном соотношении 1:3 или 1:5.

Выделение плазмидной ДНК

Для выделения плазмидной ДНК использовали коммерческие наборы: Plasmid Miniprep (Евроген, Россия) и QIAGEN® Plasmid Midi Kit (QIAGEN,

Германия) согласно протоколам производителей. Чистоту и концентрацию плазмидной ДНК оценивали при помощи электрофореза в агарозном геле и с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США).

Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Первичную структуру ДНК определяли по принципу Сэнгера на генетическом анализаторе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США). Данная работа выполнялась сотрудниками лаборатории анализа геномов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России под руководством к.б.н., доцента Ворониной О.Л.

2.2.3 Иммунологические методы

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Для непрямого твердофазного ИФА антиген (100 нг/лунку в КББ) сорбировали на 96-луночный полистироловый планшет при +4°C в течение 18 часов. Затем планшет промывали раствором ФСБ-Т (300 мкл/лунку) 3 раза. Далее для избавления от неспецифического связывания в лунки добавляли блокирующий буфер S012 в объеме 100 мкл. Инкубировали в планшетном термошейкере при +37°C в течение часа, после чего планшет промывали 3 раза раствором ФСБ-Т. Затем добавляли сыворотку крови животного или очищенные антитела в различных разведениях в блокирующем буфере и инкубировали час при тех же условиях. Планшет промывали 4 раза раствором ФСБ-Т, чтобы удалить не связавшиеся антитела. Далее добавляли вторичные антитела (100 мкл/лунку), разведенные в блокирующем буфере. Инкубировали 1 час при +37°C. Далее планшет промывали раствором ФСБ-Т 5 раз. После этого добавляли 100 мкл/лунку ТМБ и выдерживали в темноте 15 минут. Далее останавливали реакцию добавлением 50 мкл/лунку 1 М серной кислоты и проводили измерение оптической плотности на планшетном спектрофотометре при длине волны света 450 нм (ОП_{450нм}). Значения полумаксимальной эффективной концентрации (EC₅₀) рассчитывали с использованием четырехпараметрической логистической регрессии в GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США).

Для проведения конкурентного ИФА VHH последовательно разводили в блокирующем буфере со стартовой концентрацией 800 нМ (~10 мкг/мл). Конкурентные антитела в формате VHH-Fc (5 нМ) добавляли в равном объеме в лунки, содержащие VHH. Связавшиеся VHH-Fc детектировали с использованием anti-human IgG HRP (Sigma, США). Оптическую плотность в лунках, содержащих только VHH-Fc, принимали за 100% уровень сигнала. Ингибирование выражали как процент снижения ОП_{450нм} в лунках, содержащих смесь VHH/VHH-Fc, по сравнению с лунками без VHH.

Для ИФА с денатурированным антигеном, белок перед иммобилизацией денатурировали путем добавления 1% додецилсульфата натрия (ДСН) и 50 мМ дитиотреитола (ДТТ) и последующего нагревания при +99°C в твердотельном термостате в течение 10 мин.

Для проведения ИФА с изменением конформации НА, после этапа блокировки в лунки планшета вносили трипсин-ТРСК, разведенный в ФСБ до конечной концентрации 25 нг/мл в объеме 100 мкл/лунку. После инкубации в течение 1 ч при +37°C без вращения, в лунки добавляли 0,1 М цитратный буфер, содержащий 150 мМ хлорида натрия, с различными значениями pH – 7.4, 6.0, 5.0 – в объеме 200 мкл/лунку. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч без вращения, промывали 3 раза и далее осуществляли стандартный протокол ИФА.

Для ИФА с дегликозилированным антигеном, перед сорбцией N-связанные гликаны удаляли при помощи фермента N-гликозидазы F (PNGase F; New England Biolabs, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя.

Для проведения ИФА с клеточной культурой MDCK, инфицированной ВГА, предварительно клетки рассевали в 96-луночные культуральные планшеты в количестве 15000/лунку. На следующий день планшеты трижды промывали ФСБ и вносили 200 ТЦД₅₀/лунку ВГА в среде MegaVir с добавлением 1 мкг/мл трипсина-ТРСК. Планшеты инкубировали 24 часа в CO₂-инкубаторе при +37°C, трижды промывали ФСБ и фиксировали клетки с помощью охлажденного 10% параформальдегида в ФСБ (AppliChem, США) в течение 12 мин при комнатной

температуре. Далее проводили ИФА согласно стандартному протоколу. В качестве положительных контролей использовали антитела производства Sino Biological (Китай): кроличьи мАт к нуклеопротеину широкого спектра (Cat: 40208-R010); поликлональные кроличьи антитела к HA ВГА H1N1 (Cat: 11055-T62) и HA ВГА H3N2 (Cat: 11056-T62); вторичные антитела к IgG кролика (Cat: SSA003).

Иммуноблоттинг

Белки разделяли с использованием готовых гелей Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, США) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham™ Hybond™ N (Cytiva, США). После блокировки мембраны 5% обезжиренным молоком в ФСБ-Т в течение 1 ч при +37°C добавляли VHH-Fc в конечной концентрации 1 мкг/мл. Мембрану инкубировали 1 ч при +37°C, после чего промывали ФСБ-Т с содержанием 0,1% Tween-20 в течение 15 мин, меняя буфер каждые 5 мин. Далее вносили вторичные антитела anti-human IgG HRP (Sigma, США). После инкубации, мембрану также отмывали ФСБ-Т в течение 30 мин, меняя буфер каждые 10 мин. Иммунодетекцию проводили с использованием субстрата Clarity™ Western ECL (Bio-Rad, США) на приборе Amersham Imager 600 (GE Healthcare, Швеция).

Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

Аффинность и кинетику взаимодействия VHH и антигена (СД НА) определяли на четырехканальном оптическом биосенсоре Biacore 3000 (GE Healthcare, Швеция). Рекомбинантный белок СД НА (20 мкг/мл в 10 mM ацетатном буфере pH 4.5) ковалентно иммобилизовали на поверхности оптического чипа CM5 с помощью набора Amine Coupling Kit (GE Healthcare, Швеция). Кинетические параметры анализировали путем инъекции пятикратных разведений образцов VHH в диапазоне концентраций от 267 до 0 нМ через контрольный (без иммобилизованного лиганда) и рабочий каналы в течение 3 мин с постоянной скоростью потока 15 мкл/мин. В качестве рабочего буфера использовали HBS-EP (0,01 M HEPES pH 7.4, 0,15 M NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% Surfactant P20). Время диссоциации после нанесения образцов составляло 10 мин. После каждого измерения проводили регенерацию поверхности чипа с помощью инъекции

буфера, содержащего 100 мМ Трис-HCl pH 1.3, в течение 30 с при скорости потока 30 мкл/мин. Все измерения проводили при температуре +25°C не менее 2 раз.

Значения равновесных констант диссоциации и ассоциации (K_d и K_a), констант скорости образования (k_{on}) и распада (k_{off}) молекулярных комплексов рассчитывали с помощью программного обеспечения BIAEvaluation (GE Healthcare, Швеция).

Исследование активации FcγR с помощью репортерных клеточных линий

Изучение способности антител активировать антителозависимую клеточную цитотоксичность или антителозависимый клеточный фагоцитоз проводили совместно с к.б.н. Джаруллаевой А.Ш. (лаб. клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Клетки НЕК293 за день до начала эксперимента рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты, а затем трансдуцировали рекомбинантным Ad5-swH1opt/California или Ad5-tet-swH3glic (15 БОЕ/клетку). Спустя 18 часов среду с вирусом заменяли на свежую ростовую среду и добавляли к клеткам антитела, предварительно разведенные в среде DMEM. Планшеты инкубировали в CO₂-инкубаторе при +37°C в течение 1 часа, затем однократно промывали для удаления не связавшихся антител. Далее вносили репортерные клетки Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 или Jurkat-Lucia™ NFAT-CD32 и проводили эксперимент, как описано ранее [119]. Анализ включал положительный контроль, отрицательный контроль (VHH или нерелевантный VHH-Fc) и интактные клетки. Исследование каждого антитела производили в четырех повторах.

2.2.4 Вирусологические методы

Культивирование эукариотических клеток

Клетки линии MDCK культивировали в ростовой среде DMEM в CO₂-инкубаторе при +37°C, с содержанием 5% CO₂.

Титрование ВГА по конечной точке цитопатического действия (ЦПД) для определения ТЦД₅₀

MDCK рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты в количестве 15000 клеток/лунку. На следующий день в отдельном планшете готовили десятикратные разведения ВГА в среде MegaVir. Далее разведения вируса добавляли к клеткам MDCK, предварительно трижды промытые ФСБ. Инкубировали клетки в течение 72 часов, после чего производили учет результатов (наличие или отсутствие цитопатического действия) визуально. Титр ВГА рассчитывали по методу Рида и Менча [213].

Титрование ВГА по методу бляшкообразования для определения количества БОЕ

MDCK рассеивали в 6-луночные культуральные планшеты в количестве 500000 клеток/лунку. На следующий день клетки трижды промывали ФСБ, добавляли к ним десятикратные разведения вируса в среде DMEM 0% и инкубировали 1 час при +37°C. Затем среду, содержащую ВГА, удаляли и заменяли на 2×DMEM, смешанный в пропорции 1:1 с 2% агаром. Планшеты инкубировали в течение 72 часов. Далее из лунок удаляли агаризованное покрытие, после чего клетки фиксировали охлажденным 10% параформальдегидом в ФСБ (AppliChem, США) в течение 12 мин при комнатной температуре. Фиксатор удаляли и клетки окрашивали 0,5% раствором кристаллического фиолетового в 20% этаноле. После окрашивания кристаллическим фиолетовым живые клетки приобретают фиолетовую окраску, а бляшки, представляющие собой мертвые клетки, остаются неокрашенными. Излишки краски отмывали водой и визуально производили подсчет индивидуальных бляшек.

Реакция нейтрализации (РН)

Для проведения стандартной РН в формате микронейтрализации клетки MDCK рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты в количестве 15000 клеток/лунку. На следующий день в отдельном планшете готовили серийные разведения антител (в 2-4 повторях) в среде MegaVir в объеме 50 мкл; далее к разведениям вносили ВГА в среде MegaVir в количестве 100 ТЦД₅₀/лунку в объеме

50 мкл. Смесь вируса и антител инкубировали 1 ч при +37°C. В это время клетки MDCK промывали 3 раза ФСБ для удаления остатков сыворотки, после чего в лунки к клеткам переносили смесь ВГА и антител. Планшеты инкубировали в течение 72 часов, после чего производили учет результатов визуально. Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации IC₅₀ рассчитывали по методу Рида и Менча [213].

Модифицированные методики РН были адаптированы из [212]:

1) Для постановки РН с целью оценить влияние антител на выход вируса из клетки, MDCK инфицировали ВГА в среде MegaVir в количестве 100 ТЦД₅₀/лунку и инкубировали 2 ч при +37°C. После этого ростовую среду с вирусом удаляли, промывали клетки ФСБ и вносили среду MegaVir, содержащую серийные разведения антител. Следующие этапы соответствовали стандартной РН.

2) Для постановки РН с целью оценить влияние антител на проникновение вируса в клетки, смесь вируса и последовательных разведений антител инкубировали 1 ч при +37°C. В это время клетки MDCK промывали 3 раза ФСБ, после чего в лунки к клеткам переносили смесь ВГА и антител и инкубировали в течение 2 ч при +37°C. После этого ростовую среду с вирусом заменяли на свежую среду MegaVir. Следующие этапы соответствовали стандартной РН.

Получение эскейп-мутантов ВГА

Получение мутантов ВГА, резистентных к нейтрализующему действию VHH-Fc, проводили согласно методике, описанной Leon P. E. для антител, не обладающих активностью в РТГА [161].

Определение количества ВГА в гомогенатах легких инфицированных мышей

За 24 часа до начала эксперимента клетки MDCK рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты (15000 клеток/лунку). Последовательные разведения гомогенатов легких в питательной среде MegaVir добавляли в планшеты с клетками, трижды промытыми ФСБ. Планшеты инкубировали в течение 72 часов, после чего производили учет результатов визуально. Исследование проводили в

четырёх повторах. Значения титра вируса в гомогенатах легких рассчитывали по методу Рида и Менча [213].

Анализ ингибирования гемолиза

Анализ ингибирования гемолиза эритроцитов проводили согласно [83].

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Способность антител тормозить реакцию агглютинации эритроцитов оценивали, как описано ранее [298].

2.2.5 Получение однодоменных антител

Иммунизация животного

Альпака и двугорбого верблюда иммунизировали по схемам, подробно описанным в Главе 3 «Результаты собственных исследований». Кровь для выделения мононуклеарных клеток отбирали на 5-7 сутки после финальной иммунизации.

Изоляция мононуклеарных клеток периферической крови и выделение тотальной РНК

Для изоляции мононуклеарных клеток свежевыделенную кровь помещали в пробирку с антикоагулянтом литий-гепарин (2000 МЕ на 50 мл крови). Затем кровь разбавляли равным объемом 0,9% раствора NaCl комнатной температуры. С помощью пипетки аккуратно наслаивали разбавленную кровь на градиент раствора Фиколла с плотностью 1,077 г/см³ и центрифугировали при 2000 об/мин в течение 20 мин при комнатной температуре.

В результате центрифугирования кровь разделялась на 4 фракции, слой лимфоцитов собирали и переносили в новый фалькон, где ресуспендировали в ФСБ. Затем пробирки центрифугировали 10 мин 2000 об/мин при +4 °C. Затем супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в холодном реагенте TRIzol™. Выделение тотальной РНК проводили согласно протоколу фирмы-производителя TRIzol™ (Invitrogen, США). Чистоту и концентрацию полученной РНК оценивали при помощи электрофореза в агарозном геле и с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США).

Обработка тотальной РНК ДНКазой и реакция обратной транскрипции

Удаление ДНК из образцов тотальной РНК, выделенной из моноклеаров, осуществляли с помощью фермента ДНКазы ezDNase Enzyme (Thermo Scientific, США) согласно протоколу производителя.

Для синтеза кДНК из полученной РНК, обработанной ДНКазой, использовали набор для постановки реакции обратной транскрипции «SuperScript™ IV First-Strand Synthesis System» (Invitrogen, США). Процедура проводили по протоколу фирмы-производителя.

Гнездовая (вложенная) ПЦР

Для амплификации последовательностей VHH использовали метод гнездовой ПЦР. Программа амплификации и праймеры, используемые для каждого раунда ПЦР, приведены в Таблице 6.

Таблица 6 – Программы амплификации и пары праймеров для гнездовой ПЦР

| Раунд гнездовой ПЦР | | Первый | Второй |
|----------------------------|----------|--|--|
| Праймеры | | - смесь праймеров VH1, VH2, VH3, VH4 - CH2Forta4 | - смесь праймеров VH1, VH2, VH3, VH4 - VHH-NotI |
| Программа ПЦР | I этап | Предварительная денатурация – 98 °C – 40 сек | Предварительная денатурация – 98 °C – 40 сек |
| | II этап | Непосредственно ПЦР, 36 циклов: денатурация ДНК – 98 °C - 15 сек, отжиг праймеров на матрице – 58 °C - 20 сек, элонгация – 72 °C – 30 сек | Непосредственно ПЦР, 18 циклов: денатурация ДНК – 98 °C - 15 сек, отжиг праймеров на матрице – 58 °C - 20 сек, элонгация – 72 °C - 20 сек |
| | III этап | Финальная элонгация – 72 °C – 2 мин | Финальная элонгация – 72 °C – 3 мин |

Клонирование фрагментов VHH в фагмидный вектор и идентификация бактериальных клонов, несущих фрагменты VHH

Клонирование ампликонов, полученных в результате гнездовой ПЦР и соответствующих VHH, в фагмидный вектор pHEN1 осуществляли по специфическим сайтам эндонуклеаз рестрикции SfiI и NotI согласно стандартным методам молекулярно-генетического клонирования. Для очищения и увеличения концентрации ДНК в лигазной смеси использовали метод спиртового осаждения нуклеиновых кислот. Осажденную ДНК растворяли в стерильной деионизированной воде и использовали для электропорации компетентных клеток *E. coli* штамма TG1. Полученные трансформанты высевали на твердую питательную среду 2хYT (квадратные чашки Петри 245×245×28 мм), содержащую ампициллин и 2% глюкозы, и инкубировали в течение ночи при +37°C. Одну из аликвот трансформантов использовали для приготовления 10-кратных разведений, которые высевали на стандартные чашки Петри, с целью подсчета выросших колоний и определения сложности полученной библиотеки клонов-трансформантов. Выросшие на чашках 245×245×28 мм колонии собирали и ресуспендировали в жидкой среде 2хYT, содержащей ампициллин и 15% глицерина. Данные колонии-трансформанты представляют собой исходную библиотеку.

Далее проводили скрининг случайным образом выбранных индивидуальных колоний с помощью ПЦР на наличие вставки (фрагментов VHH) с последующим анализом в агарозном геле.

Наработка библиотек фаговых частиц

Аликвоту трансформированных клеток *E. coli* штамма TG1 добавляли к 25 мл жидкой питательной среды 2хYT с ампициллином и 2% глюкозы до значений ОП_{600нм} не более 0,1. Инкубировали в термошейкере при +37°C и 250 об/мин до достижения значений ОП_{600нм} 0,5-0,6. Далее клетки TG1 переносили в 50 мл фальконы и добавляли к ним фаг-помощник KM13 при значении МИ (множественность инфекции) = 20. Клетки перемешивали и инкубировали 30 мин при +37°C без перемешивания для инфицирования бактериальных клеток фагом-

помощником. Для удаления излишка фага, клеточную суспензию центрифугировали при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин при 4000 об/мин. Осадок бактериальных клеток ресуспендировали и переносили в 125 мл свежей питательной среды 2xYT, содержащей антибиотики ампициллин и канамицин. Устойчивость к канамицину приобретается в результате инфицирования клеток *E. coli* штамма TG1 фагом-помощником KM13, в то время как ген устойчивости к ампициллину содержится в фагмиде pHEN1. Инкубировали в термошейкере при $+30^{\circ}\text{C}$ и 250 об/мин в течение ночи.

На следующий день культуральную жидкость, содержащую фаговые частицы, осветляли от бактериальных клеток центрифугированием при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 45 мин при 4000 об/мин. Супернатант смешивали с преципитирующим раствором (20% полиэтиленгликоль 8000 и 2,5 М NaCl) в соотношении 5:1. Перемешивали и инкубировали на льду 1 ч для преципитации фаговых частиц. Далее осаждали фаги центрифугированием при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин при 4000 об/мин. Осадок, содержащий фаговые частицы, ресуспендировали в 1 мл ФСБ и центрифугировали при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 2 мин при 14000 об/мин для преципитации оставшихся бактериальных клеток. К надосадочной жидкости, содержащей фаговые частицы, вновь добавляли преципитирующий раствор и инкубировали на льду в течение 30 мин для преципитации фаговых частиц. Центрифугировали при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 5 мин при 14000 об/мин, и осадок ресуспендировали в 0,75 мл ФСБ, после чего добавляли 0,25 мл 80 % глицерина и хранили при -70°C .

Титрование специфических рекомбинантных бактериофагов

Бактериофаги последовательно разводили в 500 мкл жидкой среды 2xYT до разведения $1/10^{10}$. Далее к трем последним разведениям добавляли 500 мкл предварительно подрощенных до ОП_{600нм} 0,5-0,6 клеток TG1, перемешивали и инкубировали 30 мин при $+37^{\circ}\text{C}$ без перемешивания для инфицирования бактериальных клеток. Инфицированные рекомбинантными бактериофагами клетки TG1 высевали на агаризованную питательную среду, содержащую ампициллин, и инкубировали при $+30^{\circ}\text{C}$ в течение ночи. Для получения значения

титра бактериофага количество выросших колоний умножали на 20 и на соответствующее разведение бактериофага.

Селекция (биопаннинг) специфических рекомбинантных бактериофагов методом фагового дисплея

Антиген предварительно сорбировали в КББ в 96-луночный иммунологический планшет в количестве 5 мкг/лунку для первого раунда селекции и 1 мкг/лунку для последующих. Аналогичным образом сорбировали такое же количество бычьего сывороточного альбумина (БСА) в качестве контрольного антигена. Планшет инкубировали при +4°C в течение ночи, после чего 3 раза промывали раствором ФСБ-Т. Далее для блокирования не специфически связывающихся фаговых частиц 100 мкл 5% раствора обезжиренного молока в ФСБ-Т добавляли в лунку с сорбированным БСА. В лунке с специфическим антигеном оставляли ФСБ-Т. Инкубировали на шейкере при +37°C в течение 1 ч. После инкубации из лунок отбирали ФСБ-Т и блокирующий буфер. В лунку с антигеном добавляли блокирующий буфер в объеме 100 мкл, в лунку с БСА добавляли 100 мкл блокирующего буфера и 100 мкл библиотеки фаговых частиц (не менее 10^{11} частиц). Инкубировали в планшетном термошейкере при температуре +37°C в течение 1 ч. Из лунки с антигеном удаляли блокирующий буфер и переносили в нее фаговые частицы из лунки с БСА. Инкубировали в термошейкере при +37°C в течение 1 ч. Лунку с антигеном 10-12 раз промывали раствором ФСБ-Т. Связавшиеся с антигеном фаговые частицы, несущие специфичные фрагменты VHH, элюировали трипсином в ФСБ (1 мг/мл) в объеме 50 мкл при комнатной температуре в течение 20 мин. После чего элюированные бактериофаги добавляли клеткам *E. coli* штамма TG1 в логарифмической фазе роста и инкубировали 30 мин при +37°C без перемешивания. Инфицированные клетки *E. coli* штамма TG1 высевали на квадратные чашки Петри 245×245×28 мм с агаризованной питательной средой и ампициллином, подращивали в течение 18 часов при +30°C. На следующий день с чашек Петри 245×245×28 мм собирали пул трансформированных клеток, которые сразу использовали для наработки

библиотек фаговых частиц, либо хранили в жидкой питательной среде 2хУТ, содержащей 15% глицерина при -70°C .

Бактериальные клоны, полученные в виде индивидуальных колоний при титровании элюированных фаговых частиц, переносили в глубоколоночный планшет, содержащий жидкую питательную среду 2хТУ с ампициллином. Планшет инкубировали в течение 18 ч при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и 210 об/мин. Затем бактерии осаждали центрифугированием при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, 4500 об/мин в течение 40 мин. Данный планшет представлял собой «masterplate», который служил источником индивидуальных клонов бактерий для последующего анализа.

Анализ клонов, полученных в рамках фагового дисплея, методом фагового ИФА

Часть бактериальной суспензии из «masterplate» переносили в новый глубоколоночный планшет, содержащий жидкую питательную среду 2хТУ с ампициллином, инкубировали в термощейкере при температуре $+37^{\circ}\text{C}$ и 250 об/мин до достижения значений $\text{ОП}_{600\text{нм}}$ 0,5-0,6. Затем в каждую лунку добавляли фаг-помощник КМ13 при значении $\text{МИ} = 20$, планшет инкубировали при $+37^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин без перемешивания. Для удаления не связавшегося фаг-помощника, бактерии осаждали центрифугированием при температуре 4°C , 4500 об/мин в течение 40 мин и ресуспендировали осажденные бактериальные клетки в 1 мл свежей питательной среды 2хУТ, содержащей ампициллин и канамицин. Инкубировали в термощейкере при температуре $+30^{\circ}\text{C}$ и 250 об/мин в течение ночи. На следующий день бактерии осаждали центрифугированием при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, 4500 об/мин в течение 40 мин. Супернатант использовали в качестве источника бактериофагов для постановки ИФА. Фаговый ИФА проводили согласно стандартной методике твердофазного непрямого ИФА, где после этапа блокирования иммунологического планшета в лунки вносили по 100 мкл супернатанта, содержащего бактериофаги. В качестве мишени для фагового ИФА брали специфический антиген и контрольный антиген – БСА. Лунки с специфическим антигеном, в которых сигнал в два и более раз превышал сигнал в соответствующей лунке с БСА, считали положительными.

Анализ клонов, полученных в рамках фагового дисплея, методом VNN-ИФА

Часть бактериальной суспензии из «masterplate» переносили в новый глубоколоночный планшет, содержащий жидкую питательную среду 2xTY с ампициллином, инкубировали в термошейкере при +37°C и 250 об/мин до достижения значений ОП_{600нм} 0,5-0,6. Затем в каждую лунку добавляли изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ) до конечной концентрации 1 mM и инкубировали в термошейкере при +30°C и 250 об/мин в течение ночи. На следующий день проводили три цикла замораживания-оттаивания планшета для разрушения бактериальной стенки и выхода VNN в культуальную среду. Далее планшет центрифугировали при +4°C, 4500 об/мин в течение 40 мин и супернатант использовали в качестве источника VNN для постановки ИФА. VNN-ИФА проводили согласно стандартной методике твердофазного непрямого ИФА, где после этапа блокирования иммунологического планшета в лунки вносили по 100 мкл супернатанта, содержащего VNN. В качестве мишени для фагового ИФА брали специфический антиген и контрольный антиген – БСА. Лунки с специфическим антигеном, в которых сигнал в два и более раз превышал сигнал в соответствующей лунке с БСА, считали положительными.

Индивидуальные клоны, определенные по результатам ИФА как положительные, использовали для выделения плазмидной ДНК. Нуклеотидную последовательность VNN определяли при помощи секвенирования по методике Сэнгера. Полученные последовательности анализировали с использованием программного обеспечения Geneious Prime 11.0.

Экспрессия и очистка однодоменных антител

Для экспрессии VNN рекомбинантную фагмидную ДНК, выделенную из отобранных индивидуальных клонов клеток *E. coli* штамма TG1, трансформировали в *E. coli* штамм Rosetta (DE3). Бактериальные клетки в жидкой среде инкубировали в термошейкере при +37°C и 250 об/мин до достижения значений ОП_{600нм} 0,5-0,6. Затем добавляли ИПТГ до конечной концентрации 1 mM и наращивали в течение ночи при +30°C, осаждали центрифугированием и

лизировали BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, США) согласно протоколу производителя или с помощью ферментативного лизиса. Однодоменные антитела очищали методом металл-аффинной хроматографии с последующим переводом элюированной фракции в ФСБ. Оценку концентрации и чистоты полученных препаратов VHH проводили с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) по Лэммли в невосстанавливающих условиях и с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США).

Электрофорез в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) по Лэммли

Электрофорез белков проводили в полиакриламидном геле Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, США) в присутствии ДСН по Лэммли. При электрофорезе в неденатурирующих невосстанавливающих условиях образцы смешивали с двукратным буфером для нанесения проб (4% ДСН, 20% глицерина, 0,004% бромфенолового синего, 0,125 М Tris-HCl, pH 6.8) без 2-меркаптоэтанола и, не нагревая, вносили в лунки геля. При электрофорезе в денатурирующих восстанавливающих условиях образцы, в соотношении 1:1, смешивали с двукратным буфером для внесения проб, содержащим 10% 2-меркаптоэтанола, и инкубировали 10 мин при +95°C. В качестве стандарта молекулярных масс использовали Precision Plus Protein™ (Bio-Rad, США). Электрофорез проводили при комнатной температуре в трис-глициновом буфере (25 mM Tris-HCl, 250 mM глицина и 0,1 % ДСН) при постоянном напряжении 200 В в течение 25-40 мин. Гели с разделенными фрагментами фотографировали, используя систему детектирования гелей Gel-Doc EZ Imager (Bio-Rad, США).

Получение конструкций VHH-Fc и VHH-VHH-Fc, экспрессия и очистка модифицированных VHH

Дизайн генетических конструкций VHH-Fc и VHH-VHH-Fc выполняли с использованием программного обеспечения Geneious Prime 11.0. Все конструкции содержали сигнальный пептид тяжелой цепи IgG человека. В конструкциях VHH-Fc соответствующее VHH слито с шарнирным участком и Fc человеческого IgG1 (GenBank: JQ666008.1). В конструкциях VHH-VHH-Fc C-конец первого VHH соединен гибким глицин-сериновым линкером [(G4S)×4] с N-концом второго

однодоменного антитела, которое, в свою очередь, С-концом соединено с шарнирным участком и Fc-фрагментом человеческого IgG1.

С помощью ПЦР получали последовательности генов VHH-Fc и VHH-VHH-Fc, которые клонировали в вектор для эукариотической экспрессии pFUSE по сайтам эндонуклеаз рестрикции HindIII и XbaI согласно стандартным методам молекулярно-генетического клонирования.

Экспрессию антител осуществляли с помощью транзientной трансфекции клеток CHO-S плазмидными конструкциями, кодирующими гены VHH-Fc и VHH-VHH-Fc, которую выполняли совместно с Рябовой Е.И. и к.б.н. Есмагамбетовым И.Б. (лаб. иммунобиотехнологии и лаб. стромальной регуляции иммунитета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России).

Аффинную хроматографическую очистку VHH-Fc и VHH-VHH-Fc с использованием в качестве сорбента сефарозы с иммобилизованным протеином А осуществляли совместно с Прокофьевым В.В. и к.б.н. Есмагамбетовым И.Б. (лаб. иммунобиотехнологии и лаб. стромальной регуляции иммунитета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России). Оценку концентрации и чистоты полученных препаратов антител проводили с помощью SDS-PAGE в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях и с использованием спектрофотометра NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, США).

2.2.6 Методы работы с лабораторными животными

Оценка профилактической и терапевтической эффективности антител

Все эксперименты были одобрены этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 19 от 2022 г.).

Животных (SPF мышей BALB/c, 6-8 недель, 18-20 г) случайным образом распределяли на группы по 5-8 особей. Под ингаляционным изофлурановым наркозом мышей интраназально инфицировали адаптированными к мышам вирусами гриппа в дозе 5ЛД₅₀ в объеме 50 мкл/животное. Для заражения животных использовали вирусы, полученные от д.б.н. Шмарова М.М. (лаб. клеточной

биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России). Антитела вводили внутрибрюшинно в объеме 200 мкл, либо интраназально под ингаляционным наркозом в объеме 50 мкл. Подробная информация о схемах введения антител представлена в Главе 3 «Результаты собственных исследований».

За животными наблюдали в течение 14 дней после заражения и ежедневно взвешивали, после чего подвергали эвтаназии в CO₂-камере. Мышей, масса тела которых снизилась на 25% или более, эвтаназировали.

Получение гомогенатов легких инфицированных животных

Животным вводили антитела за 24 часа до заражения ВГА. Подробная информация о дозировке антител и штаммах исследуемых вирусов представлена в Главе 3 «Результаты собственных исследований». На 3 сутки после заражения мышей эвтаназировали с помощью CO₂-камеры и отбирали легкие с соблюдением правил асептики. Затем легкие четыре раза промывали в ФСБ с пенициллином-стрептомицином (ПанЭко, Россия). Органы помещали в заранее подготовленные эппендорфы, содержащие 1 мл ФСБ, после чего гомогенизировали с использованием лизирующего матрикса 0.7 mm Garnet Bulk Media (Omni International, США). Пробирки с гомогенизированными легкими центрифугировали 30 секунд при 10000 об/мин и температуре +4°C, надосадочную жидкость отбирали и хранили при -70°C.

2.2.7 Биоинформатические методы

Дизайн праймеров и генетических конструкций, анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей белков выполняли с использованием программного обеспечения Geneious Prime 11.0 и NCBI BLAST.

Нуклеотидные и аминокислотные последовательности белков брали из следующих баз данных: GenBank, GISAID, UniProt.

Анализ третичной структуры НА эскейп-мутантов проводили с использованием структур, загруженных из базы данных PDB. Визуализацию данных структур осуществляли с использованием программного обеспечения Chimera 1.17.2 [205].

2.2.8 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, США), а также Excel (Microsoft, США). Каждый эксперимент повторялся не менее двух раз. Принятые в работе уровни значимости и их обозначение на рисунках: * – $p \leq 0.05$; ** – $p \leq 0.01$; *** – $p \leq 0.001$; **** – $p < 0.0001$.

Данные, представленные на линейных графиках и гистограммах, показывают среднее значение \pm SD (стандартное отклонение). Сравнение двух исследуемых групп между собой проводилось с помощью U-критерия Манна-Уитни. При количестве исследуемых групп >2 сравнение осуществляли методом однофакторного дисперсионного анализа с последующим тестом множественного сравнения Тьюки или методом двухфакторного дисперсионного анализа с последующим тестом множественного сравнения Даннета.

Различия между выживаемостью животных в опытных и контрольной группах рассчитывали с использованием логрангового метода Мантель-Кокс. Результаты изменения массы тела животных представлены как средние значения \pm SEM (стандартная ошибка среднего).

2.2.9 Доклинические исследования безопасности и фармакокинетики кандидатного препарата ГамИнфлюМаб

Исследования проводили совместно с центром доклинических исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России.

Исследование острой токсичности на мышах и крысах, хронической токсичности на кроликах и крысах проводили в соответствии с ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», Решению Совета ЕЭК №81 от 03.11.2016 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств» и в соответствии с требованиями OECD Principles on Good Laboratory Practice (ENV/MC/CHEM (98) 17).

Исследование репродуктивной токсичности препарата ГамИнфлюМаб проводили в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. Миронова А.Н., М., ФГБУ «НЦЭМСП»- 2012 г., в 2-х томах), Москва 2012 и OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Test No. 443: Extended One-Generation Reproductive Toxicity Study и его Российской адаптацией: ГОСТ 32379-2020 МЕТОДЫ ИСПЫТАНИЯ ПО ВОЗДЕЙСТВИЮ ХИМИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ НА ОРГАНИЗМ ЧЕЛОВЕКА Испытания по оценке репродуктивной/онтогенетической токсичности (скрининговый метод).

2.2.10 Клинические исследования безопасности, переносимости и фармакокинетики кандидатного препарата ГамИнфлюМаб

Клинические исследования были выполнены совместно с ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Исследование «Открытое исследование безопасности, переносимости и фармакокинетики лекарственного препарата для ранней этиотропной терапии инфекции, вызванной вирусом гриппа типа А на основе моноклональных антител при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы» представляло собой описательное открытое проспективное нерандомизированное клиническое исследование, которое проводилось в соответствии со следующими нормативными документами: Хельсинкская декларация Всемирной Медицинской Ассоциации. Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека; Руководство Международной Конференции по Гармонизации. Правила надлежащей клинической практики (ICH GCP); Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ (в действующей редакции) «Об обращении лекарственных средств» Федеральный закон Российской Федерации от 27 июля 2006 г. № 152-ФЗ «О персональных данных»; Федеральный закон Российской Федерации от 21 ноября 2011 г. № 323-ФЗ «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации»; ГОСТ «Надлежащая клиническая практика»; Приказ МЗ РФ № 200н от 01 апреля 2016 г.

«Об утверждении правил надлежащей клинической практики»; Правила надлежащей клинической практики Евразийского экономического союза (утв. Решением Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 79); Приказ Росздравнадзора № 1071 от 15.02.2017 г. «Об утверждении порядка осуществления фармаконадзора».

Клиническое исследование лекарственного препарата проводилось на основании разрешения на проведение клинического исследования, выданного Министерством здравоохранения Российской Федерации по результатам экспертизы документов для получения разрешения на проведение клинического исследования и этической экспертизы, предусмотренных статьей 39 Федерального закона от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

Номер и дата разрешения РКИ №471 от 29.08.2023

Номер и дата получения заключения Совета по этике: Выписка из протокола № 341 от 18.08.2023 г.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Получение рекомбинантных антигенов гемагглютининов вирусов гриппа типа А

Известно, что основной антигенной детерминантой ВГА является поверхностный гликопротеин НА, поэтому он служит перспективной мишенью для разработки терапевтических средств против ВГА, в том числе на основе мАт. Поскольку большинство существующих мАт с широким спектром кросс-реактивности направлены на консервативные конформационные эпитопы, важным этапом данной работы было получение рекомбинантных антигенов с сохранной четвертичной структурой.

Для получения полноразмерного рекомбинантного НА распространенным подходом является экспрессия полипептида НА0, который, в зависимости от штамма ВГА, способен естественным образом тримеризоваться [272]. С этой целью в базе данных GISAID были выбраны последовательности сезонных штаммов ВГА H1N1 (A/Hawaii/70/2019) и H3N2 (A/Hong Kong/45/2019) (номера EPI1617983 и EPI1691930, соответственно), актуальных на момент выполнения работы.

Также, целью данной работы являлось использование стволового (стеблевого) домена НА (СД НА) как антигенной мишени по причине высокой консервативности его аминокислотного состава. Однако, в составе полноразмерного НА данный домен обладает низкой иммуногенностью, так как экранируется иммунодоминантным глобулярным доменом. В связи с этим, необходимо было получить тримеризованный рекомбинантный стеблевой домен, лишенный «глобулы». Для этого была использована последовательность стеблевого домена НА штамма A/Brisbane/59/2007 (H1N1) mini-НА #4900, опубликованная Импальяццо А. и соавт. [130]. В указанной работе, последовательность СД НА была модифицирована таким образом, чтобы стабилизировать его тримерную форму и сохранить сайты связывания широко нейтрализующих антител.

При помощи программного обеспечения Geneious Prime 11.0 был выполнен дизайн генетических конструкций, позволяющий эффективно экспрессировать гемагглютинины и стеблевой домен в клетках млекопитающих и выполнять очистку рекомбинантных белков при помощи металл-аффинной хроматографии. Схема генетических конструкций представлена на Рисунке 10.

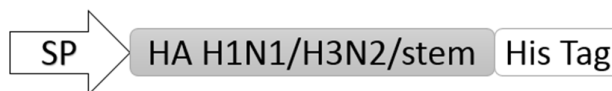


Рисунок 10 – Схематическое изображение генетической конструкции, экспрессирующей антигена ВГА: SP – сигнальный пептид щелочной фосфатазы; HA H1N1/H3N2/stem – гемагглютинин ВГА H1N1 или H3N2, или СД НА; His Tag – гистидиновая метка.

Далее, в ЗАО «Евроген» (Россия) были получены следующие плазмидные конструкции:

- pAL-TA-NAstem, содержащая ген СД НА штамма A/Brisbane/59/2007 (H1N1) mini-НА #4900;
- pAL-TA-H1N1, несущая ген полноразмерного НА вируса гриппа A/Hawaii/70/2019 (H1N1);
- pAL-TA-H3N2, содержащая ген полноразмерного НА вируса гриппа A/Hong Kong/45/2019 (H3N2).

На основе полученных плазмидных векторов методами молекулярного клонирования с помощью эндонуклеаз рестрикции XbaI и XhoI получали плазмиды (pFUSE-puro-H1N1, pFUSE-puro-H3N2 и pFUSE-puro-NAstem), которые использовали для трансфекции клеток CHO-S с целью получения стабильных продуцентов антигенов ВГА. Перед трансфекцией полученные рекомбинантные плазмиды линеаризовали по сайту эндонуклеазы рестрикции PmeI. Трансфекцию осуществляли с использованием реагента TransIT-X2 (Mirus Bio, США).

В процессе культивирования и селекции клеток-продуцентов антигенов ВГА наличие или отсутствие экспрессии антигенов контролировали методами SDS-PAGE и иммуноблоттинга.

Очистку полученных антигенов из культуральной жидкости производили с помощью аффинной хроматографии с сорбентом на основе никель-сефарозы, обеспечивающей специфическое связывание с гистидиновой меткой в составе рекомбинантных белков.

Получение стабильных продуцентов вышеуказанных рекомбинантных белков и их хроматографическую очистку проводили совместно с к.б.н. Есмагамбетовым И.Б. (в.н.с. лаб. стромальной регуляции иммунитета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Формирование тримеров очищенных белков подтверждали методом электрофореза белков в полиакриламидном геле (Рисунок 11).

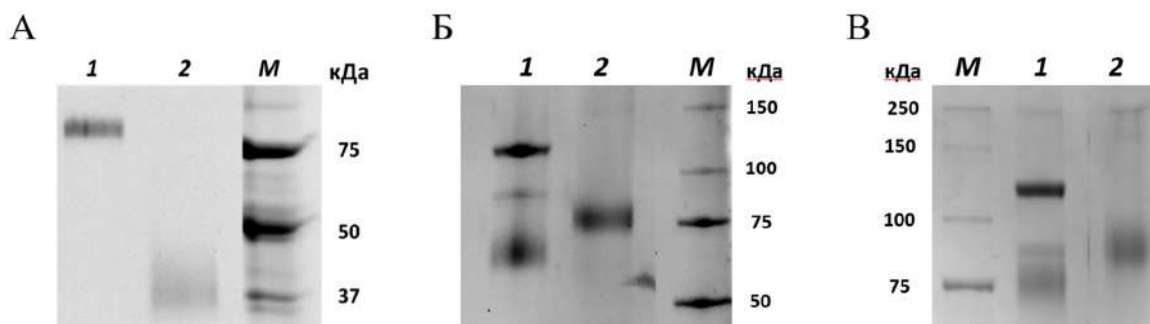


Рисунок 11 – Электрофоретический анализ белковых препаратов антигенов ВГА в 12% полиакриламидном геле: А – СД НА; Б – НА0 А/Hawaii/70/2019 (H1N1); В – НА0 А/Hong Kong/45/2019 (H3N2). 1 – неденатурирующие невосстанавливающие условия; 2 – денатурирующие восстанавливающие условия. М – маркер молекулярного веса белков.

Таким образом, были получены три рекомбинантных антигена вируса гриппа: полноразмерные НА штаммов А/Hawaii/70/2019 (H1N1) и А/Hong Kong/45/2019 (H3N2), а также стеблевой домен НА штамма А/Brisbane/59/2007 (H1N1).

3.2 Получение однодоменных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1, и характеристика их активности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

Как обсуждалось в Главе 1 «Обзор литературы», НА вирусов гриппа типа А принято делить на две филогенетические группы: к группе 1 относятся НА подтипов Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13, Н16, Н17, Н18; остальные подтипы составляют группу 2 (Рисунок 12). На данном этапе диссертационной работы получали однодоменные антитела, активные в отношении гемагглютининов, относящихся к филогенетической группе 1.

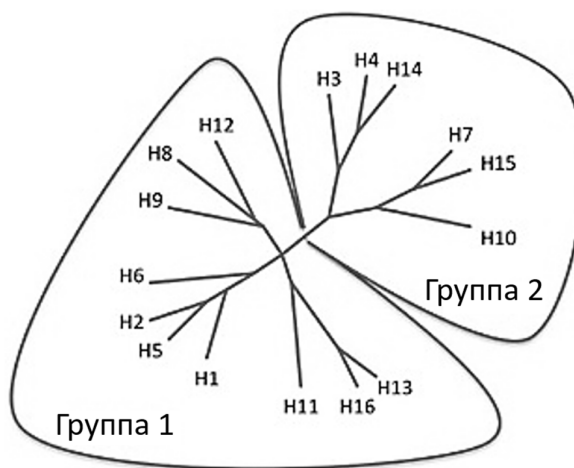


Рисунок 12 – Филогенетическое дерево НА вирусов гриппа типа А.

Для этого фрагменты VHH тяжелоцепочечных иммуноглобулинов семейства Верблюдовых изолировали при помощи методики фагового дисплея. Схема процесса представлена на Рисунке 13.

