

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО  
АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ»  
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

**ЩЕБЛЯКОВ Дмитрий Викторович**

**Универсальная технологическая платформа для  
создания средств терапии и диагностики инфекционных  
заболеваний на основе однодоменных антител**

**3.2.7 – Иммунология (биологические науки)**

**1.5.6. – Биотехнология (биологические науки)**

**ДИССЕРТАЦИЯ на соискание ученой степени**

**доктора биологических наук**

**Научный консультант:**

**доктор биологических наук, академик РАН**

**Д. Ю. Логунов**

## Оглавление

ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ.....	8
ВВЕДЕНИЕ.....	11
Актуальность проблемы.....	11
Цель и задачи исследования.....	15
Научная и практическая значимость.....	16
Внедрение полученных результатов в практику.....	21
Методология и методы исследования.....	22
Достоверность результатов.....	23
Положения, выносимые на защиту:.....	23
Апробация работы.....	24
Соответствие диссертации паспорту научной специальности.....	25
Публикации.....	25
Объем и структура диссертации.....	25
Личный вклад автора.....	26
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	28
1.1 Моноклональные антитела их виды и модификации.....	28
1.2 Особенности молекулярной структуры однодоменных антител.....	32
1.3 Технология получения однодоменных антител.....	34
1.4 Применение однодоменных антител в диагностике.....	47
1.5 Применение однодоменных антител в терапии.....	54
1.6 Вирус Эбола. Выбор мишени для нейтрализующих однодоменных антител. .....	63
1.7 Коронавирус SARS-Cov-2. Выбор мишени для разработки средства терапии заболевания COVID-19.....	69
1.8 Ботулизм. Роль ботулотоксина А (BoNT/A) <i>C.botulinum</i> в развитии ботулизма.....	78
1.9 <i>C.difficile</i> , роль токсина В (TcdB) в развитии патологий ассоциированных с <i>C. difficile</i> (антибиотикоопосредованные диареи (АОД) и псевдомембранозный колит (ПМК)).....	84

1.10 <i>Mycoplasma hominis</i> и ее роль в патогенезе урогенитальной инфекции человека.....	90
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	93
2.1. Материалы, использованные в диссертационной работе .....	93
2.1.1 Оборудование .....	93
2.1.2. Микроорганизмы и рекомбинантные вирусные векторы.....	95
2.1.3. Линии клеток млекопитающих, использованные в диссертационной работе.....	97
2.1.4 Животные .....	98
2.1.5. Плазмидные векторы. ....	98
2.1.6. Антитела.....	100
2.1.7. Рекомбинантные белки .....	101
2.1.8. Различные реактивы для молекулярно-биологических процедур .....	101
2.1.9. Среды для культивирования бактерий.....	101
2.1.10. Среды для культивирования эукариотических клеток и реактивы для трансфекции.....	102
2.1.11. Наборы.....	103
2.1.12. Синтез нуклеотидных последовательностей, секвенирование .....	104
2.1.13. Реактивы, используемые в иммунобиологических методах .....	104
2.2. МЕТОДЫ .....	105
2.2.1 Получение антигенов для иммунизации.....	105
2.2.1.1 Культивирование <i>M.hominis</i> и выделение фракции ЛАМБ.....	105
2.2.1.2 Получение нетоксичной субъединицы CROPS токсина В <i>C.difficile</i> . ...	106
2.2.1.3 Выделение ботулотоксина А <i>C.botulinum</i> .....	107
2.2.1.4. Получение рекомбинантного аденовируса 5 серотипа, несущего ген белка GP вируса Эбола (rAd5-GP) и рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного белком GP вируса Эбола (rVSV-GP).....	108
2.2.1.5 Получение рекомбинантного белка рецептор-связывающего домена (RBD) коронавируса SARS-Cov-2 .....	109
2.2.2 Получение иммунных библиотек однодоменных антител .....	111

