

Воронина Дарья Владимировна

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

3.2.7. – Иммунология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

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

Научный руководитель:

Щебляков Дмитрий Викторович – доктор биологических наук, руководитель отдела генетики и молекулярной биологии бактерий, заведующий лабораторией иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Катруха Алексей Генрихович – доктор биологических наук, профессор кафедры биохимии, заведующий кафедрой биохимии биологического факультета федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова».

Алешкин Андрей Владимирович – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор РАН, директор по новым продуктам ООО «Орфан-Био».

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «17» апреля 2026 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 21.1.018.03 при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
д.б.н.,

Ермолаева С.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности. Вирусы гриппа принадлежат к порядку *Articulavirales*, семейству *Orthomyxoviridae* и включают 4 типа: вирус гриппа типа А (ВГА), вирус гриппа типа В, вирус гриппа типа С и недавно идентифицированный тип D [Hause V. M. et al., 2013]. 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 [Iuliano A.D. et al., 2018]. 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 ВГА 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) [Throsby M. et al., 2008]. 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 [Sutton T. C., 2018].

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. В среднем для всех вирусов гриппа эффективность вакцинации при совпадении штаммов составляет 49%, а при несовпадении – 9% [Okoli G. N. et al., 2021]. 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 [Николаева С.В. и др., 2024; Bonanni P. et al., 2024]. 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 гриппа: ингибиторы нейраминидазы (NA) осельтамивир и занамивир, а также ингибитор НА умифеновир. Также, на российском фармацевтическом рынке представлены и другие группы противогриппозных средств: ингибитор М2 белка (римантадин) и ингибитор РА субъединицы вирусной полимеразы (балоксавир марбоксил). Вместе с тем вирусы гриппа не перестают изменяться, появляются устойчивые к лекарственным средствам штаммы, которые снижают эффективность противовирусных препаратов. 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 (mAb) 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. 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 [Mota, K. G., Moro, A. M., 2025]. 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 [Hamers-Casterman C. et al., 1993]. 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 [Muyltermans S., Cambillau C., Wyns L., 2001]. Достаточную площадь антигенсвязывающей поверхности sdAb обеспечивает удлиненный CDR3 участок VHH, который также обладает большим аминокислотным и структурным разнообразием в сравнении с CDR3 переменного фрагмента тяжелой цепи классических IgG [Mitchell L. S., Colwell L. J., 2018]. 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). 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.

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

Задачи исследования:

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 А/Hawaii/70/2019 (H1N1) и А/Hong Kong/45/2019 (H3N2), а также стеблевой домен НА штамма А/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 А/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. Отработана 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».

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 рН 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», (Любляна, Словения, 2021); Первом Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии, (Москва, 2023); IV Международном форуме Дни Вирусологии, (Санкт-Петербург, 2023); XI Международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2023», (Москва, 2023); VIII Сеченовском Международном биомедицинском саммите: научно-технологическая кооперация в медицинской отрасли (SIBS-2024), (Москва, 2024); научно-практической конференции с международным участием «Всероссийский дискуссионный клуб все о респираторных инфекциях: диагностика, лечение, профилактика», (онлайн трансляция, 2025); XV Международной научно-практической конференции «Биотехнология и биомедицинская инженерия», (Курск, 2025).

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) под руководством в.н.с., к.б.н. Есмагамбетова И.Б. (зав. лаб. стромальной регуляции иммунитета). Иммунизацию животных проводили совместно с м.н.с. Алексеевой И.А. (лаб. иммунобиотехнологии). Исследование способности антител активировать Fc-опосредованные механизмы с помощью репортерных клеточных линий проводили совместно с к.б.н. Джаруллаевой А.Ш. (лаб. клеточной микробиологии).

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Клеточные линии и вирусы. В работе использовали следующие клеточные линии: CHO-S (Thermo Scientific) для продукции тяжелоцепочечных мАт; MDCK (Российская коллекция клеточных линий позвоночных) для культивирования и титрования ВГА; Jurkat-Lucia™ NFAT-CD16 и Jurkat-Lucia™ NFAT-CD32 (InvivoGen) для оценки активации Fc-зависимых эффекторных функций. ВГА и рекомбинантные репликативно-дефектные аденовирусы человека 5 типа, несущие гены НА подтипа Н1 или Н3 (Ad5-swH1opt/California и Ad5-tet-swH3glic) были любезно предоставлены д.б.н. Шмаровым М.М. (лаб. клеточной биотехнологии). Вирус A/Darwin/6/2021(H3N2) был предоставлен к.б.н. Тимофеевой Т.А. (лаб. физиологии вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского). Вирус A/Moscow/V-01/2023(H3N2) был выделен в лаб. иммунобиотехнологии (GenBank: PQ632955-PQ632962). Для процедур фагового дисплея использовали бактериофаг-помощник KM13 (Cancer Research Center of Marseille, France).

Антитела и рекомбинантные белки. Для иммуноферментного (ИФА) и вестерн-блот анализа применяли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена: anti-Llama IgG (Bethyl, США), anti-c-Мус (Abcam, Великобритания), anti-human IgG и anti-mouse IgG (Sigma, США), anti-M13 и anti-rabbit IgG (Sino Biological, Китай). Также использовали антитела производства Sino Biological (Китай): мАт к нуклеопротеину широкого спектра; поликлональные антитела к НА ВГА подтипа Н1N1 или Н3N2. Используемые в работе

рекомбинантные НА были получены из Sino Biological (Китай), Immune Technology (США) или IRR (США).

Бактериальные штаммы и плазмидные векторы. В работе использовали следующие штаммы *E. coli*: DH5 α (NEB, США) для процедур молекулярного клонирования; TG1 (Lucigen, Великобритания) для процедур фагового дисплея; Rosetta (DE3), предоставленный д.б.н. Белым Ю.Ф. (лаб. молекулярных основ патогенности), использовали для продукции sdAb. Фагмидный вектор pHEN1, используемый в процедуре фагового дисплея, получен в лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ. Плазмидный вектор pFUSE использовали для экспрессии рекомбинантных белков в эукариотической системе экспрессии (InvivoGen, Франция).

Лабораторные животные. В экспериментах использовали SPF мышей линии BALB/c. Лабораторные животные содержались в соответствии с Директивой 2010/63/EU и рекомендациями FELASA. Все эксперименты были одобрены этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 19 от 2022 г.).

Методы исследования. Молекулярно-биологические методы исследования включали получение плазмидных ДНК, содержащих гены рекомбинантных НА и тяжелоцепочечных антител, методами молекулярного клонирования; выделение тотальной РНК из мононуклеарных клеток иммунизированных животных и синтез кДНК; проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР) для амплификации последовательностей V_HH и их клонирование в фагмидный вектор; секвенирование по Сэнгеру; экспрессия и хроматографическая очистка sdAb. Культуральные методы включали как культивирование бактериальных клеток, так и эукариотических адгезивных и суспензионных клеточных линий, а также выделение бактериофагов. Селекцию специфических бактериофагов проводили методом фагового дисплея. Иммунологические методы включали различные варианты ИФА; иммуноблоттинг; определение аффинности антител с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR); исследование активации Fc γ R CD16 и CD32 с помощью репортерных клеточных линий. Вирусологические методы включали изоляцию вирусов гриппа и их культивирование с использованием клеток линии MDCK; определение инфекционного титра вирусов по ТЦД50 и количеству бляшек, вирусной нагрузки в легких инфицированных мышей; исследование нейтрализующей активности антител в реакции нейтрализации; получение эскейп-мутантов ВГА, устойчивых к нейтрализующему действию антител; анализ ингибирования гемолиза и реакция торможения гемагглютинации.