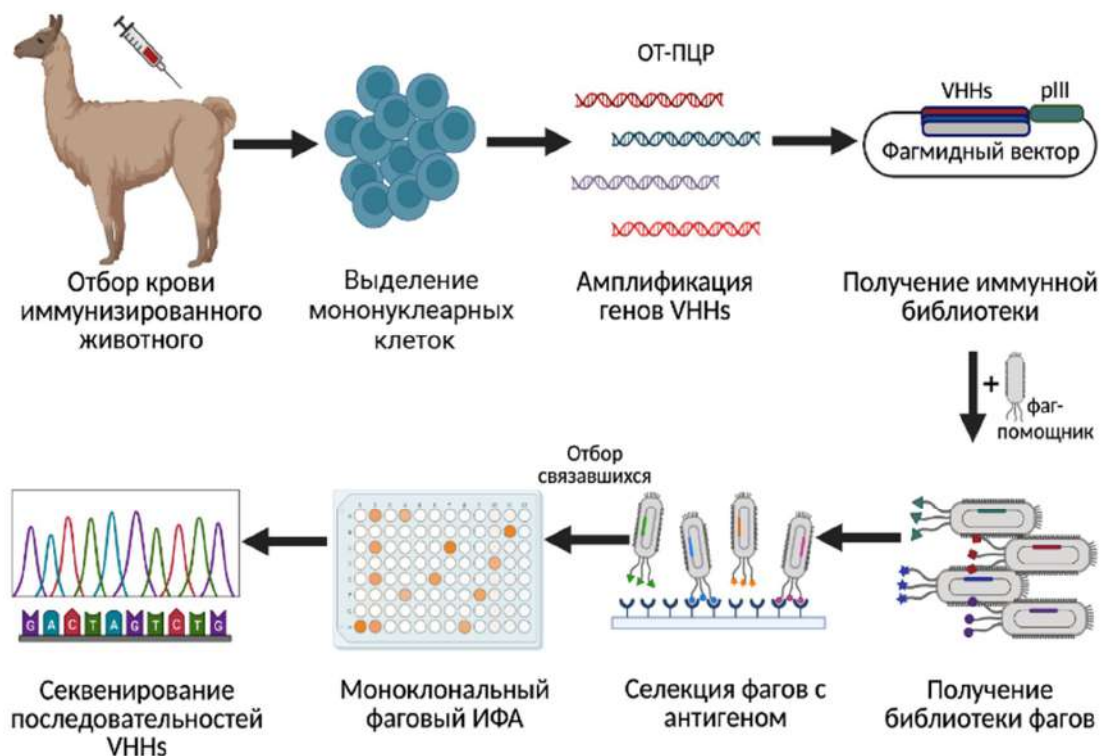


Рисунок 13 – Схема получения иммунной библиотеки и отбор специфических однодоменных антител.

После цикла иммунизаций из крови животного (альпака или верблюда) выделяли фракцию мононуклеарных клеток крови. Из пула этих клеток получали тотальную РНК и на ее матрице синтезировали кДНК, которую далее использовали для амплификации генов VHH в гнездовой ПЦР. Полученные ампликоны, гидролизованные эндонуклеазами рестрикции SfiI и NotI, встраивали в фагмидный вектор pHEN1, где последовательность VHH оказывалась слита с последовательностью поверхностного белка pIII бактериофага, таким образом получая иммунную библиотеку. Данную библиотеку трансформировали в бактерии *E. coli* штамма TG1 и заражали трансформированные клетки фагом-помощником, предоставляющим белки, необходимые для сборки фаговых частиц. В результате получали библиотеку рекомбинантных фагов, на поверхности которых в составе белка pIII представлены однодоменные антитела. Далее проводили селекцию бактериофагов на антигене и удаляли не связавшиеся фаговые частицы. Специфическими фагами, элюированными с использованием трипсина,

трансдуцировали бактериальные клетки и получали обогащенную библиотеку бактериальных клонов. Клоны бактерий, содержащих фагмиды, рассеивали в 96-луночные планшеты и вновь трансдуцировали фагом-помощником для продукции индивидуальных специфических рекомбинантных бактериофагов. Полученные фаги анализировали в моноклональном фаговом ИФА и отбирали клоны, дающие наибольший сигнал. Из соответствующих бактериальных клонов выделяли фагмидную ДНК и секвенировали по Сэнгеру.

3.2.1 Иммунизация животного, получение иммунной библиотеки рекомбинантных бактериофагов и селекция специфических однодоменных антител

Иммунную библиотеку получали, вакцинируя альпака (*Vicugna pacos*) по схеме, указанной на Рисунке 14А.

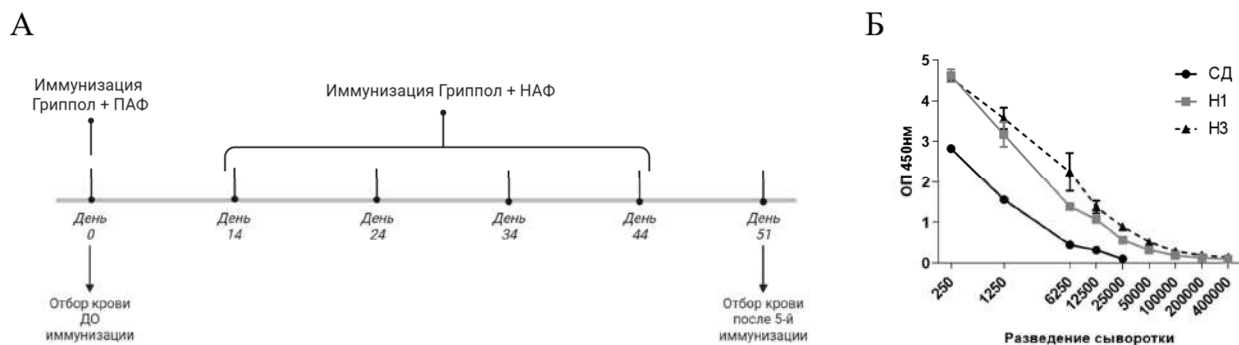


Рисунок 14 – Схема иммунизации альпака субъединичной вакциной Гриппол® (А) и уровень антител в сыворотке альпака после 5-й иммунизации (Б).

Для проведения первичной иммунизации животному подкожно вводили препарат, состоящий из вакцины Гриппол® плюс и полного адъюванта Фрейнда (ПАФ), смешиваемых с в соотношении 1:1 до получения гомогенной суспензии. Гриппол® плюс представляет собой трехвалентную субъединичную инактивированную вакцину, содержащую поверхностные белки вирусов гриппа. В состав вакцины Гриппол® плюс, актуальной на момент выполнения работы, входили НА следующих штаммов: A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09, A/Hong

Kong/4801/2014 (H3N2), B/Brisbane/60/2008. В последующие четыре инъекции Гриппол® плюс сочетали с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ).

Эффективность иммунизации контролировали, определяя уровень НА-специфических антител в сыворотке крови альпака. Титр антител к стеблевому домену (СД НА) составил 1:12500, к НА Н1 и Н3 1:204800 и 1:409600 соответственно, что свидетельствует о формировании выраженного гуморального ответа после цикла иммунизации альпака как к полноразмерным НА, так и непосредственно к СД НА (Рисунок 14Б).

Через 7 дней после последней иммунизации у альпака отбирали 50 мл периферической крови и выделяли пул мононуклеарных клеток, которые использовали для выделения тотальной РНК. Качество полученной РНК оценивали по соотношению A260/280 и A260/230, а также по наличию на электрофореграмме полос, соответствующих 16S и 28S рибосомной РНК (Рисунок 15А). Выделенную РНК использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК с праймерами Oligo d(T)₂₀ и обратной транскриптазой SuperScript IV (Invitrogene, США). Полученную кДНК анализировали методом ПЦР на ген «домашнего хозяйства» GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа).

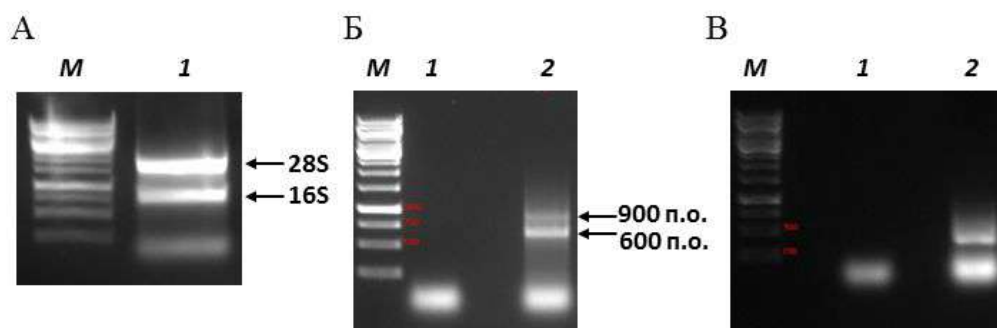


Рисунок 15 – Электрофоретический анализ качества РНК (1), выделенной из мононуклеарных клеток иммунизированного альпака (А). Электрофореграмма первого (Б) и второго (В) раунда гнездовой ПЦР: 1 – отрицательный контроль реакции; 2 – целевой ПЦР-продукт; М – маркер длин ДНК.

На матрице кДНК с помощью высокоточной полимеразы Q5 (New England Biolabs, США) ставили гнездовую ПЦР, позволяющую амплифицировать последовательности однодоменных антител. На первом раунде гнездовой ПЦР амплифицируются фрагменты тяжелых цепей IgG, как классических, так и HcAb, что объясняет присутствие на электрофореграмме двух полос, 900 п.о. и 600 п.о., соответственно (Рисунок 15Б). Целевой продукт длиной 600 п.о. выделяли из геля и использовали как матрицу для второго раунда ПЦР. Праймеры для этого этапа гнездовой ПЦР содержат на своих концах сайты рестриктаз SfiI и NotI, необходимые для дальнейшего клонирования в фагмидный вектор pHEN1 (Рисунок 15В).

ПЦР-продукт, полученный в результате второго раунда ПЦР, клонировали в фагмидный вектор pHEN1 и трансформировали методом электропорации в *E. coli* штамма TG1. Клетки данного штамма формируют на своей поверхности пили, необходимые для инфицирования бактериофагами, а также продуцируют супрессорную тРНК амбер-стоп кодона (UAG), который расположен в фагмиде между последовательностью VNN и белка рIII. Таким образом, в клетках штамма TG1 кодон UAG может как кодировать аминокислоту глутамин, так и терминировать трансляцию. Эффективность супрессии амбер-стоп кодона в *E. coli* штамма TG1 составляет примерно 20%, благодаря чему в дополнение к VNN, представленным на поверхности бактериофага в составе белка рIII, данные клетки могут продуцировать и растворимые антитела.

Далее случайным образом выбирали 32 бактериальных клона, которые анализировали методом ПЦР на наличие вставки. В результате 97% исследованных колоний содержали целевую вставку. Количество полученных трансформированных клеток составило 3×10^6 колоний. Стартовую библиотеку трансформированных клонов *E. coli* TG1 использовали для получения библиотеки фаговых частиц с экспонированными в составе рIII минорного белка оболочки бактериофага фрагментами VNN. В качестве фага-помощника использовали бактериофаг KM13.

Выбор антигена для отбора специфических рекомбинантных бактериофагов является одним из особенно важных этапов при получении VHH. Известно, что в структуре НА наибольшей консервативностью обладает стеблевой домен (СД НА) [155]. Антитела к СД НА, как правило, обладают широким спектром специфической и нейтрализующей активности [182]. В связи с этим в качестве мишени для биопаннинга выбрали рекомбинантный СД НА штамма A/Brisbane/59/2007 (H1N1). Последовательно проводили три раунда селекции, результаты которой контролировали методом поликлонального фагового ИФА.

На следующем этапе получали и анализировали методом моноклонального фагового ИФА индивидуальные клоны с 2 и 3 раундов селекции. Всего было проанализировано около 200 индивидуальных клонов, из которых отобрали 65 клонов, имеющих ОП_{450нм} в ИФА выше 0,25. Данные клоны анализировали при помощи секвенирования по Сэнгеру. Полные аминокислотные последовательности индивидуальных клонов VHH (от FR1 до FR4 включительно) использовали для построения филогенетического дерева с помощью программного обеспечения Geneious Prime 11.0 (Рисунок 16).

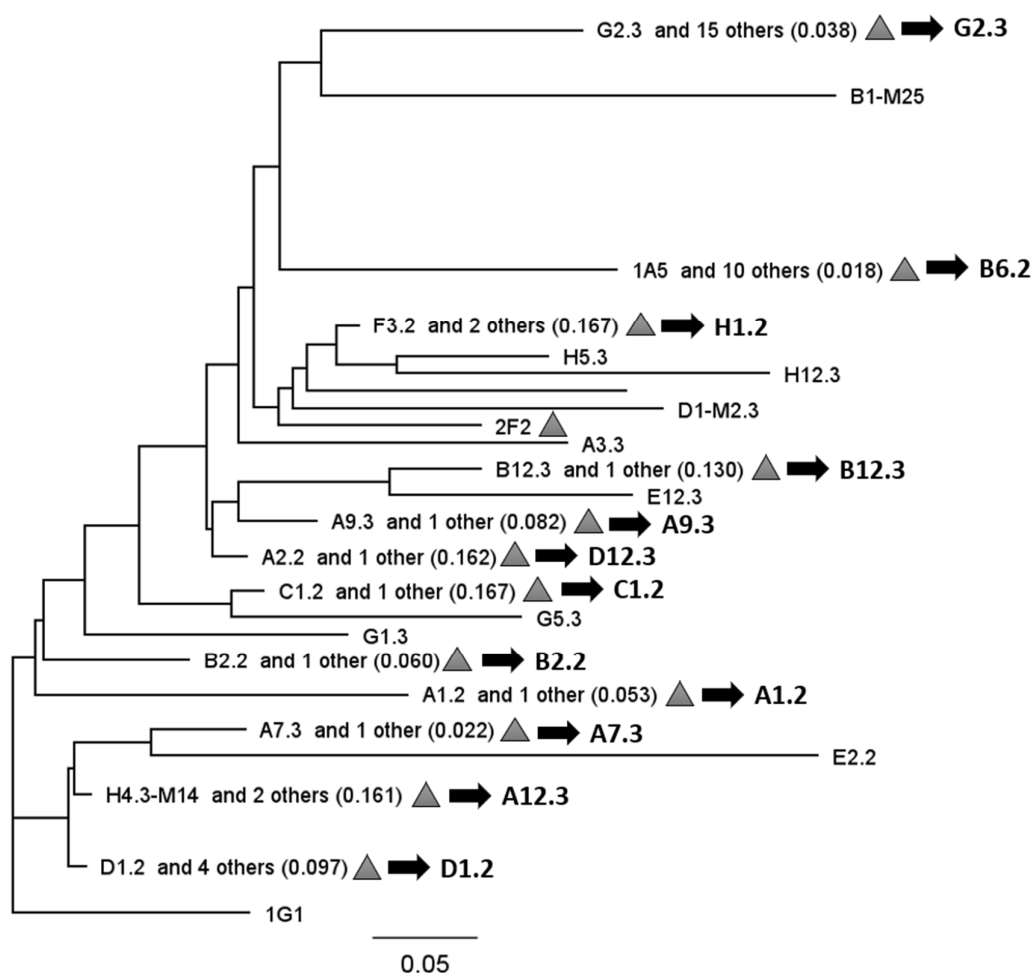


Рисунок 16 – Филогенетическое дерево отобранных индивидуальных клонов. Треугольниками отмечены клоны, выбранные для дальнейшего анализа.

Для дальнейшего анализа отобрали 12 клонов VHH, относящиеся к разным клонотипам, и 1 уникальный клон.

3.2.2 Продукция VHH и определение их специфической активности *in vitro* и *in vivo*

Для получения белковых препаратов отобранных антител, фагмиды pHEN1, содержащие специфические последовательности VHH, трансформировали методом теплового шока в клетки *E. coli* штамма Rosetta (DE3). Белковые препараты VHH очищали из растворимой фракции лизата клеток *E. coli* методом металл-аффинной хроматографии, после чего проводили диализ в ФСБ. Очищенные фракции растворимых белков использовались для анализа экспрессии

методом SDS-PAGE, по результатам которых было показано, что молекулярная масса отобранных VHH составляла 16-17 кДа (Рисунок 17).

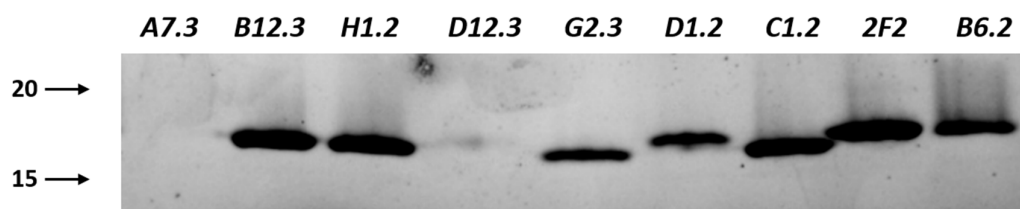


Рисунок 17 – Результаты SDS-PAGE анализа экспрессии некоторых клонов отобранных однодоменных антител.

Согласно полученным данным, экспрессировались индивидуальные клоны B12.3, H1.2, G2.3, D1.2, C1.2, 2F2 и B6.2. Указанные VHH выбрали для дальнейшего исследования.

Определение аффинности однодоменных антител в отношении НА

Далее способность экспрессирующихся VHH связываться с НА подтверждали в твердофазном непрямом ИФА с использованием в качестве антигена СД НА штамма A/Brisbane/59/2007 (H1N1) и полноразмерный НА H1 2009. В результате, высокий уровень специфической активности продемонстрировали клоны 2F2, H1.2 и G2.3, данные представлены на Рисунке 18А и Б. На основании зависимости ОП_{450нм} от концентрации VHH были построены калибровочные кривые и определены значения ЕС₅₀. Значения ЕС₅₀ для СД НА и клонов H1.2, G2.3 и 2F2 составили 0.7, 7.4 и 13.8 нМ, соответственно, а для НА H1 2009 – 0.6, 5.9 и 3.0 нМ. Также для 2F2, H1.2 и G2.3 методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе Biacore 3000 были определены термодинамические характеристики взаимодействия с антигеном СД НА (Рисунок 18В).

Согласно литературным данным, антитела, связывающиеся с СД НА, не обладают активностью в РТГА [17]. Полученные нами данные согласуются с опубликованными ранее: ни одно из исследуемых антител (2F2, H1.2 и G2.3) не тормозило агглютинацию эритроцитов.

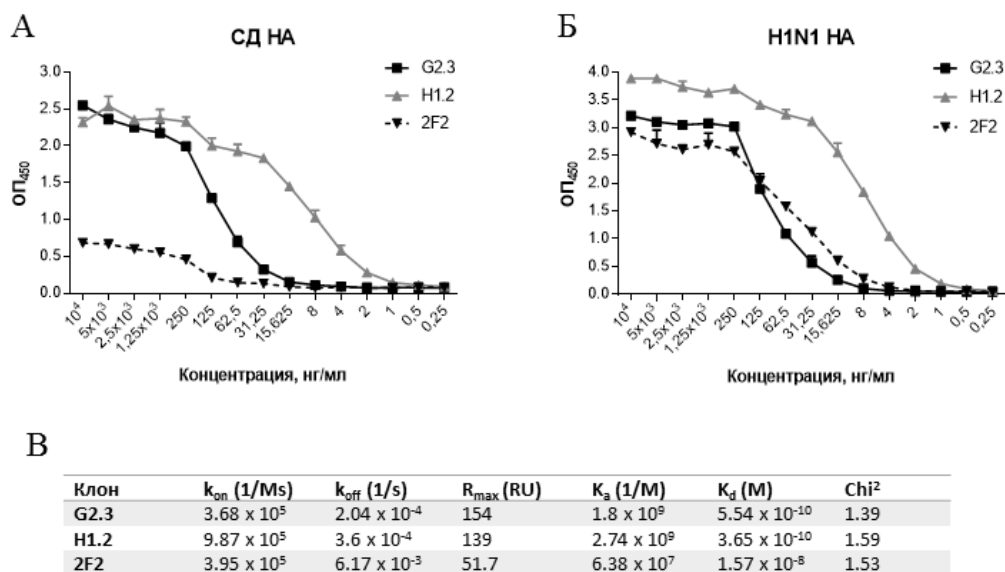


Рисунок 18 – Результаты изучения антиген-специфической активности VNN в непрямом ИФА: А – в качестве антигена использовался СД НА; Б – антиген – НА Н1 2009. В – параметры кинетики взаимодействия VNN и СД НА, определенные методом SPR: k_{on} – константа ассоциации; k_{off} – константа диссоциации; R_{max} – максимальный уровень сигнала; K_a – равновесная константа ассоциации; K_d – равновесная константа диссоциации; χ^2 – критерий хи-квадрат.

Таким образом, было показано наличие специфического взаимодействия VNN как с СД, так и с полноразмерным НА. Значения K_d коррелируют со значениями, полученными в непрямом ИФА: самые низкие равновесные константы диссоциации (наномолярный диапазон) характерны для антител H1.2 и G2.3. Несмотря на сопоставимую с этими клонами EC_{50} в ИФА на полноразмерном НА, клон 2F2 показал существенно более низкую специфическую активность и аффинность на СД НА. На основании проведенных *in vitro* экспериментов для дальнейшей характеристики были отобраны клоны H1.2 и G2.3, обладающие наибольшей аффинностью (K_d 3.65×10^{-10} и 5.54×10^{-10} М, соответственно).

Изучение кросс-реактивности и нейтрализующих свойств однодоменных антител к НА филогенетических групп 1 и 2

Спектр различных штаммов ВГА, с которыми способны связываться антитела H1.2 и G2.3, определяли в непрямом ИФА с рекомбинантными НА0

белками (Рисунок 19). Взаимодействие VHH оценивали с НА, относящихся как к филогенетической группе 1, так и к группе 2. Результаты ИФА показали, что H1.2 и G2.3 связываются только с НА филогенетической группы 1 (Рисунок 19А).

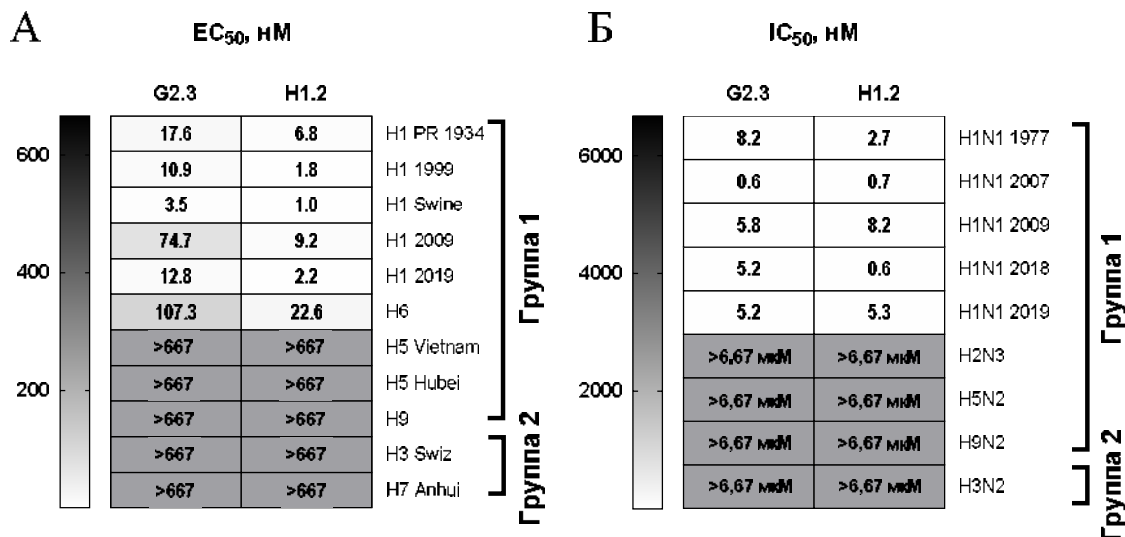


Рисунок 19 – Результаты исследования спектра взаимодействия и нейтрализации VHH. А – тепловая карта значений EC₅₀; Б – тепловая карта значений IC₅₀. На рисунке и в тексте использовано сокращенное название используемых антигенов и вирусов, их расшифровка приведена в Главе 2.

Согласно полученным данным, однодоменные антитела эффективно взаимодействуют с широким спектром НА подтипа H1, который охватывает штаммы, циркулировавшие с 1934 года по настоящее время, и, в том числе штамм гриппа свиней (на Рисунке 8 обозначен как «H1 Swine»). Также, H1.2 и G2.3 связываются с НА подтипа H6, который в основном обнаруживается у диких птиц; однако, данные VHH не взаимодействовали с НА подтипов H5 и H9.

Спектр вируснейтрализующей активности VHH оценивали при помощи реакции микронейтрализации (РН) с нативными вирусами гриппа типа А, относящихся к филогенетической группе 1 или 2, на клетках MDCK (Рисунок 19Б). Как видно из представленных данных, однодоменные антитела G2.3 и H1.2 обладают выраженной вируснейтрализующей активностью в отношении вирусов подтипов H1N1, циркулировавших в популяции с 1977 года, а также вируса H1N1

птиц (отмечен на Рисунке 19Б как «H1N1 2018»). Однако, мономерные формы VHH не были способны ингибировать цитопатическое действие ВГА подтипов H2N3, H5N2, H9N2 и H3N2, что согласуется с результатами ИФА.

Суммарно, полученные результаты свидетельствуют о том, что отобранные VHH обладают широким спектром связывания и нейтрализации ВГА филогенетической группы 1 преимущественно подтипа H1. Также показано взаимодействие VHH G2.3 и H1.2 с НА подтипа H6.

Исследование протективной активности одноклоновых антител на мышинной модели летальной инфекции ВГА

Далее оценивали эффективность отобранных VHH *in vivo* на модели летальной инфекции мышей (Рисунок 20). Мышам линии BALB/c за 1 час до заражения интраназально (и.н.) вводили антитела в дозе 1 мг/кг (в случае опытных групп), либо ФСБ (для контрольной группы). Спустя час, мышей и.н. инфицировали адаптированным к мышам вирусом A/California/07/2009 (H1N1) в дозе 5 ЛД₅₀. Ежедневно в течение 14 дней после заражения мышей взвешивали и осматривали на предмет наличия клинических признаков инфекции. При снижении массы тела на 25% и более животных гуманным способом эвтаназировали.

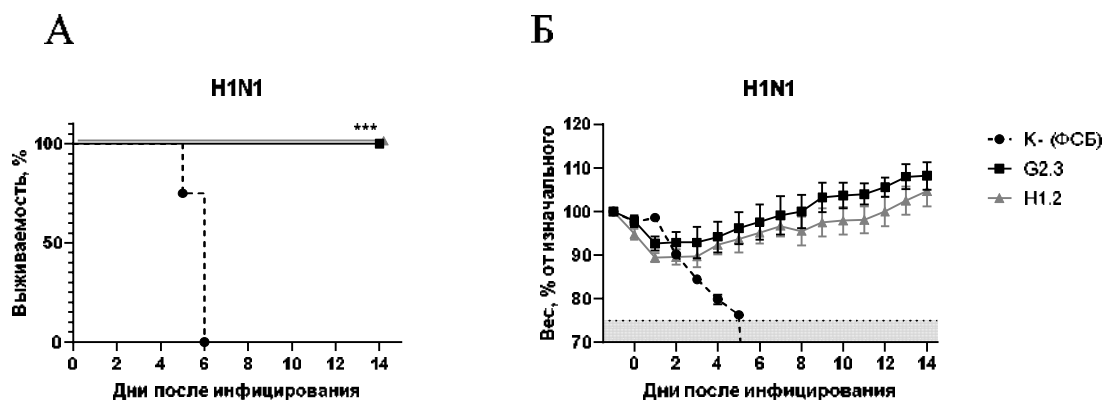


Рисунок 20 – Динамика выживаемости (А) и массы тела (Б) мышей после профилактического введения VHH и последующего заражения A/California/07/2009 (H1N1). Контрольная группа получала ФСБ и на графике обозначена как «К- (ФСБ)».

В контрольной группе все животные пали к 6 дню после инфицирования, в то время как мыши, получавшие антитело G2.3 или H1.2, были защищены от летального исхода (Рисунок 20А). Также, потеря веса животных из опытных групп в среднем не превышала 10% от изначальной массы тела и к концу эксперимента все мыши восстановили свой изначальный вес или превысили его (Рисунок 20Б). Исходя из полученных данных, можно сделать вывод о 100% протективности однодоменных антител G2.3 и H1.2 против летальной дозы адаптированного к мышам ВГА A/California/07/2009 (H1N1) при и.н. введении.

3.3 Получение тяжелоцепочечных моноклональных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1, и изучение их активности *in vitro* и *in vivo*

Для применения в качестве терапевтического препарата против вирусной инфекции, необходимо поддерживать в системном кровотоке достаточно высокие концентрации антител. Поскольку период полувыведения VHH не превышает 90 минут, необходимо модифицировать однодоменные антитела для увеличения времени их циркуляции в крови. Также, ранее было показано, что Fc-опосредованные функции иммуноглобулинов являются важным механизмом элиминации различных вирусных инфекций, в том числе и вызываемых вирусами гриппа [80, 99, 116, 225, 279]. Поэтому, с целью увеличения связывающей способности однодоменных антител и продолжительности их циркуляции в системном кровотоке, а также добавления им эффекторных функций, к нуклеотидной последовательности VHH добавляли последовательность Fc фрагмента IgG1 человека (Рисунок 21А).

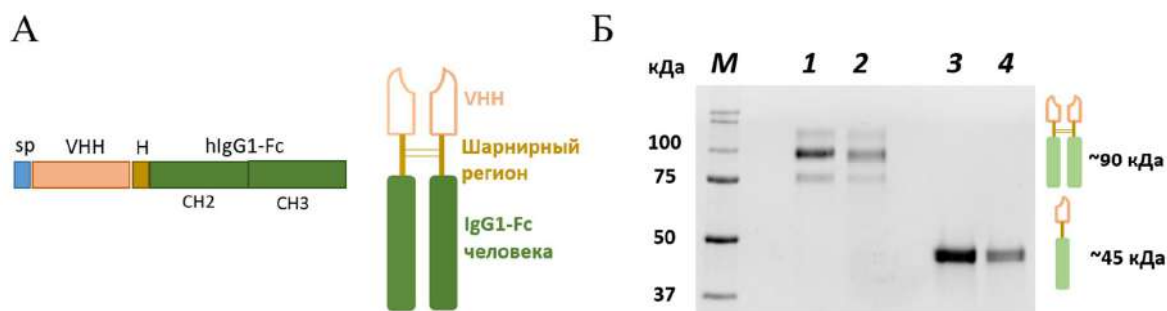


Рисунок 21 – Схематическое изображение конструкции, кодирующей VHH-Fc, и структуры VHH-Fc (A): sp – сигнальный пептид; VHH – ген однодоменного антитела; H – шарнирный регион IgG1 человека; hIgG1-Fc – Fc-фрагмент IgG1 человека. Б – результаты SDS-PAGE полученных препаратов антител: 1 и 3 – G2.3-Fc в неденатурирующих и денатурирующих условиях; 2 и 4 – H1.2-Fc в неденатурирующих и денатурирующих условиях. Наличие полос с Mw ~90 кДа в образцах в неденатурирующих условиях говорит о димеризации VHH-Fc.

Субтип IgG1 является подклассом выбора для разработки средств терапии на основе мАт, поскольку Fc IgG1 эффективно связывается с C1q и различными Fc-рецепторами, обеспечивая тем самым активацию Fc-опосредованных функций, необходимых для элиминации вируса (АЗКЦ, АЗКФ и КЗЦ).

3.3.1 Получение слитых с Fc-фрагментом однодоменных антител, связывающихся с НА филогенетической группы 1

Плазмидные конструкции на основе вектора pFUSE, несущие гены мономеров VHH, слитых с Fc-фрагментом IgG1, получали при помощи методов молекулярного клонирования:

- Нуклеотидную последовательность антитела G2.3, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека – pFUSE-G2.3-Fc;
- Нуклеотидную последовательность антитела H1.2, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека – pFUSE-H1.2-Fc.

Полученные плазмиды использовали для постановки транзientной трансфекции клеток линии CHO-S. После 10 дней инкубации клеточную суспензию осветляли центрифугированием и супернатант использовали для

аффинной очистки антител с использованием сорбента с белком А. Транзientную трансфекцию клеток для экспрессии антител и их хроматографическую очистку проводили совместно с к.б.н. Есмагамбетовым И.Б. (в.н.с. лаб. стромальной регуляции иммунитета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Чистоту полученных препаратов, а также димеризацию молекул VHH-Fc оценивали с помощью SDS-PAGE, результаты которого представлены на Рисунке 21Б. Полученные данные подтверждают высокую степень очистки и димеризацию антител.

Специфическую активность VHH-Fc исследовали с помощью иммуноблоттинга с НА в неденатурирующих невосстанавливающих условиях (Рисунок 22А и Б). Полученные данные демонстрируют специфическое связывание VHH-Fc как с мономерной формой НА Н1 2009 (полоса с молекулярной массой ~75 кДа), так и с ди- и тримерной формой (полосы выше 75 кДа).

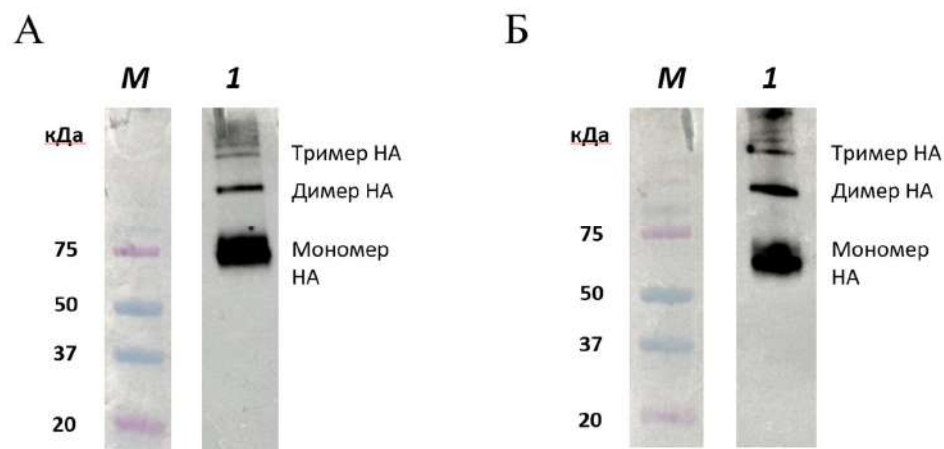


Рисунок 22 – Вестерн-блот анализ специфичности антител G2.3-Fc (А) и H1.2-Fc (Б) к НА Н1 2009 в неденатурирующих условиях. М – маркер молекулярного веса белков.

Таким образом была подтверждена чистота полученных препаратов мАт, формирование димеров VHH-Fc, а также связывание слитых с Fc-фрагментом антител с НА.

3.3.2 Изучение кросс-реактивности и нейтрализующих свойств тяжелоцепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1

Аналогично мономерным формам VHH, для VHH-Fc определяли спектр связывающей и нейтрализующей активности в непрямом ИФА и РН, соответственно (Рисунок 23).

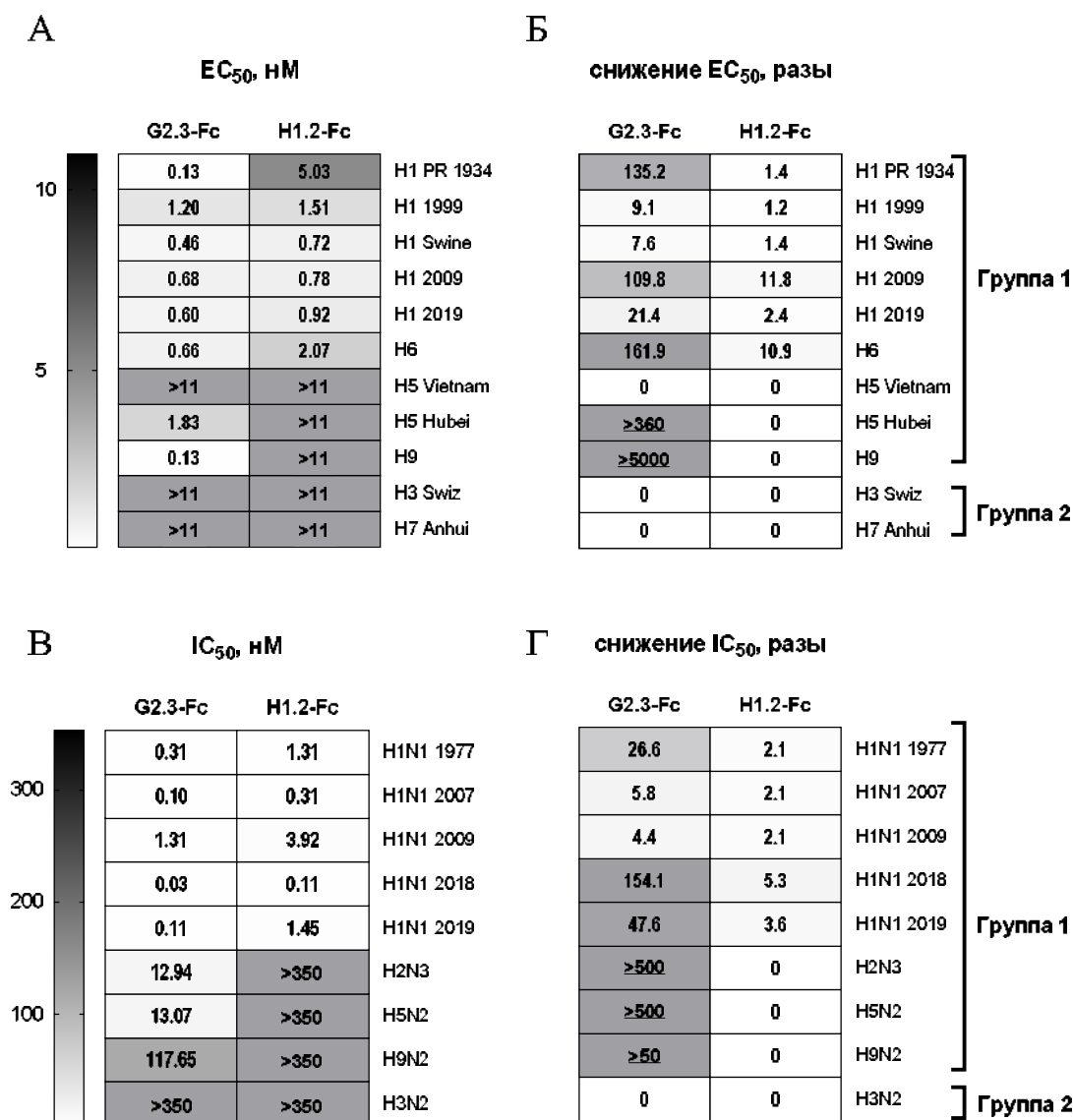


Рисунок 23 – Результаты исследования спектра взаимодействия и нейтрализации VHH-Fc. А – тепловая карта значений EC₅₀. Б – таблица, показывающая во сколько раз, снизились значения EC₅₀ для VHH после их

модификации в сравнении с мономерной формой. В – тепловая карта значений IC_{50} . Г – таблица, показывающая, во сколько раз снизились значения IC_{50} для VHH после их модификации в сравнении с мономерной формой. Нижнее подчеркивание выделяет подтипы, в отношении которых связывающая или нейтрализующая активность была зарегистрирована только после слияния с Fc.

Согласно результатам ИФА, значения EC_{50} , определенные для каждого из VHH-Fc, находились в наномолярном диапазоне (Рисунок 23А). Модификация Fc-фрагментом увеличила способность G2.3-Fc и H1.2-Fc связываться с НА различных штаммов ВГА группы 1. Наибольшее изменение активности наблюдалось для G2.3-Fc в отношении НА подтипов H1 PR 1934, H1 2009 и H6: EC_{50} снизилась в 135.2, 109.8 и 161.9 раз, соответственно (Рисунок 23Б). Более того G2.3-Fc, в отличие от мономера G2.3, связывалось с НА подтипов H5 и H9. Для H1.2-Fc выраженное снижение EC_{50} было характерно для НА H1 2009 и H6 (11.8 и 10.9 раз, соответственно). Также, в отличие от G2.3-Fc, H1.2-Fc не взаимодействовало с НА подтипов H5 или H9.

Полученные в РН данные подтверждали результаты ИФА (Рисунок 23В). Наиболее выраженные изменения в противовирусной активности были характерны для G2.3-Fc: его IC_{50} для вирусов H1N1 1977, 2018 и 2019 годов снизилась в 26.6, 154.1 и 47.6 раз, соответственно (Рисунок 23Г). Также, в сравнении с моновалентной формой, G2.3-Fc показал наличие вируснейтрализующей активности в отношении ВГА подтипов H2, H5 и H9. Таким образом, было показано, что слитые с Fc-фрагментом однодоменные антитела, в сравнении с моновалентной формой VHH, характеризовались более эффективным связыванием с антигеном и нейтрализацией ВГА, при этом наиболее выраженная разница между VHH и VHH-Fc была характерна для G2.3-Fc. Также, G2.3-Fc обладал более широким спектром активности в пределах филогенетической группы 1, нежели H1.2-Fc.

3.3.3 Исследование активации Fc γ R тяжелопечечными антителами, специфичных к НА филогенетической группы 1

Исходя из полученных на предыдущих этапах работы данных, для дальнейшего исследования был выбран клон G2.3-Fc, так как он обладает более широким спектром связывающей и нейтрализующей активности в сравнении с H1.2-Fc.

Далее оценивали функциональность Fc-фрагмента в составе VHH-Fc и способность антител задействовать эффекторные функции, поскольку предыдущие исследования указывают на важную роль Fc-опосредованных функций специфичных к «стеблю» антител в элиминации гриппозной инфекции *in vivo* [76]. Взаимодействие Fc-области антитела с рецептором CD16 или CD32 на поверхности соответствующих иммунных клеток приводит к индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКИ) или антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), соответственно. Возможность НА-специфической активации Fc γ R VHH-Fc исследовали с помощью репортерных клеточных линий Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 и Jurkat-Lucia™ NFAT-CD32 (InvivoGen, США). Данные клеточные линии содержат NFAT-индуцируемый репортерный ген люциферазы Lucia и стабильно экспрессируют на мембране молекулы CD16 или CD32 – Fc γ R, связывающие константную область IgG. Таким образом, при добавлении целентеразина (люциферин) в клеточном супернатанте удастся легко отследить активацию NFAT, опосредованную взаимодействием с CD16 или CD32 фрагмента Fc молекулы иммуноглобулина, связанного с целевым антигеном. Данный эксперимент выполнялся совместно с к.б.н. Джаруллаевой А.Ш. (лаб. клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Предварительно, для оценки доступности для VHH-Fc эпитопов на экспонированном на клеточной мембране НА проводили ИФА с клетками, инфицированными различными ВГА. Согласно полученным данным, сигнал антитела G2.3-Fc в лунках с инфицированными клетками достоверно отличается от такового в контрольных лунках с неинфицированными клетками (Рисунок 24).