2.2.2.1	Иммунизация, отбор крови и выделение лимфоцитов.....	111
2.2.2.2	Выделение РНК из лимфоцитов и синтез кДНК. ....	113
2.2.2.3	ПЦР-амплификация последовательностей VNN .....	114
2.2.2.4	Клонирование VNN последовательностей в фагмидный вектор pHEN1 и получение библиотеки клонов-трансформантов .....	115
2.2.2.5	Получение библиотеки бактериофагов.....	116
2.2.3	Проведение селекции бактериофагов, несущих на поверхности специфичные VNN (биопаннинг).....	117
2.2.4	Анализ специфичности клонов однодоменных антител методами Фаг- ИФА и VNN-ИФА .....	119
2.2.5	Получения белковых препаратов однодоменных антител .....	121
2.2.6	Определение аффинности клонов однодоменных антител методом плазмонного резонанса и оптической интерференции .....	122
2.2.7	Оценка нейтрализующей активности однодоменных антител в отношении токсина В <i>C.difficile</i> .....	123
2.2.8	Получение однодоменных антител в форме димеров и слитых с Fc- фрагментами иммуноглобулина G. ....	124
2.2.9	Оценка протективной активности однодоменных антител на модели летальной интоксикации ботулотоксином <i>in vivo</i> . ....	125
2.2.10	Модель вагинальной инфекции <i>M. hominis</i> . ....	126
2.2.11.	Оценка нейтрализующей активности однодоменных антител, специфичных белку GP вируса Эбола методом определения титра антител, вызывающего 50%-е снижение количества бляшек на инфицированном вирусом монослое культуры клеток.....	127
2.2.12	Изучение фармакокинетики однодоменных антител.....	127
2.2.13	Анализ нейтрализующей активности однодоменных антител в отношении коронавируса SARS-CoV-2 методом микронеutralизации.....	128
2.2.14	Исследование протективности однодоменных антител на модели летальной инфекции SARS-Cov-2 на мышах. ....	129
2.2.15.	Доклинические исследования безопасности.....	130

2.2.16 Клинические исследования .....	131
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	132
3.1 Универсальная технологическая платформа, позволяющая разрабатывать препараты для терапии и диагностики инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител .....	135
3.2. Получение молекул на основе неканонических однодоменных антител и их модификаций для экстренной профилактики и терапии инфекционных заболеваний.....	133
3.2.1. Получение однодоменных антител обладающих нейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола.....	136
3.2.1.1 Получение панели рекомбинантных антител, специфичныхк EBOV GP .....	138
3.2.1.2 Оценка аффинности и нейтрализующей активности отборанных клонов антител.....	144
3.2.1.3 Получение модифицированных моноклональных антител, содержащих Fc-фрагмент IgG1 человека и изучение их вируснейтрализующих свойств ....	146
3.2.1.4 Оценка протективной активности антител на модели летальной инфекции мышей rVSV-GP.....	153
3.2.1.5 Оценка протективной активности антител на модели летальной инфекции макак-резусов вирусом лихорадки Эбола .....	156
3.2.1.6 Доклинические исследования безопасности и фармакокинетики препарата ГамЭзумаб.....	159
3.2.1.7 Клинические исследования безопасности и фармакокинетики препарата ГамЭзумаб на здоровых добровольцах.....	169
3.2.2. Разработка препарата на основе однодоменных антител для экстренной профилактики и этиотропной терапии COVID-19 .....	174
3.2.2.1 Проведение иммунизации и отбор клонов однодоменных антител, специфических рецептор-связывающему домену (RBD) S-гликопротеина SARS-Cov-2.....	176