Доклинические исследования. Проводили совместно с центром доклинических исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России в соответствии с Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Миронов А.Н., 2012].

Клинические исследования. Клинические исследования I фазы препарата ГамИнфлюМаб выполнены в соответствии с Протоколом №01-ГамИнФлюМаб-2023 «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».

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

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. Для получения полноразмерного рекомбинантного НА распространенным подходом является экспрессия полипептида НА0, который, в зависимости от штамма ВГА, способен естественным образом тримеризоваться [Weldon W. C. et al., 2010]. 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. Для этого была использована последовательность стеблевого домена НА штамма A/Brisbane/59/2007 (H1N1) mini-НА #4900, опубликованная [Impagliazzo A. et al., 2015]. Нуклеотидные последовательности, соответствующие указанным выше антигенам, были синтезированы в ЗАО «Евроген» (Россия) в составе вектора рAL-ТА. Далее гены полноразмерных НА H1N1 и H3N2, а также СД НА клонировали в вектор рFUSE, и полученные плазмидные ДНК использовали для трансфекции клеток CHO-S с целью получения стабильных продуцентов. Очистку полученных антигенов из культуральной жидкости производили с помощью металл-аффинной хроматографии. Таким образом, были получены три рекомбинантных антигена: 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).

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

Для получения sdAb, активных в отношении НА, относящихся к филогенетической группе 1, альпака (*V. pacos*) иммунизировали препаратом, состоящим из вакцины Гриппол® плюс и полного адьюванта Фрейнда (для первой инъекции), или вакцины Гриппол® плюс в сочетании с неполным адьювантом Фрейнда (для последующих четырех иммунизаций). Интервал между первой и второй иммунизациями составлял 14 дней, между последующими – 10 дней. Титр антител в сыворотке альпака после 5-й иммунизации к СД НА составил 1:12500, к НА H1 и H3 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. Через 7 дней после последней иммунизации у альпака отбирали 50 мл периферической крови и выделяли пул мононуклеарных клеток (РВМС). Нуклеотидные последовательности, соответствующие вариabельным фрагментам VHH, выделенные из РВМС, клонировали в фагмидный вектор рHEN1. Отбор специфических sdAb осуществляли методом фагового дисплея как описано в [Воронина Д.В. и др., 2021]. В качестве мишени для биопаннинга выбрали рекомбинантный СД НА штамма A/Brisbane/59/2007 (H1N1), полученный на предыдущем этапе работы. Последовательно проводили три раунда селекции, результаты которой контролировали методом поликлонального фагового ИФА. При дальнейшем анализе индивидуальных клонов методами моноклонального фагового ИФА и секвенирования по Сэнгеру были отобраны 13 клонов VHH.

Анализ аффинности (методами ИФА и SPR) отобранных антител позволили выбрать два наиболее перспективных sdAb: H1.2 и G2.3. Значения EC₅₀ (полумаксимальной эффективной концентрации) для СД НА и клонов H1.2 и G2.3 составили 0.7 и 7.4 нМ, соответственно, а для

HA H1 2009 – 0.6 и 5.9 нМ. Методом SPR определены равновесные константы диссоциации для H1.2 и G2.3: K_d 3.65×10^{-10} и 5.54×10^{-10} М, соответственно. Изучение кросс-реактивности отобранных sdAb проводили методом непрямого ИФА с рекомбинантными HA0 белками различных штаммов, относящихся к филогенетическим группам 1 и 2, а также с помощью реакции вируснейтрализации (РВН) с различными ВГА. Согласно полученным данным, H1.2 и G2.3 эффективно взаимодействуют и/или нейтрализуют с широким спектром HA подтипа H1 и H6, который охватывает штаммы, циркулировавшие с 1934 года по настоящее время, и, в том числе штаммы гриппа свиней и диких птиц. Далее оценивали эффективность отобранных VHH *in vivo* на модели летальной инфекции мышей. Животным за 1 час до заражения интраназально (и.н.) вводили sdAb в дозе 1 мг/кг и спустя час и.н. заражали вирусом A/California/07/2009 (H1N1) в дозе 5 ЛД₅₀. В результате, G2.3 и H1.2 продемонстрировали 100% защиту инфицированных животных от летального исхода. Также, кратковременная потеря веса животными из опытных групп не превышала 10% от изначальной массы тела.

Получение тяжелопепочечных моноклональных антител, специфичных к HA 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 [Wohlbold T. J. et al., 2017; Gao R. et al., 2020]. 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.

На основе отобранных sdAb G2.3 и H1.2 получали модифицированные mAт, слитые с Fc-фрагментом IgG1 (VHH-Fc): G2.3-Fc и H1.2-Fc. Синтезированные конструкции использовали для транзientной трансфекции клеток CHO-S и последующей очистки mAт методом аффинной хроматографии.

Аналогично мономерным формам VHH, для VHH-Fc определяли спектр связывающей и нейтрализующей активности в непрямом ИФА и РВН, соответственно (Рисунок 1).

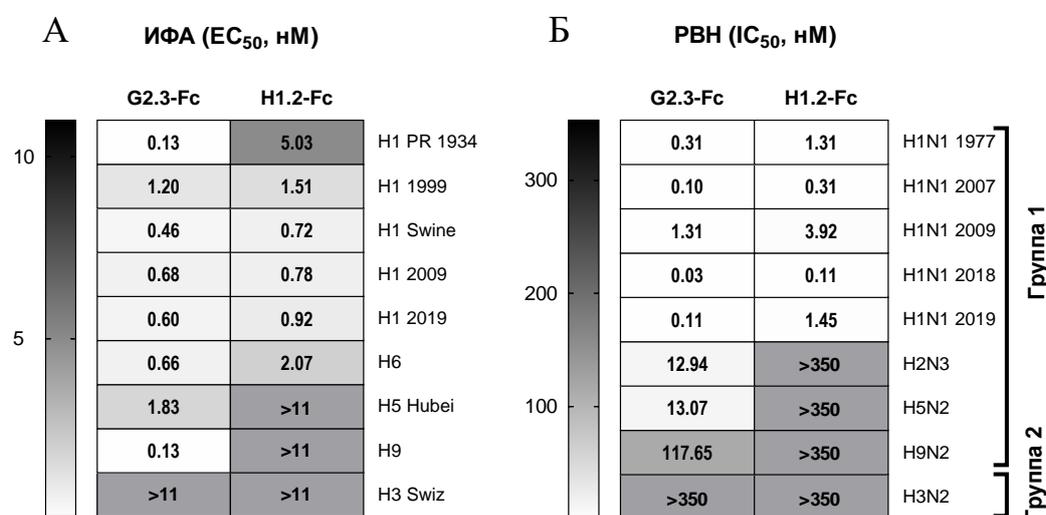


Рисунок 1 – Результаты исследования спектра взаимодействия и нейтрализации VHN-Fc. Тепловые карты значений EC₅₀ (А) и IC₅₀ (Б).