Полученные данные свидетельствуют о доступности эпитопов НА, представленного на поверхности клетки, для связывания с VHH-Fc.

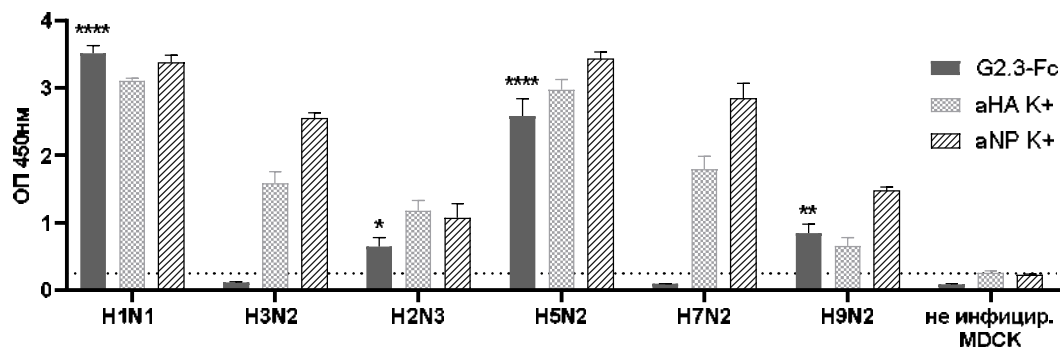


Рисунок 24 – Результаты ИФА с клетками MDCK, инфицированными различными ВГА. аНА K⁺ – контрольные антитела к НА подтипа Н1 или Н3; аNP K⁺ – контрольные антитела к NP белку ВГА. Звездочками отмечено статистически значимое увеличение сигнала в сравнении с неинфицированными клетками.

Затем проводили анализ активации АЗКЦ и АЗКФ, в ходе которого было показано, что G2.3-Fc, в отличие от моновалентной формы G2.3, успешно индуцирует оба исследуемых механизма (Рисунок 25).

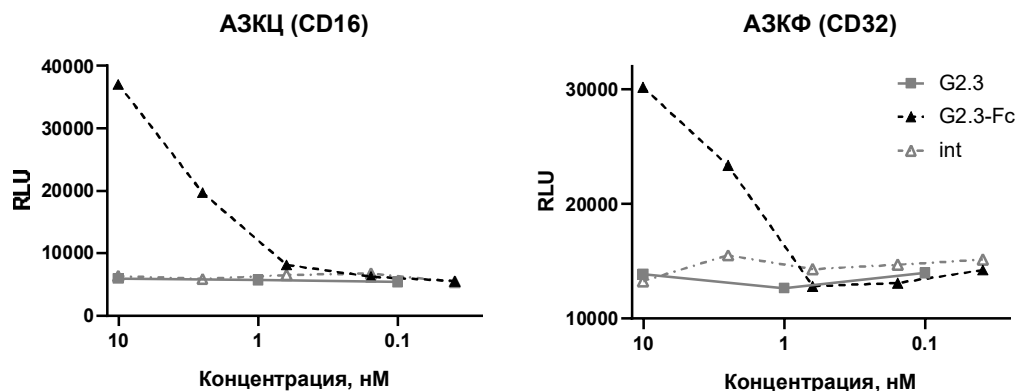


Рисунок 25 – Результаты исследования активации G2.3-Fc эффекторных функций АЗКЦ и АЗКФ с использованием в качестве таргетных клеток MDCK, инфицированных ВГА A/Duck/mallard/Moscow/4970/2018 (H1N1). Результаты выражены в RLU – относительных единицах люминесценции.

Из полученных данных следует, что слияние с фрагментом Fc позволяет VHH-Fc эффективно задействовать эффекторные функции в ответ на связывание с НА.

3.3.4 Исследование эффективности тяжелоцепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1, *in vivo* для профилактики инфекции, вызванной ВГА

Изучение эффективности VHH-Fc *in vivo* проводили с использованием летальной модели инфекции, вызванной вирусами гриппа, у мышей.

Среди ВГА филогенетической группы 1, подтипы Н1 и Н2 в прошлом были причиной возникновения пандемий гриппа («Испанка» 1918г., «Азиатский грипп» 1957 г., «Свиной грипп» 2009г.). Кроме того, эксперты полагают, что с вирусами подтипов Н5 и Н9 может быть связано появление будущих пандемических штаммов [6]. В связи с этим, было принято решение исследовать эффективность профилактического введения антитела G2.3-Fc *in vivo* в отношении ВГА подтипов Н1, Н2, Н5 и Н9.

Системный путь введения, а именно внутривенный (в.в.) путь, является самым распространённым способом доставки терапевтических мАт у людей [208]. Однако, ввиду технической сложности выполнения в.в. инъекций у мелких грызунов, в доклинических исследованиях возможна замена в.в. введения на внутрибрюшинное (в.б.) [193, 231].

На первом этапе мышам в.б. вводили VHH-Fc в дозе 10 мг/кг за 24 часа до заражения 5 ЛД₅₀ адаптированного к мышам вируса A/Victoria/2570/2019 (H1N1), A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 (H2N3), A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) или A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2). В течение 14 дней после инфицирования мышей ежедневно взвешивали и регистрировали выживаемость (Рисунок 26). Согласно полученным данным, G2.3-Fc эффективно защищало мышей как от летального исхода, так и от развития инфекции, вызванной вирусами H1N1, H2N3, H5N2 или H9N2, о чем свидетельствует отсутствие снижения веса у животных в опытных группах. При этом все мыши в контрольных группах,

получавшие ФСБ, стремительно теряли в весе и погибали, либо достигали конечной точки (снижение веса >25%) к 7 суткам после заражения.

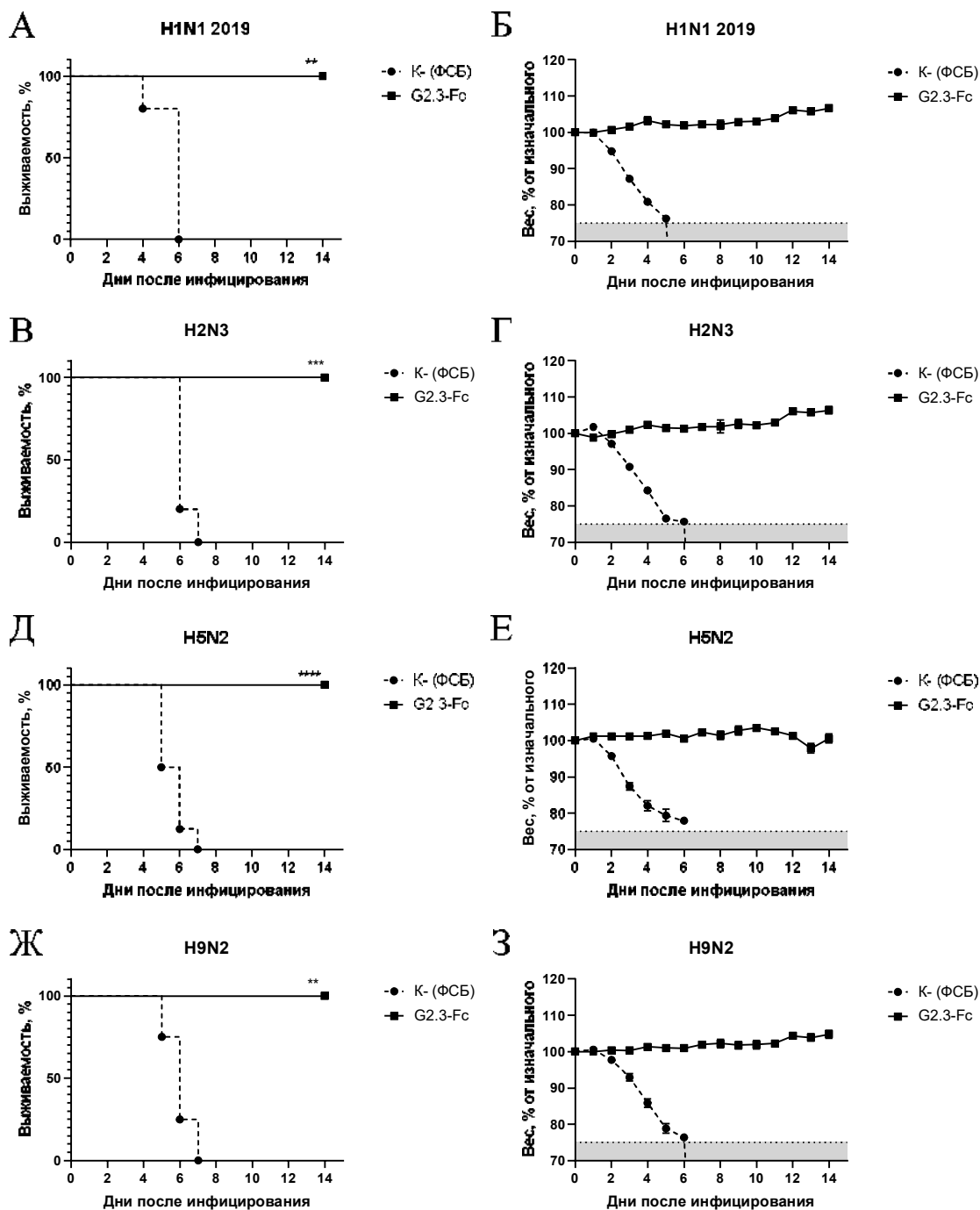


Рисунок 26 – Исследование эффективности системного профилактического введения G2.3-Fc. Динамика выживаемости и изменения массы тела мышей после заражения: А и Б – A/Victoria/2570/2019(H1N1); В и Г – A/BlackDuck/NewJersey/

1580/78(H2N3); Д и Е – A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84(H5N2); Ж и З – A/Swine/Hong Kong/9A-1/98(H9N2).

Затем исследовали протективность системного введения G2.3-Fc в более низких дозах (Рисунок 27). Животные в.б. получали VHH-Fc в дозе 3 мг/кг или 0,6 мг/кг за 24 часа до заражения 5 ЛД₅₀ адаптированного к мышам вируса A/California/07/2009 (H1N1) или A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). В течение 14 дней после инфицирования мышей ежедневно взвешивали и регистрировали выживаемость. Так, G2.3-Fc в дозе 3 мг/кг и 0,6 мг/кг продемонстрировало 100% протективность при заражении вирусами H1N1 и H5N2. У мышей, получавших антитела, также не наблюдалось снижение веса. В контрольных группах мыши погибали к 7 дню после инфицирования.

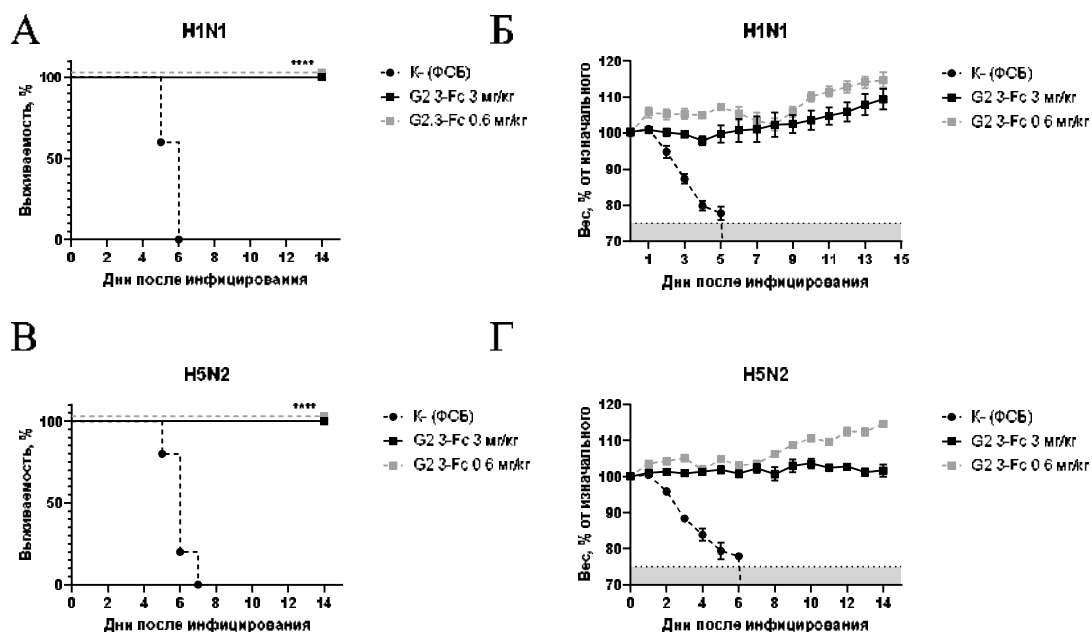


Рисунок 27 – Динамика выживаемости и изменения массы тела мышей после заражения: А и Б – A/California/07/2009 (H1N1); В и Г – A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2).

Для того, чтобы оценить влияние системной доставки антител на репликацию ВГА в легких мышей, животным вводили 3 мг/кг или 0,6 мг/кг VHH-Fc за 24 часа до заражения 5 ЛД₅₀ A/California/07/2009 (H1N1) или A/Mallard

duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2). На 3-й день после заражения мышей эвтаназировали и отбирали легкие для определения инфекционного титра вирусов (Рисунок 28). Согласно полученным данным, при системном введении 3 мг/кг G2.3-Fc в профилактическом режиме титр вируса H1N1 или H5N2 в легких животных снижался до неопределяемых значений (предел детекции 1,5 lg ТЦД₅₀/мл). G2.3-Fc в дозе 0,6 мг/кг обеспечивало защиту мышей от летального исхода (Рисунок 27В и Г), однако не оказывало существенного влияния на размножение вируса H1N1 или H5N2 в легких испытуемых животных (Рисунок 28).

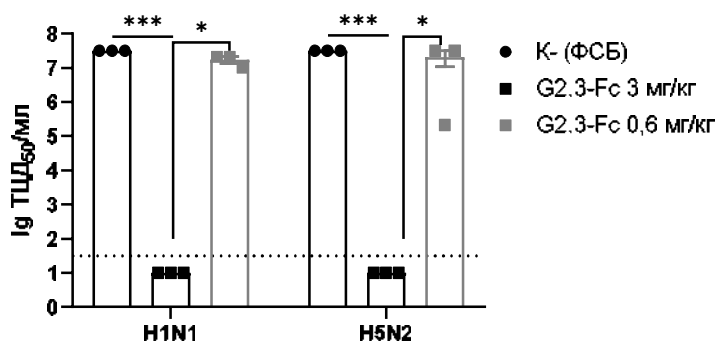


Рисунок 28 – Инфекционный титр ВГА в легких мышей. Пунктирной линией обозначен предел обнаружения метода.

Таким образом, было показано, что системное профилактическое введение G2.3-Fc обеспечивает 100% защиту животных от летальной инфекции, вызванной ВГА подтипов H1 и H5 в дозе 0,6 мг/кг, а также подтипов H2 и H9 в дозе 10 мг/кг.

3.3.5 Исследование *in vivo* эффективности тяжелоцепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1, для терапии инфекции, вызванной ВГА

Эффективность терапевтического применения антитела G2.3-Fc *in vivo* оценивали путем инфицирования мышей линии BALB/c вирусом гриппа H1N1 (A/California/07/2009) в дозе 5ЛД₅₀ и последующего в.б. введения антитела в разные временные точки. В течение 14 дней после инфицирования мышей ежедневно взвешивали и регистрировали выживаемость (Рисунок 29).

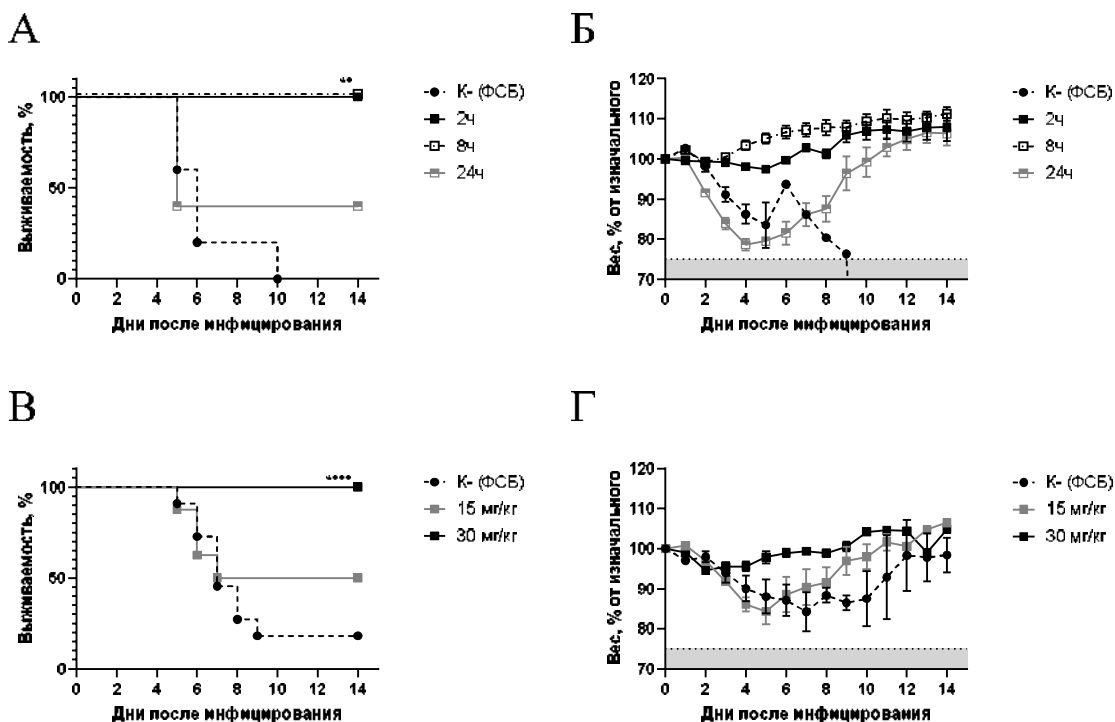


Рисунок 29 – Исследование эффективности терапевтического введения G2.3-Fc: А и Б – динамика выживаемости (А) и изменения массы тела (Б) мышей после введения G2.3-Fc в разные интервалы времени после заражения A/California/07/2009 (H1N1); В и Г – динамика выживаемости (В) и изменения массы тела (Г) мышей после введения G2.3-Fc в разных дозах спустя 24 часа после заражения A/California/07/2009 (H1N1).

На первом этапе исследовали протективность введения G2.3-Fc в дозе 10 мг/кг спустя различные интервалы времени после инфицирования животных (Рисунок 29А и Б). Было показано, что антитело в данной дозировке при введении через 2 или 8 часов после заражения приводит к полной протекции мышей как от развития клинических признаков заболевания (не наблюдали снижение веса в опытных группах), так и от летального исхода. В случае терапевтического введения G2.3-Fc спустя 24 часа выживало 40% животных, статистической значимости в выживаемости между данной группой мышей и контрольной группой не обнаружено.

На следующем этапе, антитело G2.3-Fc вводили в более высоких дозах спустя 24 часа после инфицирования (Рисунок 29В и Г). Так, G2.3-Fc в дозе 15 мг/кг обеспечивало 50% выживаемость животных, в то время как при введении 30 мг/кг протективность увеличивалась до 100%. При этом в группе, получавшей 15 мг/кг G2.3-Fc отмечали снижение массы тела в среднем на 16%; в то время как при введении 30 мг/кг антитела изменение массы тела мышей составило менее 5%. Полученные данные свидетельствуют о высоком потенциале G2.3-Fc для терапевтического применения.

Таким образом, было показано, что препарат антитела G2.3-Fc обладает выраженным противовирусным действием в режиме терапевтического введения.

3.3.6 Механизм противовирусного действия тяжелоцепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1

Известно, что нейтрализация вирусов гриппа антителами может осуществляться посредством различных механизмов, осуществляемых на разных стадиях жизненного цикла вируса, включая ингибирование прикрепления вируса, блокирование слияния мембран в поздней эндосоме, ограничение процесса сборки и активацию эффекторных функций [154]. Принимая во внимание опубликованные данные, на следующем этапе работы определяли механизм противовирусного действия G2.3-Fc.

Для того, чтобы оценить, насколько эффективно G2.3-Fc способно ингибировать интернализацию или выход вируса из клетки, использовали модифицированную методику РН, как описано в разделе «Материалы и методы». Согласно полученным с использованием вируса H1N1 2019 (A/Victoria/2570/2019) результатам, IC_{50} , ингибирующая выход вирионов из клетки, составила 1,52 нМ, в то время как IC_{50} для интернализации вируса составила 0,5 нМ. Таким образом, G2.3-Fc блокирует как проникновение, так и выход вируса из клетки, однако более эффективно подавляет проникновение ВГА в клетку.

Затем исследовали влияние антитела на процесс слияния мембран. Этот процесс состоит из двух стадий, на которые могут влиять антитела: расщепление

НА трипсин-подобными протеазами клетки-хозяина и индуцированное низким pH конформационное изменение НА. Первоначально моделировали протеолитическую активацию НА с помощью трипсина-TPCK в присутствии VHH-Fc; расщепление НА подтверждали с помощью SDS-PAGE в денатурирующих условиях (Рисунок 30А). Результаты показали, что G2.3-Fc, так же, как и контрольное антитело к СД НА, SD38-Fc [158], не могло предотвратить протеазное расщепление НА.

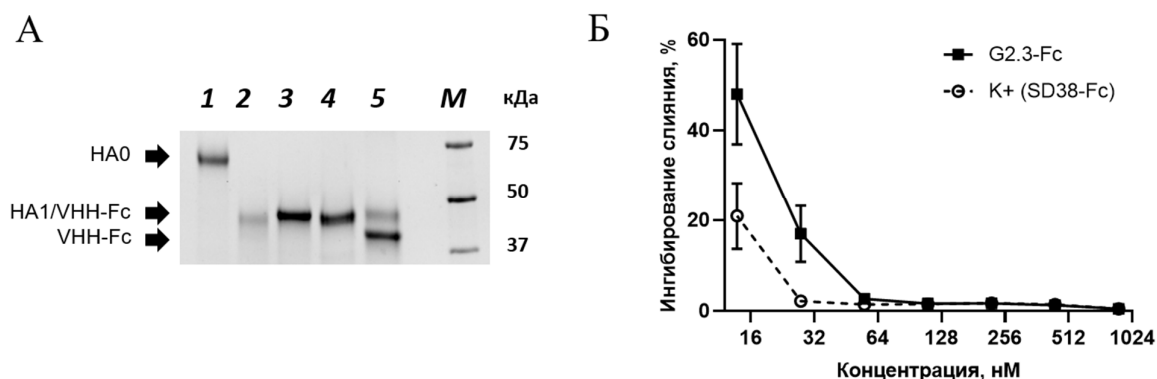


Рисунок 30 – Исследование влияния G2.3-Fc на процесс слияния мембран. А – анализ ингибирования протеазного расщепления НА: 1 – НА Н1 (~65–67 кДа) в денатурирующих условиях; 2 – продукт расщепления НА Н1: НА1 (~45 кДа), полоса, соответствующая НА2, не показана; 3 – НА Н1, предварительно инкубированный с G2.3-Fc, полоса, соответствующая НА1, перекрывается с полосой, соответствующей одиночной цепи VHH-Fc; 4 – НА Н1, предварительно инкубированный с p2.C5-Fc (VHH-Fc к S-белку вируса SARS-CoV-2), полоса, соответствующая НА1, перекрывается с полосой, соответствующей VHH-Fc; 5 – НА Н1, предварительно инкубированный с контрольным антителом, SD38-Fc, полоса, соответствующая НА1, отделяется от одиночной цепи VHH-Fc. Б – анализ ингибирования гемолиза на примере вируса A/California/07/2009 (H1N1), отражающий процесс конформационных изменений НА под действием низкого pH и последующей фузии мембран.

Далее для того, чтобы изучить возможность ингибирования G2.3-Fc конформационных изменений НА, использовали анализ ингибирования гемолиза.

Когда НА связывается с сialовыми кислотами куриных эритроцитов, он претерпевает конформационные изменения при обработке буфером с низким значением pH, формируя поры на поверхности клеток, через которые гемоглобин выходит из клеток. Как видно из представленных на Рисунке 30Б данных, G2.3-Fc ингибировал гемолиз; минимальная концентрация антитела, обеспечивающая полное ингибирование фузии, составила 55,1 нМ. В совокупности эти результаты показывают, что G2.3-Fc блокирует интернализацию вируса, вмешиваясь в процесс слияния мембран.

Таким образом, было показано, что тяжелопепочечное антитело G2.3-Fc блокирует как выход вирусного потомства из клетки, так и интернализацию ВГА. Механизм противовирусного действия данного антитела связан с ингибированием фузии, путем предотвращения конформационных изменений НА под действием низкого pH.

3.3.7 Характеристика эпитопной специфичности тяжелопепочечных антител, связывающихся с НА филогенетической группы 1

Первоначально, для локализации эпитопа G2.3-Fc в молекуле НА проводили конкурентный ИФА с контрольным VHH-Fc, в качестве которого брали описанное ранее антитело широкого спектра к СД НА SD38-Fc [158]. Исходя из данных рентгеноструктурного анализа, как сообщалось в Главе 1 «Обзор литературы», эпитоп SD38-Fc располагается в области А-спирали стеблевого домена НА. В результате конкурентного ИФА было показано, что VHH G2.3 конкурирует за связывание с SD38-Fc (Рисунок 31А). Полученные данные позволяют предположить, что G2.3-Fc имеет перекрывающийся с SD38-Fc эпитоп.

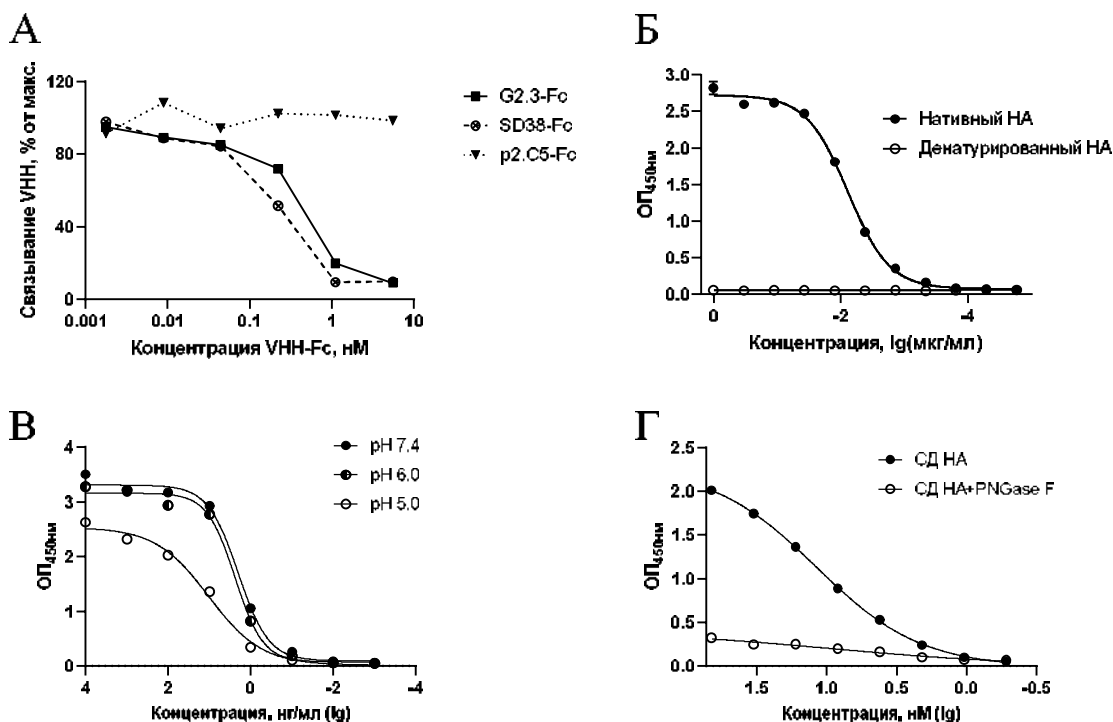


Рисунок 31 – Изучение эпитопной специфичности G2.3-Fc. А – результаты конкурентного ИФА мономера G2.3 с антителами в формате VNN-Fc; p2.C5-Fc – нерелевантное VNN-Fc к S-белку вируса SARS-CoV-2. Б – результаты ИФА с денатурированным HA Н1 2009. В – ИФА с HA Н1 2009, обработанным трипсином-TPCK и буферами с различными pH. Г – результаты ИФА, показывающие изменение аффинности G2.3 к CD HA при дегликозилировании антигена с помощью эндогликозидазы PNGase F.

Далее, с целью установить, является ли эпитоп G2.3-Fc конформационным или линейным, проводили ИФА с денатурированным и нативным HA Н1 2009. Было продемонстрировано, что G2.3-Fc теряет способность узнавать HA после денатурации, что говорит о конформационной природе его эпитопа (Рисунок 31Б).

Также оценивали связывание G2.3-Fc с HA, претерпевающим конформационные изменения под действием снижения pH. Для этого HA Н1 2009, иммобилизованный в лунках иммунологического планшета, подвергали протеолитическому расщеплению с помощью трипсина-TPCK, инкубировали в буферах с различным значением pH, и далее проводили ИФА по стандартному

протоколу. Таким образом, имитируется процесс, происходящий в поздней эндосоме клетки, инфицированной ВГА, и который приводит к слиянию мембран. Согласно полученным данным, при снижении pH связывающая активность VNN-Fc значительно падает (Рисунок 31В). Это свидетельствует о том, что существенная перестройка молекулы НА, особенно его «стебля», в условиях низкого pH, приводит к разрушению эпитопа G2.3-Fc.

С целью оценки влияния гликозилирования на взаимодействие антитела G2.3-Fc с НА, проводили твердофазный непрямой ИФА с рекомбинантным СД НА в его нативной и дегликозилированной формах (Рисунок 31Г). Согласно полученным данным, дегликозилирование антигена приводит к значительному падению сигнала (снижение значений ОП_{450нм} в 6,2 раза в лунках с максимальной концентрацией антитела 1 мкг/мл) в сравнении с нативной формой СД НА. Полученные данные, вероятно, свидетельствуют о наличии в эпитопе антитела G2.3-Fc гликанов, необходимых для его связывания с НА.

Таким образом, было установлено, что эпитоп G2.3-Fc располагается в стеблевом домене НА, перекрывается с эпитопом контрольного антитела SD38-Fc, является конформационным и включает N-связанные гликаны.

Затем, используя ВГА H1N1 2019 (A/Victoria/2570/2019), для антитела G2.3-Fc получали эскейп-мутант путем пассирования вируса в присутствии увеличивающейся концентрации G2.3-Fc на клетках MDCK. Индивидуальные эскейп-мутанты выделяли из первого вирусного пассажа, способного реплицироваться в присутствии максимальной концентрации G2.3-Fc – 360 мкг/мл, и анализировали наличие нуклеотидных замен при помощи секвенирования по Сэнгеру. Четыре клона эскейп-мутанта содержали две одинаковые аминокислотные замены в НА2 субъединице: T393N и H455L (T49N и H111L по нумерации НА2 субъединицы). Таким образом, в позиции 49 полярная аминокислота треонин сменилась на также полярную аминокислоту аспарагин; в свою очередь, в позиции 111 произошла замена положительно заряженной аминокислоты гистидин на гидрофобную – лейцин. Дополнительно, все вирусы, включая те, которые пассировались без присутствия антитела, приобрели

адаптационные к клеточной культуре мутации в глобулярном домене HA1 субъединицы: K173E, D204V, A212E, Q240R.

Анализ ленточной диаграммы HA показал, что а.о. Т49 располагается в А-спирали, аминокислота Н111 – в С-спирали HA2 субъединицы (Рисунок 32А). Известно, что эпитоп SD38-Fc также расположен в области А-спирали, что подтверждает результаты конкурентного ИФА, показавшие перекрывание эпитопов антител G2.3-Fc и SD38-Fc (Рисунок 30А). Аминокислота Т49 в трехмерной структуре HA легко доступна для связывания с антителами, в отличие от Н111, которая частично экранируется HA1 субъединицей (Рисунок 32Б).

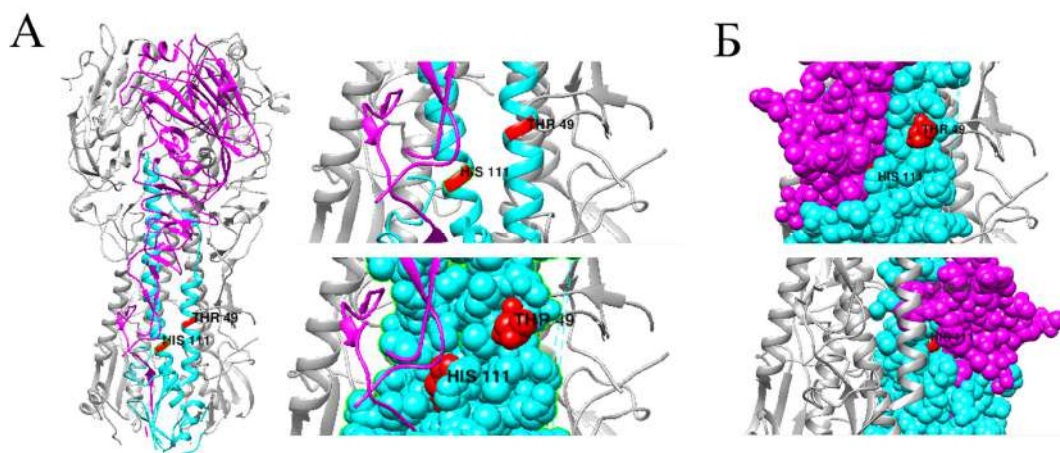


Рисунок 32 – Локализация а.о., заменившихся в эскейп-мутанте под влиянием G2.3-Fc. Показаны на структуре тримера HA штамма A/California/04/2009(H1N1) (PDB ID 3AL4). HA1 субъединица одного мономера окрашена пурпурным цветом, HA2 – бирюзовым; два других мономера выкрашены в серый цвет; красным цветом выделены а.о. Т49 (Thr49) и Н111 (His111). А – ленточная диаграмма тримера HA. Б – трехмерная структура мономера HA в цвете, два других мономера (серые) представлены в виде ленточной диаграммы.

Из представленных результатов следует, что эпитоп G2.3-Fc является конформационным и высококонсервативным среди HA филогенетической группы 1 и затрагивает аминокислоты в составе А-спирали HA2-цепи.

3.4 Получение однодоменных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2, и характеристика их активности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

3.4.1 Иммунизация животного, получение иммунной библиотеки рекомбинантных бактериофагов и селекция специфических однодоменных антител

На следующем этапе работы, двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) иммунизировали препаратом рекомбинантного НА A/Hong Kong/45/2019 (H3N2) (далее сокращенно НЗ НК), адсорбированного на гидроксиде алюминия, 5 раз, с интервалом 14 дней между первой и второй инъекцией и 10 дней между последующими (Рисунок 33А). Эффективность иммунизации контролировали, определяя уровень НЗ-специфических антител в сыворотке крови верблюда (Рисунок 33Б). Титр антител к НЗ НК составил 1: 1 968 300, что свидетельствует о формировании выраженного гуморального ответа после цикла иммунизации верблюда.

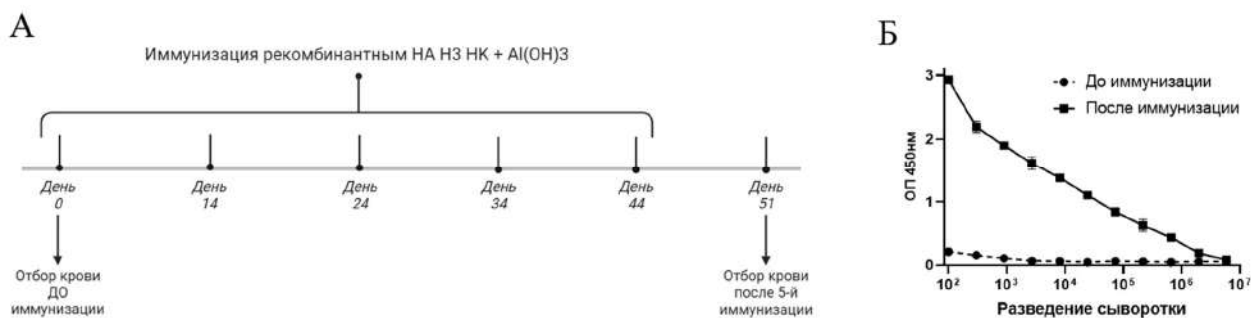


Рисунок 33 – Схема иммунизации *C. Bactrianus* (А) и уровень антител к НА НЗ (A/Hong Kong/45/2019) в сыворотке крови верблюда после 5-й иммунизации (Б).

Последующие этапы работы по получению иммунной библиотеки проводили в соответствии с п. 3.2.1 Главы «Результаты собственных исследований». В итоге была получена библиотека клеток *E. coli* штамма TG1 сложностью $1,4 \times 10^7$ колоний. Стартовую библиотеку трансформированных клонов TG1 использовали для получения библиотеки фаговых частиц с экспонированными в составе рП

белка оболочки бактериофага фрагментами VHH. В качестве фага-помощника использовали бактериофаг KM13.

Далее проводили две независимые селекции специфических рекомбинантных бактериофагов методом фагового дисплея. Первый вариант биопаннинга осуществляли на рекомбинантном НЗ НК, которым иммунизировали животное. Для второго варианта селекции был выбран инактивированный вирус A/Aichi/2/68 (H3N2). Гемагглютинин данного ВГА филогенетически далек от НА НЗ НК – степень гомологии аминокислотных последовательностей НА двух штаммов составляет 85,2%. Использование для селекции гетерологичной мишени предположительно способствует отбору клонов, обладающих более широким спектром связывания. Последовательно было проведено два раунда для селекции на рекомбинантном НА и три раунда селекции на инактивированном вирусе H3N2. Обогащение фаговой библиотеки НЗ-специфическими фагами контролировали методом поликлонального фагового ИФА.

На следующем этапе получали и анализировали индивидуальные клоны методом моноклонального фагового ИФА. Для последующего секвенирования выбрали 96 клонов, специфичных для рекомбинантного НА НЗ или специфичных вирусу H3N2, и имеющих ОП_{450нм} в ИФА выше 0,25. Данные клоны анализировали при помощи секвенирования по Сэнгеру, которое выполнялось в лаборатории анализа геномов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России под руководством к.б.н., доцента Ворониной О.Л.

Аминокислотные последовательности индивидуальных клонов использовали для построения филогенетического дерева с помощью программного обеспечения Geneious Prime 11.0 (Рисунок 34).

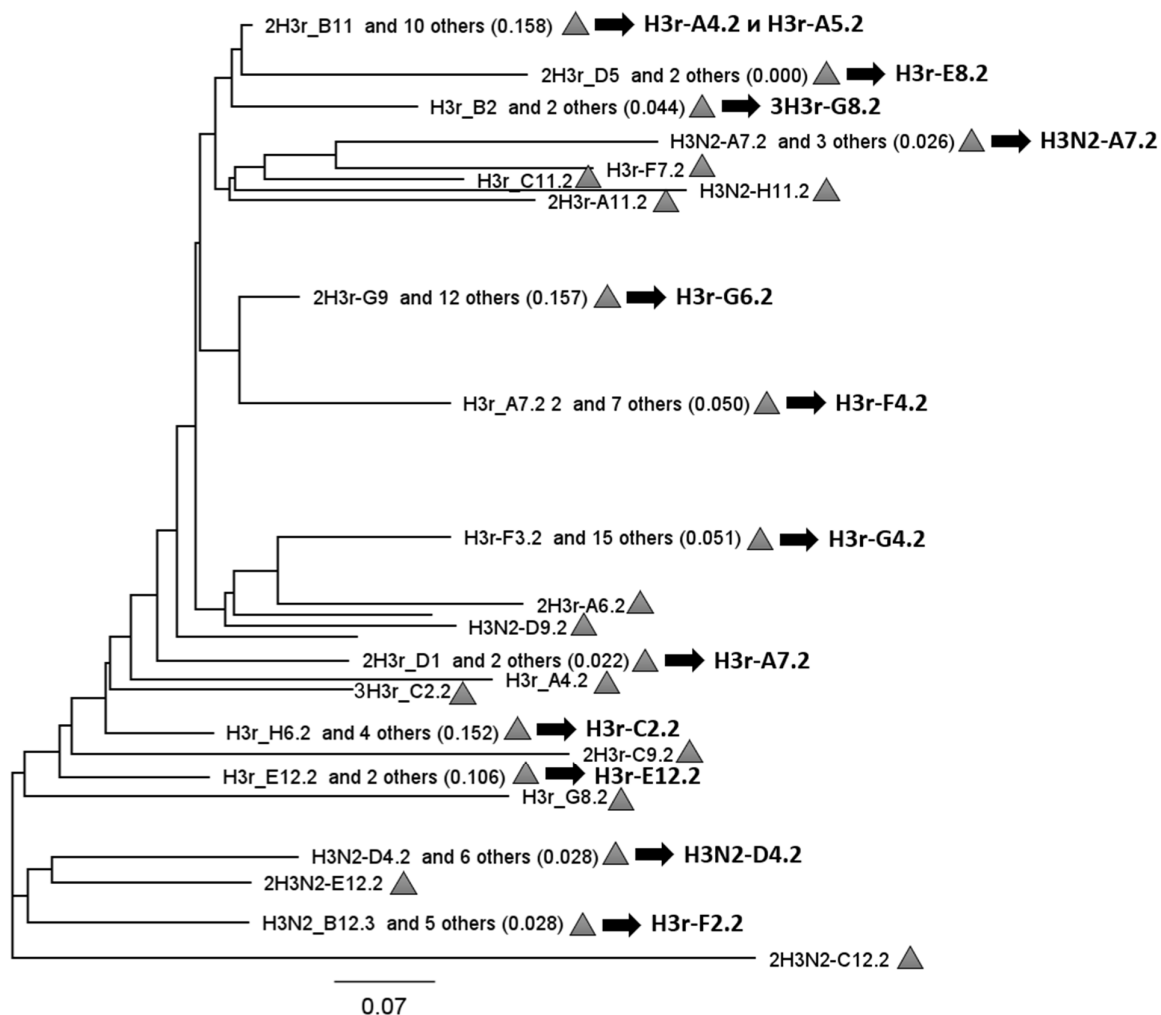


Рисунок 34 – Филогенетическое дерево отобранных индивидуальных клонов. Треугольниками отмечены клоны, выбранные для дальнейшего анализа.

Для дальнейшего анализа были выбраны 12 клонов, относящихся к различным клонотипам, и 12 уникальных клонов.

3.4.2 Продукция VHH и определение их специфической активности *in vitro*

Для продукции и очистки отобранных VHH фагмиду pHEN1, содержащую специфическую последовательность VHH, трансформировали методом теплового шока в клетки *E. coli* штамма Rosetta (DE3). Препарат VHH очищали из растворимой фракции лизата клеток *E. coli* методом металл-аффинной хроматографии, после чего проводили диализ в ФСБ. Очищенные фракции растворимых белков использовали для анализа экспрессии методом SDS-PAGE, по

результатам которого было показано, что молекулярная масса отобранных антител составляла 16-18 кДа (Рисунок 35).