3.2.2.2 Анализ вируснейтрализующей активности однодоменных антител и изучение ее механизма.....	181
3.2.2.3 Получение молекул VHH, содержащих различные модификации и оценка их противовирусной активности <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i> . ....	186
3.2.2.4 Разработка препарата ГамКовиМаб - антитела моноклональные для экстренной профилактики и ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, раствор для инфузий .....	189
3.2.2.5. Открытое исследование безопасности и фармакокинетики лекарственного препарата для ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы .....	202
3.2.3. Разработка препарата на основе модифицированных однодоменных антител для терапии интоксикации, вызванной ботулотоксином. ....	216
3.2.3.1. Выделение антигенного материала проведение иммунизации альпак	216
3.2.3.2 Получение библиотеки однодоменных антител специфичных ботулотоксину и предварительная оценка нейтрализующей активности.....	218
3.2.3.3. Отбор индивидуальных клонов VHH и оценка их нейтрализующей активности.....	220
3.2.3.4. Модификация клонов однодоменных антител для усиления их протективной активности.....	221
3.2.4 Получение однодоменных антител и их модификаций, специфичных к токсину В <i>Clostridioides difficile</i> и обладающих нейтрализующей активностью .....	226
3.2.4.1. Проведение иммунизации животных семейства Camelidae нетоксичным производным токсина В <i>C. difficile</i> .....	227
3.2.4.2. Проведение селекции и отбор клонов VHH, специфически связывающихся с CRiPs доменом токсина В <i>C. difficile</i> .....	230
3.2.4.3 Изучение нейтрализующей активности наиболее аффинных однодоменных антител в отношении токсина В <i>C. difficile</i> .....	237

3.3 Получение молекул на основе неканонических однодоменных антител и их модификаций для обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов .....	240
3.3.1.1 Получение и характеристика неканонических однодоменных антител для детекции <i>M.hominis</i> различными методами .....	241
3.3.1.2 Идентификация мишени для антител aMh06 .....	251
3.3.1.3 Изучение диагностического потенциала препаратов на основе aMh06 для детекции <i>M. hominis</i> .....	254
3.3.1.4. Генетическая пассивная иммунизация для защиты от урогенитальной инфекции, вызванной <i>M. hominis</i> .....	261
3.3.2. Разработка биосенсоров на основе неканонических однодоменных антител для детекции токсина <i>Clostridioides difficile</i> методом плазмонного резонанса .....	271
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	285
Заключение .....	321
Выводы .....	319
Список литературы .....	321

## **ПРИНЯТЫЕ СОКРАЩЕНИЯ**

BCA (BSA) – бычий сывороточный альбумин

ИФА (ELISA)– иммуноферментный анализ

кДНК (сDNA)– кодирующая ДНК

КОЕ (CFU) – колониеобразующая единица

ЛАМП (LAMPs) – липид-ассоциированные мембранные белки

мРНК (mRNA) – матричная РНК

ПАМП (PAMPs) – патоген-ассоциированные молекулярные паттерны

ПЦР (PCR) – полимеразная цепная реакция

тРНК (tRNA) – транспортная РНК

ЭДТА (EDTA) – этилендиаминтетрауксусная кислота

A260 (A280 и т.п.) – поглощение при длине волны 260 нм (280 нм)