Согласно результатам ИФА, модификация Fc-фрагментом увеличила аффинность антител к НА различных штаммов ВГА группы 1. Антитело G2.3-Fc, в отличие от мономера G2.3, связывалось с НА подтипов Н5 и Н9, в то время как Н1.2-Fc не взаимодействовало с НА данных подтипов. Полученные в РВН данные подтверждали результаты ИФА (Рисунок 1Б). Наиболее выраженные изменения в противовирусной активности были характерны для G2.3-Fc: в сравнении с моновалентным G2.3, его модифицированный вариант демонстрировал вируснейтрализующую активность против ВГА подтипов Н2, Н5 и Н9. Также, G2.3-Fc обладал более широким спектром активности в пределах филогенетической группы 1, нежели Н1.2-Fc. Исходя из полученных данных, для дальнейшего исследования был выбран клон G2.3-Fc.

Далее оценивали функциональность Fc-фрагмента в составе VHN-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* [DiLillo D. J. et al., 2016]. Взаимодействие Fc-фрагмента с CD16 или CD32 на поверхности соответствующих иммунных клеток приводит к индукции антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (АЗКЦ) или антителозависимого клеточного фагоцитоза (АЗКФ), соответственно. Возможность VHN-Fc активировать FcγR исследовали с помощью репортерных клеточных линий, которые содержат NFAT-индуцируемый репортерный ген люциферазы Luc₂ и стабильно экспрессируют на мембране молекулы CD16 или CD32. В результате анализа активации АЗКЦ и АЗКФ было показано, что G2.3-Fc, в отличие от моновалентной формы G2.3, успешно индуцирует оба исследуемых механизма в ответ на связывание с таргетными клетками MDCK, инфицированными вирусом A/Duck/mallard/Moscow/4970/2018 (H1N1) (Рисунок 2). Из полученных данных следует, что слияние с фрагментом Fc позволяет VHN-Fc эффективно задействовать эффекторные функции в ответ на связывание с НА.

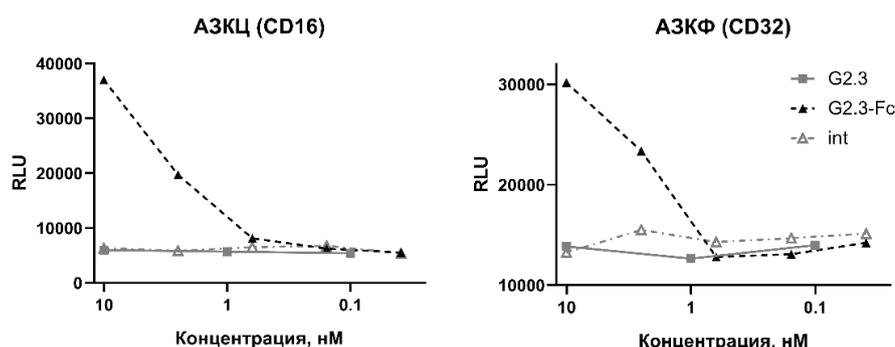


Рисунок 2 – Результаты исследования активации G2.3-Fc эффекторных функций АЗКЦ и АЗКФ. RLU – относительные единицы люминесценции.

Далее проводили изучение эффективности VHN-Fc *in vivo* 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, и также эксперты полагают, что с вирусами подтипов Н5 и Н9 может быть связано появление будущих пандемических штаммов [Ильичева Т. Н. и др., 2023]. В связи с этим, эффективность профилактического введения антитела G2.3-Fc исследовали в отношении ВГА подтипов Н1, Н2,

Н5 и Н9. На первом этапе мышам внутрибрюшинно (в.б.) вводили VHH-Fc в дозе 10 мг/кг за 24 часа до заражения 5 ЛД₅₀ 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). Согласно полученным данным, G2.3-Fc эффективно защищало мышей как от летального исхода, так и от развития инфекции, вызванной исследуемыми вирусами, о чем свидетельствует отсутствие снижения веса у животных в опытных группах. Затем исследовали протективность системного введения G2.3-Fc в более низких дозах (Рисунок 3). Согласно полученным данным, G2.3-Fc в дозе 3 мг/кг и 0,6 мг/кг демонстрировало 100% протективность при заражении вирусами H1N1 и H5N2. У мышей, получавших антитела, также не наблюдалось снижение веса. Также оценивали влияние G2.3-Fc на репликацию ВГА в легких мышей (Рисунок 3В и Е). На 3-й день после заражения мышей эвтаназировали и отбирали легкие для определения инфекционного титра вирусов на культуре клеток MDCK. Согласно полученным данным, при введении 3 мг/кг G2.3-Fc титр вирусов 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, однако не оказывало существенного влияния на размножение вирусов H1N1 или H5N2 в легких испытываемых животных.

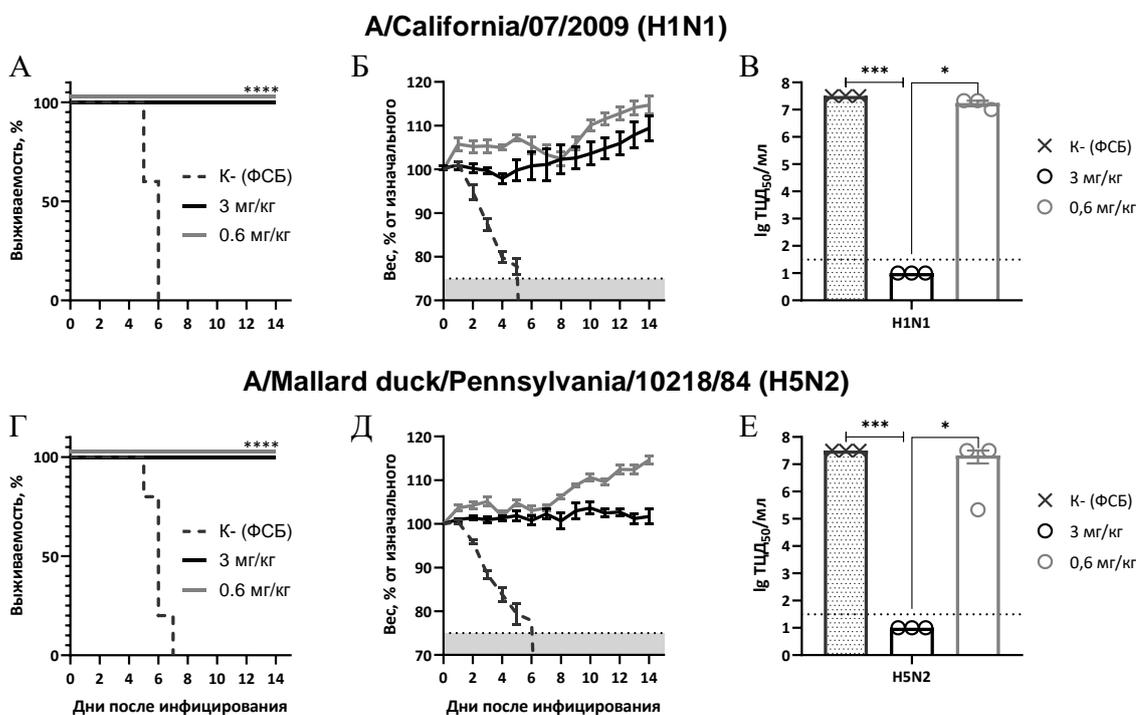


Рисунок 3 – Исследование эффективности профилактического введения G2.3-Fc. Динамика выживаемости (А и Г), изменения массы тела (Б и Д) и инфекционный титр ВГА в легких мышей (В и Е) после заражения вирусами гриппа А.