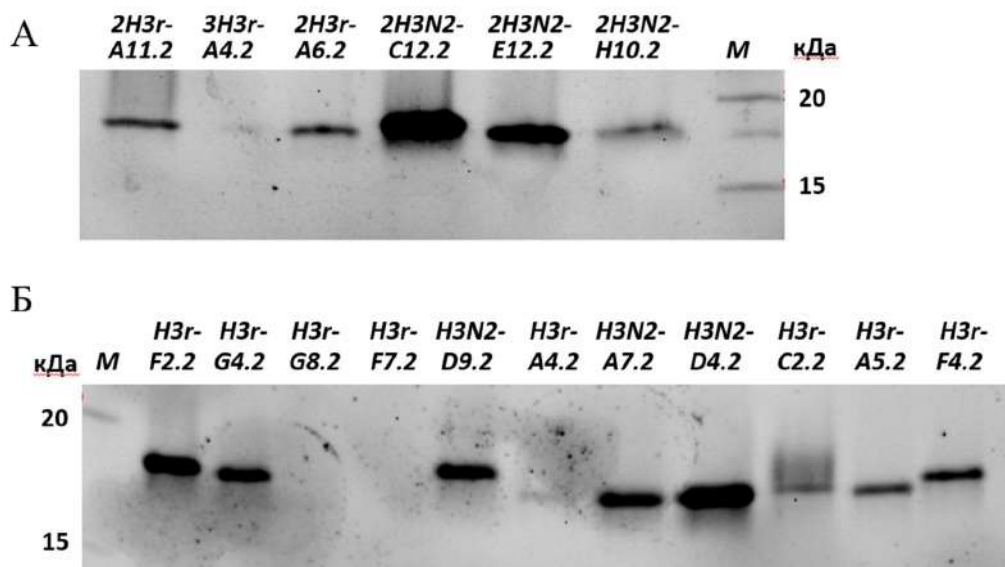


Рисунок 35 – Результаты SDS-PAGE анализа экспрессии некоторых отобранных клонов VHH (А и Б). М – маркер молекулярного веса белков.

Из 25 исследованных VHH экспрессировались 22 индивидуальных клон, которые подвергали дальнейшему анализу.

Определение связывающей и нейтрализующей активности однодоменных антител *in vitro*, а также исследование их кросс-реактивности к НА филогенетической группы 1 и 2

Далее активность очищенных однодоменных антител подтверждали в твердофазном непрямом ИФА на рекомбинантном НА НЗ НК и инактивированном вирусе НЗН2 (Рисунок 36). Из всех исследованных VHH для оценки кросс-реактивности отобрали 7 клонов с наибольшим сигналом на НЗ НК (H3r-A5.2, H3r-C2.2, H3r-C11.2, 2H3r-A6.2, 2H3N2-E12.2, H3N2-D4.2 и H3N2-D9.2; далее в тексте для упрощения: A5.2, C2.2, C11.2, A6.2, E12.2, D4.2 и D9.2).

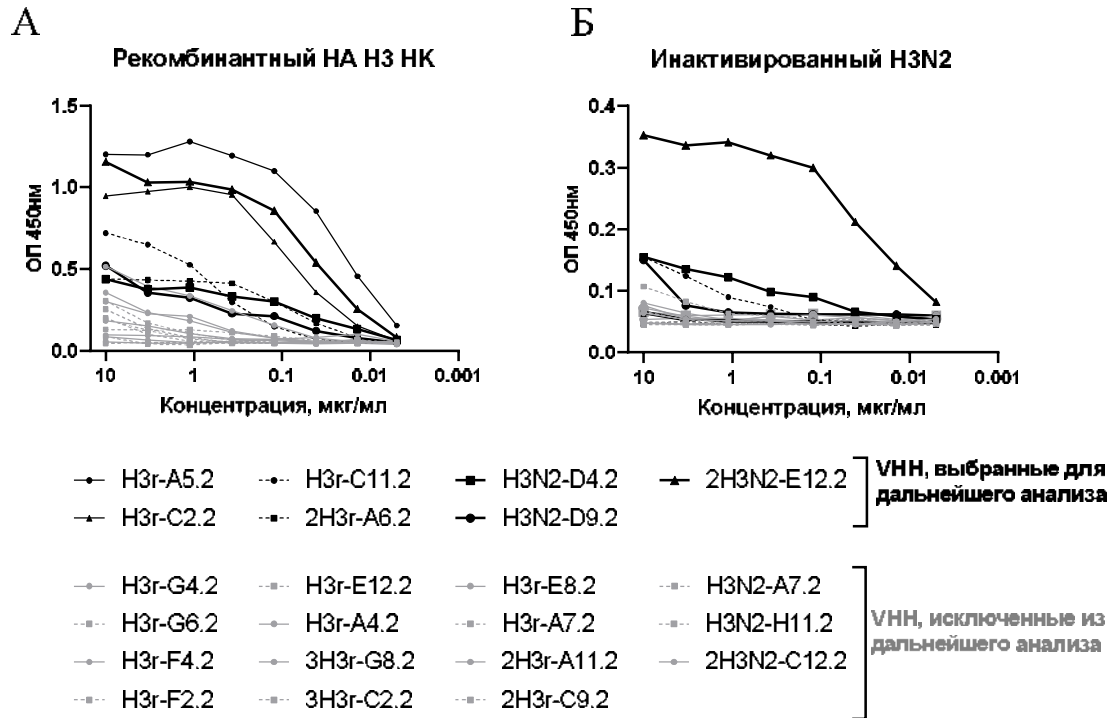


Рисунок 36 – Результаты изучения антиген-специфической активности VНН в непрямом ИФА: А – в качестве антигена использовался НА НЗ НК; Б – антиген – инактивированный вирус НЗН2 Aichi.

Изучение кросс-реактивности отобранных VНН осуществляли при помощи ИФА с использованием в качестве антигенов различных рекомбинантных НА (эктодомен НА0 и субъединица НА1). На основании зависимости ОП_{450nm} от концентрации однодоменного антитела были построены калибровочные кривые и определены значения ЕС₅₀, представленные на Рисунке 37. Результаты данного анализа показали, что отобранные VНН связываются только с НА группы 2, при этом наибольшим спектром кросс-реактивности обладали E12.2, D4.2 и D9.2. Также стоит отметить, что E12.2 и D9.2, помимо полноразмерного НА, узнавали субъединицу НА1.

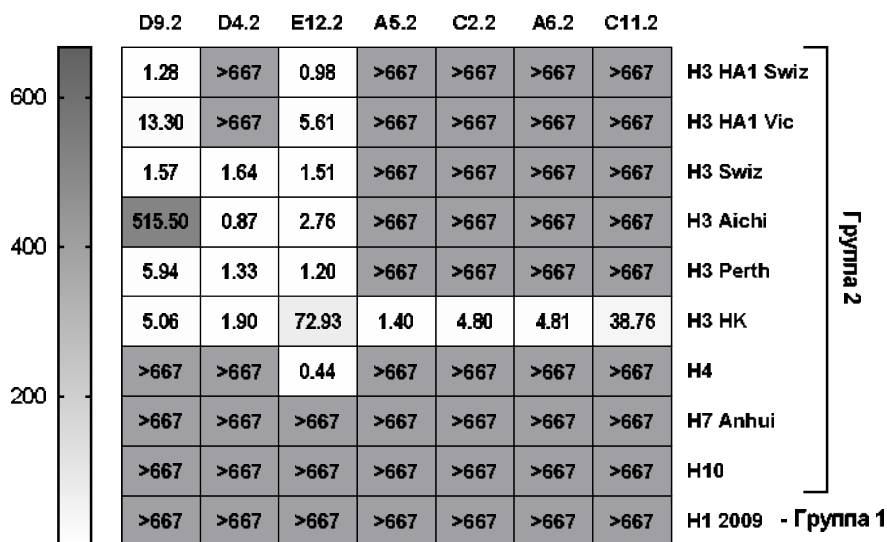


Рисунок 37 – Результаты исследования спектра взаимодействия VNN в виде тепловой карты значений ЕС₅₀.

Согласно результатам, полученным в ходе исследования нейтрализующей активности указанных VNN, ни одно из них не обладало способностью ингибировать проникновение и/или выход вируса из клетки. Также не наблюдалось активности в анализе РТГА. Однако, учитывая широкий спектр активности антител E12.2, D4.2 и D9.2, данные клоны отобрали для последующих исследований.

Для проведения оценки протективности указанных однодоменных антител *in vivo* было принято решение модифицировать их путем присоединения Fc-фрагмента, поскольку E12.2, D4.2 и D9.2 не обладали прямым вируснейтрализующим действием, и, следовательно могли реализовать свой противовирусный потенциал через эффекторные функции, опосредованные Fc-фрагментом. Помимо этого, как было указано ранее, такая модификация может повысить аффинность связывания антитела и антигена за счет увеличения валентности, а также пролонгировать время циркуляции антитела в кровеносном русле.

3.5 Получение тяжелоцепочечных моноклональных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2, и изучение их активности *in vitro* и *in vivo*

3.5.1 Получение слитых с Fc-фрагментом однодоменных антител, связывающихся с НА филогенетической группы 2

Плазмидные конструкции на основе вектора pFUSE, несущие гены мономеров VHH, слитых с Fc-фрагментом IgG1, получали при помощи методов молекулярного клонирования:

- Нуклеотидную последовательность антитела E12.2, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека – pFUSE-E12.2-Fc;
- Нуклеотидную последовательность антитела D4.2, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека – pFUSE-D4.2-Fc;
- Нуклеотидную последовательность антитела D9.2, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека – pFUSE-D9.2-Fc.

Полученные плазмиды использовали для постановки транзientной трансфекции клеток линии CHO-S. После 10 дней инкубации клеточную суспензию осветляли центрифугированием и супернатант использовали для аффинной очистки антител. Транзientную трансфекцию клеток для экспрессии антител и их хроматографическую очистку проводили совместно с Рябовой Е.И. и Прокофьевым В.В. (лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Чистоту полученных препаратов, а также димеризацию молекул VHH-Fc оценивали с помощью SDS-PAGE, результаты которого представлены на Рисунке 38. Полученные данные подтверждают высокую степень очистки и димеризацию антител.

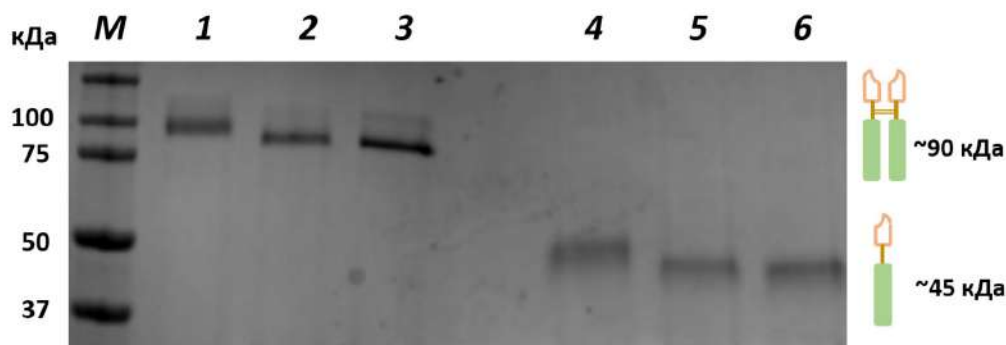


Рисунок 38 – Результаты SDS-PAGE анализа полученных препаратов антител: 1 и 4 – D9.2-Fc в неденатурирующих и денатурирующих условиях; 2 и 5 – E12.2-Fc в неденатурирующих и денатурирующих условиях; 3 и 6 – D4.2-Fc в неденатурирующих и денатурирующих условиях; М – маркер молекулярного веса белков. Наличие полос с молекулярной массой ~90 кДа в образцах в неденатурирующих условиях говорит о формировании димеров VHH-Fc.

Специфическую активность VHH-Fc исследовали с помощью иммуноблоттинга с НА подтипа H3, результаты которого представлены на Рисунке 39. Оценка специфичности VHH-Fc методом вестерн-блот показала, что все отобранные антитела распознают как мономерную, так и ди- и тримерную формы HA0 H3 Swiz.

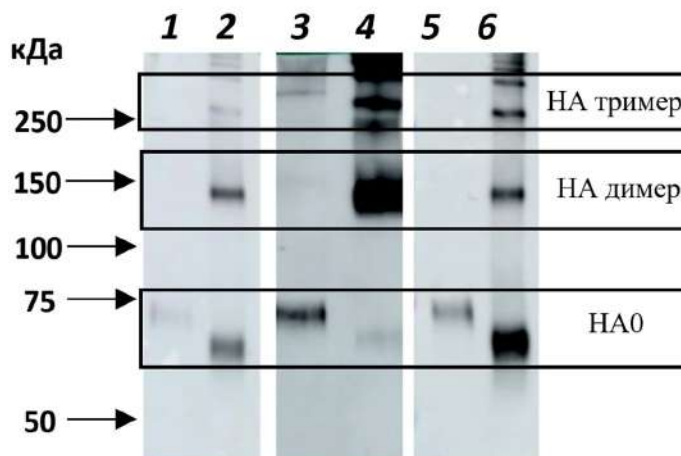


Рисунок 39 – Вестерн-блот анализ специфичности антител D9.2-Fc (1, 2), D4.2-Fc (3, 4) и E12.2-Fc (5, 6) к HA0 H3 Swiz в денатурирующих восстанавливающих (1, 3, 5) и неденатурирующих невосстанавливающих (2, 4, 6) условиях.

Таким образом, были получены препараты VHH-Fc, подтверждена их чистота и димеризация, а также показано специфическое связывание полученных антител с НА подтипа H3.

3.5.2 Изучение *in vitro* активности и кросс-реактивности тяжелоцепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2

Спектр связывающей активности для VHH-Fc определяли в непрямом ИФА. Согласно полученным результатам, значения EC_{50} , определенные для каждого из VHH-Fc, находились в наномолярном диапазоне (Рисунок 40А). Введение Fc фрагмента в структуру молекулы VHH повышало эффективность связывания каждого VHH-Fc, но в разной степени (Рисунок 40Б). Наиболее заметное увеличение аффинности продемонстрировали D4.2-Fc и D9.2-Fc. EC_{50} мономерной формы D9.2 для H3 Aichi составляла 515,5 нМ, в то время как значение EC_{50} Fc-слитой формы для этого штамма снизилось в 1120,6 раз и составила 0,46 нМ. И D9.2-Fc, и D4.2-Fc также показали способность связывать НА подтипа H4. Наименее выраженный эффект модификация Fc-фрагментом оказала на E12.2.

Аналогично мономерам VHH, слитые с Fc формы антител не обладали нейтрализующей активностью *in vitro*.

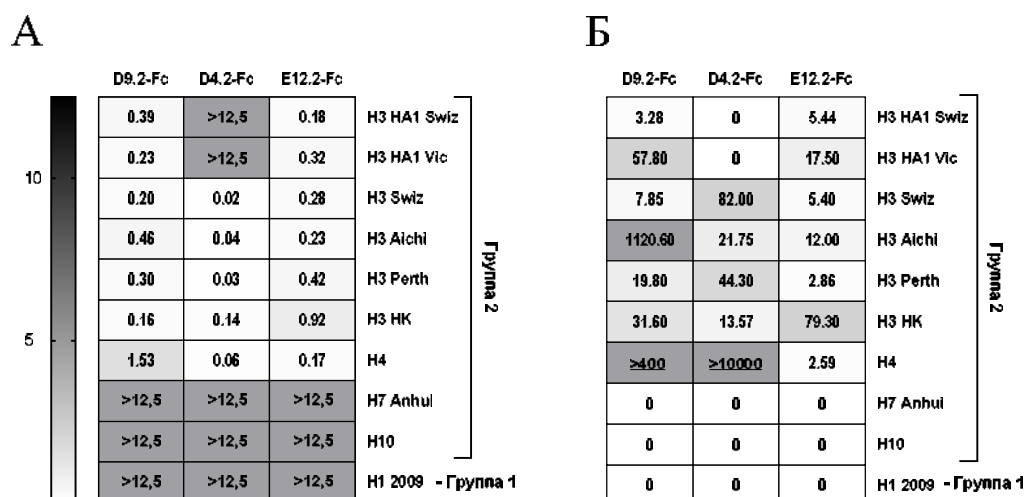


Рисунок 40 – Результаты исследования спектра взаимодействия VNN-Fc: А – тепловая карта значений EC_{50} . Б – таблица, показывающая, во сколько раз снизились значения EC_{50} для VNN после их модификации в сравнении с мономерной формой. Нижнее подчеркивание выделяет подтипы, в отношении которых связывающая активность была зарегистрирована только после слияния с Fc.

Таким образом, в результате модификации однодоменных антител Fc-фрагментом увеличилась аффинность, а также спектр активности VNN: слитые с Fc формы однодоменных антител D9.2 и D4.2 были способны взаимодействовать с НА подтипа H4.

На следующем этапе изучали эпитопную специфичность отобранных антител D4.2-Fc, D9.2-Fc и E12.2-Fc. Результаты представлены на Рисунке 41.

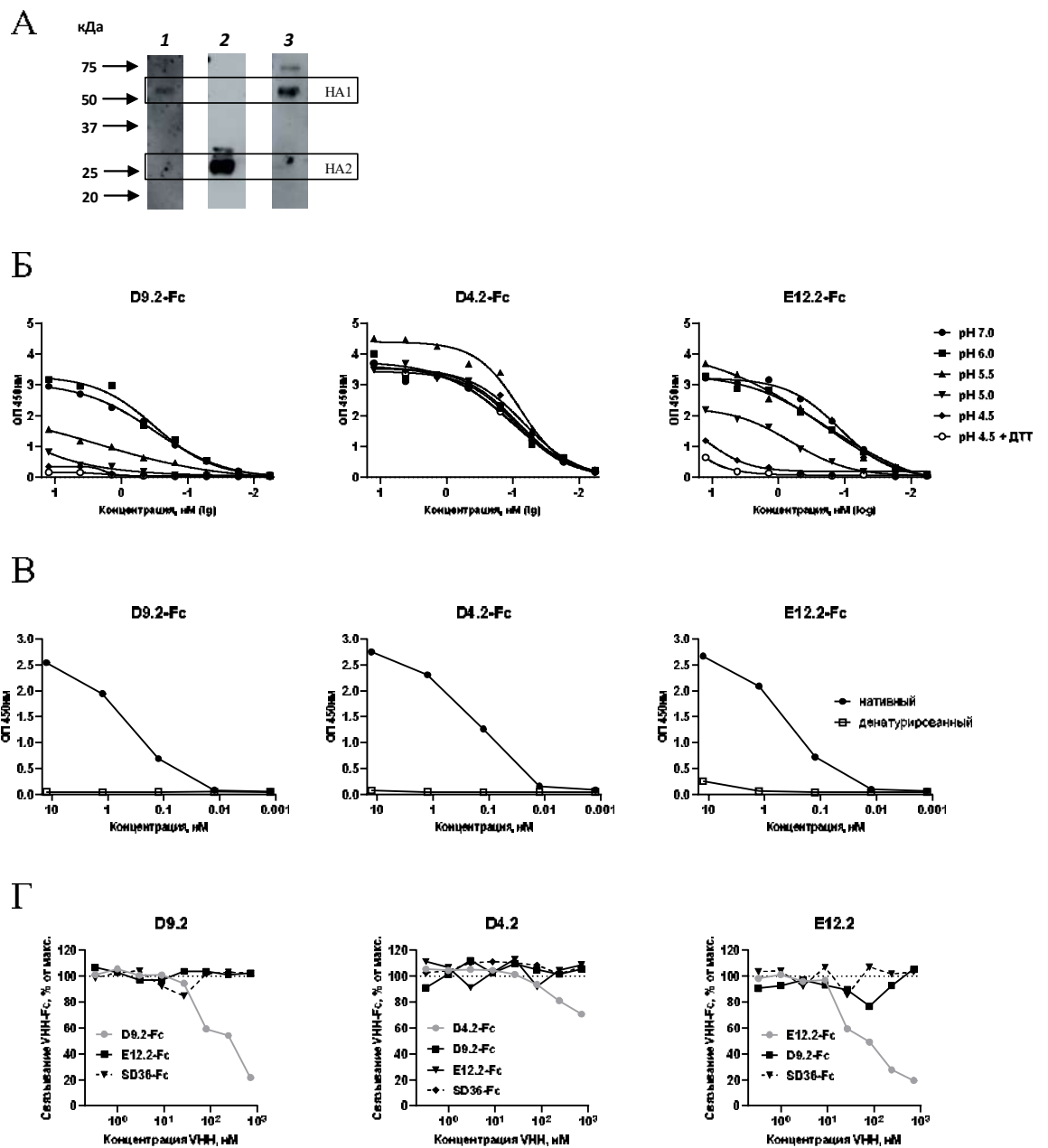


Рисунок 41 – Результаты исследования эпитопной специфичности VNN-Fc. А – вестерн-блот анализ специфичности VNN-Fc к HA1 или HA2 субъединице HA: инактивированный ВГА H3N2 Aichi в восстанавливающих условиях, детектированный D9.2-Fc (1), D4.2-Fc (2) или E12.2-Fc (3). Б – результаты непрямого ИФА, показывающие связывание VNN-Fc с H3 Aichi, обработанным трипсином-ТРСК и инкубированным в буферах с различным pH или ДТТ. В – результаты непрямого ИФА VNN-Fc с нативным или денатурированным H3 Aichi.

Г – результаты конкурентного ИФА мономеров VHH с антителами в формате VHH-Fc.

При помощи иммуноблоттинга было подтверждено взаимодействие антител D9.2-Fc и E12.2-Fc с HA1 субъединицей (Рисунок 41А). Для антитела D4.2-Fc было показано наличие специфического взаимодействия с HA2 субъединицей, что объясняет отсутствие связывания в ИФА с HA1. Далее определяли, разрушается ли распознаваемый антителом эпитоп при снижении pH (Рисунок 41Б). Как известно, в процессе слияния мембран HA претерпевает значительные конформационные изменения, вызванные понижением pH в эндосомах клетки-хозяина. Несмотря на то, что субъединица HA1 не претерпевает таких серьезных перестроек, как HA2 [39, 40], активность связывающих HA1 антител (D9.2-Fc и E12.2-Fc) уменьшалась с уменьшением pH и полностью терялась при добавлении ДТТ, поскольку он удаляет субъединицу HA1 из HA. Однако D4.2-Fc одинаково связывалось с HA при различных значениях pH, как и с HA, обработанным ДТТ, что подтверждает нахождение его эпитопа именно в субъединице HA2. Также было показано, что ни одно из исследуемых VHH-Fc не связывалось с денатурированным HA (Рисунок 41В). Полученные результаты свидетельствуют о конформационной природе эпитопов антител D9.2-Fc, D4.2-Fc и E12.2-Fc. Далее в ходе конкурентного ИФА установлено, что три отобранных клон VHH-Fc узнают различные не перекрывающиеся эпитопы на поверхности HA, а связывающее субъединицу HA2 антитело D4.2-Fc не конкурировало с контрольным VHH-Fc к HA2, SD36-Fc [158] (Рисунок 41Г).

Таким образом, было показано, что отобранные VHH-Fc обладают широким спектром реактивности внутри HA подтипа H3, а также связываются с HA подтипа H4. Было установлено, что антитела D9.2-Fc и E12.2-Fc взаимодействуют с HA1, а D4.2-Fc – с HA2 субъединицей. Все выбранные антитела распознают неперекрывающиеся конформационные эпитопы в составе молекулы HA.

3.5.3 Исследование активации FcγR тяжелоцепочечными антителами, специфичными к НА филогенетической группы 2

Далее оценивали функциональность Fc-фрагмента в составе VHH-Fc и его способность взаимодействовать с FcγR. Данный эксперимент выполнялся совместно с к.б.н. Джаруллаевой А.Ш. (лаб. клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Предварительно, для оценки доступности эпитопов на экспонированном на клеточной мембране НА проводили ИФА с клетками MDCK, инфицированными ВГА (Рисунок 42). Согласно полученным данным, сигнал всех антител в лунках с инфицированными H3N2 клетками достоверно отличался от такового в контрольных лунках с неинфицированными клетками. Полученные данные свидетельствуют о доступности эпитопов НА, представленного на поверхности клетки, для связывания с VHH-Fc.

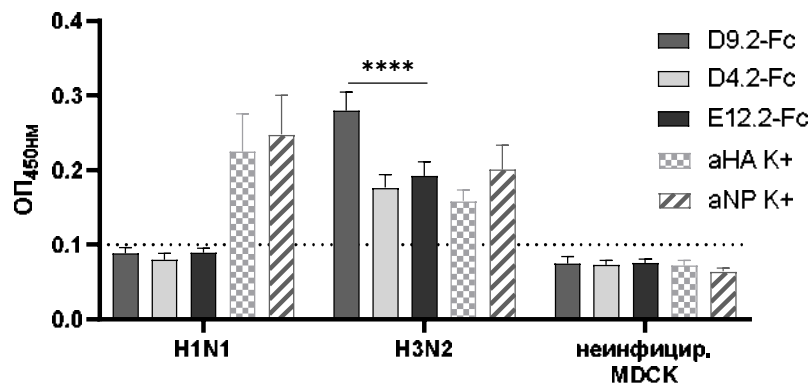


Рисунок 42 – Результаты ИФА с клетками MDCK, инфицированными различными ВГА. aHA K+ – контрольные антитела к НА подтипа H1 или H3, aNP K+ – контрольные антитела к NP белку ВГА.

На Рисунке 43 представлены результаты, полученные при исследовании способности антител D9.2-Fc, D4.2-Fc и E12.2-Fc активировать АЗКЦ и АЗКФ. Активность всех VHH-Fc статистически достоверно отличалась от активности моновалентной формы VHH и интактных клеток.

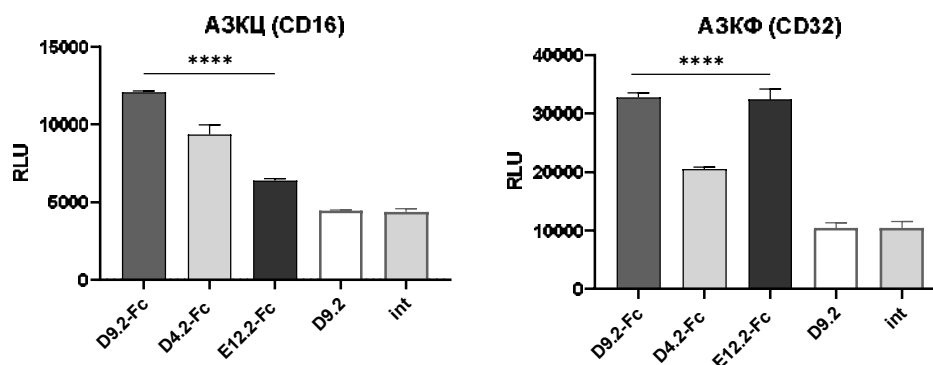


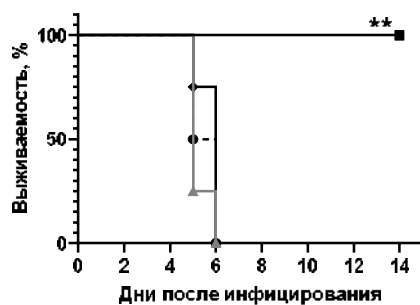
Рисунок 43 – Результаты исследования активации эффекторных функций АЗКЦ и АЗКФ с использованием в качестве таргетных клеток НЕК293, трансдуцированных рекомбинантным Ad5-tet-swH3glic. Результаты выражены в RLU – относительных единицах люминесценции.

Из полученных данных следует, что слияние с доменом Fc позволяет VHH-Fc эффективно задействовать эффекторные механизмы в ответ на связывание с НА.

3.5.4 Исследование эффективности тяжелоцепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2, *in vivo* для профилактики и терапии инфекции, вызванной ВГА

Изучение эффективности VHH-Fc *in vivo* проводили с использованием летальной модели инфекции, вызванной вирусом гриппа H3N2, у мышей (Рисунок 44). Самкам линии BALB/c интраназально (и.н.) вводили 1 мг/кг VHH-Fc за 1 ч до инфицирования. Животным контрольной группы вводили антитело формата VHH-Fc, специфичное к S-белку вируса SARS-CoV-2 – p2.C5-Fc [92]. В течение 14 дней после инфицирования мышей ежедневно взвешивали и регистрировали выживаемость. Мыши в контрольной группе теряли в весе и погибали к 6 суткам после заражения. Аналогичное течение инфекции наблюдалось и в группах животных, которым вводили антитела D4.2-Fc и E12.2-Fc. В свою очередь, антитело D9.2-Fc обеспечивало 100% защиту мышей от летального исхода, а снижение массы тела в среднем не превышало 10% от изначального веса.

А



Б

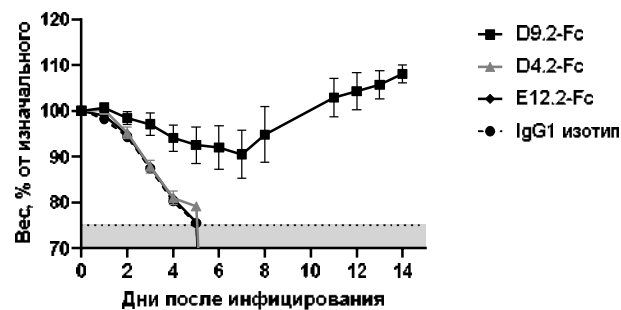


Рисунок 44 – Динамика выживаемости (А) и изменения массы тела (Б) мышей после местного (и.н.) профилактического введения VHH-Fc и последующего заражения A/Aichi/2/68 (H3N2).

В связи с тем, что антитело D9.2-Fc единственное продемонстрировало эффективность *in vivo*, его отобрали для дальнейших исследований.

Далее изучали протективность D9.2-Fc *in vivo* при системном введении. В профилактическом режиме антитела вводили внутривенно в дозе 10 мг/кг за 24 ч до заражения ВГА. У животных, получавших D9.2-Fc, не наблюдалось признаков заболевания, потеря веса отсутствовала или была незначительной, в то время как контрольные мыши пали спустя 7 суток (Рисунок 45А и Б). Для оценки эффективности D9.2-Fc в терапевтическом режиме антитело вводили в.б. 40 мг/кг D9.2-Fc спустя 24 ч после инфицирования. Выживаемость в группе мышей, получивших D9.2-Fc, составила 80% (4 из 5 животных выжило); в среднем изменение массы тела не превышало 15%, при этом к концу наблюдения вес выживших мышей вернулся к начальным значениям (Рисунок 45В и Г). Мыши из контрольной группы пали к 9 дню после заражения.

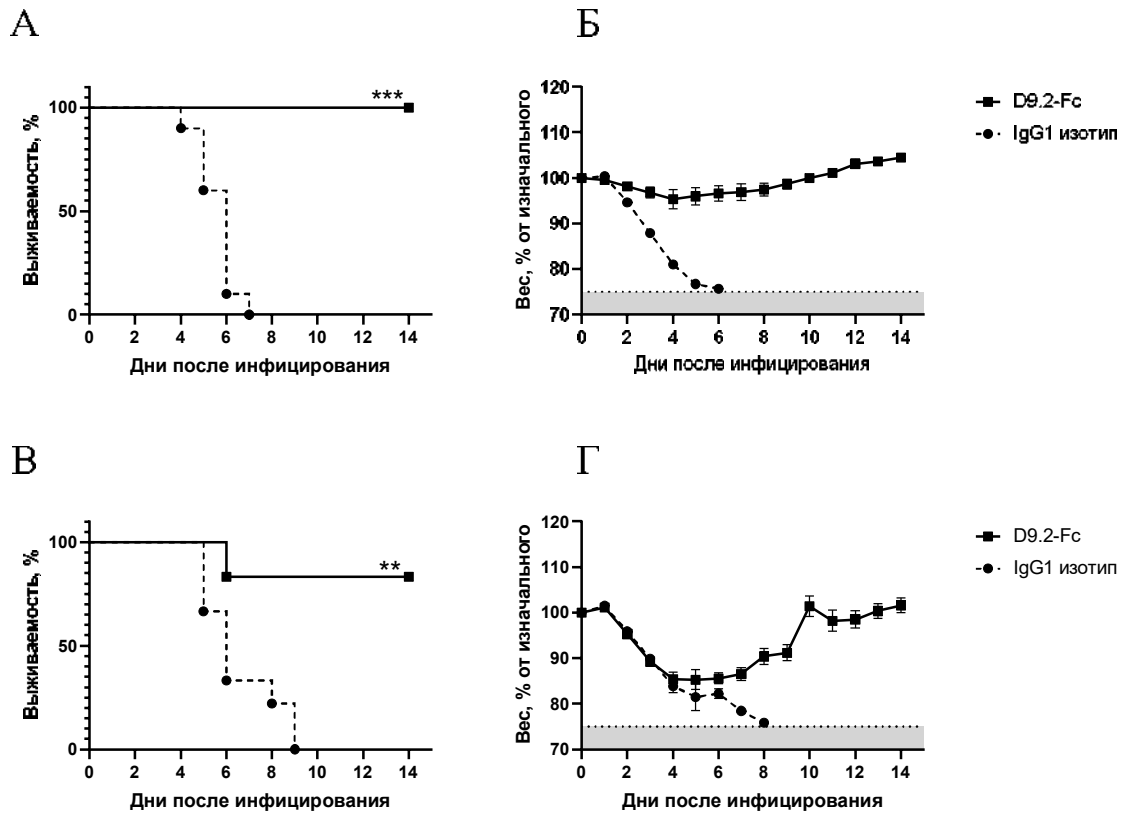


Рисунок 45 – Изучение эффективности системного введения D9.2-Fc *in vivo* против инфекции, вызванной A/Aichi/2/68 (H3N2). Динамика выживаемости и изменения массы тела мышей: А и Б – после профилактического введения D9.2-Fc за 24 часа до заражения; В и Г – после терапевтического введения D9.2-Fc спустя 24 часа после заражения.

Для того, чтобы оценить влияние D9.2-Fc на репликацию ВГА в легких мышей, животным вводили 10 мг/кг VHH-Fc за 24 часа до заражения 5 ЛД₅₀ A/Aichi/2/68 (H3N2). На 3-й день после заражения мышей эвтаназировали и отбирали легкие для определения инфекционного титра вируса (Рисунок 46). Согласно полученным данным, при системном введении D9.2-Fc в профилактическом режиме титр вируса H3N2 в легких животных снижался в среднем на 2 lg ТЦД₅₀/мл в сравнении с контрольной группой, однако различия между группами были статистически не значимы.

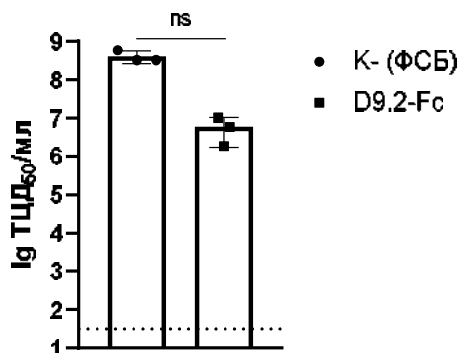


Рисунок 46 – Инфекционный титр A/Aichi/2/68 (H3N2) в легких мышей. Пунктирной линией обозначен предел обнаружения метода; ns – не значимо.

Таким образом, было показано, что антитело D9.2-Fc при системном профилактическом или терапевтическом введении эффективно защищает животных от летальной инфекции, вызванной ВГА подтипа H3.

3.5.5 Механизм противовирусного действия тяжелоцепочечных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2

Поскольку D9.2-Fc не обладало способностью нейтрализовать ВГА *in vitro*, мы предположили, что эффективность данного антитела *in vivo* опосредована Fc-зависимыми эффекторными функциями, такими как АЗКЦ, АЗКФ и КЗЦ. Как описано в п. 1.5.3 данного раздела, D9.2-Fc способен активировать Fc-опосредованные функции в ответ на связывание с НА *in vitro*. Далее было необходимо подтвердить данную гипотезу в экспериментах *in vivo*.

Для этого были получены две дополнительные формы D9.2: VHH с Fc IgG2a мыши (D9.2-mG2a), а также D9.2-mG2a LALA-PG, в которой в Fc фрагмент внесены мутации L234A, L235A и P329G (Рисунок 47А). Комплекс мутаций LALA-PG ингибирует связывание с FcγR и C1q, в то время как взаимодействие с FcRn и стабильность Fc не затрагиваются [175]. При этом, решение сменить Fc IgG1 человека на Fc IgG2a мыши обусловлено большим сродством мышинового Fc фрагмента к мышинным же FcγR, в сравнении с человеческим Fc [49, 77]. Таким

образом, разница между эффективностью полностью функционального Fc и Fc с абортированным связыванием с FcγR и C1q будет наиболее заметна.

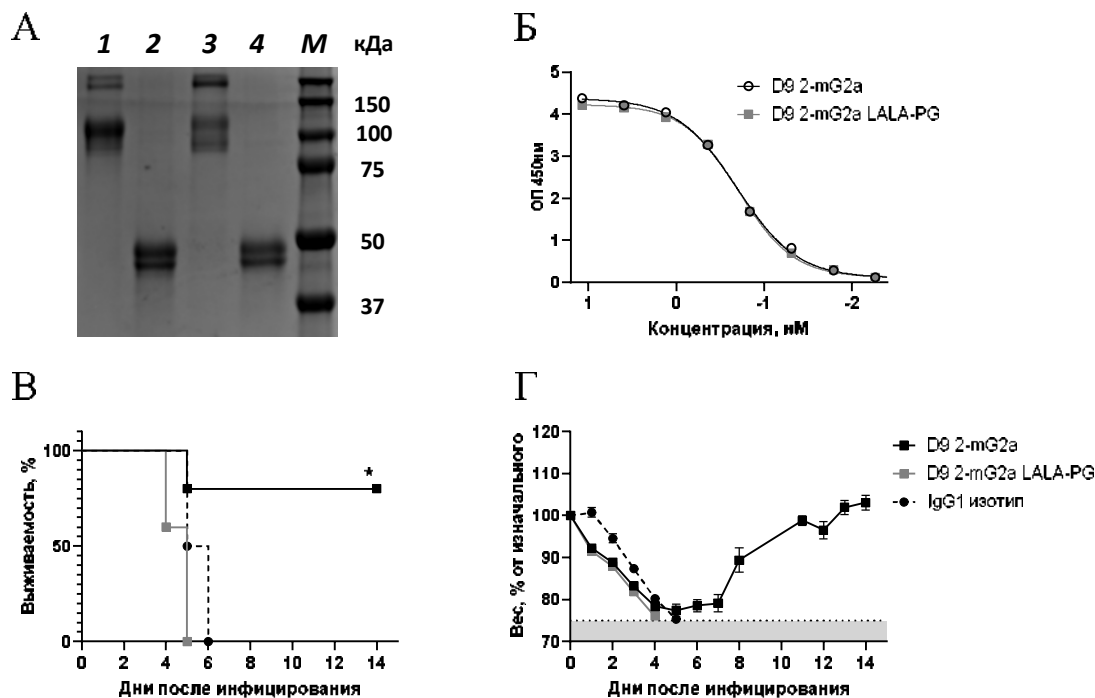


Рисунок 47 – Изучение механизма противовирусного действия D9.2-Fc. А – SDS-PAGE в неденатурирующих (1, 3) и денатурирующих восстанавливающих (2, 4) условиях: D9.2-mG2a (1, 2) и D9.2-mG2a LALA-PG (3, 4), М – маркер молекулярных масс. Б – результаты ИФА, отражающие связывание указанных антител с НА НЗ Aichi. В и Г – кривые выживаемости и изменения массы тела мышей после заражения A/Aichi/2/68 (H3N2).

С помощью ИФА показано, что внесенные в Fc мутации не влияют на связывание D9.2 с НА (Рисунок 47Б). Для оценки и сравнения протективных свойств полученных конструкций *in vivo* животным вводили в.б. антитела в дозе 5 мг/кг за 24 ч до заражения вирусом A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 5 ЛД₅₀ (Рисунок 47В и Г). В течение 14 дней после инфицирования мышей ежедневно взвешивали и регистрировали выживаемость. Мыши (4 из 5), получавшие антитело D9.2-mG2a, были защищены от летального исхода, тогда как все мыши, получавшие антитело D9.2-mG2a LALA-PG, пали к 6 дню, как и мыши контрольной группы.

Следовательно, взаимодействие Fc-FcγR играет решающую роль в защите животных от летальной инфекции, вызванной ВГА, для антитела D9.2.

Таким образом, при сравнении протективных свойств *in vivo* D9.2, слитого с Fc IgG2a мыши (D9.2-mG2a), и D9.2 с мутациями LALA-PG (D9.2-mG2a LALA-PG) было установлено, что D9.2-Fc защищает животных от летальной гриппозной инфекции благодаря Fc-FcγR-взаимодействию.

3.6 Получение тяжелоцепочечных биспецифических антител, связывающихся с НА филогенетических групп 1 и 2, и характеристика их активности в экспериментах *in vitro* и *in vivo*

3.6.1 Получение слитых с Fc-фрагментом гетеродимеров однодоменных антител, специфичных к НА филогенетических групп 1 и 2

На основании результатов, полученных на предыдущих этапах работы, было принято решение получить слитые с Fc-фрагментом гетеродимеры антител G2.3 и D9.2, обладающих различной специфичностью к ВГА, для получения тяжелоцепочечных мАт с расширенным спектром реактивности, включающим ВГА обеих филогенетических групп.

С этой целью был произведен дизайн генетических конструкций с различной ориентацией молекул VHH относительно Fc-фрагмента (Рисунок 48А). Соответствующие плазмидные конструкции на основе вектора pFUSE, несущие гены двух VHH, слитых с Fc-фрагментом IgG1 человека, получали при помощи методов молекулярного клонирования:

- Нуклеотидную последовательность антитела G2.3, слитого глицин-сериновым линкером с D9.2 и Fc-фрагментом – pFUSE-G2.3-D9.2-Fc;
- Нуклеотидную последовательность антитела D9.2, слитого глицин-сериновым линкером с G2.3 и Fc-фрагментом – pFUSE-D9.2-G2.3-Fc.