BoNT – ботулинистический нейротоксин

BSA – бычий сывороточный альбумин

CDR – гипервариабельная область иммуноглобулина

CH – константный домен иммуноглобулина

CMV промотор – ранний промотор цитомегаловируса человека

DMEM - среда Игла, модифицированная по способу Дульбекко

DPBS – фосфатносолевой буфер Дульбекко

EDTA (ЭДТА) – этилендиаминтетрауксусная кислота

Fab – антигенсвязывающий фрагмент антитела

FcR – рецептор, связывающийся с Fc-фрагментом

FcRn – неонатальный FcR

hcIgG–антитела, состоящие из тяжелых цепей иммуноглобулинов класса G

IPTG - изопропилтиогалактопиранозид

LAMPs (ЛАМП) - липид-ассоциированные белки

MALDI – Матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация

MBP – мальтоза-связывающий белок

MOI – множественность инфекционных единиц

OptiMEM – оптимизированная среда Игла  
PBS – фосфатносолевой буфер  
PEG - полиэтиленгликоль  
pIII – белок III головки бактериофага M13  
rAd – рекомбинантный репликативнодефектный аденовирусный вектор  
RPMI – среда “Roswell Park Memorial Institute medium”  
scFv - объединенные в одну полипептидную цепь VH- и VL-участки Ig  
SDS – додецилсульфат натрия  
SOC – супер-оптимальная среда с катаболитным репрессором  
SPRi – поверхностный плазмонный резонанс  
TBS – буфер на основе трис(гидроксиметил)аминометана  
TcdA – токсин А *Clostridioides difficile*  
TcdB – токсин Б *Clostridioides difficile*  
TMB - тетраметилбензидин  
TPBS – фосфатносолевой буфер, содержащий детергент твин-20  
TX-114 – тритон X-114  
VH – переменный домен тяжелой цепи канонического иммуноглобулина  
VL - переменный домен легкой цепи канонического иммуноглобулина  
VHH – однодоменные антитела, наноантитела  
GP – поверхностный гликопротеин вируса Эбола;  
rVSV – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита  
БВБЭ – болезнь, вызванная вирусом Эбола  
БОЕ – бляшкообразующая единица  
rVSV-GP – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, несущий ген гликопротеина вируса Эбола вида Заир и псевдотипированный гликопротеином вируса Эбола вида Заир  
RBD – рецептор-связывающий домен поверхностного гликопротеина коронавируса SARS-Cov-2  
АЗЦТ – антитело-зависимая цитотоксичность  
КЗЦТ – комплемент-зависимая цитотоксичность

оцРНК – одноцепочечная РНК

Cl\_obs метаболический клиренс

Clast\_obs/Cmax – доля вещества в последней точке наблюдения относительно максимальной концентрации

Cmax – максимальная концентрация

Fc – константный регион иммуноглобулинов (fragment constant)

GMK-АН-1(Д) - постоянная культура клеток почки африканской зеленой мартышки

GP – гликопротеин

IgG/E/M/A/Y/NAR – иммуноглобулин соответствующего класса (immunoglobulin)

Lambda\_z - константа реакции элиминации

LMR – малые молекулярные веса (low molecular weight)

m– статистическая стандартная ошибка выборочного среднего арифметического

MLD – муцинподобный домен (mucine like domain)

MRT 0-inf\_obs - среднее время пребывания (удерживания)

Mw –молекулярный вес (molecular weight)

SDS – додецил сульфат натрия (sodium dodecyl sulfate)

siRNA – малая интерферирующая рибонуклеиновая кислота (small interfering RNA)

t1/2 – период полувыведения

TMB – тетраметилбензидин (tetra methyl benzidine)

V – объем (volume)

VSV – вирус везикулярного стоматита (vesicular stomatite virus)

Vss\_obs - кажущийся объём распределения в равновесном состоянии.

Vz\_obs - объем распределения

Z-average – средний диаметр

♂ – самцы

♀ – самки

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность проблемы**

Моноклональные антитела – иммуноглобулины, продуцируемые из единичной В клетки и обладающие способностью связываться со специфической мишенью (антигеном). Открытие структуры и функций иммуноглобулинов определили развитие целого ряда направлений исследований, посвященных разработке средств диагностики и терапии на основе иммуноглобулинов разных классов и их фрагментов.

Одним из ключевых этапов в использовании моноклональных антител в клинической практике стала разработка гибридомной технологии в 1975г. [Kohler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975;256:495–7.], которая позволила получать очищенные препараты моноклональных антител в больших количествах, значительно расширив объем фундаментальных исследований и потенциал для их клинического использования. Десять лет спустя первое, хорошо охарактеризованное моноклональное антитело, ОКТ3 [Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs*. 2015;7:9–14.], было одобрено для лечения острого отторжения органов у людей. Различные научно-технические достижения в областях молекулярной биологии, генной инженерии и биотехнологии также значительно ускорили разработку и внедрение моноклональных антител в практику. И на сегодняшний день не менее 570 терапевтических моноклональных антител прошли клинические испытания, из которых более 80 препаратов получили разрешение Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) на использование и в настоящее время применяются [The Antibody Society. In: Approved antibodies. Jun 27, 2019 <https://www.antibodysociety.org/> Accessed 15 Jul 2019.]. Примечательно, что большая часть из представленных препаратов применяется для иммунотерапии рака, аутоиммунных заболеваний (псориаз, болезнь Крона) и/или в качестве противовоспалительных средств (атеросклероз, сепсис и др) [Kaplon H, Reichert