Эффективность терапевтического применения антитела G2.3-Fc *in vivo* оценивали путем инфицирования мышей вирусом A/California/07/2009 (H1N1) в дозе 5ЛД₅₀ и в.б. введения антитела спустя 24 часа после инфицирования (Рисунок 4). 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% (Рисунок 4А). 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% (Рисунок 4Б). Полученные данные свидетельствуют о высоком потенциале G2.3-Fc для терапевтического применения.

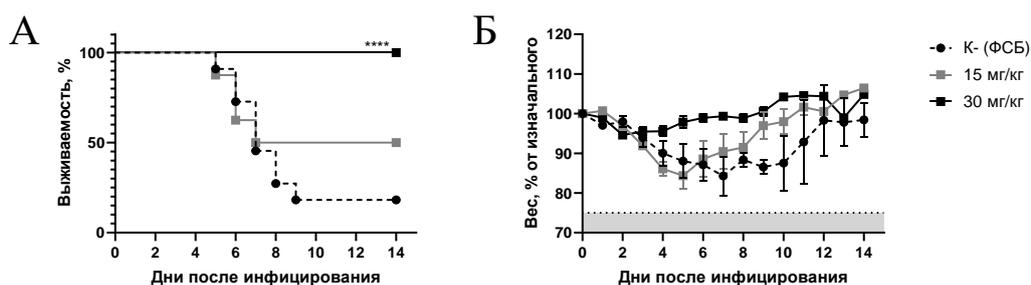


Рисунок 4 – Исследование эффективности терапевтического введения G2.3-Fc. Динамика выживаемости (А) и изменения массы тела (Б) мышей после заражения A/California/07/2009 (H1N1).

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 [Krammer F., 2019]. На следующем этапе работы определяли механизм противовирусного действия G2.3-Fc. При помощи модифицированных методик РВН [Ramos K. E. et al., 2024] было установлено, что G2.3-Fc способен блокировать как проникновение, так и выход вируса из клетки, однако более эффективно подавляет проникновение ВГА в клетку (IC_{50} , ингибирующая выход вирионов из клетки, составила 1,52 нМ, в то время как IC_{50} для интернализации вируса составила 0,5 нМ). Затем исследовали влияние антитела на процесс слияния мембран, который состоит из двух стадий: расщепление НА трипсин-подобными протеазами клетки-хозяина и индуцированное низким рН конформационное изменение НА. Первоначально моделировали протеолитическую активацию НА с помощью трипсина-TPСК в присутствии VNH-Fc; расщепление НА подтверждали с помощью SDS-PAGE в денатурирующих условиях. Результаты показали, что G2.3-Fc, так же, как и контрольное антитело к СД НА, SD38-Fc [Laursen N. S. et al., 2018], не могло предотвратить протеазное расщепление НА. Далее для того, чтобы изучить возможность ингибирования G2.3-Fc конформационных изменений НА, использовали анализ ингибирования гемолиза [Du R. et al., 2021] (Рисунок 5). Когда НА связывается с сиаловыми кислотами куриных эритроцитов, он претерпевает конформационные изменения при обработке буфером с низким значением рН, формируя поры на поверхности клеток, через которые гемоглобин выходит из клеток. Согласно полученным данным, G2.3-Fc ингибировал гемолиз; минимальная концентрация антитела, обеспечивающая полное ингибирование фузии, составила 55,1 нМ.

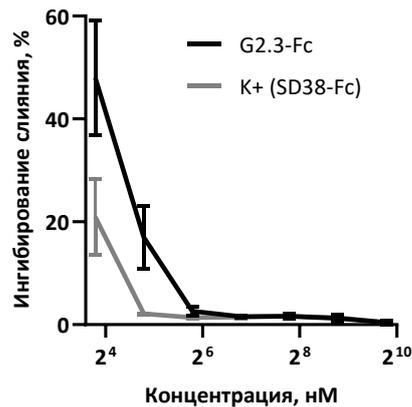


Рисунок 5 – Анализ ингибирования гемолiza на примере вируса A/California/07/2009 (H1N1), отражающий процесс конформационных изменений HA под действием низкого pH и последующей фузии мембран.

Таким образом, было показано, что тяжелопепочное 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 HA под действием низкого pH.

Характеристика эпитопной специфичности тяжелопепочных антител, связывающихся с HA филогенетической группы 1

Первоначально, для локализации эпитопа G2.3-Fc в молекуле HA проводили конкурентный ИФА с контрольным VHH-Fc, в качестве которого брали описанное ранее антитело широкого спектра к СД HA SD38-Fc [Laursen N. S. et al., 2018]. Исходя из данных рентгеноструктурного анализа, эпитоп SD38-Fc располагается в области А-спирали СД HA. В результате анализа было показано, что G2.3 конкурирует за связывание с SD38-Fc. Полученные данные позволяют предположить, что G2.3-Fc имеет перекрывающийся с SD38-Fc эпитоп. Далее, с целью установить, является ли эпитоп G2.3-Fc конформационным или линейным, проводили ИФА с денатурированным и нативным HA H1 2009. Было продемонстрировано, что G2.3-Fc теряет способность узнавать HA после денатурации, что говорит о конформационной природе его эпитопа. Также оценивали связывание G2.3-Fc с HA, претерпевающим конформационные изменения под действием снижения pH. Для этого HA H1 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 VHH-Fc значительно падает. Это свидетельствует о том, что существенная перестройка молекулы HA, особенно его «стебля», в условиях низкого pH, приводит к разрушению эпитопа G2.3-Fc. С целью оценки влияния гликозилирования на взаимодействие антитела с HA, проводили непрямой ИФА с СД HA в его нативной и дегликозилированной формах. 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 HA. 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 A/Victoria/2570/2019(H1N1), для G2.3-Fc получали эскейп-мутанты 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). Дополнительно, все вирусы, включая те, которые пассировались без присутствия антитела, приобрели адаптационные к клеточной культуре мутации в глобулярном домене НА1 субъединицы: K173E, D204V, A212E, Q240R. Анализ ленточной диаграммы НА показал, что а.о. Т49 располагается в А-спирали, аминокислота Н111 – в С-спирали НА2 субъединицы (Рисунок 6). 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.

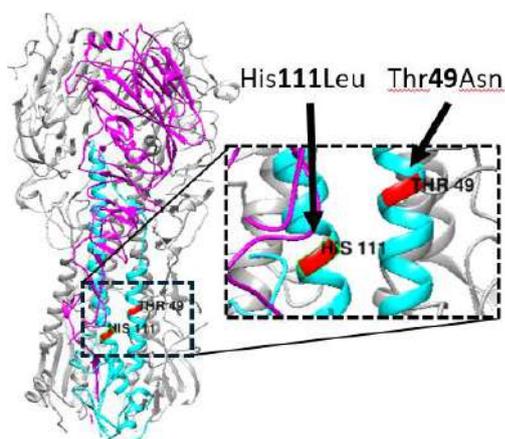


Рисунок 6 – Локализация а.о., заменившихся в эскейп-мутанте под влиянием G2.3-Fc. Показаны на структуре тримера НА штамма A/California/04/2009(H1N1) (PDB ID 3AL4). НА1 субъединица одного мономера окрашена пурпурным цветом, НА2 – бирюзовым; два других мономера выкрашены в серый цвет; красным цветом выделены а.о. Т49 (Thr49) и Н111 (His111).