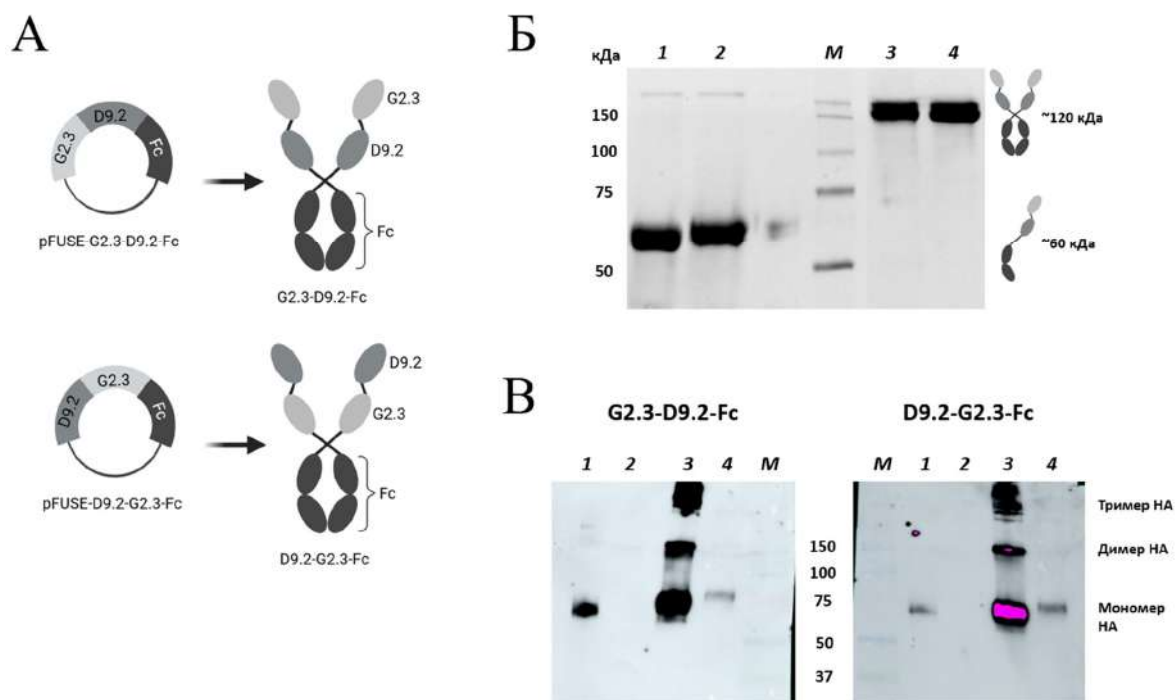


Рисунок 48 – Получение биспецифических антител. А – схемы генетических конструкций для экспрессии VHH-VHH-Fc. Б – результаты SDS-PAGE анализа полученных препаратов антител: 1 и 3 – D9.2-G2.3-Fc в денатурирующих и неденатурирующих условиях, соответственно; 2 и 4 – G2.3-D9.2-Fc в денатурирующих и неденатурирующих условиях, соответственно. В – вестерн-блот анализ специфичности антител G2.3-D9.2-Fc и D9.2-G2.3-Fc к H1 2009 (1 – неденатурирующие условия; 2 – денатурирующие восстанавливающие условия) и H3 Swiz (3 – неденатурирующие условия; 4 – денатурирующие восстанавливающие условия). М – маркер молекулярного веса белков.

Полученные плазмиды использовали для постановки транзientной трансфекции клеток линии CHO-S для экспрессии антител, которую проводили совместно с Рябовой Е.И. (лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Аффинную хроматографическую очистку проводили совместно с Прокофьевым В.В. (лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Чистоту полученных препаратов, а также димеризацию молекул VHH-VHH-Fc оценивали с помощью SDS-PAGE,

результаты которого представлены на Рисунке 48Б. Полученные данные подтверждают высокую степень очистки и димеризацию антител.

Специфическую активность VHH-VHH-Fc исследовали с помощью иммуноблоттинга, результаты которого представлены на Рисунке 48В. Показано, что полученные антитела VHH-VHH-Fc узнают НА подтипов Н1 и Н3.

3.6.2 Изучение кросс-реактивности и нейтрализующих свойств

тяжелоцепочечных биспецифических антител, связывающихся с НА филогенетических групп 1 и 2

Спектр связывающей и нейтрализующей активности для VHH-VHH-Fc определяли в непрямом ИФА и РН, соответственно.

Согласно результатам ИФА, значения EC_{50} , определенные для каждого из VHH-VHH-Fc, находились в наномолярном диапазоне (Таблица 7). Полученные биспецифические антитела повторяли спектр активности, характерный для исходных антигенсвязывающих фрагментов G2.3 и D9.2.

Таблица 7 – Результаты исследования аффинности и спектра взаимодействия VHH-VHH-Fc в непрямом ИФА с различными НА

| Антиген гемагглютинин | | | EC_{50} , нМ | |
|-----------------------|-------------|---------------------------|------------------|------------------|
| Подтип НА | Субъединица | Штамм | G2.3-D9.2- Fc | D9.2-G2.3- Fc |
| Н1 | HA0 | A/Puerto Rico/8/1934 | 0.4 | 0.7 |
| | HA0 | A/New Caledonia/20/1999 | 0.37 | 0.42 |
| | HA2 | A/Brisbane/59/2007 | 0.09 | 0.2 |
| | HA0 | A/California/04/2009 | 0.14 | 0.28 |
| | HA0 | A/Swine/Jiangsu/J004/2018 | 0.05 | 0.05 |
| | HA0 | A/Hawaii/70/2019 | 0.11 | 0.19 |
| | HA0 | A/Wisconsin/588/2019 | 0.07 | 0.11 |
| Н3 | HA0 | A/Aichi/2/1968 | 0.17 | 0.32 |
| | HA0 | A/Perth/16/2009 | 0.3 | 0.14 |
| | HA1 | A/Victoria/210/2009 | 0.14 | 0.25 |

| Антиген гемагглютинин | | | EC ₅₀ , нМ | |
|-----------------------|-------------|----------------------------|-----------------------|------------------|
| Подтип НА | Субъединица | Штамм | G2.3-D9.2- Fc | D9.2-G2.3- Fc |
| H3 | HA0 | A/Switzerland/9715293/2013 | 0.2 | 0.21 |
| | HA1 | A/Switzerland/9715293/2013 | 0.13 | 0.29 |
| | HA0 | A/Darwin/6/2021 | 0.6 | 0.13 |
| H4 | HA0 | A/mallard/Ohio/657/2002 | 0.12 | 0.22 |
| H5 | HA0 | A/Hubei/1/2010 | 6.74 | 4.25 |
| H6 | HA0 | A/mallard/Ohio/217/1998 | 0.19 | 0.15 |
| H7 | HA0 | A/Anhui/1/2013 | - | - |
| H9 | HA0 | A/Hong Kong/35820/2009 | 2.57 | 1.47 |

Полученные в РН данные подтверждали результаты ИФА (Таблица 8). Нейтрализующая активность VNN-VNN-Fc, наравне со связывающей активностью, в большей степени соответствовала спектру отдельных VNN, входящих в их состав, за некоторыми исключениями. Так, антитела G2.3-D9.2-Fc и D9.2-G2.3-Fc не нейтрализовали ВГА H9N2 в максимальной концентрации 9,09 мкМ, несмотря на то, что в ИФА регистрировали связывание с НА подтипа H9. Также значительное снижение нейтрализующей активности (в сравнении с G2.3-Fc) наблюдали для антитела G2.3-D9.2-Fc в отношении ВГА H2N3 и H5N2: значения IC₅₀ увеличивались в 895 и 33,5 раз, соответственно.

Таблица 8 – Результаты исследования нейтрализующей активности VNN-VNN-Fc в РН с различными ВГА обеих филогенетических групп

| Вирус | | IC ₅₀ , нМ | |
|--------|---------------------------------|-----------------------|------------------|
| Подтип | Штамм | G2.3-D9.2- Fc | D9.2-G2.3- Fc |
| H1N1 | A/USSR/90/77 | 11,5 | 3,03 |
| | A/Brisbane/59/2007 | 11,5 | 0,71 |
| | A/California/07/2009 | 11,5 | 7,2 |
| | A/Duck/mallard/Moscow/4970/2018 | 2,03 | 0,37 |
| | A/Victoria/2570/2019 | 11,5 | 2,4 |

| Вирус | | IC ₅₀ , нМ | |
|--------|--------------------------------------|-----------------------|--------------|
| Подтип | Штамм | G2.3-D9.2-Fc | D9.2-G2.3-Fc |
| H2N3 | A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 | 7363 | 710 |
| H3N2 | A/Aichi/2/1968 | - | - |
| | A/Darwin/6/2021 | - | - |
| | A/Moscow/V-01/2023 | - | - |
| H5N2 | A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84 | 1313 | 112,3 |
| H9N2 | A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 | >9090 | >9090 |

Таким образом, было показано, что объединение двух антигенсвязывающих фрагментов (G2.3 и D9.2) в составе тяжелопепочечного биспецифического мАт позволяет антителу G2.3-D9.2-Fc или D9.2-G2.3-Fc эффективно связываться с НА обеих филогенетических групп, а также нейтрализовать ВГА группы 1.

3.6.3 Исследование активации FcγR тяжелопепочечными биспецифическими антителами, связывающимся с НА филогенетических групп 1 и 2

Далее оценивали функциональность Fc-фрагмента в составе VHH-VHH-Fc и его способность взаимодействовать с FcγR. Данный эксперимент выполнялся совместно с к.б.н. Джаруллаевой А.Ш. (лаб. клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Предварительно, для оценки доступности эпитопов на экспонированном на клеточной мембране НА проводили ИФА с клетками MDCK, инфицированными различными ВГА обеих филогенетических групп (Рисунок 49). Уровень сигнала в лунках с инфицированными клетками при добавлении VHH-VHH-Fc статистически значимо отличался от сигнала в лунках с неинфицированными MDCK. Полученные данные свидетельствуют о доступности эпитопов НА, представленного на поверхности клетки, для связывания с VHH-Fc.

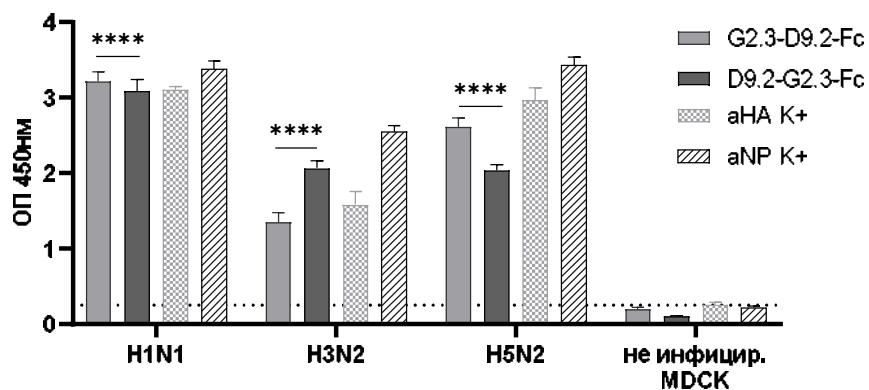


Рисунок 49 – Результаты ИФА с клетками MDCK, инфицированными различными ВГА. aHA K⁺ – контрольные антитела к HA подтипа H1 или H3, aNP K⁺ – контрольные антитела к NP белку ВГА.

На Рисунке 50 представлены результаты, полученные при исследовании способности VNN-VNN-Fc активировать АЗКЦ и АЗКФ. Согласно полученным данным, биспецифические антитела эффективно задействовали эффекторные функции Fc фрагмента в ответ на связывание с HA обеих филогенетических групп (H1 и H3).

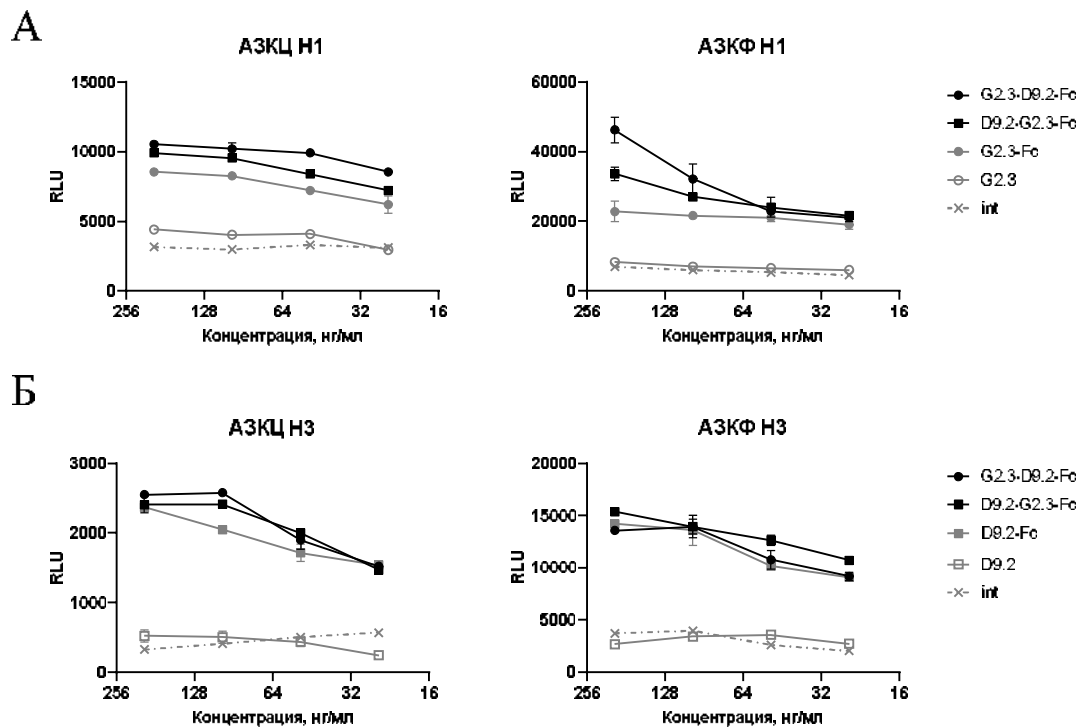


Рисунок 50 – Результаты исследования способности G2.3-D9.2-Fc и D9.2-G2.3-Fc к активации эффекторных функций (АЗКЦ и АЗКФ) с использованием в качестве таргетных клеток НЕК293, трансдуцированных Ad5-swH1opt/California (А) или Ad5-tet-swH3glic (Б). Отрицательным контролем, помимо интактных клеток (int), являлись мономеры G2.3 или D9.2. Результаты выражены в RLU – относительных единицах люминесценции.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о способности VHH-VHH-Fc взаимодействовать с FcγR и активировать эффекторные функции в ответ на связывание с НА обеих филогенетических групп, аналогично исходным VHH-Fc.

3.6.4 Исследование эффективности тяжелоцепочечных биспецифических антител *in vivo* для профилактики и терапии инфекции, вызванной ВГА

Изучение эффективности VHH-VHH-Fc *in vivo* проводили с использованием летальной модели инфекции, вызванной ВГА, относящимся к различным филогенетическим группам (H1N1 или H3N2), у мышей.

Для этого животным в.б. вводили VHH-VHH-Fc в дозе 10 мг/кг за 24 часа до заражения 5 ЛД₅₀ адаптированного к мышам вируса A/California/07/2009 (H1N1) или A/Aichi/2/1968 (H3N2). В течение 14 дней после инфицирования мышей ежедневно взвешивали и регистрировали выживаемость (Рисунок 51).

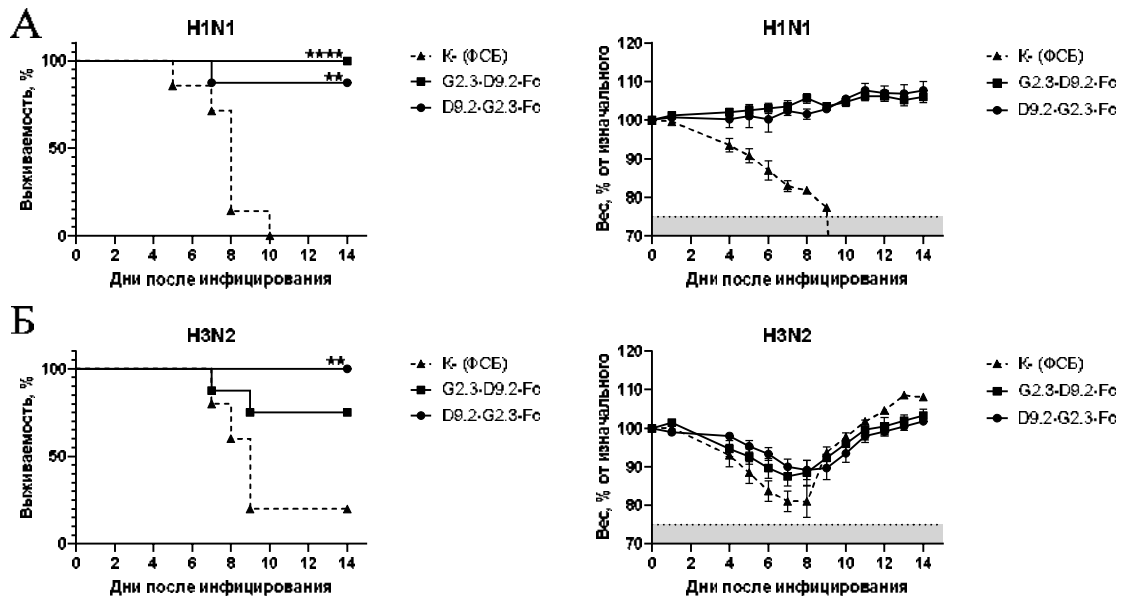


Рисунок 51 – Динамика выживаемости и изменения массы тела мышей после системного профилактического введения VHH-VHH-Fc за 24 часа до заражения A/California/07/2009 (H1N1) (А) или A/Aichi/2/1968 (H3N2) (Б).

Так, G2.3-D9.2-Fc продемонстрировал 100% защиту животных как от летального исхода, так и от развития симптомов при заражении вирусом H1N1 (Рисунок 51А). При инфицировании ВГА H3N2, G2.3-D9.2-Fc обеспечивал 75% протективность, однако различия в выживаемости между опытной и контрольной

группой были статистически незначимы (Рисунок 51Б). Профилактическое введение антитела D9.2-G2.3-Fc показало 100% и 87,5% эффективность против инфекции, вызванной вирусом H3N2 и H1N1, соответственно. В обоих случаях различия в выживаемости между группами опыта и контроля являлись статистически значимыми. В контрольных группах большая часть животных пала к 9-10 суткам после инфицирования.

Для того, чтобы оценить влияние VHH-VHH-Fc на репликацию ВГА в легких мышей, животным вводили антитела в дозе 10 мг/кг за 24 часа до заражения 5 ЛД₅₀ A/California/07/2009 (H1N1) или A/Aichi/2/68 (H3N2). На 3-й день после заражения мышей эвтаназировали и отбирали легкие для определения инфекционного титра вируса (Рисунок 52). Согласно полученным данным, системное введение G2.3-D9.2-Fc в профилактическом режиме приводило к достоверному снижению титра вирусов H1N1 и H3N2 в легких животных. При профилактическом введении D9.2-G2.3-Fc статистически значимо снижалось количество инфекционного вируса H3N2. На репликацию ВГА H1N1 антитело D9.2-G2.3-Fc не оказывало достоверно значимого влияния, однако наблюдалась тенденция к снижению: в сравнении с контрольной группой титр вируса был ниже на 0,6 lg ТЦД₅₀/мл.

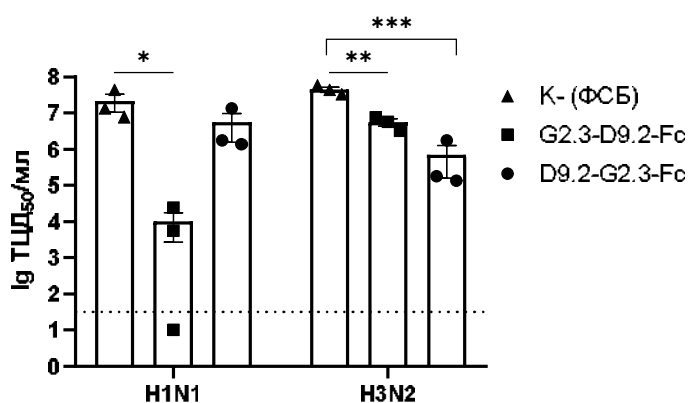


Рисунок 52 – Инфекционный титр ВГА в легких мышей. Пунктирной линией обозначен предел обнаружения метода.

Ввиду более выраженной эффективности антитела D9.2-G2.3-Fc *in vivo* в отношении ВГА, несущих НА обеих филогенетических групп (H1N1 и H3N2), его выбрали для дальнейших исследований.

Эффективность терапевтического применения антитела D9.2-G2.3-Fc *in vivo* оценивали путем инфицирования мышей линии BALB/с вирусом гриппа A/California/07/2009 (H1N1) и A/Aichi/2/1968 (H3N2) в дозе 5ЛД₅₀ и последующего в.б. введения 40 мг/кг антитела, спустя 24 часа после заражения. В течение 14 дней после инфицирования мышей ежедневно взвешивали и регистрировали выживаемость (Рисунок 53).

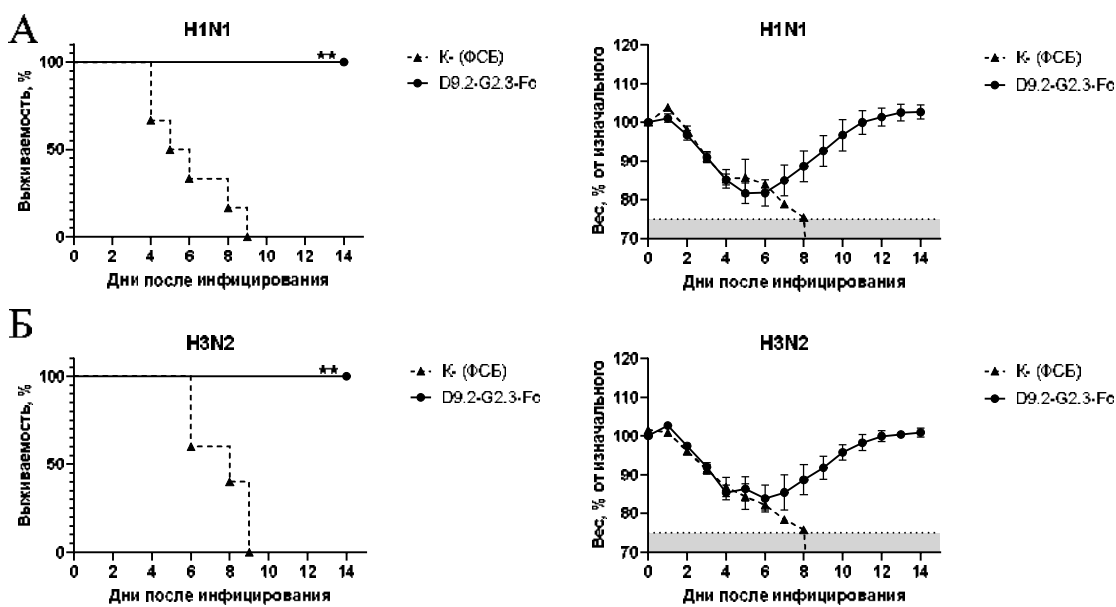


Рисунок 53 – Динамика выживаемости и изменения массы тела мышей после системного терапевтического введения VNN-VNN-Fc спустя 24 часа после заражения A/California/07/2009 (H1N1) (А) или A/Aichi/2/1968 (H3N2) (Б).

Так, антитело D9.2-G2.3-Fc обеспечивало 100% протективность при заражении как ВГА H1N1, так и H3N2. Опытные животные демонстрировали выраженное снижение веса (в среднем до 19% в случае инфицирования H1N1 и до 17% для H3N2), однако к концу эксперимента вес мышей вернулся к начальным показателям. Животные в обеих контрольных группах теряли в весе и пали к 9 суткам после инфицирования.

Таким образом, было показано, что системное профилактическое и терапевтическое введение D9.2-G2.3-Fc обеспечивает защиту животных от летальной инфекции, вызванной ВГА подтипов H1 и H3.

3.7 Доклинические исследования кандидатного лекарственного препарата на основе биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc – ГамИнфлюМаб

С целью изучения возможности использования тяжелоцепочечных биспецифических антител в качестве потенциального препарата для терапии инфекции, вызванной вирусами гриппа типа А, для дальнейшей работы нами было выбрано антитело D9.2-G2.3-Fc, поскольку VHH в его составе не только узнают различные подтипы НА, но, более того, специфичны к разным субъединицам НА: D9.2 связывается с НА1, а G2.3 – с НА2 субъединицей. Направленность на разные функциональные части НА отражается в различных механизмах действия исходных VHH: G2.3 обладает прямым нейтрализующим действием, а эффективность D9.2 зависит от функций Fc фрагмента. Объединение в одной биспецифической молекуле антигенсвязывающих фрагментов с различным механизмом противовирусной активности было успешно осуществлено в работах других исследователей [180, 212, 263].

Полученные на предыдущих этапах диссертационной работы результаты свидетельствуют о высоком потенциале D9.2-G2.3-Fc для терапии инфекции, вызванной вирусами гриппа типа А, и позволили создать кандидатный препарат на основе тяжелоцепочечного биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc – ГамИнфлюМаб (раствор для внутривенного введения, 6 мг/мл, производитель филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

3.7.1 Разработка технологии получения кандидатного лекарственного препарата ГамИнфлюМаб

Данная работа выполнялась совместно с м.н.с. Деркаевым А.А., лаб.-исслед. Прокофьевым В.В. (лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) под руководством в.н.с., к.б.н. Есмагамбетова И.Б.

(лаб. стромальной регуляции иммунитета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), а также совместно с сотрудниками Филиала «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

В процессе разработки технологии получения препарата ГамИнфлюМаб был получен стабильный эукариотический продуцент (клон 13) рекомбинантного антитела D9.2-G2.3-Fc на основе клеток линии CHO-S и создан исследовательский банк клеток данного клона. Результаты изучения стабильности экспрессии показали, что уровень продукции рекомбинантного антитела D9.2-G2.3-Fc клоном 13 не изменялся в течении 6 месяцев (около 60 пассажей) непрерывного культивирования, что говорит о генетической стабильности полученного клон-продуцента.

После подтверждения генетической стабильности и отсутствия контаминантов исследовательский банк клона 13 использовали для создания системы Главного и Рабочего банков клеток. Главный и Рабочий банк клеток исследовали на стерильность и наличие микоплазм. Оценку вирусной контаминации проводили с использованием различных лабораторных животных, куриных эмбрионов и эукариотических клеточных культур, согласно Государственной фармакопеи Российской Федерации. В результате, было показано, что исследуемые банки клеток клона 13 являются стерильными, не содержат генетический материал микроорганизмов рода *Mycoplasma*, а также не было обнаружено вирусной контаминации.

Далее разрабатывали схему хроматографической очистки препарата, которая включала в себя три стадии: аффинную, анионообменную и мультимодальную хроматографию. Аффинную хроматографию осуществляли с использованием сорбента с иммобилизованным белком А, который специфически связывается с Fc-фрагментом. Анионообменная стадия проводилась на сорбенте, содержащем в качестве функциональной группы четвертичный амин, что необходимо для избавления от остаточных белков и ДНК клеток-продуцентов. На финальной стадии производили очистку препарата рекомбинантных антител от возможных агрегатов с использованием керамического гидроксиапатита первого типа.

Затем хроматографически очищенный препарат подвергали противовирусной фильтрации, и проводили формулирование препарата на установке тангенциальной фильтрации. После подтверждали чистоту и целостность препарата антител с помощью следующих методов: SDS-PAGE, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и метода определения размера наночастиц молекул в растворе на приборе Zetasizer (Malvern Panalytical, Великобритания) (Рисунок 54).

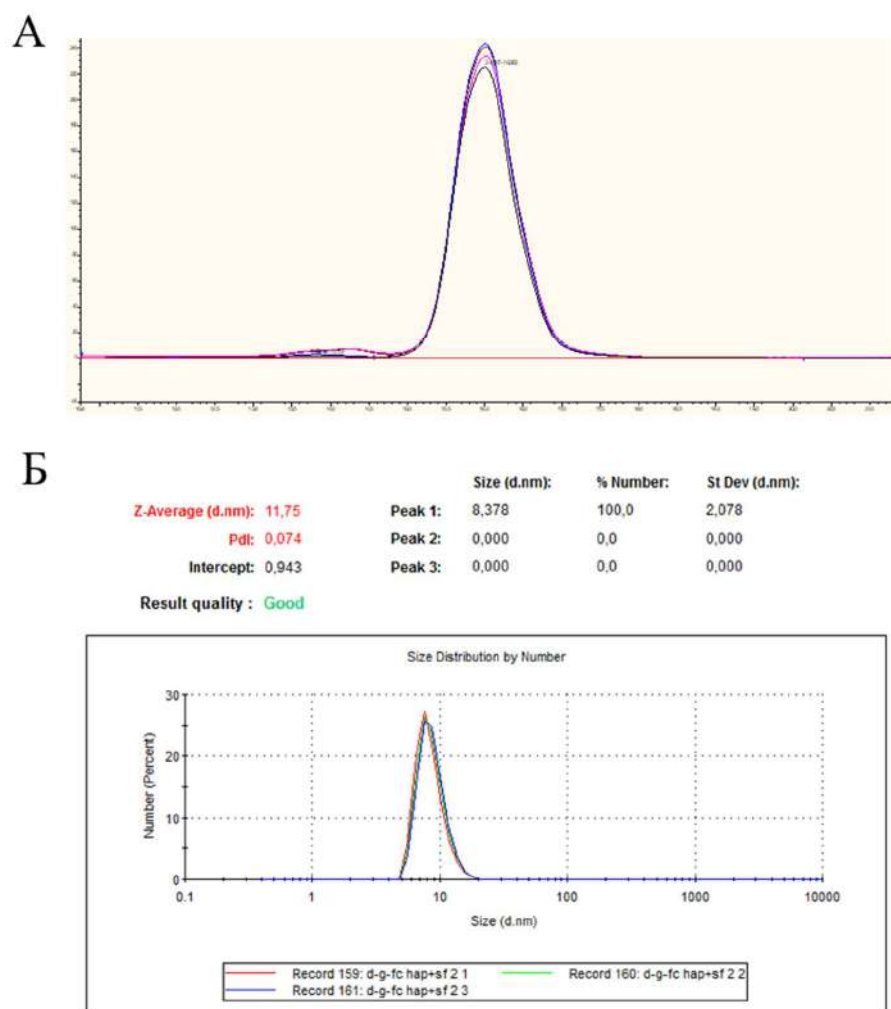


Рисунок 54 – Результаты исследования чистоты и целостности препарата рекомбинантного антитела D9.2-G2.3-Fc: А – ВЭЖХ; Б – определение размера наночастиц в растворе.

Полученные результаты свидетельствуют об однородности полученного препарата и отсутствии значимого количества примесей. Также был определен приблизительный диаметр молекулы антитела D9.2-G2.3-Fc – 8,4 нм.

Согласно данным, полученным в ходе анализа на наличие примесей в препарате ГамИнфлюМаб, количество остаточной ДНК штамма-продуцента CHO, остаточного белка штамма-продуцента CHO и количество остаточного рекомбинантного протеина А находились в диапазоне допустимых концентраций. Исследование пирогенности полученного препарата ферментативным (ЛАЛ-тест) и биологическим (введении исследуемого препарата кроликам) методами продемонстрировало отсутствие бактериальных токсинов и апирогенность исследуемого препарата.

Таким образом, была разработана технология получения кандидатного препарата ГамИнфлюМаб: получен стабильный эукариотический продуцент антитела D9.2-G2.3-Fc (клон 13) на основе клеточной линии CHO-S и подтверждена его генетическая стабильность; были созданы и охарактеризованы Главный и Рабочий банк клеток клона 13; была разработана трехстадийная схема хроматографической очистки препарата антител; была исследована и подтверждена чистота, целостность, отсутствие примесей и апирогенность кандидатного препарата ГамИнфлюМаб.

3.7.2 Исследование функциональной активности Fc-фрагмента антитела D9.2-G2.3-Fc

Функциональная активность Fc-фрагмента антитела D9.2-G2.3-Fc была продемонстрирована в п. 3.6.1 данной главы в исследовании способности D9.2-G2.3-Fc активировать АЗКЦ и АЗКФ с помощью репортерных клеточных линий Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 и Jurkat-Lucia™ NFAT-CD32 (InvivoGen, США).

На данном этапе работы дополнительно проводили измерение аффинности взаимодействия Fc антитела D9.2-G2.3-Fc с разными классами FcR методом биослойной интерферометрии. Результаты анализа представлены на Рисунке 55А.

Также с помощью ИФА показано взаимодействие Fc-фрагмента антитела D9.2-G2.3-Fc с белком системы комплемента человека C1q (Рисунок 55Б).

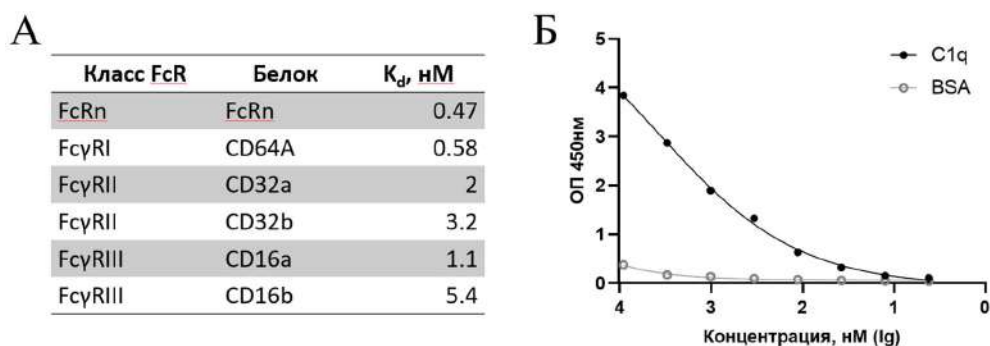


Рисунок 55 – Результаты исследования взаимодействия D9.2-G2.3-Fc с Fc-рецепторами (А) и белком системы комплемента человека C1q (Б). K_d – равновесная константа диссоциации.

Исходя из полученных результатов, для антитела D9.2-G2.3-Fc продемонстрировано высокоаффинное взаимодействие Fc-фрагмента и различных FcR, а также связывание с белком системы комплемента C1q человека.

3.7.3 Исследование фармакокинетики кандидатного лекарственного препарата ГамИнфлюМаб

Фармакокинетику препарата ГамИнфлюМаб изучали при однократном внутривенном введении лабораторным мышам линии BALB/c в дозе 5 мг/кг. Точки отбора проб крови включали: 1 час после полного введения препарата, 4 часа, 24 часа, 48 часов, 96 часов, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 21 день. На каждую временную точку использовали по 3 животных. Количество препарата в сыворотке крови мышей определяли с помощью ИФА.

Фармакокинетические параметры рассчитывали 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.

Результаты исследования представлены в Таблице 9. Согласно полученным данным, период полувыведения ($t_{1/2}$) препарата ГамИнфлюМаб составляет около 64 часов, максимальная концентрация (C_{max}) препарата в сыворотке крови мышей в среднем достигала 36,4 мкг/мл, а время достижения C_{max} (T_{max}) приходилось на временную точку 1 час. Среднее время удержания препарата (MRT_{0-inf_obs}) составило 70 часов. Площадь под экспериментальной кривой концентрация-время (AUC_{0-t}) составила 1309,4 мкг/мл*час, что отличается от площади с учетом экстраполяции данных менее чем на 1 % ($AUC_{0-t/0-inf_obs}$). Минимальные количества действующего вещества препарата (0,23 мкг/мл) детектировали в сыворотке крови мышей вплоть до 21 дня после введения.

Таблица 9 – Фармакокинетические параметры препарата ГамИнфлюМаб

| Параметры | Единицы | Значение |
|-------------------------|--------------------------|--------------------|
| Lambda_z | 1/h (часы) | 0,0109034253076719 |
| $t_{1/2}$ | h (часы) | 63,57150721 |
| T_{max} | h (часы) | 1 |
| C_{max} | мкг/мл | 36,37 |
| C_0 | мкг/мл | 42,2501647177734 |
| C_{last_obs}/C_{max} | | 0,003478141 |
| AUC_{0-t} | мкг/мл*часы | 1309,401082 |
| AUC_{0-inf_obs} | мкг/мл*часы | 1321,002941 |
| $AUC_{0-t/0-inf_obs}$ | | 0,991217386 |
| $AUMC_{0-inf_obs}$ | мкг/мл*часы ² | 92218,99713 |
| MRT_{0-inf_obs} | часы | 69,80983483 |
| V_{z_obs} | (мг/кг)/(мкг/мл) | 6,942777744 |
| Cl_{obs} | (мг/кг)/(мкг/мл)/часы | 0,0757000585617281 |
| V_{ss_obs} | (мг/кг)/(мкг/мл) | 5,28460858477272 |

Таким образом, кандидатный препарат ГамИнфлюМаб характеризуется линейной фармакокинетикой, высокой биодоступностью и длительным периодом полувыведения (64 часа).

3.7.4 Доклинические исследования безопасности кандидатного лекарственного препарата ГамИнфлюМаб

Доклинические исследования безопасности проводились на базе Центра доклинических исследований, ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет). Исследования проводили согласно Руководству по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (Под общей редакцией Хабриева Р.У. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина»»), Москва 2005; Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств (под ред. Миронова А.Н., М., ФГБУ «НЦЭМСП»- 2012 г., в 2-х томах), Москва 2012.

Исследование токсичности при однократном введении на мышах

Все животные, однократно внутривенно получавшие исследуемый препарат (в дозах 150 мг/кг, 90 мг/кг и 30 мг/кг) и буфер/плацебо при внутривенном введении, выглядели здоровыми, активно поедали корм, адекватно реагировали на раздражители, проявляли исследовательский интерес. Влияния исследуемого препарата на массу тела животных не было выявлено.

Определение летальных (ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄, ЛД₉₉), переносимых и максимально переносимых доз, а также коэффициента видовой чувствительности в рамках данного исследования невозможно, по причине отсутствия гибели и видимых негативных эффектов.

Некропсия, проведенная через 14 дней после однократного введения исследуемого препарата, и макроскопический осмотр не выявили отклонений показателей опытных групп от групп контроля при внутривенном введении.

Исследование токсичности при однократном введении на крысах

Все животные, однократно внутривенно получавшие исследуемый препарат (в дозах 60 мг/кг, 30 мг/кг и 15 мг/кг) и буфер/плацебо при внутривенном введении, выглядели здоровыми, активно поедали корм, адекватно реагировали на

раздражители, проявляли исследовательский интерес. Влияния исследуемого препарата на массу тела животных не было выявлено.

Определение летальных (ЛД₁₀, ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄, ЛД₉₉), переносимых и максимально переносимых доз, а также коэффициента видовой чувствительности в рамках данного исследования невозможно, по причине отсутствия гибели и видимых негативных эффектов.

Некропсия, проведенная через 14 дней после однократного введения исследуемого препарата, и макроскопический осмотр не выявили отклонений показателей опытных групп от групп контроля при внутривенном введении.

Исследование токсичности при многократном введении на кроликах, включая анализ местнораздражающего действия

При повторном еженедельном внутривенном применении исследуемого препарата в течение 28 дней у кроликов во всех исследуемых дозах (48 мг/кг, 24 мг/кг, 4,8 мг/кг) препарат не вызывает изменений в общем состоянии и поведении животных.

Статистический анализ массы тела не выявил статистически достоверного влияния препарата на темп прироста массы тела самцов и самок кроликов.

Статистический анализ миелограммы, показателей мочи, сердечно-сосудистой системы и ЦНС, коагулометрического и биохимического исследования, не выявил достоверных различий между контрольными и опытными группами.

Результаты гематологического исследования свидетельствуют о достоверном влиянии исследуемого препарата на лейкоцитарную формулу самцов кроликов породы Шиншилла, получавших препарат в дозе 48 мг/кг на 30 сутки исследования, в сторону снижения гранулоцитов и повышение лимфоцитов. После восстановительного периода у самок, получавших препарат в дозе 48 мг/кг, было отмечено снижение процента лимфоцитов. Описанные изменения, вероятно, связаны с фармакологической активностью исследуемого препарата.

Некропсия, проведенная на 30 и 45 сутки эксперимента, не выявила отклонений в строении тела, структуре и массе внутренних органов у кроликов опытных групп в сравнении с контрольной группой.

При сравнительном анализе внутренних органов кроликов патоморфологических изменений не выявлено, признаков цитотоксического действия препарата не обнаружено. Гистологическое строение изучаемых образцов соответствует норме.

Подтверждено отсутствие у исследуемого препарата при повторном введении местно-раздражающего действия.

Исследование токсичности при многократном введении на крысах, включая анализ местнораздражающего действия

При повторном еженедельном внутривенном применении исследуемого препарата в течение 28 дней у крыс SD во всех исследуемых дозах (60 мг/кг, 30 мг/кг, 15 мг/кг) препарат не вызывает изменений в общем состоянии и поведении животных.

Статистический анализ массы тела не выявил статистически достоверного влияния препарата на темп прироста массы тела самцов и самок кроликов.

Статистический анализ миелограммы, показателей мочи, сердечно-сосудистой системы и ЦНС, коагулометрического и биохимического исследования, не выявил достоверных различий между контрольными и опытными группами.

Результаты гематологического исследования свидетельствуют о достоверном влиянии исследуемого препарата на лейкоцитарную формулу самцов и самок аутбредных крыс, получавших препарат в дозе 60 мг/кг на 30 сутки исследования, в сторону снижения гранулоцитов и повышение лимфоцитов. После восстановительного периода у самок, получавших препарат в дозе 30 мг/кг, было отмечено повышение гранулоцитов и снижение лимфоцитов. Описанные изменения, вероятно, связаны с фармакологической активностью исследуемого препарата.

Некропсия, проведенная на 30 и 45 сутки эксперимента, не выявила отклонений в строении тела, структуре и массе внутренних органов у кроликов опытных групп в сравнении с контрольной группой. При сравнительном анализе внутренних органов кроликов патоморфологических изменений не выявлено, признаков цитотоксического действия препарата не обнаружено. Гистологическое строение изучаемых образцов соответствует норме.

Подтверждено отсутствие у исследуемого препарата при повторном введении местно-раздражающего действия.

Исследование репродуктивной токсичности

При изучении репродуктивной функции самок или самцов препарат в дозах 6 мг/кг и 60 мг/кг вводили половозрелым виргинным самкам крыс ежедневно в течение 15-ти дней (3 эстральных цикла) или ежедневно в течение 49-и дней (период сперматогенеза). Процент гибели эмбрионов на всех стадиях развития у самок, получавших препарат, количество резорбций, а также масса и размер плодов не отличались от контрольных значений. При макроскопическом и гистологическом исследовании яичников самок никаких признаков патологических изменений не выявлено. При макроскопическом исследовании семенников аутбредных самцов крыс, получавших исследуемый препарат в течение 48 дней, никаких патологических изменений не выявлено. Статистически значимых межгрупповых различий в показателях функционального состояния сперматозоидов самцов также не обнаруживалось. В опытных группах роды прошли нормально у всех беременных самок. Интегральные и специфические показатели постнатального развития крысят от опытных крыс-самок не отличались статистически значимым образом от контрольных значений. Продолжительность беременности у опытных самок находилась на уровне контроля и физиологической нормы для данного вида животных. Течение родов было без особенностей. Все крысята родились жизнеспособными, гибели крысят в первый месяц жизни не было зафиксировано. Физическое развитие потомства протекало без каких-либо отклонений от нормы.

При внутривенном введении препарата с 1 по 19-й день беременности не оказывает эмбриотоксического и тератогенного действия, регистрируемого в антенатальном периоде развития потомства.

Результаты проведенных исследований на крысах показывают, что препарат ГамИнфлюМаб не оказывает эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в постнатальном периоде развития потомства.

Исследование тканевой перекрестной реактивности

Исследование перекрестной реактивности с помощью иммуногистохимического метода проводили на 26 типах нормальных тканей: кровеносный сосуд, сердце, легкие, печень, желчный пузырь, селезенка, желудок, поджелудочная железа, кишечник, почки, околоушная слюнная железа, щитовидная железа, паращитовидная железа, небная миндалина, тимус, лимфатический узел, надпочечник, гипофиз, головной мозг, периферический нерв, скелетная мышца, яичник, семенник, кожа, красный костный мозг, клетки крови.

Результаты иммуногистохимического исследования с моноклональными терапевтическими антителами к вирусам гриппа типа А (D9.2-G2.3-Fc) не выявили специфического окрашивания в исследуемых органах; иммуногистохимическая реакция – негативная.

Общее заключение

Совокупные результаты токсикологических исследований препарата позволяют заключить, что препарат не оказывает отрицательного действия на организм животных в дозах, предполагаемых для клинического использования. Препарат не обладает острой токсичностью, хронической токсичностью, местно-раздражающим действием и кросс-реактивностью с нормальными тканями человека.

Таким образом, на основе тяжелоцепочечного биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc был разработан кандидатный препарат ГамИнфлюМаб; проведенные доклинические исследования активности и безопасности данного препарата позволили сделать вывод о целесообразности проведения дальнейших

клинических исследований кандидатного препарата ГамИнфлюМаб как перспективного средства для терапии и экстренной профилактики гриппа.

3.8 Клиническое исследование безопасности, переносимости и фармакокинетики кандидатного лекарственного препарата ГамИнфлюМаб

В рамках доклинических исследований кандидатный препарат ГамИнфлюМаб показал специфическую активность, эффективность и безопасность, что позволило начать его клинические исследования. Было получено разрешение на проведение клинических исследований №454 от 23.08.2023 и начато исследование «Открытое исследование безопасности, переносимости и фармакокинетики лекарственного препарата для ранней этиотропной терапии инфекции, вызванной вирусом гриппа типа А на основе моноклональных антител при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы» в соответствии с Протоколом №01-ГамИнФлюМаб-2023, версия 1.1 от 25.07.2023.

Клиническое исследование проводили на базе ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации. Схема дизайна исследования представлена на Рисунке 56.

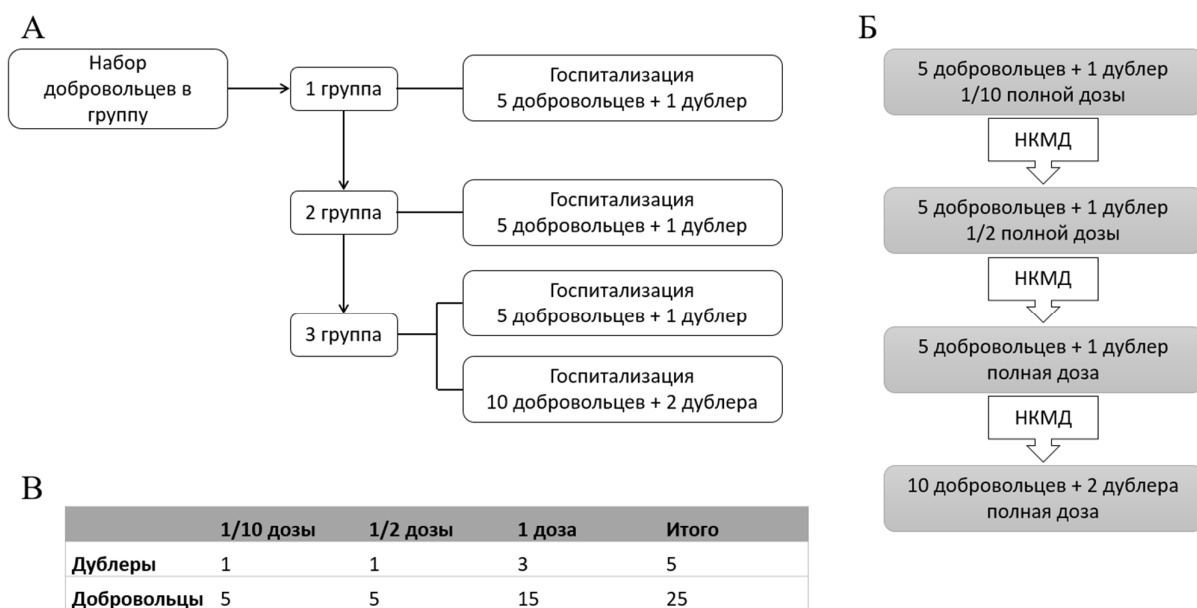


Рисунок 56 – Схема клинического исследования: А – формирование групп; Б – график проведения НКМД; В – распределение добровольцев на группы.

Участие в исследовании приняли 42 добровольца, всем участникам были проведены процедуры скрининга, из них 25 принимали исследуемый препарат. Добровольцев включали в три группы (Г-1, Г-2, Г-3), исследуемый препарат вводили однократно с постепенной эскалацией дозы - 5 добровольцев 1/10 дозы что составляет 1,2 мг/кг, 5 добровольцев 1/2 дозы 6 мг/кг и 15 добровольцев полная доза 12 мг/кг. В первой когорте 1/10 дозы, первое введение препарата осуществлялось одному добровольцу, и после заседания независимого комитета по мониторингу данных (НКМД) принималось решение о продолжении исследования.

В исследование были включены здоровые добровольцы, мужчины и женщины от 20 до 43 лет (включительно), соответствующие критериям включения и не имеющие критериев невключения.

Клиническое исследование состояло из 9 визитов, включая визит 0 (этап скрининга, амбулаторный), визит 1 (этап введения препарата: госпитализация добровольцев, день 0-7) и последующие амбулаторные визиты (день 10, 14, 21, 28, 45, 60 и 90).

Все добровольцы завершили участие в исследовании согласно Протоколу, за исключением добровольца №КВД-040 из Г-3 (полная доза), который досрочно завершил участие в исследовании после визита 2.

Оценка безопасности и переносимости

Результаты проведенного исследования показали благоприятный профиль безопасности и переносимости кандидатного препарата ГамИнфлюМаб. Основанием послужило отсутствие достоверных различий жизненно-важных показателей, параметров инструментальных и лабораторных исследований на протяжении всего исследования по сравнению с исходными данными на скрининге, а также в сравнении между исследуемыми группами добровольцев на протяжении всего исследования.

Всего в ходе исследования было зарегистрировано 132 нежелательных явлений (НЯ), связанных с соматическим статусом и изменением лабораторных показателей добровольцев. По степени тяжести большинство НЯ охарактеризованы как «легкие» и 2 из 132 случаев (1,5 %) – как «среднетяжелые». В 6 из 132 случаев (4,5 %) причинно-следственная связь с препаратом оценена как «вероятная», в 56 случаях (42,4 %) – «возможная», в 2 случаях (1,5 %) – «определенная» и в 68 случаях (51,5 %) – «сомнительная». Большинство случаев НЯ не нуждались в лечении, в 5 из 132 случаев (3,8 %) проведена медикаментозная терапия. 1 НЯ послужило причиной отмены препарата. Исходом 98 из 132 случаев (74,2 %) стало «явление разрешилось / субъект выздоровел» и в 12 случаях (9,1 %) - «не разрешилось / не изменилось». Также в 22 случаях (16,7 %) исход на настоящее время не определен. Частота возникновения НЯ на одного добровольца при введении препарата ГамИнфлюМаб в Г-1 (49 случаев – 37,1 %) составила 9,8, для Г-2 (13 случаев – 9,8 %) – 2,6 и для Г-3 (70 случаев – 53,0 %) – 4,67. Ни одно из НЯ по критерию серьезности не было отнесено к категории СНЯ. Серьезных непредвиденных реакций не было.

На основе опроса добровольцев и осмотра врачом оценивали следующие местные поствакцинальные реакции: боль, гиперемия в месте введения препарата, отек, увеличение регионарных лимфатических узлов. Во всех точках обследования

для всех добровольцев групп 1 – 3 отмечен один признак «отсутствует», что свидетельствовало об удовлетворительной переносимости препарата по анализируемому показателю.

Также были оценены местные и системные реакции. По результатам сравнительной оценки суммарного количества общих реакций в Г-1 – Г-3 установлено отсутствие статистически значимых различий между всеми группами. Представленные данные свидетельствуют об удовлетворительной переносимости препарата.

Также не выявлено достоверных различий значений ЖВП и параметров ЭКГ. Исключение составили: ЖВП ДАД в точке В1_Д6_У ($p=0,034$), ЧСС в точке В1_8 ч ($p=0,024$), В1_Д2_У ($p=0,031$) и В1_Д7 ($p=0,026$), ЧДД в точке В1_Д4_В ($p=0,029$) и ТТ в точке ДВ ($p=0,010$), В1_Д3_В ($p=0,013$), В1_Д4_У ($p=0,012$), В1_Д4_В ($p=0,006$), В1_Д5_У ($p=0,031$) и В1_Д6_В ($p=0,001$) и параметра ЭКГ ЧСС в точке В1_Д2 ($p=0,012$) и В1_Д7 ($p=0,009$) в группах 1-3 при межгрупповом сравнении.

Значения лабораторных показателей также статистически значимо не различались в исследуемых группах, исключение составили: доли Моноцитов в точке ДВ, В1_Д2, В1_Д7, В3 и В5, количества Моноцитов в точке В1_Д2, доли Нейтрофилов в точке В3, СОЭ в точке В5, Эритроцитов в точке В1_Д7 в ОАК, АСТ в точке В1_Д2, В1_Д7, В3, Креатинина в точке ДВ, В1_Д7, ЛДГ в точке В1_Д2, В1_Д7, Общего белка в точке В1_Д7, В3, С-РБ в точке ДВ, В1_Д2, В1_Д7, В3 в БхАК, МНО в точке ДВ, В3, Тромбинового времени в точке ДВ, В1_Д7, В3 в коагулограмме, доли CD16 (CD16⁺/56⁺- клетки (NK)) в точке В3, количества CD3 (CD3⁺-клетки (Т-лимфоциты)) в точке В1_Д2, IgE в точке В1_Д7 в иммунологическом анализе крови, pH в точке В5 в ОАМ в группах 1-3 при межгрупповом сравнении. А также снижение Гематокрита в точке В3 ($p=0,041$), Гемоглобина в точке В3 ($p=0,003$) в ОАК, С-РБ в точке В5 ($p=0,041$) в БхАК и повышение ЛДГ в точке В3 ($p=0,041$) в БхАК, IgG в точке В5 ($p=0,003$) в иммунологическом анализе крови в Г-1; снижение Тромбинового времени в точке В3 ($p=0,009$) в коагулограмме и повышение Тромбоцитов в точке В3 ($p=0,023$) в ОАК, ЩФ в точке В3 ($p=0,017$) и В5 ($p=0,031$) в БхАК, МНО в точке В3 ($p=0,017$)

в коагулограмме в Г-2; снижение Общего билирубина в точке В3 ($p=0,024$) в БхАК, МНО в точке В1_Д7 ($p=0,006$) в коагулограмме и повышение Гематокрита в точке В1_Д7 ($p=0,001$), Гемоглобина в точке В1_Д7 ($p=0,029$), Тромбоцитов в точке В3 ($p=0,049$), Эритроцитов в точке В1_Д7 ($p=0,049$) в ОАК, Общего белка в точке В5 ($p=0,029$), ЩФ в точке В1_Д7 ($p=0,035$) и В3 ($p=0,049$) в БхАК в Г-3 при внутригрупповом сравнении.

При этом статистически значимые различия отдельных параметров были отнесены к статистическим ошибкам 1 типа, поскольку встречались во всех группах и имели разнонаправленный характер.

Оценка параметров иммуногенности и фармакокинетики

Выявление и измерение концентрации антител к антителу (ADA) D9.2-G2.3-Fc у здоровых добровольцев при однократном введении возрастающих доз (1,2; 6; 12 мг/кг) кандидатного препарата ГамИнфлюМаб проводили в сыворотке здоровых добровольцев. Забор крови для получения сыворотки проводили до введения препарата и через 7, 28 и 90 дней после введения препарата. Для выявления и определения концентрации ADA в сыворотке крови здоровых добровольцев была использована коммерческая тест-система Human Anti-Human Antibody ELISA Kit (Epitope Diagnostics, США), согласно протоколу фирмы-производителя.

В результате проведения анализа концентраций ADA в сыворотках крови добровольцев не было показано статистически достоверного увеличения содержания указанных антител, следовательно препарат не является иммуногенным.

Количественное определение концентрации исследуемого кандидатного препарата ГамИнфлюМаб в биологических образцах выполнено с использованием метода твердофазного ИФА. Забор образцов крови для исследования проводился в следующие временные точки: до введения препарата, через 1 час, через 4 часа, 8 часов, 24 часа, 36 часов, 48 часов, 96 часов, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 21 день, 28 дней, 45 дней, 60 дней, 90 дней. 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.

Результаты исследования фармакокинетики кандидатного лекарственного препарата ГамИнфлюМаб представлены в Таблице 10 и на Рисунке 57.

Таблица 10 – Результаты расчета фармакокинетических параметров

| Параметр | Ед. измерения | D9.2-G2.3-Fc | | |
|-------------------|----------------------|--------------|------------|------------|
| | | 1,2 мг/кг | 6 мг/кг | 12 мг/кг |
| Lambda_z | 1/h | 0,0021 | 0,0022 | 0,0021 |
| t1/2 | h | 322,9 | 316,07 | 327,8 |
| Tmax | h | 1 | 8 | 1 |
| Cmax | µg/ml | 61,00 | 387,38 | 536,38 |
| C0 | µg/ml | 1 | 1 | 1 |
| Clast_obs/Cmax | | 0,014 | 0,023 | 0,078 |
| AUC 0-t | µg/ml*h | 11563,82 | 59194,16 | 84806,77 |
| AUC 0-inf_obs | µg/ml*h | 11972,039 | 63373,72 | 104734,4 |
| AUC 0-t/0-inf_obs | | 0,9659 | 0,934 | 0,809 |
| AUMC 0-inf_obs | µg/ml*h ² | 4581078,43 | 22157036,6 | 58435795,8 |
| MRT 0-inf_obs | h | 382,14 | 349,12 | 557,44 |
| Vz_obs | (mg/kg)/ (µg/ml) | 0,0467 | 0,0431 | 0,0541 |
| Cl_obs | (mg/kg)/ (µg/ml)/h | 0,0001 | 9,46E-05 | 0,00011 |
| Vss_obs | (mg/kg)/ (µg/ml) | 0,038 | 0,033 | 0,0638 |

Согласно полученным данным, период полувыведения (t1/2) кандидатного препарата ГамИнфлюМаб составляет около 320 часов, максимальная концентрация (Cmax) препарата при введении терапевтической дозы 12 мг/кг в среднем составила 536,4 мкг/мл, а время достижения Cmax (Tmax) приходилось на временную точку 1 час.

Изменение концентрации в сыворотке в зависимости от дозы вводимого препарата

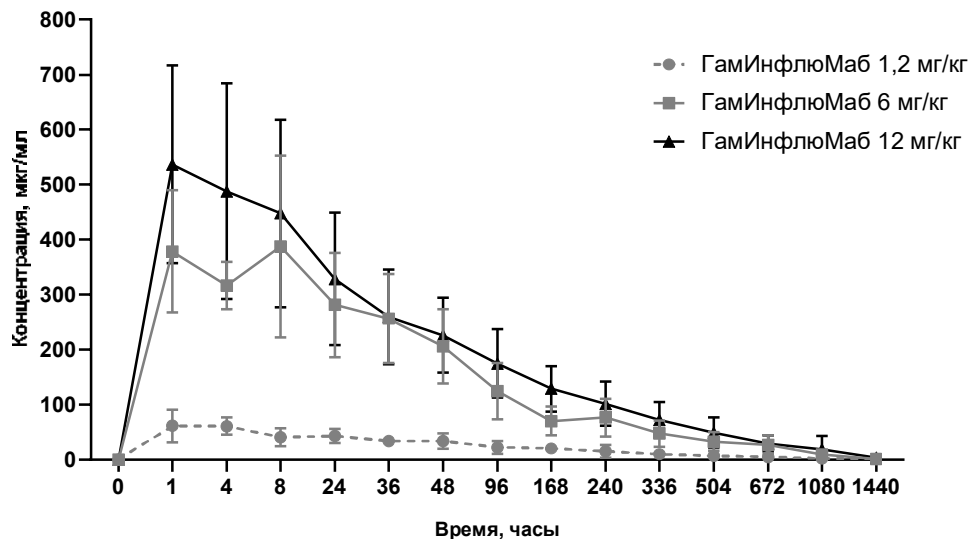


Рисунок 57 – Изменение концентрации антитела D9.2-G2.3-Fc в сыворотке крови добровольцев в зависимости от дозы вводимого препарата ГамИнфлюМаб.

Таким образом, показано длительное сохранение действующих веществ в плазме крови в высоких концентрациях, что позволяет рассматривать кандидатный препарат ГамИнфлюМаб как перспективное терапевтическое и профилактическое средство.

Заключение. Результаты проведенных доклинического и клинического исследований позволяют сделать вывод об эффективности, безопасности и переносимости кандидатного препарата ГамИнфлюМаб (раствор для внутривенного введения, 6 мг/мл, производитель филиал «Медгамал» ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) для ранней этиотропной терапии гриппозной инфекции, вызываемой вирусами гриппа типа А.

В совокупности полученные данные характеризуют разработанный кандидатный препарат ГамИнфлюМаб как перспективное лекарственное средство для специфической терапии гриппозной инфекции и обосновывают целесообразность проведения дальнейших клинических исследований.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Вирусы гриппа типа А ежегодно приводят к гибели сотен тысяч людей по всему миру и в будущем могут спровоцировать развитие новой пандемии. Повторяющиеся сезонные эпидемии и вероятность возникновения пандемии связаны с быстрой антигенной изменчивостью ВГА, которая снижает эффективность вакцинации и приводит к устойчивости к противовирусным препаратам. Вышесказанное обуславливает высокую значимость защиты от ВГА для системы здравоохранения и актуальность разработки новых, универсальных средств профилактики и терапии инфекции, вызванной ВГА. В решении данной задачи ценным дополнением к арсеналу противовирусных средств могли бы служить мАт широкого спектра, нацеленные на консервативные эпитопы поверхностных белков вируса гриппа.

За последние годы стремительный прогресс в области биотехнологии и иммунологии привел к тому, что в настоящее время на мировом фармацевтическом рынке существует более 200 препаратов против различных заболеваний на основе мАт и около 1400 экспериментальных препаратов проходят клинические исследования [66]. По состоянию на май 2025 г. среди 229 зарегистрированных препаратов мАт доля противовирусных антител составляет всего 7% (против таких вирусов как бешенство, РСВ, SARS-CoV-2, вирус Эбола и ВИЧ), при этом среди них нет ни одного одобренного препарата на основе мАт против вирусов гриппа (по данным The Antibody Society). Подавляющее большинство используемых в клинической практике мАт по своей структуре относятся к классическим иммуноглобулинам, состоящим из двух тяжелых и двух легких цепей. Однако, такие мАт имеют ряд ограничений при распознавании некоторых эпитопов вирусных белков: широкая, плоская поверхность паратопа IgG, включающая 6 участков CDR, наряду с большим размером молекулы могут препятствовать эффективному связыванию с консервативными, зачастую труднодоступными, участками поверхностных белков. Антигенсвязывающие фрагменты тяжелоцепочечных антител – VHH – являются перспективным инструментом

для разработки терапевтических препаратов против инфекционных заболеваний, в том числе гриппа, поскольку они способны эффективно распознавать труднодоступные и скрытые эпитопы, обильно представленные на поверхности белков оболочки вируса гриппа (НА, NA и М2). Несмотря на относительную новизну формата VHH, уже четыре препарата на основе однодоменных антител одобрены и успешно применяются в различных странах для терапии аутоиммунных заболеваний и раковых опухолей. Однако, на сегодняшний день не существует ни одного зарегистрированного препарата на основе однодоменных антител против вируса гриппа (по данным электронного ресурса ClinicalTrials.gov). Поэтому, разработка профилактических и терапевтических средств на основе однодоменных антител широкого спектра против инфекции, вызванной ВГА, является перспективным направлением исследований.

В связи с этим целью данного исследования являлось получение однодоменных антител к консервативным эпитопам гемагглютиниона и изучение возможности их применения для терапии инфекции, вызванной ВГА.

Выбор антигена для иммунизации животного и отбора специфических клонов является существенным этапом при получении антител методом фагового дисплея. Известно, что основной антигенной детерминантой ВГА является поверхностный гликопротеин НА, поэтому он служит перспективной мишенью для разработки терапевтических средств против ВГА, в том числе на основе МАт. Спектр активности МАт напрямую зависит от консервативности узнаваемого эпитопа, что в свою очередь определяется витальностью функции тех или иных а.о. Среди антител, специфических к глобулярному домену НА, широким спектром активности характеризуются антитела, мимикрирующие связывание сиаловых кислот с RBS [105, 157, 160, 228, 232, 275]. Также кросс-реактивностью обладают антитела к «интерфейсу» – части поверхности глобулы, где мономеры соприкасаются друг с другом, формируя тример [30, 32, 269]. Все указанные выше эпитопы не только высококонсервативные, но также конформационные. Наибольшей же консервативностью в структуре НА обладает стеблевой домен (СД НА). В основном МАт широкого спектра к СД НА связываются с

конформационными эпитопами в области гидрофобной бороздки А-спирали [80, 98, 123, 158]. Таким образом, поскольку большинство существующих мАт с широким спектром кросс-реактивности направлены на консервативные конформационные эпитопы, было необходимо получить рекомбинантные антигены с сохранной четвертичной структурой. Поэтому на первом этапе настоящей работы были получены рекомбинантные полноразмерные НА следующих штаммов ВГА А/Hawaii/70/2019 (H1N1) и А/Hong Kong/45/2019 (H3N2), а также стабилизированный тример СД НА штамма А/Brisbane/59/2007 (H1N1). Для получения полноразмерного рекомбинантного НА распространенным подходом является экспрессия полипептида НА0, который, в зависимости от штамма ВГА, способен естественным образом тримеризоваться [272]. В свою очередь получение стеблевого домена в отрыве от глобулярного является технически сложной задачей по ряду причин. Во-первых, в природе не предусмотрен процесс фолдинга и тримеризация СД НА как независимой единицы. По всей видимости, сворачивание СД происходит котрансляционно с укладкой глобулярного домена в следующей последовательности: начальный участок СД (представлен первыми ~42 а.о. НА1 цепи), «глобула» НА и оставшиеся а.о. СД. Также, в отсутствии головного домена обнажаются гидрофобные а.о. СД, в результате чего белок становится склонен к агрегации, снижается его стабильность и растворимость [167]. В связи с этим, необходимо было получить стабилизированный тримеризованный рекомбинантный СД НА. Для этого была использована последовательность «стебля» НА штамма А/Brisbane/59/2007 (H1N1) mini-НА #4900, опубликованная Импальяццо А. и соавт. [130]. В указанной работе, последовательность стволового домена была модифицирована таким образом, чтобы стабилизировать его тримерную форму и сохранить сайты связывания широко нейтрализующих антител.

Важно отметить, что НА вирусов гриппа А делятся на две филогенетически далекие друг от друга группы. Аминокислотные последовательности и сайты гликозилирования широко варьируют не только между группами, но и внутри групп, а также среди разных штаммов ВГА внутри подтипа. Получение одного

антитела, которое могло бы узнавать и нейтрализовать различные подтипы ВГА из разных групп, представляется крайне сложной задачей. Поэтому данная работа была разбита на два последовательных этапа, в рамках которых из двух независимых иммунных библиотек были выделены однодоменные антитела отдельно против ВГА группы 1 и против ВГА группы 2.

Для получения однодоменных антител, специфичных к НА филогенетической группы 1, была проведена вакцинация альпака субъединичной вакциной Гриппол® плюс, получена иммунная библиотека и проведена селекция специфических рекомбинантных бактериофагов с использованием в качестве мишени рекомбинантного СД НА штамма A/Brisbane/59/2007 (H1N1). Известно, что в структуре НА стеблевой домен обладает наибольшей консервативностью и антитела к СД НА, как правило, обладают широким спектром специфической и нейтрализующей активности. После проведения биопаннинга среди отобранных индивидуальных клонов VHH были выбраны два антитела, обладающие наибольшей аффинностью к СД НА по результатам ИФА и SPR анализа – H1.2 и G2.3. Далее было показано, что отобранные однодоменные антитела обладают широким спектром связывания и нейтрализации ВГА филогенетической группы 1 преимущественно подтипа H1. Также показано взаимодействие VHH G2.3 и H1.2 с НА подтипа H6. Полученные в экспериментах *in vivo* на модели летальной инфекции мышей данные свидетельствовали о 100% протективности антител G2.3 и H1.2 против летальной дозы адаптированного к мышам ВГА A/California/07/2009 (H1N1) при и.н. введении.

Однодоменные антитела даже в мономерной форме не уступают по своей аффинности классическим mAb, однако, ввиду своего небольшого размера, обладают некоторыми недостатками, которые могут ограничивать их терапевтический потенциал. Поскольку однодоменные антитела представлены одной полипептидной цепью, их легко модифицировать с помощью генно-инженерных методик. Различные модификации позволяют увеличить время циркуляции антитела в организме, увеличить авидность VHH, добавить им новые функции или получить би- или мультиспецифичную молекулу. Ранее было

показано, что в мультивалентном формате многократно возрастает нейтрализующая активность VHH, а также расширяется спектр нейтрализуемых штаммов [92, 124, 158, 170]. В настоящей работе однодоменные антитела модифицировали с помощью Fc фрагмента IgG1 человека. Такая модификация за счет увеличения авидности позволяет увеличить аффинность антител и расширить спектр нейтрализующей активности. Также химера VHH-Fc характеризуется увеличенным временем полувыведения в сравнении с мономером VHH. Основное же преимущество формата VHH-Fc заключается в способности задействовать эффекторные функции, опосредованные взаимодействием Fc-фрагмента и FcγR. Неоднократно было показано, что Fc-опосредованные функции иммуноглобулинов, наряду с прямой вируснейтрализацией, являются важным механизмом элиминации инфекций, вызываемых вирусами гриппа, РСВ, вирусом лихорадки Западного Нила, вирусом Эболы, Дэнге или ВИЧ. Fc-фрагмент человеческого IgG1 является изотипом выбора при разработке терапевтических препаратов на основе мАт, поскольку он эффективно связывается с C1q и различными Fc-рецепторами, обеспечивая, таким образом, вовлечение клеточно-опосредованных механизмов в борьбу с вирусом. В результате с помощью транзientной трансфекции клеток линии CHO-S и последующей хроматографической очистки экспрессированных антител были получены препараты мАт G2.3-Fc и H1.2-Fc.

Далее исследовали изменения и спектр активности антител после модификации. Примечательным является тот факт, что опосредованная Fc-фрагментом димеризация не только повысила аффинность VHH-Fc к НА, но и обеспечила G2.3-Fc, в отличие от мономерной формы G2.3, связывание с такими подтипами НА, как H5 Hubei и H9. Для G2.3-Fc также не показано взаимодействие с НА H5 Vietnam, что может быть связано с внесением производителем рекомбинантного белка H5 Vietnam мутации в последовательность сайта расщепления трипсином (RERRRKKR→TETR) и вероятного изменения конформации белка. Более того, в результате модификации Fc, помимо улучшения нейтрализующего потенциала G2.3-Fc, данная молекула приобрела способность

нейтрализовать ВГА подтипов Н2, Н5 и Н9. Аффинность и нейтрализующая активность антитела Н1.2 после модификации Fc изменилась не так выражено, как в случае G2.3-Fc; также не наблюдали расширения спектра взаимодействия мАт Н1.2-Fc. Предположительно, это может быть связано с тем, что расстояния между мономерами VHH антитела Н1.2-Fc или гибкости шарнирного региона недостаточно для обеспечения кросс-связывания мономеров НА внутри тримера или между двумя близкими тримерами НА.

Учитывая широкий спектр связывания и нейтрализации, для дальнейшей работы использовали клон G2.3-Fc. На следующем этапе работы необходимо было оценить функциональность Fc-фрагмента в составе VHH-Fc и способность антитела задействовать эффекторные функции, поскольку предыдущие исследования указывают на важную роль Fc-опосредованных функций специфичных к «стеблю» антител в элиминации гриппозной инфекции *in vivo*. Возможность НА-специфической активации FcγR VHH-Fc исследовали с помощью репортерных клеточных линий Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 и Jurkat-Lucia™ NFAT-CD32. Полученные данные свидетельствуют о том, что слияние с доменом Fc позволяет VHH-Fc эффективно задействовать эффекторные функции в ответ на связывание с НА.

Далее оценивали профилактическую и терапевтическую эффективность мАт G2.3-Fc с использованием летальной модели инфекции, вызванной вирусами гриппа, у мышей. В режиме профилактического введения протективность G2.3-Fc *in vivo* исследовали в отношении ВГА подтипов Н1, Н2, Н5 и Н9, поскольку данные вирусы среди всех ВГА филогенетической группы 1 наиболее актуальны. ВГА подтипа Н1 циркулируют в настоящий момент в человеческой популяции. В прошлом вирусы подтипов Н1 и Н2 вызывали пандемии, а ВГА подтипов Н5 и Н9 вызывают опасения с возникновением пандемий в будущем. Согласно полученным данным, G2.3-Fc эффективно защищал мышей как от летального исхода, так и от развития инфекции, вызванной вирусами Н1N1, Н2N3, Н5N2 или Н9N2. Отдельно стоит отметить, что G2.3-Fc продемонстрировал 100% протективность при заражении вирусами Н1N1 и Н5N2 даже в такой низкой дозе, как 0,6 мг/кг. В

режиме терапевтического введения антитела спустя 24 часа после инфекции полная защита животных от летального исхода и развития симптомов заболевания была достигнута при использовании дозы G2.3-Fc 30 мг/кг.

Известно, что нейтрализация вирусов гриппа антителами может осуществляться посредством множества механизмов, осуществляемых на разных стадиях жизненного цикла вируса, включая ингибирование прикрепления вируса, блокирование слияния мембран в поздней эндосоме, ограничение процесса сборки и активацию эффекторных функций. Существует ряд работ, в которых показано, что именно антитела к «стеблю» НА, в том числе и VHN, ингибируют процесс слияния вирусной и эндосомальной мембран [80, 86, 123, 158, 239]. Также, опубликованные ранее исследования говорят о том, что антитела к стеблевому домену НА более эффективно блокируют выход вируса из клетки, нежели его проникновение [113, 212]. Поэтому для изучения механизма противовирусного действия мАт G2.3-Fc исследовали влияние антитела на различные этапы жизненного цикла вируса. Было показано, что G2.3-Fc блокирует как проникновение, так и выход вируса из клетки, при этом более эффективно подавляет проникновение ВГА в клетку. Основной же механизм действия G2.3-Fc, как показал анализ ингибирования гемолиза эритроцитов, связан с ингибированием слияния вирусной и эндосомальной мембран, путем предотвращения конформационных изменений НА под действием низкого pH.

Механизмы, лежащие в основе противовирусного действия VHN, тесно связаны с функцией таргетного белка и соответствующим эпитопом. Наиболее консервативными а.о. «стебля» являются те, которые катализируют его значительные конформационные изменения, спровоцированные снижением pH, включая пептид слияния, который заякоривается в эндосомальную мембрану. Было показано, что мАт, в том числе и однодоменные антитела, связывающиеся с этой областью, блокируют конформационные изменения, тем самым ингибируя слияние мембран [80, 86, 223, 233, 239]. Для определения эпитопной специфичности G2.3-Fc первоначально проводили конкурентный ИФА с ранее описанным VHN к СД НА – SD38 [158]. Данное антитело взаимодействует с широким спектром НА

группы 1 и механизм его нейтрализующего действия аналогичен G2.3-Fc. Известно также, что эпитоп SD38 расположен в области А-спирали «стебля» НА и частично перекрывается с эпитопами других мАт широкого спектра (CR9114, CR6261 и FI6v3). Результаты проведенного анализа показали, что G2.3 конкурирует за связывание с SD38 и, предположительно, имеет перекрывающийся с SD38 эпитоп. Также было установлено, что эпитоп G2.3-Fc является конформационным и разрушается под действием низкого pH. Для более точной характеристики эпитопа антитела G2.3-Fc были получены эскейп-мутанты вируса A/Victoria/2570/2019 (H1N1). Анализ аминокислотных замен, возникших в результате пассирования вируса в возрастающих концентрациях G2.3-Fc, показал наличие у всех выделенных эскейп-мутантов следующих мутаций: T393N и H455L (T49N и H111L по нумерации НА2 субъединицы). А.о. Т49 располагается в А-спирали СД НА, в то время как аминокислота H111 – в С-спирали НА2 субъединицы. Однако, проведенный анализ полученных эскейп-мутантов не позволяет с полной уверенностью говорить о том, что а.о. 49 и 111 непосредственно участвуют в связывании с антителом G2.3-Fc. Известно, что Т49 входит в структуру эпитопов различных мАт широкого спектра, в отличие от H111 [20]. Согласно литературным данным, исключительная консервативность гистидина в положении 111 (для НА группы 1) связана с участием данной а.о. в конформационном изменении НА в условиях сниженного pH в эндосоме [75]. Поэтому с большей вероятностью Т49 действительно непосредственно связывается с паратопом G2.3-Fc, а мутация в а.о. 111 скорее является компенсаторной и влияет на стабильность структуры молекулы НА. Стоит отметить, что G2.3-Fc не был способен взаимодействовать в ИФА с НА H2, H5 Vietnam, H8 и H12, несмотря на наличие в НА2 в положении 49 треонина. Данный феномен может быть обусловлен отличающимся профилем гликозилирования между разными подтипами НА [241]. Расположение гликанов в гемагглютинине зависит не только от конкретного штамма вируса, но также и от системы экспрессии белка [25]. Приобретение дополнительных сайтов гликозилирования в эпитопе антитела создает стерическое препятствие его взаимодействию с антигеном. В тоже время, отсутствие того или иного гликана в

месте связывания также может приводить к снижению активности антител [300]. В иммуноферментном анализе с дегликозилированным антигеном сигнал G2.3-Fc существенно снижался, что может говорить в пользу участия N-связанных гликанов в его связывании с НА.

Таким образом, было отобрано антитело G2.3-Fc, обладающее высоким терапевтическим потенциалом в качестве противовирусного средства для борьбы с инфекцией, вызванной ВГА филогенетической группы 1. Однако, на следующем этапе настоящей диссертационной работы предстояло решить задачу по получению однодоменных антител, специфичных к НА филогенетической группы 2, для того чтобы охватить больший спектр циркулирующих штаммов ВГА.

Иммунная библиотека Н3-специфических однодоменных антител была получена в результате иммунизации двугорбого верблюда препаратом полноразмерного рекомбинантного НА штамма A/Hong Kong/45/2019 (H3N2). Далее параллельно проводили две независимые селекции специфических рекомбинантных бактериофагов методом фагового дисплея. Первый вариант биопаннинга осуществляли на рекомбинантном НА, который использовали для иммунизации животного. Для второго варианта селекции был выбран инактивированный вирус A/Aichi/2/68 (H3N2). Использование для селекции гетерологичной мишени предположительно способствует отбору клонов, обладающих более широким спектром связывания. Согласно результатам исследования кросс-реактивности отобранных в ходе обеих селекций VHH широкий диапазон активности демонстрировали антитела E12.2, D4.2 и D9.2, отобранные в ходе селекции на НА штамма A/Aichi/2/68 (H3N2), тем самым подтверждая гипотезу о том, что использование гетерологичного штамма для биопаннинга способствует отбору кросс-реактивных антител. Указанные VHH взаимодействовали с НА различных штаммов внутри подтипа Н3, а E12.2 также связывался с НА подтипа Н4. Однако, все отобранные однодоменные антитела не обладали нейтрализующей активностью.

Ненейтрализующие антитела, согласно литературным данным, могут успешно реализовать противовирусное действие *in vivo* за счет Fc-опосредованных

механизмов, таких как АЗКЦ, АЗКФ и КЗЦ. Поэтому с целью улучшения терапевтического потенциала полученных VHH были получены слитые с Fc доменом IgG1 человека молекулы: D9.2-Fc, E12.2-Fc, D4.2-Fc. Исследование их аффинности и кросс-реактивности в ИФА показал наиболее выраженные изменения после модификации для антител D4.2-Fc и D9.2-Fc: помимо существенного снижения значений EC_{50} для связывания с НА подтипа НЗ, данные антитела в Fc-слитом формате могли взаимодействовать с НА подтипа Н4. Отдельно стоит отметить тот факт, что в ИФА мономеры D9.2 и E12.2, наряду с соответствующими молекулами VHH-Fc, связывались с рекомбинантной НА1 субъединицей НА, в то время как D4.2 взаимодействовало только с полноразмерными НА. Методом вестерн-блот было подтверждено наличие сайта связывания для антител D9.2-Fc и E12.2-Fc в НА1 субъединице НА, а для D4.2-Fc – в НА2 субъединице. Однако, исходя из имеющихся данных, нельзя с уверенностью заключить о расположении эпитопов в конкретном домене НА, поскольку последовательность НА1 хоть и представлена большей частью в глобулярном домене, но также включает в себя участки стеблевого домена. В ходе изучения способности полученных VHH-Fc активировать АЗКЦ и АЗКФ в ответ на связывание с НА было показано, что активность всех VHH-Fc статистически достоверно отличалась от активности моновалентной формы VHH и интактных клеток.

Следующий этап заключался в исследовании эффективности VHH-Fc *in vivo* с использованием летальной модели инфекции, вызванной вирусом гриппа H3N2, у мышей. При местном (и.н.) профилактическом введении антител D9.2-Fc, E12.2-Fc и D4.2-Fc, только D9.2-Fc обеспечивало 100% защиту животных от летального исхода. Поэтому для дальнейшего исследования выбрали антитело D9.2-Fc. В профилактическом режиме при системном введении D9.2-Fc защищал 100% мышей от летального исхода и развития признаков заболевания. В терапевтическом режиме данное антитело продемонстрировало протективность на уровне 80%.

В том случае, когда антитело не обладает нейтрализующей активностью, либо не способно непосредственно блокировать взаимодействие вируса и его рецептора, роль Fc-зависимых функций выходит на первый план в защите от инфекции. Это было продемонстрировано на примере VHN против НА ВГА, которое в слитом с Fc формате, несмотря на отсутствие прямого противовирусного действия *in vitro*, защищало животных от летальной инфекции ВГА [51]. Поэтому мы предположили, что эффективность D9.2-Fc *in vivo* может быть опосредована Fc-зависимыми эффекторными функциями. Для проверки данной гипотезы необходимо было блокировать функциональность Fc-фрагмента, при этом сохранив структуру молекулы антитела D9.2-Fc. Внесение определенных мутаций в Fc могут снизить или полностью блокировать связывание с Fcγ рецепторами (FcγR) и C1q. Наиболее широко используемой комбинацией аминокислотных замен является так называемая LALA-мутация: L234A/L235A [169]. Однако, данная мутация не полностью ингибирует взаимодействие Fc с FcγR, поэтому в последние годы активно ведется поиск новых вариантов мутаций для полного блокирования Fc-фрагмента. В 2016 г. впервые была предложена комбинация мутаций L234A/L235A/ P329G, внесение которых в Fc полностью предотвращает его связывание с FcγR и C1q [227]. Не менее важен тот факт, что данная комбинация не влияет на структуру Fc-фрагмента. При помощи внесения в Fc мутаций L234A/L235A/ P329G, было показано, что такая молекула не способна обеспечивать защиту животных от летальной инфекции, вызванной вирусом H3N2. Таким образом, было показано, что взаимодействие Fc-FcγR играет решающую роль в защите животных от летальной инфекции, вызванной ВГА, для антитела D9.2.

В результате, было получено перспективное антитело D9.2-Fc, специфичное к широкому спектру НА подтипа H3 и продемонстрировавшее протективную активность в экспериментах *in vivo* на модели летальной инфекции H3N2.

Ввиду большого разнообразия существующих подтипов НА, получение одного универсального антигенсвязывающего фрагмента, специфичного ко всем или большинству НА, является хоть и возможной, но крайне сложной задачей.

Поэтому для создания универсального терапевтического средства против ВГА необходимо комбинировать несколько антител разной специфичности. Однако такой подход имеет свои недостатки, связанные в основном с технологическим процессом производством препаратов, состоящих из ≥ 2 действующих веществ. Например, высокая стоимость и сложность производства, большая вероятность перекрёстной контаминации клонов-продуцентов. Не менее важным недостатком является большое количество суммарно вводимого белкового препарата, поскольку необходимо суммировать эффективную дозу для каждого из компонентов. Это может привести к высокому риску развития иммунологических реакций в клинической практике. Преодолеть подобные недостатки возможно путем объединения нескольких антигенсвязывающих фрагментов в одну молекулу для получения би- или мультиспецифического антитела. Биспецифические антитела получили широкое распространение в терапии онкологических и аутоиммунных заболеваний. В настоящее время биспецифические антитела активно изучаются в качестве препаратов для иммунотерапии вирусных инфекций, таких как COVID-19, ВИЧ, лихорадка Денге, Зика, и грипп [67]. В контексте получения мультиспецифических мАт VHH являются крайне удобным инструментом с точки зрения простоты генно-инженерных манипуляций, поскольку полипептидная последовательность антигенсвязывающего фрагмента кодируется одним геном. Учитывая вышеизложенное, в данной работе было принято решение объединить два VHH различной специфичности – G2.3 и D9.2 – в один гетеродимер, слитый с Fc доменом IgG1 человека. В результате, были получены препараты мАт, в которых молекулы VHH по-разному ориентированы относительно Fc-фрагмента: D9.2-G2.3-Fc и G2.3-D9.2-Fc.

Исследование спектра связывающей и нейтрализующей активности показало, что полученные VHH-VHH-Fc повторяют спектр активности, характерный для входящих в его состав антигенсвязывающих фрагментов. Существенное изменение нейтрализующих свойств VHH-VHH-Fc наблюдали для ВГА подтипа Н9, однако в ИФА оба антитела взаимодействовали с НА данного подтипа. Кроме того, регистрировали увеличение значений IC_{50} мАт G2.3-D9.2-Fc

в отношении вирусов H2N3 и H5N2. В литературе также описаны случаи, в которых мультимеризация однодоменных антител не приводила к ожидаемому повышению нейтрализующей активности [123, 174]. Полученные результаты, вероятно, связаны с высокой плотностью расположения НА на поверхности вириона, в результате чего доступ более крупной молекулы (в сравнении с VHH и VHH-Fc) к СД может быть затруднен. Другой причиной может служить пространственная конкуренция между антигенсвязывающими фрагментами в молекуле VHH-VHH-Fc ввиду недостаточной/избыточной длины линкера между двумя VHH или между VHH и Fc. Скорректировать данное явление возможно путем подбора длины линкера для каждой конкретной молекулы, либо с помощью изменения расположения VHH относительно Fc. Например, описаны биспецифические антитела, в которых антигенсвязывающие фрагменты расположены как с N-, так и с С-конца Fc-фрагмента [263, 288].