Из представленных результатов следует, что эпитоп G2.3-Fc является конформационным и высококонсервативным среди НА филогенетической группы 1 и затрагивает аминокислоты в составе А-спирали НА2-цепи.

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

На следующем этапе работы, двугорбого верблюда (*C. bactrianus*) иммунизировали препаратом рекомбинантного белка, полученного в рамках данной диссертационной работы, HA0 A/Hong Kong/45/2019 (H3N2) (далее сокращенно H3 НК), адсорбированного на гидроксиде алюминия, 5 раз, с интервалом 14 дней между первой и второй инъекцией и 10 дней между последующими. Титр антител к H3 НК в сыворотке крови верблюда после финальной иммунизации составил 1:1 968 300, что свидетельствует о формировании выраженного гуморального ответа после цикла иммунизации верблюда. Получение иммунной библиотеки и

отбор специфических sdAb осуществляли как описано в [Щебляков Д.В. и др., 2024]. Биопаннинг проводили с использованием в качестве мишени инактивированного вируса A/Aichi/2/68 (H3N2). Обогащение фаговой библиотеки H3-специфическими фагами контролировали методом поликлонального фагового ИФА. При дальнейшем анализе индивидуальных клонов методами фагового и VHH-ИФА и секвенирования по Сэнгеру были отобраны 24 клон VHH.

Анализ аффинности и кросс-реактивности отобранных антител методом ИФА позволили выбрать три наиболее перспективных sdAb: E12.2, D4.2 и D9.2. Указанные VHH связывались с широким спектром штаммов HA подтипа H3, а sdAb E12.2 также узнавало HA подтипа H4. Также, E12.2 и D9.2, помимо полноразмерного HA, узнавали субъединицу HA1. Стоит отметить, что E12.2, D4.2 и D9.2 были отобраны в процессе селекции с использованием в качестве мишени вируса A/Aichi/2/68 (H3N2), что подтвердило предположение о том, что использование гетерологичных антигенов для иммунизации и биопаннинга способствует отбору кросс-реактивных sdAb. Согласно результатам, полученным в ходе исследования нейтрализующей активности указанных VHH, 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 sdAb *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.

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

На основе отобранных sdAb E12.2, D4.2 и D9.2 получали модифицированные МАТ, слитые с Fc-фрагментом IgG1: E12.2-Fc, D4.2-Fc и D9.2-Fc. Синтезированные конструкции использовали для транзientной трансфекции клеток CHO-S и последующей очистки МАТ методом аффинной хроматографии.

Аналогично мономерным формам VHH, для VHH-Fc определяли спектр связывающей активности в непрямом ИФА (Рисунок 7). Введение Fc фрагмента в структуру молекулы VHH повышало эффективность связывания каждого VHH-Fc, но в разной степени. Наиболее заметное увеличение аффинности продемонстрировали D4.2-Fc и D9.2-Fc. EC₅₀ мономерной формы D9.2 для H3 Aichi составляла 515,5 нМ, в то время как значение EC₅₀ 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 HA подтипа H4. Наименее выраженный эффект модификация Fc-фрагментом оказала на E12.2.

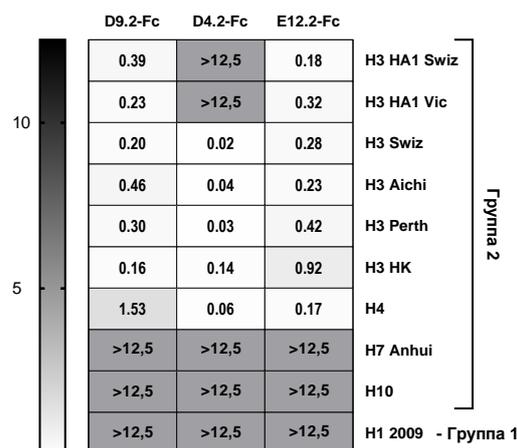


Рисунок 7 – Результаты исследования спектра взаимодействия VNN-Fc: тепловая карта значений EC_{50} , нМ.

На следующем этапе изучали эпитопную специфичность антител D4.2-Fc, D9.2-Fc и E12.2-Fc. При помощи иммуноблоттинга было подтверждено взаимодействие антител D9.2-Fc и E12.2-Fc с HA1 субъединицей. 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. 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 [Benhaim M. A. et al., 2020], 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 VNN-Fc не связывалось с денатурированным HA. Полученные результаты свидетельствуют о конформационной природе эпитопов отобранных антител. Далее в ходе конкурентного ИФА установлено, что три отобранных клон VNN-Fc узнают не перекрывающиеся эпитопы на поверхности HA. Таким образом, было показано, что отобранные VNN-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.

Далее оценивали функциональность Fc-фрагмента в составе VNN-Fc и его способность взаимодействовать с FcγR. На Рисунке 8 представлены результаты, полученные при исследовании способности антител D9.2-Fc, D4.2-Fc и E12.2-Fc активировать АЗКЦ и АЗКФ. Активность всех VNN-Fc статистически достоверно отличалась от активности моновалентной формы VNN и интактных клеток.

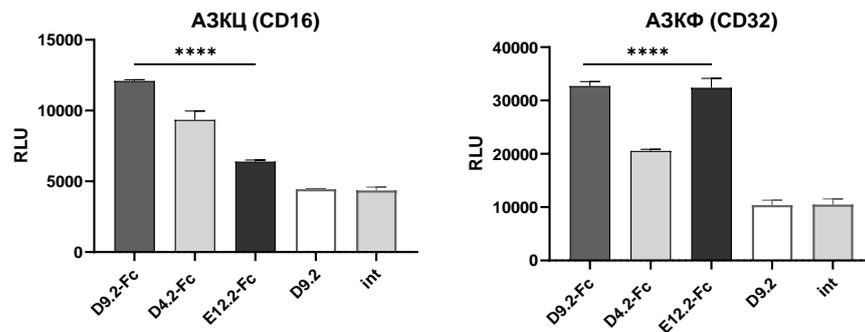


Рисунок 8 – Результаты исследования активации эффекторных функций с использованием в качестве таргетных клеток НЕК293, трансдуцированных рекомбинантным Ad5-tet-swH3glic.

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

Изучение эффективности VHH-Fc *in vivo* проводили с использованием летальной модели инфекции, вызванной вирусом гриппа H3N2, у мышей. VHH-Fc вводили и.н. в дозе 1 мг/кг за 1 ч до инфицирования. Среди трех отобранных антител, только D9.2-Fc обеспечивало 100% защиту мышей от летального исхода, а снижение массы тела в среднем не превышало 10% от изначального веса. В связи с этим, D9.2-Fc отобрали для дальнейших исследований. Далее изучали протективность D9.2-Fc *in vivo* при системном введении (Рисунок 9). В профилактическом режиме антитело вводили в.б. 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 (Рисунок 9А и Б). Для оценки эффективности D9.2-Fc в терапевтическом режиме антитело вводили в.б. в дозе 40 мг/кг спустя 24 ч после заражения. D9.2-Fc обеспечило выживаемость 80% животных; кратковременная потеря массы тела не превышала 15% (Рисунок 9В и Г).

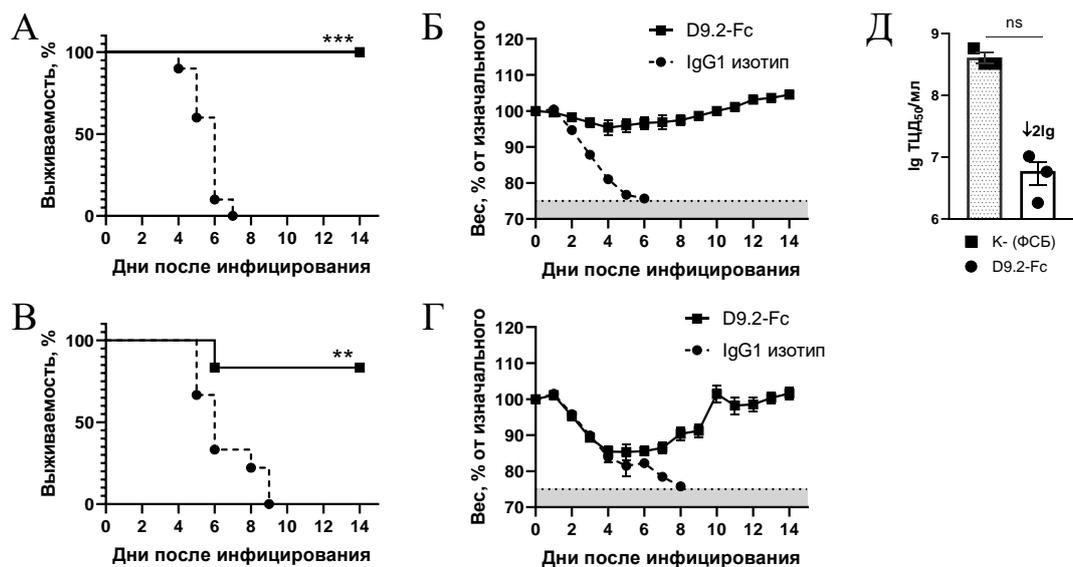


Рисунок 9 – Изучение эффективности D9.2-Fc *in vivo* против инфекции, вызванной A/Aichi/2/68 (H3N2). Динамика выживаемости и изменения массы тела мышей: А и Б – после введения D9.2-Fc за 24 часа до заражения; В и Г – после введения D9.2-Fc спустя 24 часа после заражения. Д - Инфекционный титр A/Aichi/2/68 (H3N2) в легких мышей.

Также оценивали влияние D9.2-Fc при введении в дозе 10 мг/кг за 24 часа до заражения на репликацию ВГА в легких мышей (Рисунок 9Д). Согласно полученным данным, при введении D9.2-Fc титр вируса снижался в среднем на 2 lg ТЦД₅₀/мл в сравнении с контрольной группой, однако различия были статистически не значимы. Таким образом, было показано, что антитело D9.2-Fc при системном профилактическом или терапевтическом введении эффективно защищает животных от летальной инфекции, вызванной ВГА подтипа НЗ.

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. Выше было продемонстрировано, что D9.2-Fc активирует 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. Комплекс мутаций LALA-PG ингибирует связывание с FcγR и C1q, в то время как взаимодействие с FcRn и стабильность Fc не затрагиваются [Mausser E. et al., 2023]. 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 10). Мыши (4 из 5), получавшие D9.2-mG2a, были защищены от летального исхода, тогда как все животные, получавшие D9.2-mG2a LALA-PG, пали к 6 дню. Следовательно, взаимодействие Fc-FcγR играет решающую роль в защите животных от летальной инфекции, вызванной ВГА, для антитела D9.2.

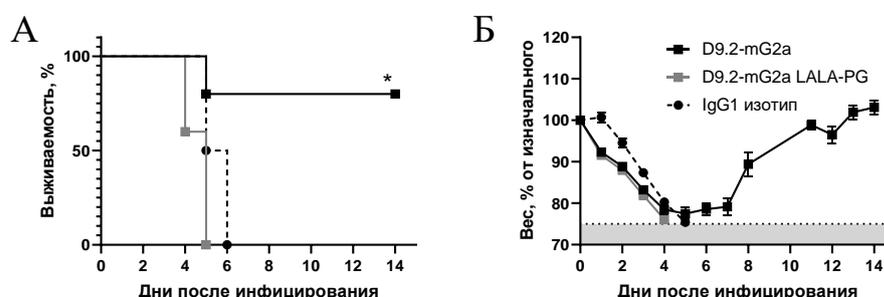


Рисунок 10 – Изучение механизма противовирусного действия D9.2-Fc. А и Б – кривые выживаемости и изменения массы тела мышей после введения D9.2-mG2a или D9.2-mG2a LALA-PG и последующего заражения A/Aichi/2/68 (H3N2).

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

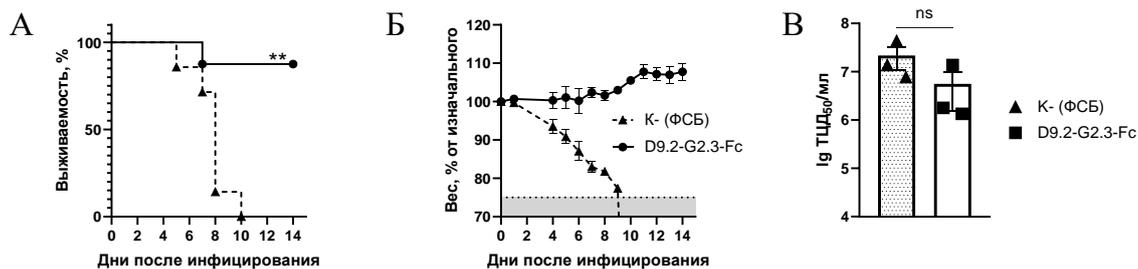
На основании результатов, полученных на предыдущих этапах работы, было принято решение получить слитые с Fc-фрагментом гетеродимеры антител G2.3 и D9.2, обладающих различной специфичностью к ВГА, для получения мАт с расширенным спектром реактивности, включающим ВГА обеих филогенетических групп. С этой целью были получены генетические конструкции с различной ориентацией молекул VHH относительно Fc-фрагмента: G2.3-D9.2-Fc

и D9.2-G2.3-Fc. Полученные плазмиды использовали для транзientной трансфекции клеток линии CHO-S и последующей очистки мАг методом аффинной хроматографии.

Спектр связывающей и нейтрализующей активности для VNH-VNH-Fc определяли в непрямом ИФА и РВН, соответственно. Согласно результатам ИФА, значения EC_{50} , определенные для каждого из VNH-VNH-Fc, находились в наномолярном диапазоне. Полученные биспецифические антитела повторяли спектр активности, характерный для исходных sdAb G2.3 и D9.2. Полученные в РВН данные подтверждали результаты ИФА. Нейтрализующая активность VNH-VNH-Fc, наравне со связывающей активностью, в большей степени соответствовала спектру отдельных VNH, входящих в их состав, за некоторыми исключениями. Так, 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 вирусов H2N3 и H5N2: значения IC_{50} увеличивались в 895 и 33,5 раз, соответственно. Учитывая более выраженную противовирусную активность D9.2-G2.3-Fc его выбрали для дальнейшего исследования. Далее оценивали функциональность Fc-фрагмента в составе VNH-VNH-Fc и его способность взаимодействовать с FcγR. Согласно полученным данным, D9.2-G2.3-Fc эффективно задействовало эффекторные функции Fc-фрагмента в ответ на связывание с НА обеих филогенетических групп (H1 и H3).