Далее оценивали профилактическую эффективность VHH-VHH-Fc с использованием летальной модели инфекции, вызванной ВГА, относящимся к различным филогенетическим группам (H1N1 или H3N2), у мышей. Наибольшую протективность продемонстрировало антитело D9.2-G2.3-Fc: оно защищало 100% и 87,5% животных при заражении летальной дозой вируса H3N2 и H1N1, соответственно. При введении в терапевтическом режиме D9.2-G2.3-Fc обеспечивало 100% протективность при заражении как ВГА H1N1, так и H3N2. Полученные результаты свидетельствуют о высоком терапевтическом потенциале антитела D9.2-G2.3-Fc как основы для разработки кандидатного препарата против инфекции, вызванной вирусами гриппа типа А.

Финалом данной диссертационной работы явилось создание кандидатного препарата ГамИнфлюМаб на основе биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc для ранней этиотропной терапии инфекции, вызванной вирусом гриппа типа А. Проведен полный спектр доклинических исследований активности и безопасности данного препарата, по результатам которых ГамИнфлюМаб показал себя как эффективный и безопасный препарат. Успешно завершено клиническое исследование «Открытое исследование безопасности, переносимости и

фармакокинетики лекарственного препарата для ранней этиотропной терапии инфекции, вызванной вирусом гриппа типа А на основе моноклональных антител при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы». Согласно результатам проведенного клинического исследования, кандидатный препарат ГамИнфлюМаб признан безопасным. Планируется подача документов для проведения следующей фазы клинических исследований для оценки эффективности препарата ГамИнфлюМаб у пациентов с лабораторно-подтвержденным диагнозом грипп типа А.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе были получены однодоменные антитела к консервативным эпитопам НА вируса гриппа А, обладающие широким спектром кросс-реактивности. Показано, что присоединение к однодоменным антителам Fc-фрагмента IgG1 способствует увеличению аффинности и нейтрализующего потенциала отобранных клонов, наряду с добавлением эффекторных функций, опосредованных Fc. Отобраны два наиболее перспективных клона в Fc-слитом формате – G2.3-Fc и D9.2-Fc, продемонстрировавшие выраженную противовирусную активность в экспериментах *in vivo* на модели летальной инфекции, вызванной различными штаммами ВГА. Для указанных антител определены механизмы противовирусного действия. Были получены биспецифические антитела, представляющие собой гетеродимеры однодоменных антител G2.3 и D9.2, слитые с Fc-фрагментом IgG1 человека. На основе биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc был разработан кандидатный препарат для ранней этиотропной терапии инфекции, вызванной вирусом гриппа типа А – ГамИнфлюМаб. Были проведены доклинические исследования препарата, результаты которого показали эффективность и отсутствие токсического действия кандидатного препарата ГамИнфлюМаб на организм экспериментальных животных. Полученные на этапе доклинических исследований данные позволили получить разрешение на проведение клинических исследований. В результате проведения I фазы клинических исследований кандидатного препарата ГамИнфлюМаб показан хороший профиль безопасности и переносимости препарата у здоровых добровольцев. В совокупности полученные данные характеризуют разработанный кандидатный препарат ГамИнфлюМаб как перспективное лекарственное средство для специфической терапии гриппозной инфекции и обосновывают целесообразность проведения дальнейших клинических исследований.

ВЫВОДЫ

1. Получены рекомбинантные антигены полноразмерного НА подтипов Н1 и Н3, а также стеблевого домена НА для проведения иммунизации животных и селекции специфических бактериофагов;
2. Методом фагового дисплея проведена селекция однодоменных антител, специфичных к НА подтипов Н1 и Н3, из которых отобраны два наиболее перспективных клона: G2.3 и D9.2;
3. В исследованиях *in vitro* продемонстрировано, что однодоменное антитело G2.3 связывает и нейтрализует различные штаммы ВГА подтипа Н1. Антитело D9.2 обладает способностью связывать широкий спектр штаммов ВГА подтипа Н3;
4. Получены варианты однодоменных антител G2.3-Fc и D9.2-Fc, содержащие Fc-фрагмент IgG1 человека. В экспериментах *in vitro* установлено выраженное увеличение аффинности и нейтрализующей активности полученных антител: более чем в 500 раз для G2.3-Fc против ВГА подтипов Н2 и Н5, и в 1120 раз для D9.2-Fc против НА подтипа Н3 (штамм A/Aichi/2/68);
5. В ходе исследования противовирусной активности отобранных антител показано, что антитело G2.3-Fc нейтрализует ВГА путем блокирования слияния вирусной и эндосомальной мембран, в то время как антитело D9.2-Fc реализует свою активность за счет активации эффекторных клеток при Fc-Fc γ R-взаимодействии;
6. На основе однодоменных антител G2.3 и D9.2 создано биспецифическое антитело D9.2-G2.3-Fc, обладающее активностью в отношении НА филогенетических групп 1 и 2. Показано, что данное антитело обеспечивает эффективную защиту лабораторных животных в дозе 10 мг/кг в профилактическом и в дозе 40 мг/кг в терапевтическом режимах введения при заражении летальными дозами ВГА подтипов Н1Н1 и Н3Н2;
7. В результате доклинических исследований показано отсутствие токсического действия кандидатного лекарственного препарата на основе

биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc в дозировках, многократно превышающих терапевтическую;

8. Проведены клинические исследования безопасности и фармакокинетики препарата на основе биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc на здоровых добровольцах с эскалацией дозы. Установлен благоприятный профиль безопасности и переносимости во всех режимах дозирования (1,2 мг/кг, 6 мг/кг и 12 мг/кг). Определены основные фармакокинетические параметры (период полувыведения – 320 часов; время достижения максимальной концентрации – 1 час). Показано отсутствие формирования антител к препарату в течение 90 дней после однократного введения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

а.о. – аминокислотный остаток

АЗКФ – антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз

АЗКЦ – антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность

Ат – антитело

БСА – бычий сывороточный альбумин

ВВИГ – внутривенные гипериммунные (специфические) иммуноглобулины

ВГА (IAV) – вирус гриппа типа А

ВГВ (IBV) – вирус гриппа типа В

ВГС (ICV) – вирус гриппа типа С

ВИЧ – вирус иммунодефицита человека

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ДТТ – дитиотреитол

ИПТГ – изопропил- β -D-1-тиогалактопиранозид

ИФА – иммуноферментный анализ

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КББ – карбонатно-бикарбонатный буфер

кДа – килодальтон

КЗЦ – комплемент-зависимая цитотоксичность

КИ – клинические исследования

кРНК – комплементарная рибонуклеиновая кислота положительной полярности

кРНП (сRNP) – комплементарный рибонуклеопротеин положительной полярности

ЛД₅₀ – средняя доза вируса, которая вызывает гибель 50 % подопытных животных

мАт – моноклональные антитела

МИ – множественность инфекции

мРНК (mRNA) – матричная рибонуклеиновая кислота

мРНК-ЛНЧ – липидные наночастицы с инкапсулированными мРНК

ОП_{450нм} – оптическая плотность, измеренная при длине волны 450 нм

ОП_{600нм} – оптическая плотность, измеренная при длине волны 600 нм

оцРНК – одноцепочечная вирусная рибонуклеиновая кислота

п.н. – пар нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РН – реакция нейтрализации

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНП (vRNP) – вирусный рибонуклеопротеин

РСВ – респираторно-синцитиальный вирус

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

СД НА, СД – стеблевой домен гемагглютинина

СК – сиаловые кислоты

ТМБ – тетраметилбензидин 3,3',5,5'

ТЦД₅₀ – 50%-ная тканевая цитопатическая доза

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с добавлением Tween-20

Ad5 – аденовирус человека 5 типа

ADA – Anti-Drug Antibodies, антитела к препарату

CD16 – кластер дифференцировки 16, FcγRIII

CD32 – кластер дифференцировки 32, FcγRII

CDR – участки, определяющие комплементарность антитела

CH – константные домены тяжелой цепи иммуноглобулина
 CHO-S – клетки яичника китайских хомячков
 DMEM – минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко
 EC₅₀ – полумаксимальная эффективная концентрация
 F1 – домен слияния гемагглютинина
 Fab – антигенсвязывающий фрагмент иммуноглобулина
 Fc – кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина
 FcγR – Fc-рецептор, связывающий константную область IgG
 FR – каркасные области VHH
 G4S – глицин-сериновый линкер
 H – гипервариабельные области тяжелой цепи иммуноглобулина
 HA – гемагглютинин вируса гриппа
 HcAb – тяжелоцепочечное антитело
 HEK293 – клетки эмбриональных почек человека
 HRP – пероксидаза хрена
 IC₅₀ – полумаксимальная ингибирующая концентрация
 IDV – вирус гриппа типа D
 IgG – иммуноглобулин класса G
 L – гипервариабельные области легкой цепи иммуноглобулина
 M1 – матриксный белок 1 вируса гриппа
 M2 – матриксный белок 2 вируса гриппа
 M2e – эктодомен белка M2 вируса гриппа
 MDCK – эпителиальные клетки почки собаки
 NA – нейраминидаза вируса гриппа
 NEP – белок ядерного экспорта вируса гриппа

NFAT – ядерный фактор активированных Т-клеток

NP – нуклеопротеин вируса гриппа

NS1,2,3 – неструктурные белки вируса гриппа

RBD – рецептор-связывающий домен гемагглютинаина

RBS – рецептор-связывающий карман или сайт гемагглютинаина

scFv – одноцепочечные антитела

SD – стандартная ошибка

sdAb – однодоменное антитело

SDS-PAGE – электрофорез белков в полиакриламидном геле по Лэммли

SPF – specific-pathogen-free, свободный от конкретных патогенов

SPR – поверхностный плазмонный резонанс

SEM – стандартная ошибка среднего

TAE – трис-ацетатный буфер

TPCK – тозилфенилаланилхлорметилкетон

VE – рудиментарный эстеразный домен гемагглютинаина

VH – переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина

VHH – переменный домен тяжелопепочечного антитела; однодоменное антитело

VL– переменный домен легкой цепи иммуноглобулина

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Васин А.В. Эволюционная динамика структурных и функциональных доменов белка NS1 вирусов гриппа А человека / Васин А.В., Петрова-Бродская А.В., Плотникова М.А., Цветков В.Б., [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2017. - № 6 (62). - С. 246–258.
2. Гамбарян А.С. Изменение вирулентности пандемического вируса гриппа А(Н1N1), обусловленное мутациями гемагглютинина и полимеразы / Гамбарян А. С., Ломакина Н. Ф., Боравлева Е. Ю., Мочалова Л. В., [и др.] // Молекулярная биология. - 2018. - № 4 (52). - С. 644–658.
3. Горшкова Е.Н. Однодоменные антитела и биоинженерные препараты на их основе: новые возможности для диагностики и терапии / Горшкова Е. Н., Василенко В. А., Тиллиб С. В., Астраханцева И. В. // Медицинская иммунология. - 2016. - № 6 (18). - С. 505–520.
4. Жирнов О.П. Асимметричная структура вируса гриппа А и новая функция матричного белка М1 / Жирнов О.П. // Вопросы вирусологии. - 2016. - № 4 (61). - С. 149–154.
5. Жирнов О.П. рН-зависимые перестройки в структуре вируса гриппа А / Жирнов О.П., Маныкин А.А. // Вопросы вирусологии. - 2014. - № 3 (59). - С. 41–46.
6. Ильичева Т. Н. Серомониторинг маркеров вирусов гриппа с пандемическим потенциалом в Российской Федерации в 2021–2023 гг. / Ильичева Т. Н., Моисеева А. А., Иванова К. И., Азаев М. Ш., [и др.] // Проблемы особо опасных инфекций. - 2023. - № 4. - С. 77–83.
7. Каверин Н. В. Антигенная структура гемагглютинина вируса гриппа А / Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В. // Вопросы вирусологии. - 2012. - № 1S. - С. 148–158.

8. Карпова Л.С. Особенности эпидемического процесса при гриппе A(H1N1)pdm09 и A(H3N2) в России с 2009 по 2017 г. / Карпова Л. С., Волик К.М., Столяров К.А., Поповцева Н.М., [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2018. - № 4 (63). - С. 177–184.
9. Крылов П. С. Аминокислотные замены в гемагглютанине вируса гриппа подтипа H5, влияющие на антигенную специфичность и вирулентность вируса / Крылов П.С., Говоркова Е.А., Каверин Н.В. // Вопросы вирусологии. - 2009. - № 5 (54). - С. 14–19.
10. Ломакина Н. Ф. Три мутации в стеблевом участке гемагглютанина влияют на pH слияния и патогенность вируса гриппа H5N1 / Ломакина Н.Ф., Садыкова Г.К., Тимофеева Т.А., Руднева И.А., [и др.] // Молекулярная биология. - 2018. - № 6 (52). - С. 1029–1037.
11. Львов Д. К. Эволюция пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 в 2009-2016 гг.: динамика рецепторной специфичности первой субъединицы гемагглютанина (HA1) / Львов Д.К., Богданова В.С., Кириллов И.М., Щелканов М.Ю., [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2019. - № 2 (64). - С. 63–72.
12. Львов Д.К. Корреляция между рецепторной специфичностью штаммов пандемического вируса гриппа а (H1N1) pdm09, изолированных в 2009-2011 гг., структурой рецепторсвязывающего сайта и вероятностью развития летальной первичной вирусной пневмонии / Д. К. Львов, М. Ю. Щелканов, Н. В. Бовин, Н. А. Малышев, [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2012. - № 1 (57). - С. 14–20.
13. Львов Д.К. Дрейфовая изменчивость вируса гриппа а(H3N2): биологические, антигенные и генетические свойства в эпидемическом сезоне 2016-2017 гг. В России и странах Северного полушария / Львов Д.К., Бурцева Е.И., Кириллова Е.С., Колобухина Л.В., [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2018. - № 2 (63). - С. 61–68.
14. Масалова О.В. Выявление консервативных и вариабельных эпитопов гемагглютанина штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm09 с

помощью моноклональных антител / Масалова О.В., Чичев Е.В., Федякина И.Т., Мукашева Е.А., [и др.] // Вопросы вирусологии. 2014. № 3 (59). С. 34–40.

15. Николаева С. В. Вакцинация против гриппа как фактор профилактики острых респираторных инфекций / Николаева С.В., Кокоев В.В., Дюсенбаев А.С., Шаравина Ю.А., [и др.] // Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. - 2024. - № 50 (3). - С. 22–28.

16. Петрова П.А. Проблемы выделения, идентификации и антигенного анализа современных вирусов гриппа А(Н3N2) / Петрова П.А., Коновалова Н.И., Даниленко Д.М., Васильева А.Д., [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2018. - № 4 (63). - С. 160–164.

17. Седова Е.С. Ненейтрализующие антитела к консервативным антигенам вируса гриппа / Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Алексеева С.В., [и др.] // Acta Naturae. - 2019. - № 4 (11). - С. 22–32.

18. Тимофеева Т. А. Влияние мутаций I155T, K156Q, K156E и N186K в гемагглютанине на вирулентность и репродукцию вирусов гриппа А/Н5N1 / Тимофеева Т. А., Садыкова Г. К., Ломакина Н. Ф., Гамбарян А. С., [и др.] // Молекулярная биология. - 2020. - № 6 (54). - С. 980–989.

19. Тимофеева Т.А. Влияние мутаций, меняющих антигенную специфичность, на рецепторсвязывающую активность гемагглютанина вирусов гриппа а подтипов Н1 и Н5 / Тимофеева Т. А., Игнатьева А. В., Руднева И. А., Мочалова Л. В., [и др.] // Вопросы вирусологии. - 2013. - № 1. - С. 24–27.

20. Щербинин Д. Н. Анализ В-клеточных эпитопов гемагглютанина вирусов гриппа / Щербинин Д.Н., Алексеева С.В., Шмаров М.М., Смирнов Ю.А., [и др.] // Acta Naturae. - 2016. - № 1 (8). - С. 13–20.

21. Aartse A. Primary antibody response after influenza virus infection is first dominated by low-mutated HA-stem antibodies followed by higher-mutated HA-head antibodies /

Aartse A., Mortier D., Mooij P., Hofman S., [et al.] // *Frontiers in Immunology*. - 2022. - № 13. – C. 1026951.

22. Ali O. A Phase 2a Study to Evaluate the Safety of MEDI8852 in Outpatient Adults with Acute, Uncomplicated Influenza A / Ali S. O., Takas T., Nyborg A., Shoemaker K., [et al.] // *Open Forum Infectious Diseases*. - 2017. - № 4. - C. S519–S519.

23. Altman M. O. Lamprey VLRB response to influenza virus supports universal rules of immunogenicity and antigenicity / Altman M. O., Bennink J. R., Yewdell J. W., Herrin B. R. // *eLife*. - 2015. - № 4 – C. e07467.

24. Altman M. O. Antibody Immunodominance: The Key to Understanding Influenza Virus Antigenic Drift / Altman M. O., Angeletti D., Yewdell J. W. // *Viral Immunology*. - 2018. - № 2 (31). - C. 142–149.

25. An Y. N-Glycosylation of Seasonal Influenza Vaccine Hemagglutinins: Implication for Potency Testing and Immune Processing / An Y., Parsons L. M., Jankowska E., Melnyk D., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2019. - № 2 (93) – C. e01693-18.

26. Andrews S. F. Immune history profoundly affects broadly protective B cell responses to influenza / Andrews S. F., Huang Y., Kaur K., Popova L. I., [et al.] // *Science Translational Medicine*. - 2015. - № 316 (7) - C. 316ra192.

27. Arezumand R. Nanobodies As Novel Agents for Targeting Angiogenesis in Solid Cancers / Arezumand R., Alibakhshi A., Ranjbari J., Ramazani A., [et al.] // *Frontiers in Immunology*. - 2017. - (8) - C. 1746.

28. Ashour J. Intracellular Expression of Camelid Single-Domain Antibodies Specific for Influenza Virus Nucleoprotein Uncovers Distinct Features of Its Nuclear Localization / Ashour J., Schmidt F. I., Hanke L., Cragolini J., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2015. - № 5 (89). - C. 2792–2800.

29. Badham M. D. Filamentous Influenza Viruses / Badham M. D., Rossman J. S. // *Current Clinical Microbiology Reports*. - 2016. - № 3 (3). - C. 155–161.

30. Bajic G. Influenza Antigen Engineering Focuses Immune Responses to a Subdominant but Broadly Protective Viral Epitope / Bajic G., Maron M. J., Adachi Y., Onodera T., [et al.] // *Cell Host & Microbe*. - 2019. - № 6 (25). - C. 827-835.e6.
31. Bangaru S. A multifunctional human monoclonal neutralizing antibody that targets a unique conserved epitope on influenza HA / Bangaru S., Zhang H., Gilchuk I. M., Voss T. G., [et al.] // *Nature Communications*. - 2018. - № 1 (9). - C. 2669.
32. Bangaru S. A Site of Vulnerability on the Influenza Virus Hemagglutinin Head Domain Trimer Interface / Bangaru S., Lang S., Schotsaert M., Vanderven H. A., [et al.] // *Cell*. - 2019. - № 5 (177). - C. 1136-1152.e18.
33. Barbey-Martin C. An Antibody That Prevents the Hemagglutinin Low pH Fusogenic Transition / Barbey-Martin C., Gigant B., Bizebard T., Calder L. J., [et al.] // *Virology*. - 2002. - № 1 (294). - C. 70–74.
34. Bates A. David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments / Bates A., Power C. A. // *Antibodies*. - 2019. - № 2 (8). - C. 28.
35. Beigel J. H. Advances in respiratory virus therapeutics – A meeting report from the 6th isirv Antiviral Group conference / Beigel J. H., Nam H. H., Adams P. L., Krafft A., [et al.] // *Antiviral Research*. - 2019. - (167). - C. 45–67.
36. Beigel J. H. Anti-influenza immune plasma for the treatment of patients with severe influenza A: a randomised, double-blind, phase 3 trial / Beigel J. H., Aga E., Elie-Turenne M. C., Cho J., [et al.] // *The Lancet Respiratory Medicine*. - 2019. - № 11 (7). - C. 941–950.
37. Beigel J. H. Influenza therapeutics in clinical practice-challenges and recent advances / Beigel J. H., Hayden F. G. // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. - 2021. - № 4 (11) - C. a038463.
38. Bencurova E. A rapid and simple pipeline for synthesis of mRNA–ribosome–VHH complexes used in single-domain antibody ribosome display / Bencurova E., Pulzova L., Flachbartova Z., Bhide M. // *Molecular BioSystems*. 2015. - № 6 (11). - C. 1515–1524.

39. Benhaim M. A. Structural monitoring of a transient intermediate in the hemagglutinin fusion machinery on influenza virions / Benhaim M. A., Mangala Prasad V., Garcia N. K., Guttman M., [et al.] // *Science Advances*. - 2020. - №18 (6) - C. eaaz8822.
40. Benton D. J. Structural transitions in influenza haemagglutinin at membrane fusion pH / Benton D. J., Gamblin S. J., Rosenthal P. B., Skehel J. J. // *Nature*. - 2020. - № 7814 (583). - C. 150–153.
41. Bliss C. M. A single-shot adenoviral vaccine provides hemagglutinin stalk-mediated protection against heterosubtypic influenza challenge in mice / Bliss C. M., Freyn A. W., Caniels T. G., Leyva-Grado V. H., [et al.] // *Molecular Therapy*. - 2022. - № 5 (30). - C. 2024–2047.
42. Boltz D. Activity of enisamium, an isonicotinic acid derivative, against influenza viruses in differentiated normal human bronchial epithelial cells / Boltz D., Peng X., Muzzio M., Dash P., [et al.] // *Antiviral Chemistry and Chemotherapy*. - 2018. - (26). - C. 204020661881141.
43. Bonanni P. Improving Influenza Vaccination Coverage in Patients with Cancer: A Position Paper from a Multidisciplinary Expert Group / Bonanni P., Maio M., Beretta G. D., Icardi G., [et al.] // *Vaccines*. - 2024. - № 4 (12). - C. 420.
44. Both G. W. Antigenic Drift in Influenza Virus H3 Hemagglutinin from 1968 to 1980: Multiple Evolutionary Pathways and Sequential Amino Acid Changes at Key Antigenic Sites / Both G. W., Sleight M. J., Cox N. J., Kendal A. P. // *Journal of Virology*. - 1983. - №1 (48) - C. 52-60.
45. Bouvier N. M. The biology of influenza viruses / Bouvier N. M., Palese P. // *Vaccine*. - 2008. - № SUPPL. 4 (26) - C. D49–D53.
46. Brankston G. Transmission of influenza A in human beings / Brankston G., Gitterman L., Hirji Z., Lemieux C., [et al.] // *The Lancet Infectious Diseases*. - 2007. - № 4 (7). - C. 257–265.

47. Bright R. A. Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern / Bright R. A., Medina M. J., Xu X., Perez-Oronoz G., Wallis T. R., [et al.] // *The Lancet*. - 2005. - № 9492 (366). - C. 1175–1181.
48. Brown L. E. An analysis of the properties of monoclonal antibodies directed to epitopes on influenza virus hemagglutinin / Brown L. E., Murray J. M., White D. O., Jackson D. C. // *Archives of Virology*. - 1990. - № 1–2 (114). - C. 1–26.
49. Bruhns P. Properties of mouse and human IgG receptors and their contribution to disease models / Bruhns P. // *Blood*. - 2012. - T. 119. № 24. - C. 5640–5649.
50. Cady S. D. Structure and Function of the Influenza A M2 Proton Channel / Cady S. D., Luo W., Hu F., Hong M. // *Biochemistry*. - 2009. - № 31 (48). - C. 7356–7364.
51. Cardoso F. M. Single-Domain Antibodies Targeting Neuraminidase Protect against an H5N1 Influenza Virus Challenge / Cardoso F. M., Ibañez L. I., Van den Hoecke S., De Baets S., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2014. - № 15 (88). - C. 8278–8296.
52. Chames P. Bispecific antibodies for cancer therapy / Chames P., Baty D. // *mAbs*. - 2009. - № 6 (1). - C. 539–547.
53. Chauhan R. P. An overview of influenza A virus genes, protein functions, and replication cycle highlighting important updates / Chauhan R. P., Gordon M. L. // *Virus Genes*. - 2022. - № 4 (58). - C. 255–269.
54. Chen B. J. The Influenza Virus M2 Protein Cytoplasmic Tail Interacts with the M1 Protein and Influences Virus Assembly at the Site of Virus Budding / Chen B. J., Leser G. P., Jackson D., Lamb R. A. // *Journal of Virology*. - 2008. - № 20 (82). - C. 10059–10070.
55. Chen J. Structure of the Hemagglutinin Precursor Cleavage Site, a Determinant of Influenza Pathogenicity and the Origin of the Labile Conformation / Chen J., Lee K. H., Steinhauer D. A., Stevens D. J., [et al.] // *Cell*. - 1998. - № 3 (95). - C. 409–417.

56. Chen W. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death / Chen W., Calvo P. A., Malide D., Gibbs J., [et al.] // *Nature Medicine*. - 2001. - № 12 (7). - C. 1306–1312.
57. Chen W. Approaches for discovery of small-molecular antivirals targeting to influenza A virus PB2 subunit / Chen W., Shao J., Ying Z., Du Y., [et al.] // *Drug Discovery Today*. - 2022. - № 6 (27). - C. 1545–1553.
58. Chen X. Rare homologous recombination in H3N2 avian influenza A viruses / Chen X., Guo F., Pan J., Shen X., [et al.] // *Journal of Infection*. - 2020. - № 3 (80). - C. 350–371.
59. Chen Y.Q. Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies Interfere with Influenza Virus Neuraminidase Activity by Steric Hindrance / Chen Y. Q., Lan L. Y., Huang M., Henry C., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2019. - № 4 (93) - C. e01526-18.
60. Coloma R. Structural insights into influenza A virus ribonucleoproteins reveal a processive helical track as transcription mechanism / Coloma R., Arranz R., de la Rosa-Trevín J. M., Sorzano C. O. S., [et al.] // *Nature Microbiology*. - 2020. - № 5 (5). - C. 727–734.
61. Corti D. A Neutralizing Antibody Selected from Plasma Cells That Binds to Group 1 and Group 2 Influenza A Hemagglutinins / Corti D., Voss J., Gamblin S. J., Codoni G., [et al.] // *Science*. - 2011. - № 6044 (333). - C. 850–856.
62. Corti D. Tackling influenza with broadly neutralizing antibodies / Corti D., Cameroni E., Guarino B., Kallewaard N. L., [et al.] // *Current Opinion in Virology*. - 2017. - (24). - C. 60–69.
63. Corti D. Broadly Neutralizing Antiviral Antibodies / Corti D., Lanzavecchia A. // *Annual Review of Immunology*. - 2013. - № 1 (31). - C. 705–742.
64. Costa T. Distribution patterns of influenza virus receptors and viral attachment patterns in the respiratory and intestinal tracts of seven avian species / Costa T., Chaves A. J., Valle R., Darji A., [et al.] // *Veterinary Research*. - 2012. - № 1 (43). - C. 28.

65. Cowling B. J. Influenza Vaccine Effectiveness and Progress Towards a Universal Influenza Vaccine / Cowling B. J., Okoli G. N. // *Drugs*. - 2024. - № 9 (84). - C. 1013–1023.
66. Crescioli S. Antibodies to watch in 2025 / Crescioli S., Kaplon H., Wang L., Visweswarajah J., [et al.] // *mAbs*. - 2025. - № 1 (17) - C. 2443538.
67. Crowe J. E. Bispecific antiviral neutralizing antibodies are twice as nice / Crowe J. E. // *Nature Immunology*. - 2022. - № 3 (23). - C. 346–347.
68. Dadonaite B. Filamentous influenza viruses / Dadonaite B., Vijayakrishnan S., Fodor E., Bhella D., [et al.] // *Journal of General Virology*. - 2016. - № 8 (97). - C. 1755–1764.
69. Dadonaite B. The structure of the influenza A virus genome / Dadonaite B., Gilbertson B., Knight M. L., Trifkovic S., [et al.] // *Nature Microbiology*. - 2019. - T. 4. № 11. - C. 1781–1789.
70. Das D. K. Direct Visualization of the Conformational Dynamics of Single Influenza Hemagglutinin Trimers / Das D. K., Govindan R., Nikić-Spiegel I., Krammer F., [et al.] // *Cell*. - 2018. - № 4 (174). - C. 926-937.e12.
71. Davey R. T. Anti-influenza hyperimmune intravenous immunoglobulin for adults with influenza A or B infection (FLU-IVIG): a double-blind, randomised, placebo-controlled trial / Davey R. T. Jr, Fernández-Cruz E., Markowitz N., Pett S., [et al.] // *The Lancet Respiratory Medicine*. - 2019. - № 11 (7). - C. 951–963.
72. Deal C. E. Engineering humoral immunity as prophylaxis or therapy / Deal C. E., Balazs A. B. // *Current Opinion in Immunology*. - 2015. - (35). - C. 113–122.
73. Deyde V. M. Surveillance of Resistance to Adamantanes among Influenza A(H3N2) and A(H1N1) Viruses Isolated Worldwide / Deyde V. M., Xu X., Bright R. A., Shaw M., [et al.] // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2007. - № 2 (196). - C. 249–257.
74. Deyde V. M. Detection of Molecular Markers of Drug Resistance in 2009 Pandemic Influenza A (H1N1) Viruses by Pyrosequencing / Deyde V. M., Sheu T. G., Trujillo A.

A., Okomo-Adhiambo M., [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2010. - № 3 (54). - C. 1102–1110.

75. Di Lella S. Modulation of the pH Stability of Influenza Virus Hemagglutinin: A Host Cell Adaptation Strategy / Di Lella S., Herrmann A., Mair C. M. // *Biophysical Journal*. - 2016. - № 11 (110). - C. 2293–2301.

76. DiLillo D. J. Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for in vivo protection / DiLillo D. J., Palese P., Wilson P. C., Ravetch J. V. // *Journal of Clinical Investigation*. - 2016. - № 2 (126). - C. 605–610.

77. DiLillo D. J. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus in vivo / DiLillo D. J., Tan G. S., Palese P., Ravetch J. V. // *Nature Medicine*. - 2014. - № 2 (20). - C. 143–51.

78. Dou D. Analysis of IAV Replication and Co-infection Dynamics by a Versatile RNA Viral Genome Labeling Method / Dou D., Hernández-Neuta I., Wang H., Östbye H., [et al.] // *Cell Reports*. - 2017. - № 1 (20). - C. 251–263.

79. Dou D. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement / Dou D., Revol R., Östbye H., Wang H., [et al.] // *Frontiers in Immunology*. - 2018. - (9) - C. 1581.

80. Dreyfus C. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses / Dreyfus C., Laursen N. S., Kwaks T., Zuijdgeest D., [et al.] // *Science*. - 2012. - № 6100 (337). - C. 1343–1348.

81. Dreyfus C. Structure of a Classical Broadly Neutralizing Stem Antibody in Complex with a Pandemic H2 Influenza Virus Hemagglutinin / Dreyfus C., Ekiert D. C., Wilson I. A. // *Journal of Virology*. - 2013. - № 12 (87). - C. 7149–7154.

82. Drori Y. Influenza vaccine effectiveness against laboratory-confirmed influenza in a vaccine-mismatched influenza B-dominant season / Drori Y., Pando R., Seftly H., Rosenberg A., [et al.] // *Vaccine*. - 2020. - № 52 (38). - C. 8387–8395.

83. Du R. Identification of a novel inhibitor targeting influenza A virus group 2 hemagglutinins / Du R., Cheng H., Cui Q., Peet N. P., [et al.] // *Antiviral Research.* - 2021. - (186). - C. 105013.
84. Dufrasne F. Baloxavir Marboxil: An Original New Drug against Influenza / Dufrasne F. // *Pharmaceuticals.* - 2021. - № 1 (15). - C. 28.
85. Einfeld A. J. At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins / Einfeld A. J., Neumann G., Kawaoka Y. // *Nature Reviews Microbiology.* - 2015. - № 1 (13). - C. 28–41.
86. Ekiert D. C. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope: implications for universal prevention and therapy / Ekiert D. C., Bhabha G., Elsliger M. A., Friesen R. H., [et al.] // *Science.* - 2009. - № 5924 (324). - C. 246–251.
87. Ekiert D. C. A Highly Conserved Neutralizing Epitope on Group 2 Influenza A Viruses / Ekiert D. C., Friesen R. H., Bhabha G., Kwaks T., [et al.] // *Science.* - 2011. - № 6044 (333). - C. 843–850.
88. Ekiert D. C. Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop / Ekiert D. C., Kashyap A. K., Steel J., Rubrum A., [et al.] // *Nature.* - 2012. - № 7417 (489). - C. 526–532.
89. Epstein S. L. Mechanisms of heterosubtypic immunity to lethal influenza A virus infection in fully immunocompetent, T cell-depleted, beta2-microglobulin-deficient, and J chain-deficient mice / Epstein S. L., Lo C. Y., Misplon J. A., Lawson C. M., [et al.] // *The Journal of Immunology.* - 1997. - № 3 (158). - C. 1222–1230.
90. Epstein S. L. Cross-protective immunity to influenza A viruses / Epstein S. L., Price G. E. // *Expert Review of Vaccines.* - 2010. - № 11 (9). - C. 1325–1341.
91. Fan K. Fenobody: A Ferritin-Displayed Nanobody with High Apparent Affinity and Half-Life Extension / Fan K., Jiang B., Guan Z., He J., [et al.] // *Analytical Chemistry.* - 2018. - № 9 (90). - C. 5671–5677.

92. 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., [et al.] // *Frontiers in Immunology*. - 2022. - (13) -C. 822159.
93. Flynn J. A. Characterization of humoral and cell-mediated immunity induced by mRNA vaccines expressing influenza hemagglutinin stem and nucleoprotein in mice and nonhuman primates / Flynn J. A., Weber T., Cejas P. J., Cox K. S., [et al.] // *Vaccine*. - 2022. - № 32 (40). - C. 4412–4423.
94. Fontana J. Influenza virus-mediated membrane fusion: Structural insights from electron microscopy / Fontana J., Steven A. C. // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. - 2015. - (581). - C. 86–97.
95. Friesen R. H. E. A common solution to group 2 influenza virus neutralization / Friesen R. H., Lee P. S., Stoop E. J., Hoffman R. M., [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2014. - № 1 (111). - C. 445–450.
96. Fu Y. A broadly neutralizing anti-influenza antibody reveals ongoing capacity of haemagglutinin-specific memory B cells to evolve / Fu Y., Zhang Z., Sheehan J., Avnir Y., [et al.] // *Nature Communications*. - 2016. - № 1 (7). - C. 12780.
97. Gaiotto T. Nanobodies mapped to cross-reactive and divergent epitopes on A(H7N9) influenza hemagglutinin using yeast display / Gaiotto T., Ramage W., Ball C., Risley P., [et al.] // *Scientific Reports*. - 2021. - № 1 (11). - C. 3126.
98. Gaiotto T. Cross-neutralising nanobodies bind to a conserved pocket in the hemagglutinin stem region identified using yeast display and deep mutational scanning / Gaiotto T., Hufton S. E. // *PLoS ONE*. - 2016. - № 10 (11). - C. 1–27.
99. Gao R. Influenza a virus antibodies with antibody-dependent cellular cytotoxicity function / Gao R., Sheng Z., Sreenivasan C. C., Wang D., [et al.] // *Viruses*. - 2020. - T. 12. № 3. - C. 276.

100. Genst E. De Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies / De Genst E., Silence K., Decanniere K., Conrath K[et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2006. - № 12 (103). - C. 4586–4591.
101. Govaert J. Dual Beneficial Effect of Interloop Disulfide Bond for Single Domain Antibody Fragments / Govaert J., Pellis M., Deschacht N., Vincke C., [et al.] // Journal of Biological Chemistry. - 2012. - № 3 (287). - C. 1970–1979.
102. Govorkova E. A. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2018–2020 / Govorkova E. A., Takashita E., Daniels R. S., Fujisaki S., [et al.] // Antiviral Research. - 2022. - (200). - C. 105281.
103. Grandea A. G. Human antibodies reveal a protective epitope that is highly conserved among human and nonhuman influenza A viruses / Grandea A. G. 3rd, Olsen O. A., Cox T. C., Renshaw M., [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2010. - № 28 (107). - C. 12658–12663.
104. Gubareva L. V. Comparison of the Activities of Zanamivir, Oseltamivir, and RWJ-270201 against Clinical Isolates of Influenza Virus and Neuraminidase Inhibitor-Resistant Variants / Gubareva L. V., Webster R. G., Hayden F. G. // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2001. - № 12 (45). - C. 3403–3408.
105. Guthmiller J. J. First exposure to the pandemic H1N1 virus induced broadly neutralizing antibodies targeting hemagglutinin head epitopes / Guthmiller J. J., Han J., Li L., Freyn A. W., [et al.] // Science Translational Medicine. - 2021. - № 596 (13). - C. eabg4535.
106. Hamers-Casterman C. Naturally occurring antibodies devoid of light chains / Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., [et al.] // Nature. - 1993. - № 6428 (363). - C. 446–448.

107. Hanke L. The Antiviral Mechanism of an Influenza A Virus Nucleoprotein-Specific Single-Domain Antibody Fragment / Hanke L., Knockenhauer K. E., Brewer R. C., van Diest E., [et al.] // *mBio*. - 2016. - № 6 (7). - C. e01569-16.
108. Hanke L. A bispecific monomeric nanobody induces spike trimer dimers and neutralizes SARS-CoV-2 in vivo / Hanke L., Das H., Sheward D. J., Perez Vidakovics L., [et al.] // *Nature Communications*. - 2022. - № 1 (13). - C. 155.
109. Hao W. Roles of the Non-Structural Proteins of Influenza A Virus / Hao W., Wang L., Li S. // *Pathogens*. - 2020. - № 10 (9). - C. 812.
110. Harmsen M. Isolation of Panels of Llama Single-Domain Antibody Fragments Binding All Nine Neuraminidase Subtypes of Influenza A Virus / Harmsen M. M., Blokker J. C., Pritz-Verschuren S. B., Bartelink W., [et al.] // *Antibodies*. - 2013. - № 4 (2). - C. 168–192.
111. Hashimoto T. Comprehensive assessment of amino acid substitutions in the trimeric RNA polymerase complex of influenza A virus detected in clinical trials of baloxavir marboxil / Hashimoto T., Baba K., Inoue K., Okane M., [et al.] // *Influenza and Other Respiratory Viruses*. - 2021. - № 3 (15). - C. 389–395.
112. Hause B. M. Isolation of a Novel Swine Influenza Virus from Oklahoma in 2011 Which Is Distantly Related to Human Influenza C Viruses / Hause B. M., Ducatez M., Collin E. A., Ran Z., [et al.] // *PLoS Pathogens*. - 2013. - № 2 (9). - C. e1003176.
113. He Y. Antibody inhibition of influenza A virus assembly and release / He Y., Guo Z., Subiaur S., Benegal A., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2024. - № 2 (98). - C. e0139823.
114. Hershberger E. Safety and efficacy of monoclonal antibody VIS410 in adults with uncomplicated influenza A infection: Results from a randomized, double-blind, phase-2, placebo-controlled study / Hershberger E., Sloan S., Narayan K., Hay C. A., [et al.] // *EBioMedicine*. - 2019. - (40). - C. 574–582.

115. Hoecke L. Van mRNA Encoding a Bispecific Single Domain Antibody Construct Protects against Influenza A Virus Infection in Mice / Van Hoecke L., Verbeke R., De Vlieger D., Dewitte H., [et al.] // *Molecular Therapy - Nucleic Acids*. - 2020. - № June (20). - C. 777–787.
116. Hoecke S. Van den Hierarchical and Redundant Roles of Activating FcγRs in Protection against Influenza Disease by M2e-Specific IgG1 and IgG2a Antibodies / Van den Hoecke S., Ehrhardt K., Kolpe A., El Bakkouri K., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2017. - № 7 (91). - C. e02500-16.
117. Hoefman S. Pre-clinical intravenous serum pharmacokinetics of albumin binding and non-half-life extended nanobodies® / Hoefman S., Ottevaere I., Baumeister J., Sargentini-Maier M. L. // *Antibodies*. - 2015. - № 3 (4). - C. 141–156.
118. Honce R. Recipe for Zoonosis: How Influenza Virus Leaps into Human Circulation / Honce R., Schultz-Cherry S. // *Cell Host and Microbe*. - 2020. - T. 28. № 4. - C. 506–508.
119. Hong Y. Cell-based reporter assays for measurements of antibody-mediated cellular cytotoxicity and phagocytosis against SARS-CoV-2 spike protein / Hong Y., Guo H., Wei M., Zhang Y., [et al.]. // *Journal of Virological Methods*. - 2022. - № January (307). - C. 293.
120. Houser K. Influenza vaccines: Challenges and solutions / Houser K., Subbarao K. // *Cell Host and Microbe*. - 2015. - T. 17. № 3. - C. 295–300.
121. Hu J. PA-X: a key regulator of influenza A virus pathogenicity and host immune responses / Hu J., Ma C., Liu X. // *Medical Microbiology and Immunology*. - 2018. - № 5–6 (207). - C. 255–269.
122. Huang K. Single-Domain Antibodies as Therapeutics for Respiratory RNA Virus Infections / Huang K., Ying T., Wu Y. // *Viruses*. - 2022. - T. 14. № 6. - C. 1162.

123. Hufton S. E. The breadth of cross sub-type neutralisation activity of a single domain antibody to influenza hemagglutinin can be increased by antibody valency / Hufton S. E., Risley P., Ball C. R., Major D., [et al.] // PLoS ONE. - 2014. - № 8 (9). - C. e103294.
124. Hultberg A. Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules / Hultberg A., Temperton N. J., Rosseels V., Koenders M., [et al.] // PLoS ONE. - 2011. - № 4 (6). - C. e17665.
125. Hung I. F. N. Hyperimmune IV Immunoglobulin Treatment / Hung I. F. N., To K. K. W., Lee C. K., Lee K. L., [et al.] // Chest. - 2013. - № 2 (144). - C. 464–473.
126. Hutchinson E. C. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture / Hutchinson E. C., Charles P. D., Hester S. S., Thomas B., [et al.] // Nature Communications. - 2014. - № 1 (5). - C. 4816.
127. Iba Y. Conserved Neutralizing Epitope at Globular Head of Hemagglutinin in H3N2 Influenza Viruses / Iba Y., Fujii Y., Ohshima N., Sumida T., [et al.] // Journal of Virology. - 2014. - № 13 (88). - C. 7130–7144.
128. Ibañez L. I. Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection / Ibañez L. I., De Filette M., Hultberg A., Verrips T., [et al.] // Journal of Infectious Diseases. - 2011. - № 8 (203). - C. 1063–1072.
129. Ilyushina N. A. Influenza A virus hemagglutinin mutations associated with use of neuraminidase inhibitors correlate with decreased inhibition by anti-influenza antibodies / Ilyushina N. A., Komatsu T. E., Ince W. L., Donaldson E. F., [et al.] // Virology Journal. - 2019. - № 1 (16). - C. 149.
130. Impagliazzo A. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen / Impagliazzo A., Milder F., Kuipers H., Wagner M. V., [et al.] // Science. - 2015. - № 6254 (349). - C. 1301–1306.
131. Inoue H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids / Inoue H., Nojima H., Okayama H. // Gene. - 1990. - № 1 (96). - C. 23–28.