Изучение профилактической эффективности D9.2-G2.3-Fc *in vivo* проводили с использованием летальной модели инфекции, вызванной ВГА, относящимся к различным филогенетическим группам (H1N1 или H3N2), у мышей (Рисунок 11). Для этого животным в.б. вводили антитело в дозе 10 мг/кг за 24 часа до заражения ВГА. D9.2-G2.3-Fc показало 100% и 87,5% эффективность против инфекции, вызванной вирусом H3N2 и H1N1, соответственно. Также оценивали влияние антитела на репликацию ВГА в легких мышей. 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.

A/California/07/2009 (H1N1)



A/Aichi/2/1968 (H3N2)

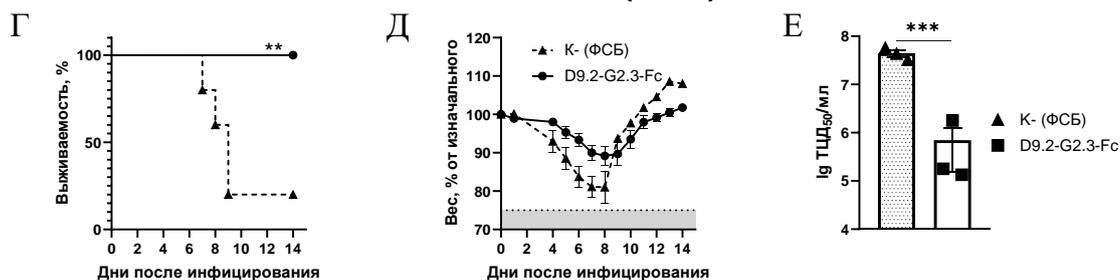


Рисунок 11 – Динамика выживаемости (А, Г) и изменения массы тела мышей (Б, Д) после профилактического введения D9.2-G2.3-Fc. В и Е – инфекционный титр ВГА в легких мышей.

Эффективность терапевтического применения антитела D9.2-G2.3-Fc *in vivo* оценивали путем в.б. введения 40 мг/кг антитела спустя 24 часа после заражения ВГА (Рисунок 12). 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. Таким образом, было показано, что D9.2-G2.3-Fc обеспечивает защиту животных от летальной инфекции, вызванной ВГА подтипов H1 и H3.

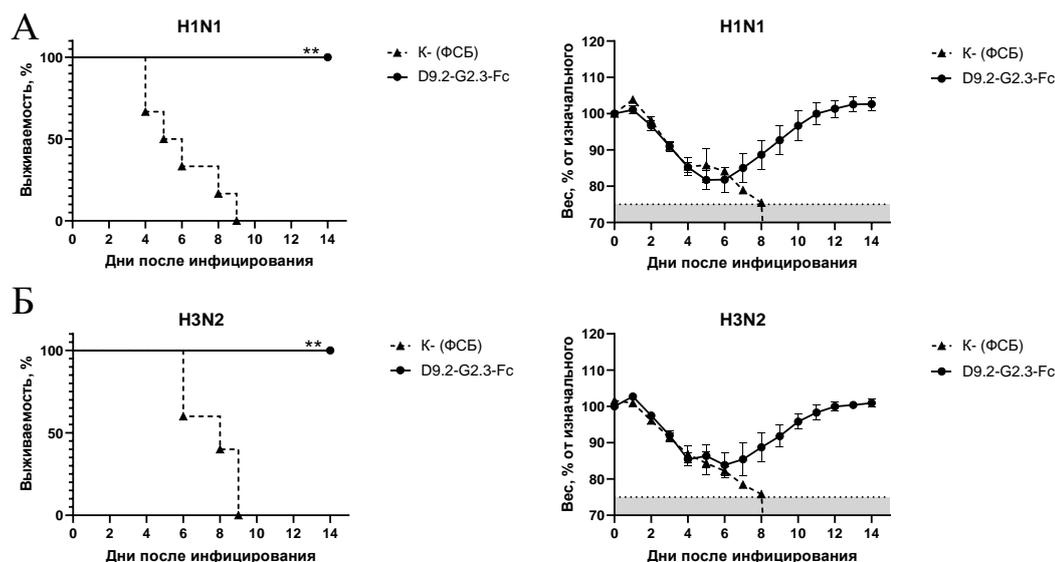


Рисунок 12 – Динамика выживаемости и изменения массы тела мышей после введения D9.2-G2.3-Fc спустя 24 часа после заражения A/California/07/2009(H1N1) (А) или A/Aichi/2/1968(H3N2) (Б).

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

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. В рамках последующей работы был поведен полный спектр доклинических исследований безопасности препарата, включающий: исследование острой и хронической токсичности, местнораздражающего действия, репродуктивной токсичности и тканевой перекрестной реактивности. Совокупные результаты токсикологических исследований препарата позволили заключить, что препарат не оказывает отрицательного действия на организм животных в дозах, предполагаемых для клинического использования.

Фармакокинетику препарата ГамИнфлюМаб изучали при однократном внутривенном введении лабораторным мышам линии BALB/c в дозе 5 мг/кг. 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 (AUC0-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.

Клиническое исследование безопасности, переносимости и фармакокинетики кандидатного лекарственного препарата ГамИнфлюМаб

В рамках продолжения работы 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 (Рисунок 13).

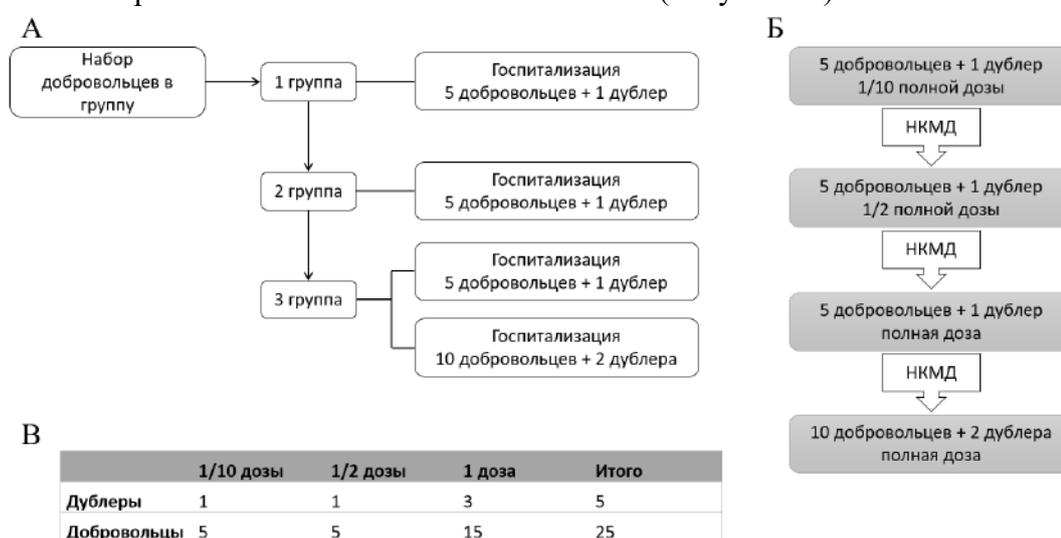


Рисунок 13 – Схема клинического исследования: А – формирование групп; Б – график проведения НКМД (независимого комитета по мониторингу данных); В – распределение добровольцев на группы.

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. 1 НЯ послужило причиной отмены препарата. Ни одно из НЯ по критерию серьезности не было отнесено к категории СНЯ. Серьезных непредвиденных реакций не было. 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 кандидатного препарата ГамИнфлюМаб проводили с использованием коммерческой тест-системы Human Anti-Human Antibody ELISA Kit (Epitope Diagnostics, США). В результате проведения анализа концентраций ADA в сыворотках крови добровольцев не было показано статистически достоверного увеличения содержания указанных антител, следовательно препарат не является иммуногенным.

Согласно полученным данным в процессе изучения фармакокинетики препарата ГамИнфлюМаб (Рисунок 14), период полувыведения ($t_{1/2}$) кандидатного препарата составляет около 320 часов, максимальная концентрация (C_{max}) препарата при введении терапевтической дозы 12 мг/кг в среднем составила 536,4 мкг/мл, а время достижения C_{max} (T_{max}) приходилось на временную точку 1 час. У отдельных добровольцев детектировали наличие препарата в сыворотке крови до последней точки наблюдения – 1440 часов (60 дней).

Изменение концентрации в сыворотке в зависимости от дозы вводимого препарата

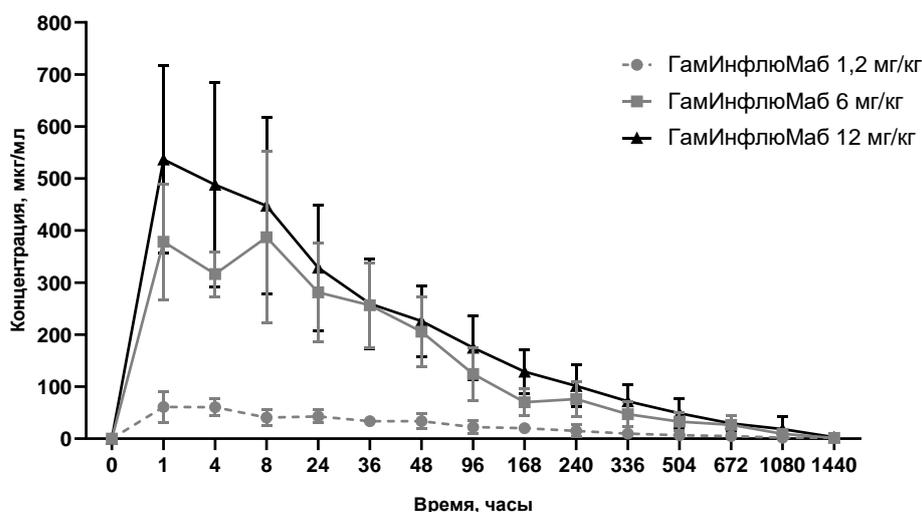


Рисунок 14 - Изменение концентрации антитела D9.2-G2.3-Fc в сыворотке крови добровольцев в зависимости от дозы вводимого препарата ГамИнфлюМаб.

Заключение. Результаты проведенных доклинического и клинического исследований позволяют сделать вывод об эффективности, безопасности и переносимости кандидатного препарата ГамИнфлюМаб 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.

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 H2 и H5, и в 1120 раз для D9.2-Fc против HA подтипа H3 (штамм A/Aichi/2/68);
5. Исследован механизм противовирусного действия отобранных антител. Показано, что антитело G2.3-Fc нейтрализует ВГА путем блокирования слияния вирусной и эндосомальной мембран. Антитело D9.2-Fc реализует свою активность за счет активации эффекторных клеток при Fc-FcγR-взаимодействии;
6. На основе однодоменных антител G2.3 и D9.2 создано биспецифическое антитело D9.2-G2.3-Fc, обладающее активностью в отношении HA филогенетических групп 1 и 2. Показано, что данное антитело обеспечивает эффективную защиту лабораторных животных в профилактическом и терапевтическом режимах введения при заражении летальными дозами ВГА подтипов H1N1 и H3N2;
7. В доклинических и клинических исследованиях I фазы установлен благоприятный профиль безопасности и переносимости кандидатного лекарственного препарата на основе биспецифического антитела D9.2-G2.3-Fc.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Воронина, Д.В.** Получение нейтрализующих наноантител к стеблевому домену гемагглютинаина вируса гриппа типа А / **Д. В. Воронина, Д. В. Щебляков, И. Б. Есмагамбетов, А. А. Деркаев, О. Попова, Д. Н. Щербинин** // Acta Naturae. – 2021. – Т. 13, № 4. – С. 33–41.
2. **Воронина, Д.В.** Наноантитело широкого спектра к гемагглютинину вируса гриппа А подтипа H3 / **Д.В. Щебляков, Д.В. Воронина, И.А. Фаворская, И.Б. Есмагамбетов, И.А. Алексеева, А.И. Коробкова, Е.И. Рябова, А.А. Деркаев, В.Ю. Кан, А.Ш. Джаруллаева, А.И. Тухватулин, А.С. Банделюк, М.М. Шмаров, Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург** // Acta Naturae. – 2024. – Т. 16, № 1. – С. 101–110.
3. **Voronina, D.V.** Cross-Reactive Fc-Fused Single-Domain Antibodies to Hemagglutinin Stem Region Protect Mice from Group 1 Influenza a Virus Infection / **D.V. Voronina, D.V. Shcheblyakov, I.A. Favorskaya, I.B. Esmagambetov, A.S. Dzharullaeva, A.I. Tikhvatulin, O.V. Zubkova, O. Popova, V.Y. Kan, A.S. Bandelyuk, M.M. Shmarov, D.Y. Logunov, B.S. Naroditsky, A.L. Gintsburg** // Viruses. – 2022. – Vol. 14. – P. 2485.
4. Кан, В.Ю. Биспецифичные антитела для терапии гриппозной инфекции / В.Ю. Кан, **Д.В. Воронина, Д.В. Щебляков** // IV Международный форум Дни Вирусологии 2023 : Сборник тезисов, Санкт-Петербург, 02-04 октября 2023 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургская общественная организация «Человек и его здоровье», 2023. – С. 33-34.
5. **Voronina, D.V.** Single-domain antibodies (sdAbs) against Influenza A viruses (IAV) with potential broadly neutralizing activity / **D.V. Voronina, D.V. Shcheblyakov** // 45th FEBS Congress, Molecules of Life: Towards New Horizons ('FEBS 2021'), Ljubljana, Slovenia, July 3–8, 2021. – Hoboken, New Jersey, U.S.: Wiley (publisher), 2021. – С. 06.1-04.

Патенты:

6. Патент РФ на изобретение RU 2777073 С1 «Однодоменное антитело для нейтрализации вирусов и его модификации, и способ их применения для экстренной профилактики заболеваний, вызываемых вирусом гриппа А»: заявл. 08.11.2021 : опубл. 01.08.2022 / **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.;**

заявитель: ФГБУ «НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. почётного акад. Н. Ф. Гамалеи»
Минздрава России. – 43 с.