132. Iuliano A.D. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study / Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., [et al.] // *Lancet*. - 2018. - № 10127 (391). - C. 1285–1300.
133. Ivanovic T. Influenza-virus membrane fusion by cooperative fold-back of stochastically induced hemagglutinin intermediates / Ivanovic T., Choi J. L., Whelan S. P., van Oijen A. M., [et al.] // *eLife*. - 2013. - (2). - C. e00333.
134. Jagger B. W. An Overlapping Protein-Coding Region in Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response / Jagger B. W., Wise H. M., Kash J. C., Walters K. A., [et al.] // *Science*. - 2012. - № 6091 (337). - C. 199–204.
135. Jiang S. Roles of the hemagglutinin of influenza A virus in viral entry and development of antiviral therapeutics and vaccines / Jiang S., Li R., Du L., Liu S. // *Protein & Cell*. - 2010. - № 4 (1). - C. 342–354.
136. Jiao C. Analysis of the conserved protective epitopes of hemagglutinin on influenza A viruses / Jiao C., Wang B., Chen P., Jiang Y., [et al.] // *Frontiers in Immunology*. - 2023. - (14). - C. 1086297.
137. Johansson B. E. Dissociation of influenza virus hemagglutinin and neuraminidase eliminates their intravirionic antigenic competition / Johansson B. E., Kilbourne E. D. // *Journal of Virology*. - 1993. - № 10 (67). - C. 5721–5723.
138. Kadam R. U. Structural basis of influenza virus fusion inhibition by the antiviral drug Arbidol / Kadam R. U., Wilson I. A. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2017. - № 2 (114). - C. 206–214.
139. Kallewaard N. L. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes / Kallewaard N. L., Corti D., Collins P. J., Neu U., [et al.] // *Cell*. - 2016. - № 3 (166). - C. 596–608.
140. Kanegae Y. Evolutionary Pattern of the Hemagglutinin Gene of Influenza B Viruses Isolated in Japan: Cocirculating Lineages in the Same Epidemic Season / Kanegae Y.,

Sugita S., Endo A., Ishida M., [et al.] // Journal of Virology. - 1990. - № 6 (64). - C. 2860–2865.

141. Kaplon H. Antibodies to watch in 2022 / Kaplon H., Chenoweth A., Crescioli S., Reichert J. M. // mAbs. - 2022. - № 1 (14). - C. 2014296.

142. Kaverin N. V. Structural Differences among Hemagglutinins of Influenza A Virus Subtypes Are Reflected in Their Antigenic Architecture: Analysis of H9 Escape Mutants / Kaverin N. V., Rudneva I. A., Ilyushina N. A., Lipatov A. S., [et al.] // Journal of Virology. - 2004. - № 1 (78). - C. 240–249.

143. Kaverin N. V. Epitope Mapping of the Hemagglutinin Molecule of a Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus by Using Monoclonal Antibodies / Kaverin N. V., Rudneva I. A., Govorkova E. A., Timofeeva T. A., [et al.] // Journal of Virology. - 2007. - № 23 (81). - C. 12911–12917.

144. Klein E. Y. Influenza a H1N1 pandemic strain evolution - Divergence and the potential for antigenic drift variants / Klein E. Y., Serohijos A. W., Choi J. M., Shakhnovich E. I., [et al.] // PLoS ONE. - 2014. - № 4 (9). - C. e93632.

145. Klein J. S. Examination of the contributions of size and avidity to the neutralization mechanisms of the anti-HIV antibodies b12 and 4E10 / Klein J. S., Gnanapragasam P. N., Galimidi R. P., Foglesong C. P., [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2009. - № 18 (106). - C. 7385–7390.

146. Knossow M. Mechanism of Neutralization of Influenza Virus Infectivity by Antibodies / Knossow M., Gaudier M., Douglas A., Barrère B., [et al.] // Virology. - 2002. - № 2 (302). - C. 294–298.

147. Kobayashi D. Turkeys possess diverse Sia α 2-3Gal glycans that facilitate their dual susceptibility to avian influenza viruses isolated from ducks and chickens / Kobayashi D., Hiono T., Ichii O., Nishihara S., [et al.] // Virus Research. - 2022. - (315). - C. 198771.

148. Kode S. S. Selection of avian influenza A (H9N2) virus with reduced susceptibility to neuraminidase inhibitors oseltamivir and zanamivir / Kode, S. S., Pawar, S. D., Cherian, S. S., Tare, D. S., [et al.] // *Virus Research*. - 2019. - (265). - C. 122–126.
149. Koel B. F. Substitutions near the receptor binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution / Koel, B. F., Burke, D. F., Bestebroer, T. M., van der Vliet, S., [et al.] // *Science*. - 2013. - № 6161 (342). - C. 976–979.
150. Kordyukova L. V. Matrix proteins of enveloped viruses: a case study of Influenza A virus M1 protein / Kordyukova, L. V., Shtykova, E. V., Baratova, L. A., Svergun, D. I., [et al.] // *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*. - 2019. - № 3 (37). - C. 671–690.
151. Kosik I. Neuraminidase inhibition contributes to influenza A virus neutralization by anti-hemagglutinin stem antibodies / Kosik, I., Angeletti, D., Gibbs, J. S., Angel, M., [et al.] // *Journal of Experimental Medicine*. - 2019. - № 2 (216). - C. 304–316.
152. Kosik I. Influenza A virus hemagglutinin specific antibodies interfere with virion neuraminidase activity via two distinct mechanisms / Kosik I., Yewdell J. W. // *Virology*. - 2017. - (500). - C. 178–183.
153. Krammer F. Influenza / Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M., Peiris M., [et al.] // *Nature Reviews Disease Primers*. - 2018. - T. 4. № 1. - C. 1–21.
154. Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination / Krammer F. // *Nature Reviews Immunology*. - 2019. - № 6 (19). - C. 383–397.
155. Krammer F. Advances in the development of influenza virus vaccines / Krammer F., Palese P. // *Nature Reviews Drug Discovery*. - 2015. - № 3 (14). - C. 167–182.
156. Krammer F. Universal Influenza Virus Vaccines That Target the Conserved Hemagglutinin Stalk and Conserved Sites in the Head Domain / Krammer F., Palese P. // *The Journal of Infectious Diseases*. - 2019. - № Suppl_1 (219). - C. S62–S67.

157. Krause J. C. A Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibody That Recognizes a Conserved, Novel Epitope on the Globular Head of the Influenza H1N1 Virus Hemagglutinin / Krause J. C., Tsibane T., Tumpey T. M., Huffman C. J., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2011. - № 20 (85). - C. 10905–10908.
158. Laursen N. S. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin / Laursen N. S., Friesen R. H. E., Zhu X., Jongeneelen M., [et al.] // *Science*. - 2018. - № 6414 (362). - C. 598–602.
159. Lee P. S. Heterosubtypic antibody recognition of the influenza virus hemagglutinin receptor binding site enhanced by avidity / Lee P. S., Yoshida R., Ekiert D. C., Sakai N., [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2012. - № 42 (109). - C. 17040–17045.
160. Lee P. S. Receptor mimicry by antibody F045–092 facilitates universal binding to the H3 subtype of influenza virus / Lee P. S., Ohshima N., Stanfield R. L., Yu W., [et al.] // *Nature Communications*. - 2014. - № 1 (5). - C. 3614.
161. Leon P. E. Generation of Escape Variants of Neutralizing Influenza Virus Monoclonal Antibodies / Leon P. E., Wohlbold T. J., He W., Bailey M. J., [et al.] // *Journal of Visualized Experiments*. - 2017. - № 126. - C. 56067.
162. Li Q. Mucosal nanobody IgA as inhalable and affordable prophylactic and therapeutic treatment against SARS-CoV-2 and emerging variants / Li Q., Humphries F., Girardin R. C., Wallace A., [et al.] // *Frontiers in Immunology*. - 2022. - (13). - C. 995412.
163. Li Y. T. Avian influenza viruses in humans: Lessons from past outbreaks / Li Y. T., Linster M., Mendenhall I. H., Su Y. C. F., [et al.] // *British Medical Bulletin*. - 2019. - T. 132. № 1. - C. 81–95.
164. Liu H. Two pan-SARS-CoV-2 nanobodies and their multivalent derivatives effectively prevent Omicron infections in mice / Liu H., Wu L., Liu B., Xu K., [et al.] // *Cell Reports Medicine*. - 2023. - № 2 (4). - C.

165. Liu J. K. H. The history of monoclonal antibody development - Progress, remaining challenges and future innovations / Liu J. K. H. // *Annals of Medicine & Surgery*. - 2014. - № 4 (3). - C. 113–116.
166. Lu R. M. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases / Lu R. M., Hwang Y. C., Liu I. J., Lee C. C., [et al.] // *Journal of Biomedical Science*. - 2020. - № 1 (27). - C. 1.
167. Lu Y. Production and stabilization of the trimeric influenza hemagglutinin stem domain for potentially broadly protective influenza vaccines / Lu Y., Welsh J. P., Swartz J. R. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. - 2014. - № 1 (111). - C. 125–130.
168. Luke T. C. Meta-Analysis: Convalescent Blood Products for Spanish Influenza Pneumonia: A Future H5N1 Treatment? / Luke T. C., Kilbane E. M., Jackson J. L., Hoffman S. L. // *Annals of Internal Medicine*. - 2006. - № 8 (145). - C. 599.
169. Lund J. Human Fc gamma RI and Fc gamma RII interact with distinct but overlapping sites on human IgG / Lund J., Winter G., Jones P. T., Pound J. D., [et al.] // *Journal of immunology*. - 1991. - № 8 (147). - C. 2657–62.
170. Lutje Hulsik D. A gp41 MPER-specific Llama VHH Requires a Hydrophobic CDR3 for Neutralization but not for Antigen Recognition / Lutje Hulsik D., Liu Y. Y., Strokappe N. M., Battella S., [et al.] // *PLoS Pathogens*. - 2013. - № 3 (9). - C. e1003202.
171. Margine I. H3N2 Influenza Virus Infection Induces Broadly Reactive Hemagglutinin Stalk Antibodies in Humans and Mice / Margine I., Hai R., Albrecht R. A., Obermoser G., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2013. - № 8 (87). - C. 4728–4737.
172. Matsuzaki Y. Antigenic and genetic characterization of influenza C viruses which caused two outbreaks in Yamagata City, Japan, in 1996 and 1998 / Matsuzaki Y., Sugawara K., Mizuta K., Tsuchiya E., [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. - 2002. - № 2 (40). - C. 422–429.

173. Matz H. The immunoglobulins of cartilaginous fishes / Matz H., Munir D., Logue J., Dooley H. // *Developmental & Comparative Immunology*. - 2021. - (115). - C. 103873.
174. Matz J. Straightforward Selection of Broadly Neutralizing Single-Domain Antibodies Targeting the Conserved CD4 and Coreceptor Binding Sites of HIV-1 gp120 / Matz J., Kessler P., Bouchet J., Combes O., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2013. - № 2 (87). - C. 1137–1149.
175. Mausser E. LALAPG variant of the Human Contraception Antibody (HCA) reduces Fc-mediated effector functions while maintaining sperm agglutination activity / Mausser E., Nador E., Politch J. A., Pauly M. R., [et al.] // *PLOS ONE*. - 2023. - № 3 (18). - C. e0282147.
176. McAuley J. L. Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions / McAuley J. L., Gilbertson B. P., Trifkovic S., Brown L. E., [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. - 2019. - (10). - C. 39.
177. McKimm-Breschkin J. L. Prevention and treatment of respiratory viral infections: Presentations on antivirals, traditional therapies and host-directed interventions at the 5th ISIRV Antiviral Group conference / McKimm-Breschkin J. L., Jiang S., Hui D. S., Beigel J. H., [et al.] // *Antiviral Research*. - 2018. - (149). - C. 118–142.
178. Medina R. A. Glycosylations in the Globular Head of the Hemagglutinin Protein Modulate the Virulence and Antigenic Properties of the H1N1 Influenza Viruses / Medina R. A., Stertz S., Manicassamy B., Zimmermann P., [et al.] // *Science Translational Medicine*. - 2013. - № 187 (5). - C. 187ra70.
179. Mitchell L. S. Comparative analysis of nanobody sequence and structure data / Mitchell L. S., Colwell L. J. // *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. - 2018. - № 7 (86). - C. 697–706.
180. Moirangthem R. Dual neutralization of influenza virus hemagglutinin and neuraminidase by a bispecific antibody leads to improved antiviral activity / Moirangthem

R., Cordela S., Khateeb D., Shor B., [et al.] // *Molecular Therapy*. - 2024. - № 10 (32). - C. 3712–3728.

181. Momose F. Apical Transport of Influenza A Virus Ribonucleoprotein Requires Rab11-positive Recycling Endosome / Momose F., Sekimoto T., Ohkura T., Jo S., [et al.] // *PLoS ONE*. - 2011. - № 6 (6). - C. e21123.

182. Moody M. A. H3N2 Influenza Infection Elicits More Cross-Reactive and Less Clonally Expanded Anti-Hemagglutinin Antibodies Than Influenza Vaccination / Moody M. A., Zhang R., Walter E. B., Woods C. W., [et al.] // *PLoS ONE*. - 2011. - № 10 (6). - C. e25797.

183. Musharrafieh R. The L46P Mutant Confers a Novel Allosteric Mechanism of Resistance Toward the Influenza A Virus M2 S31N Proton Channel Blockers / Musharrafieh R., Lagarias P. I., Ma C., Tan G. S., [et al.] // *Molecular Pharmacology*. - 2019. - № 2 (96). - C. 148–157.

184. Musharrafieh R. Discovery of M2 channel blockers targeting the drug-resistant double mutants M2-S31N/L26I and M2-S31N/V27A from the influenza A viruses / Musharrafieh R., Ma C., Wang J. // *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. - 2020. - (141). - C. 105124.

185. Muyldermans S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies / Muyldermans S. // *Annual Review of Biochemistry*. - 2013. - № 1 (82). - C. 775–797.

186. Muyldermans S. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains / Muyldermans S., Cambillau C., Wyns L. // *Trends in Biochemical Sciences*. - 2001. - № 4 (26). - C. 230–235.

187. Nachbagauer R. Age Dependence and Isotype Specificity of Influenza Virus Hemagglutinin Stalk-Reactive Antibodies in Humans / Nachbagauer R., Choi A., Izikson R., Cox M. M., [et al.] // *mBio*. - 2016. - № 1 (7). - C. e01996-15.

188. Nakamura G. An In Vivo Human-Plasmablast Enrichment Technique Allows Rapid Identification of Therapeutic Influenza A Antibodies / Nakamura G., Chai N., Park S., Chiang N., [et al.] // *Cell Host & Microbe*. - 2013. - № 1 (14). - C. 93–103.
189. Nelson M. I. Multiple reassortment events in the evolutionary history of H1N1 influenza A virus since 1918 / Nelson M. I., Viboud C., Simonsen L., Bennett R. T., [et al.] // *PLoS Pathogens*. - 2008. - № 2 (4). - C. e1000012.
190. Nelson M. I. Human-origin influenza A(H3N2) reassortant viruses in Swine, southeast Mexico / Nelson M. I., Souza C. K., Trovão N. S., Diaz A., [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. - 2019. - № 4 (25). - C. 691–700.
191. Newcomb L. L. Interaction of the Influenza A Virus Nucleocapsid Protein with the Viral RNA Polymerase Potentiates Unprimed Viral RNA Replication / Newcomb L. L., Kuo R. L., Ye Q., Jiang Y., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2009. - № 1 (83). - C. 29–36.
192. Nobusawa E. Comparison of the Mutation Rates of Human Influenza A and B Viruses / Nobusawa E., Sato K. // *Journal of Virology*. - 2006. - № 7 (80). - C. 3675–3678.
193. Ohshima M. Intraperitoneal and intravenous deliveries are not comparable in terms of drug efficacy and cell distribution in neonatal mice with hypoxia–ischemia / Ohshima M., Taguchi A., Tsuda H., Sato Y., [et al.] // *Brain and Development*. - 2015. - № 4 (37). - C. 376–386.
194. Okoli G. N. Variable seasonal influenza vaccine effectiveness across geographical regions, age groups and levels of vaccine antigenic similarity with circulating virus strains: A systematic review and meta-analysis of the evidence from test-negative design studies after the 2009/10 influenza pandemic / Okoli G. N., Racovitan F., Abdulwahid T., Righolt C. H., [et al.] // *Vaccine*. - 2021. - T. 39. № 8. - C. 1225–1240.
195. Okuno Y. A common neutralizing epitope conserved between the hemagglutinins of influenza A virus H1 and H2 strains / Okuno Y., Isegawa Y., Sasao F., Ueda S. // *Journal of Virology*. - 1993. - № 5 (67). - C. 2552–2558.

196. Paget J. Has influenza B/Yamagata become extinct and what implications might this have for quadrivalent influenza vaccines? / Paget J., Caini S., Del Riccio M., van Waarden W., [et al.] // *Eurosurveillance*. - 2022. - № 39 (27). - C.
197. Palese P. Inhibition of Influenza Virus Replication in Tissue Culture by 2-deoxy-2,3-dehydro-N-trifluoroacetylneuraminic acid (FANA): Mechanism of Action / Palese P., Compans R. W. // *Journal of General Virology*. - 1976. - № 1 (33). - C. 159–163.
198. Palomo C. Trivalency of a Nanobody Specific for the Human Respiratory Syncytial Virus Fusion Glycoprotein Drastically Enhances Virus Neutralization and Impacts Escape Mutant Selection / Palomo C., Mas V., Detalle L., Depla E., [et al.] // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. - 2016. - № 11 (60). - C. 6498–6509.
199. Pan Y. Human monoclonal antibodies derived from a patient infected with 2009 pandemic influenza A virus broadly cross-neutralize group 1 influenza viruses / Pan Y., Sasaki T., Kubota-Koketsu R., Inoue Y., [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2014. - № 1 (450). - C. 42–48.
200. Paniker C. K. J. Serological Relationships between the Neuraminidases of Influenza Viruses / Paniker C. K. J. // *Journal of General Virology*. - 1968. - № 3 (2). - C. 385–394.
201. Pasick J. Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia / Pasick J., Handel K., Robinson J., Copps J., [et al.] // *Journal of General Virology*. - 2005. - № 3 (86). - C. 727–731.
202. Paterson D. Emerging Roles for the Influenza A Virus Nuclear Export Protein (NEP) / Paterson D., Fodor E. // *PLoS Pathogens*. - 2012. - № 12 (8). - C. e1003019.
203. Pérez J. M. J. Thermal Unfolding of a Llama Antibody Fragment: A Two-State Reversible Process / Pérez J. M., Renisio J. G., Prompers J. J., van Platerink C. J., [et al.] // *Biochemistry*. - 2001. - № 1 (40). - C. 74–83.
204. Petrova V. N. The evolution of seasonal influenza viruses / Petrova V. N., Russell C. A. // *Nature Reviews Microbiology*. - 2018. - № 1 (16). - C. 47–60.

205. Pettersen E. F. UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis / Pettersen E. F., Goddard T. D., Huang C. C., Couch G. S., [et al.] // *Journal of Computational Chemistry*. - 2004. - № 13 (25). - C. 1605–1612.
206. Pflug A. Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine / Pflug A., Lukarska M., Resa-Infante P., Reich S., [et al.] // *Virus Research*. - 2017. - (234). - C. 103–117.
207. Pielak R. M. Influenza M2 proton channels / Pielak R. M., Chou J. J. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. - 2011. - № 2 (1808). - C. 522–529.
208. Pitiot A. Alternative Routes of Administration for Therapeutic Antibodies—State of the Art / Pitiot A., Heuzé-Vourc'h N., Sécher T. // *Antibodies*. - 2022. - № 3 (11). - C. 56.
209. Popova L. Immunodominance of Antigenic Site B over Site A of Hemagglutinin of Recent H3N2 Influenza Viruses / Popova L., Smith K., West A. H., Wilson P. C., [et al.] // *PLoS ONE*. - 2012. - № 7 (7). - C. e41895.
210. Ramage W. Cross-Reactive and Lineage-Specific Single Domain Antibodies against Influenza B Hemagglutinin / Ramage W., Gaiotto T., Ball C., Risley P., [et al.] // *Antibodies*. - 2019. - № 1 (8). - C. 14.
211. Ramos E. L. Efficacy and Safety of Treatment With an Anti-M2e Monoclonal Antibody in Experimental Human Influenza / Ramos E. L., Mitcham J. L., Koller T. D., Bonavia A., [et al.] // *Journal of Infectious Diseases*. - 2015. - № 7 (211). - C. 1038–1044.
212. Ramos K. E. Broadly protective bispecific antibodies that simultaneously target influenza virus hemagglutinin and neuraminidase / Ramos K. E., Okba N. M. A., Tan J., Bandawane P., [et al.] // *mBio*. - 2024. - № 7 (15). - C.
213. Reed, L.J. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints / Reed, L.J., Muench H. // *American Journal of Epidemiology*. - 1938. - № 3 (27). - C. 493–497.

214. Reeth K. Van A human case of swine influenza virus infection in Europe – implications for human health and research / Reeth K. Van, Nicoll A. // *Eurosurveillance*. - 2009. - № 7 (14). - C. 19124.
215. Roshan R. Isolation and characterization of nanobodies against epithelial cell adhesion molecule as novel theranostic agents for cancer therapy / Roshan R., Naderi S., Behdani M., Cohan R. A., [et al.] // *Molecular Immunology*. - 2021. - (129). - C. 70–77.
216. Rossey I. Potent single-domain antibodies that arrest respiratory syncytial virus fusion protein in its prefusion state / Rossey I., Gilman M. S., Kabeche S. C., Sedeyn K., [et al.] // *Nature Communications*. - 2017. - № 1 (8). - C. 14158.
217. Rossman J. S. Influenza Virus M2 Protein Mediates ESCRT-Independent Membrane Scission / Rossman J. S., Jing X., Leser G. P., Lamb R. A. // *Cell*. - 2010. - № 6 (142). - C. 902–913.
218. Rossman J. S. Filamentous Influenza Virus Enters Cells via Macropinocytosis / Rossman J. S., Leser G. P., Lamb R. A. // *Journal of Virology*. - 2012. - № 20 (86). - C. 10950–10960.
219. Rossotti M. A. Arsenal of nanobodies shows broad-spectrum neutralization against SARS-CoV-2 variants of concern in vitro and in vivo in hamster models / Rossotti M. A., van Faassen H., Tran A. T., Sheff J., [et al.] // *Communications Biology*. - 2022. - № 1 (5). - C. 933.
220. Rudneva I. A. Antigenic Epitopes in the Hemagglutinin of Qinghai-Type Influenza H5N1 Virus / Rudneva I. A., Kushch A. A., Masalova O. V., Timofeeva T. A., [et al.] // *Viral Immunology*. - 2010. - № 2 (23). - C. 181–187.
221. Russell C. J. Hemagglutinin Stability and Its Impact on Influenza A Virus Infectivity, Pathogenicity, and Transmissibility in Avians, Mice, Swine, Seals, Ferrets, and Humans / Russell C. J. // *Viruses*. - 2021. - № 5 (13). - C. 746.

222. Russell C. J. Influenza Hemagglutinin Protein Stability, Activation, and Pandemic Risk / Russell C. J., Hu M., Okda F. A. // Trends in Microbiology. - 2018. - № 10 (26). - C. 841–853.
223. Russell R. J. Structure of influenza hemagglutinin in complex with an inhibitor of membrane fusion / Russell R. J., Kerry P. S., Stevens D. J., Steinhauer D. A., [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2008. - № 46 (105). - C. 17736–17741.
224. Sánchez-de Prada L. Group 1 and group 2 hemagglutinin stalk antibody response according to age / Sánchez-de Prada L., Sanz-Muñoz I., Sun W., Palese P., [et al.] // Frontiers in Immunology. - 2023. - (14). - C. 1194073.
225. Saphire E. O. Systematic Analysis of Monoclonal Antibodies against Ebola Virus GP Defines Features that Contribute to Protection / Saphire E. O., Schendel S. L., Fusco M. L., Gangavarapu K., [et al.] // Cell. - 2018. - № 4 (174). - C. 938-952.e13.
226. Schepens B. Nanobodies® Specific for Respiratory Syncytial Virus Fusion Protein Protect Against Infection by Inhibition of Fusion / Schepens B., Ibañez L. I., De Baets S., Hultberg A., [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. - 2011. - № 11 (204). - C. 1692–1701.
227. Schlothauer T. Novel human IgG1 and IgG4 Fc-engineered antibodies with completely abolished immune effector functions / Schlothauer T., Herter S., Koller C. F., Grau-Richards S., [et al.] // Protein Engineering Design and Selection. - 2016. - № 10 (29). - C. 457–466.
228. Schmidt A. G. Viral Receptor-Binding Site Antibodies with Diverse Germline Origins / Schmidt A. G., Therkelsen M. D., Stewart S., Kepler T. B., [et al.] // Cell. - 2015. - № 5 (161). - C. 1026–1034.
229. Schmidt F. I. Phenotypic lentivirus screens to identify functional single domain antibodies / Schmidt F. I., Hanke L., Morin B., Brewer R., [et al.] // Nature Microbiology. - 2016. - № 8 (1). - C. 16080.

230. Selman M. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing / Selman M., Dankar S. K., Forbes N. E., Jia J. J., [et al.] // *Emerging Microbes & Infections*. - 2012. - № 1 (1). - C. 1–10.
231. Shoyaib A. Al Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies? / Shoyaib A. Al, Archie S. R., Karamyan V. T. // *Pharmaceutical Research*. - 2020. - № 1 (37). - C. 12.
232. Simmons H. C. A new class of antibodies that overcomes a steric barrier to cross-group neutralization of influenza viruses / Simmons H. C., Watanabe A., Oguin Iii T. H., Van Itallie E. S., [et al.] // *PLOS Biology*. - 2023. - № 12 (21). - C. e3002415.
233. Skehel J. J. Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin / Skehel J. J., Wiley D. C. // *Annual Review of Biochemistry*. - 2000. - № 1 (69). - C. 531–569.
234. Smith G. J. D. Dating the emergence of pandemic influenza viruses / Smith G. J., Bahl J., Vijaykrishna D., Zhang J., [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. - 2009. - № 28 (106). - C. 11709–11712.
235. Smith K. Rapid generation of fully human monoclonal antibodies specific to a vaccinating antigen / Smith K., Garman L., Wrammert J., Zheng N. Y., [et al.] // *Nature Protocols*. - 2009. - № 3 (4). - C. 372–384.
236. Smith W., Andrewes C. H., Laidlaw P. P. A VIRUS OBTAINED FROM INFLUENZA PATIENTS / Smith W., Andrewes C. H., Laidlaw P. P. // *The Lancet*. - 1933. - № 5732 (222). - C. 66–68.
237. Steinhauer D. A. Role of Hemagglutinin Cleavage for the Pathogenicity of Influenza Virus / Steinhauer D. A. // *Virology*. - 1999. - № 1 (258). - C. 1–20.
238. Stephenson I. Neuraminidase inhibitor resistance after oseltamivir treatment of acute influenza A and B in children / Stephenson I., Democratis J., Lackenby A., McNally T., [et al.] // *Clinical Infectious Diseases*. - 2009. - № 4 (48). - C. 389–396.

239. Sui J. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses / Sui J., Hwang W. C., Perez S., Wei G., [et al.] // *Nature Structural and Molecular Biology*. - 2009. - № 3 (16). - C. 265–273.
240. Sun E. Z. Real-Time Dissection of Distinct Dynamin-Dependent Endocytic Routes of Influenza A Virus by Quantum Dot-Based Single-Virus Tracking / Sun E. Z., Liu A. A., Zhang Z. L., Liu S. L., [et al.] // *ACS Nano*. - 2017. - № 5 (11). - C. 4395–4406.
241. Sun S. Glycosylation Site Alteration in the Evolution of Influenza A (H1N1) Viruses / Sun S., Wang Q., Zhao F., Chen W., [et al.] // *PLoS ONE*. - 2011. - № 7 (6). - C. e22844.
242. Sun X. Broad neutralizing antibody-based strategies to tackle influenza / Sun X., Ling Z., Yang Z., Sun B. // *Current Opinion in Virology*. - 2022. - (53). - C. 101207.
243. Sutton T. C. In Vitro Neutralization Is Not Predictive of Prophylactic Efficacy of Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies CR6261 and CR9114 against Lethal H2 Influenza Virus Challenge in Mice / Sutton T. C., Lamirande E. W., Bock K. W., Moore I. N., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2017. - № 24 (91). - C. 1–12.
244. Sutton T. C. The pandemic threat of emerging H5 and H7 avian influenza viruses / Sutton T. C. // *Viruses*. - 2018. - № 9 (10). - C. 1–21.
245. Tan G. S. Characterization of a Broadly Neutralizing Monoclonal Antibody That Targets the Fusion Domain of Group 2 Influenza A Virus Hemagglutinin / Tan G. S., Lee P. S., Hoffman R. M., Mazel-Sanchez B., [et al.] // *Journal of Virology*. - 2014. - № 23 (88). - C. 13580–13592.
246. Tao H. Intrahost Dynamics of Influenza Virus Reassortment / Tao H., Steel J., Lowen A. C. // *Journal of Virology*. - 2014. - № 13 (88). - C. 7485–7492.
247. Tauber S. Behaviour of influenza A viruses differentially expressing segment 2 gene products in vitro and in vivo / Tauber S., Ligertwood Y., Quigg-Nicol M., Dutia B. M., [et al.] // *Journal of General Virology*. - 2012. - № 4 (93). - C. 840–849.

248. Terryn S. Protective Effect of Different Anti-Rabies Virus VHH Constructs against Rabies Disease in Mice / Terryn S., Francart A., Lamoral S., Hultberg A., [et al.] // PLoS ONE. - 2014. - № 10 (9). - C. e109367.
249. Throsby M. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells / Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L. L., [et al.] // PLoS ONE. - 2008. - № 12 (3). - C. e3942.
250. Tillib S. V. Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2) / Tillib S. V., Ivanova T. I., Vasilev L. A., Rutovskaya M. V., [et al.] // Antiviral Research. - 2013. - № 3 (97). - C. 245–254.
251. Tong S. A distinct lineage of influenza A virus from bats / Tong S., Li Y., Rivailler P., Conrardy C., [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. - 2012. - № 11 (109). - C. 4269–4274.
252. Tong S. New World Bats Harbor Diverse Influenza A Viruses / Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., [et al.] // PLoS Pathogens. - 2013. - № 10 (9). - C.
253. Tsuchiya E. Antigenic structure of the haemagglutinin of human influenza A/H2N2 virus / Tsuchiya E., Sugawara K., Hongo S., Matsuzaki Y., [et al.] // Journal of General Virology. - 2001. - № 10 (82). - C. 2475–2484.
254. Uehara T. Treatment-Emergent Influenza Variant Viruses With Reduced Baloxavir Susceptibility: Impact on Clinical and Virologic Outcomes in Uncomplicated Influenza / Uehara T., Hayden F. G., Kawaguchi K., Omoto S., [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. - 2019. - № 3 (221). - C. 346–355.
255. Vandervén H. A. The protective potential of Fc-mediated antibody functions against influenza virus and other viral pathogens / Vandervén H. A., Kent S. J. // Immunology and Cell Biology. - 2020. - T. 98. № 4. - C. 253–263.

256. Vasin A. V. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: An overview of recently discovered proteins / Vasin A. V., Temkina O. A., Egorov V. V., Klotchenko S. A., [et al.] // *Virus Research*. - 2014. - (185). - C. 53–63.
257. Velthuis A. J. W. te Influenza virus RNA polymerase: insights into the mechanisms of viral RNA synthesis / Velthuis A. J. W. te, Fodor E. // *Nature Reviews Microbiology*. - 2016. - № 8 (14). - C. 479–493.
258. Vijayakrishnan S. Cryotomography of Budding Influenza A Virus Reveals Filaments with Diverse Morphologies that Mostly Do Not Bear a Genome at Their Distal End / Vijayakrishnan S., Loney C., Jackson D., Suphamungmee W., [et al.] // *PLoS Pathogens*. - 2013. - № 6 (9). - C. e1003413.
259. Vlieger D. De Single-Domain Antibodies and Their Formatting to Combat Viral Infections / De Vlieger D., Ballegeer M., Rossey I., Schepens B., [et al.] // *Antibodies*. - 2018. - № 1 (8). - C. 1.
260. Vlieger D. De Selective Engagement of FcγRIV by a M2e-Specific Single Domain Antibody Construct Protects Against Influenza A Virus Infection / De Vlieger D., Hoffmann K., Van Molle I., Nerinckx W., [et al.] // *Frontiers in Immunology*. - 2019. - (10). - C. 2920.
261. Vries R. D. de Influenza virus-specific antibody dependent cellular cytotoxicity induced by vaccination or natural infection / de Vries R. D., Nieuwkoop N. J., Pronk M., de Bruin E., [et al.] // *Vaccine*. - 2017. - № 2 (35). - C. 238–247.
262. Vuchelen A. 1H, 13C and 15N assignments of a camelid nanobody directed against human α -synuclein / Vuchelen A., O'Day E., De Genst E., Pardon E., [et al.] // *Biomolecular NMR Assignments*. - 2009. - № 2 (3). - C. 231–233.
263. Wang J. Design and Characterization of Bispecific and Trispecific Antibodies Targeting SARS-CoV-2 / Wang J., Qian Q., Jiang Y., Liang Z., [et al.] // *Vaccines*. - 2025. - № 3 (13). - C. 255.

264. Wang Q. Host Interaction Analysis of PA-N155 and PA-N182 in Chicken Cells Reveals an Essential Role of UBA52 for Replication of H5N1 Avian Influenza Virus / Wang Q., Li Q., Liu T., Chang G., [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. - 2018. - (9). - C. 936.
265. Wang W. Human antibody 3E1 targets the HA stem region of H1N1 and H5N6 influenza A viruses / Wang W., Sun X., Li Y., Su J., [et al.] // *Nature Communications*. - 2016. - № 1 (7). - C. 13577.
266. Wang X. Adenovirus delivery of encoded monoclonal antibody protects against different types of influenza virus infection / Wang X., Zhou P., Wu M., Yang K., [et al.] // *npj Vaccines*. - 2020. - № 1 (5). - C. 57.
267. Wang Y. Monoclonal antibody recognizing SLLTEVET epitope of M2 protein potently inhibited the replication of influenza A viruses in MDCK cells / Wang Y., Zhou L., Shi H., Xu H., [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2009. - № 1 (385). - C. 118–122.
268. Wang Y. Antigenic characterization of influenza and SARS-CoV-2 viruses / Wang Y., Tang C. Y., Wan X. F. // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. - 2022. - T. 414. № 9. - C. 2841–2881.
269. Watanabe A. Antibodies to a Conserved Influenza Head Interface Epitope Protect by an IgG Subtype-Dependent Mechanism / Watanabe A., McCarthy K. R., Kuraoka M., Schmidt A. G., [et al.] // *Cell*. - 2019. - № 5 (177). - C. 1124-1135.e16.
270. Wei G. Potent neutralization of influenza a virus by a single-domain antibody blocking M2 ion channel protein / Wei G., Meng W., Guo H., Pan W., [et al.] // *PLoS ONE*. - 2011. - № 12 (6). - C. e28309.
271. Weis W. Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid / Weis W., Brown J. H., Cusack S., Paulson J. C., [et al.] // *Nature*. - 1988. - № 6172 (333). - C. 426–431.

272. Weldon W. C. Enhanced Immunogenicity of Stabilized Trimeric Soluble Influenza Hemagglutinin / Weldon W. C., Wang B. Z., Martin M. P., Koutsouanos D. G., [et al.] // PLoS ONE. - 2010. - № 9 (5). - C. e12466.
273. Wentworth D. E. Transmission of Swine Influenza Virus to Humans after Exposure to Experimentally Infected Pigs / Wentworth D. E., McGregor M. W., Macklin M. D., Neumann V., [et al.] // The Journal of Infectious Diseases. - 1997. - № 1 (175). - C. 7–15.
274. Whitley R. J. Global assessment of resistance to neuraminidase inhibitors, 2008–2011: The influenza resistance information study (IRIS) / Whitley R. J., Boucher C. A., Lina B., Nguyen-Van-Tam J. S., [et al.] // Clinical Infectious Diseases. - 2013. - № 9 (56). - C. 1197–1205.
275. Whittle J. R. R. Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin / Whittle J. R., Zhang R., Khurana S., King L. R., [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2011. - № 34 (108). - C. 14216–14221.
276. Wiggins K. B. The Nature of Immune Responses to Influenza Vaccination in High-Risk Populations / Wiggins K. B., Smith M. A., Schultz-Cherry S. // Viruses. - 2021. - № 6 (13). - C. 1109.
277. Wiley D. C. Structural identification of the antibody-binding sites of Hong Kong influenza haemagglutinin and their involvement in antigenic variation / Wiley D. C., Wilson I. A., Skehel J. J. // Nature. - 1981. - № 5796 (289). - C. 373–378.
278. Wise H. M. Identification of a Novel Splice Variant Form of the Influenza A Virus M2 Ion Channel with an Antigenically Distinct Ectodomain / Wise H. M., Hutchinson E. C., Jagger B. W., Stuart A. D., [et al.] // PLoS Pathogens. - 2012. - № 11 (8). - C. e1002998.
279. Wohlbold T. J. Broadly protective murine monoclonal antibodies against influenza B virus target highly conserved neuraminidase epitopes / Wohlbold T. J., Podolsky K. A.,

Chromikova V., Kirkpatrick E., [et al.] // *Nature Microbiology*. - 2017. - № 10 (2). - C. 1415–1424.

280. Wu N. C. A Perspective on the Structural and Functional Constraints for Immune Evasion: Insights from Influenza Virus / Wu N. C., Wilson I. A. // *Journal of Molecular Biology*. - 2017. - № 17 (429). - C. 2694–2709.

281. Wu Y. A potent broad-spectrum protective human monoclonal antibody crosslinking two haemagglutinin monomers of influenza A virus / Wu Y., Cho M., Shore D., Song M., [et al.] // *Nature Communications*. - 2015. - (6). - C. 7708.

282. Wu Y. Single-domain antibodies as therapeutics against human viral diseases / Wu Y., Jiang S., Ying T. // *Frontiers in Immunology*. - 2017. - № DEC (8). - C. 1–13.

283. Xu R. Structural Basis of Preexisting Immunity to the 2009 H1N1 Pandemic Influenza Virus / Xu R., Ekiert D. C., Krause J. C., Hai R., [et al.] // *Science*. - 2010. - № 5976 (328). - C. 357–360.

284. Yamauchi Y. Influenza A virus uncoating / Yamauchi Y. // *Advances in Virus Research*. - 2020. - (106). - C. 1–38.

285. Yamayoshi S. A Broadly Reactive Human Anti-hemagglutinin Stem Monoclonal Antibody That Inhibits Influenza A Virus Particle Release / Yamayoshi S., Uraki R., Ito M., Kiso M., [et al.] // *EBioMedicine*. - 2017. - (17). - C. 182–191.

286. Yamazaki T. Neutralizing Antibodies Induced by Gene-Based Hydrodynamic Injection Have a Therapeutic Effect in Lethal Influenza Infection / Yamazaki T., Nagashima M., Ninomiya D., Aina A., [et al.] // *Frontiers in Immunology*. - 2018. - (9). - C. 47.

287. Yang J. A new role of neuraminidase (NA) in the influenza virus life cycle: implication for developing NA inhibitors with novel mechanism of action / Yang J., Liu S., Du L., Jiang S. // *Reviews in Medical Virology*. - 2016. - № 4 (26). - C. 242–250.

288. Yang M. L. A VHH single-domain platform enabling discovery and development of monospecific antibodies and modular neutralizing bispecifics against SARS-CoV-2 variants / Yang M. L., Yuan T. Z., Chan K. Y., Ding L., [et al.] // *Antibody Therapeutics*. - 2024. - № 2 (7). - C. 164–176.
289. Yasuhara A. Antigenic drift originating from changes to the lateral surface of the neuraminidase head of influenza A virus / Yasuhara A., Yamayoshi S., Kiso M., Sakai-Tagawa Y., [et al.] // *Nature Microbiology*. - 2019. - № 6 (4). - C. 1024–1034.
290. Yep A. T. Broad reactivity single domain antibodies against influenza virus and their applications to vaccine potency testing and immunotherapy / Tung Yep A., Takeuchi Y., Engelhardt O. G., Hufton S. E. // *Biomolecules*. - 2021. - T. 11. № 3. - C. 1–23.
291. Yoshizumi T. Influenza A virus protein PB1-F2 translocates into mitochondria via Tom40 channels and impairs innate immunity / Yoshizumi T., Ichinohe T., Sasaki O., Otera H., [et al.] // *Nature Communications*. - 2014. - № 1 (5). - C. 4713.
292. Zaraket H. Burden of influenza B virus infection and considerations for clinical management / Zaraket H., Hurt A. C., Clinch B., Barr I., [et al.] // *Antiviral Research*. - 2021. - T. 185. - C. 104970.
293. Zavrtanik U. Structural Basis of Epitope Recognition by Heavy-Chain Camelid Antibodies / Zavrtanik U., Lukan J., Loris R., Lah J., [et al.] // *Journal of Molecular Biology*. - 2018. - № 21 (430). - C. 4369–4386.
294. Zhang W. Genetic evolution and molecular selection of the HE gene of influenza C virus / Zhang W., Zhang L., He W., Zhang X., [et al.] // *Viruses*. - 2019. - № 2 (11). - C. 167.
295. Zhang X. Targeting Hemagglutinin: Approaches for Broad Protection against the Influenza A Virus / Zhang X., Zhang L., Xue C. // *Viruses*. - 2019. - № 5 (11). - C. 405.
296. Zhao C. Influence of Host Sialic Acid Receptors Structure on the Host Specificity of Influenza Viruses / Zhao C., Pu J. // *Viruses*. - 2022. - № 10 (14). - C. 2141.

297. Zhong W. Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity to Hemagglutinin of Influenza A Viruses After Influenza Vaccination in Humans / Zhong W., Liu F., Wilson J. R., Holiday C., [et al.] // Open Forum Infectious Diseases. - 2016. - № 2 (3). - C. ofw102.
298. Zhu L. Inhibition of Influenza A Virus (H1N1) Fusion by Benzenesulfonamide Derivatives Targeting Viral Hemagglutinin / Zhu L., Li Y., Li S., Li H., [et al.] // PLoS ONE. - 2011. - № 12 (6). - C. e29120.
299. Zolotarova O. Antigenic site variation in the hemagglutinin of pandemic influenza A(H1N1)pdm09 viruses between 2009–2017 in Ukraine / Zolotarova O., Budzanivska I., Leibenko L., Radchenko L., [et al.] // Pathogens. - 2019. - № 4 (8). - C. 194.
300. Zost S. J. Contemporary H3N2 influenza viruses have a glycosylation site that alters binding of antibodies elicited by egg-adapted vaccine strains / Zost S. J., Parkhouse K., Gumina M. E., Kim K., [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. - 2017. - № 47 (114). - C. 12578–12583.