JM. Antibodies to watch in 2019. MAbs. 2019;11:219–38.]. При этом лишь незначительная часть исследований направлена на разработку средств терапии вирусных и бактериальных инфекций на основе моноклональных антител. Так, на сегодняшний день разрешены к использованию препараты для терапии инфекции вызванной респираторным синцитиальным вирусом [Detalle L, Stohr T, Palomo C, Piedra PA, et al. 2016], вирусом иммунодефицита человека [Koch K, 2017], а также терапии сибирской язвы [Mahtab Moayeri, 2015]. Очевидно, что в условиях растущего числа сезонных инфекционных заболеваний, вновь возникающих вирусных инфекций, способных вызывать пандемии и изменчивость возбудителей, а также потенциальной возможности использования инфекционного агента в качестве биологического оружия, изучение и использование технологической платформы, позволяющей разрабатывать средства диагностики и терапии инфекций на основе моноклональных антител является актуальной задачей.

Канонические антитела, состоящие из тяжелых и легких цепей, несмотря на их широкое распространение, имеют очевидные для практического использования недостатки, связанные с их структурной организацией, ограничивающих и/или существенно усложняющих процесс их отбора. Кроме того, канонические антитела, полученные при помощи гибридомной технологии, даже после гуманизации могут вызывать дозо-зависимую иммунотоксичность и другие нежелательные явления, а также имеют лимитированную эффективность проникновения в различные ткани [Descotes, 2009; Hansel и др., 2010; Shah, Betts, 2013; Tabrizi, Bornstein, Suria, 2010]. Эти ограничения привели к необходимости развития нового направления - получению различных антигенсвязывающих фрагментов антител, главным образом Fab (~57кДа) и scFv (~27кДа). Эти типы препаратов на основе моноклональных антител часто оказываются малорастворимыми, склонными к агрегации, с чем связаны сложности при их продукции в препаративных количествах [Holliger, Hudson, 2005].

В начале 1990 годов у представителей семейства Camelidae наряду с иммуноглобулинами канонической структуры были открыты неканонические антитела, которые состоят из димеров только тяжелых цепей иммуноглобулинов класса G [Hamers-Casterman и др., 1993]. Антигенсвязывающий домен этих антител сформирован переменными участками только тяжелой цепи. Вскоре аналогичные антитела были также обнаружены у акул, скатов и некоторых других хрящевых рыб [Greenberg и др., 1995]. Однодоменная природа антигенсвязывающих фрагментов таких иммуноглобулинов позволила свести процедуру их получения к селекции только функциональных фрагментов тяжелых цепей, так называемых однодоменных антител (V<sub>HH</sub>). Дальнейшие исследования показали, что подобные структуры, сформированные в ходе эволюционного процесса и прошедшие аффинное созревание *in vivo*, обладают высокой стабильностью, растворимостью и другими особенными физико-химическими и термодинамическими характеристиками [Dumoulin и др., 2002; Linden R.H. и др., 1999]. Более того, гиперпеременные домены (CDR – complementarity determining regions), в среднем содержат большее число аминокислотных остатков (по сравнению с каноническими антителами), что увеличивает площадь контакта с антигеном, компенсируя отсутствие легких цепей без потери в аффинности [Muyldermans и др., 1994]. Кроме того, протяженная форма CDR3 петли за счет увеличения числа аминокислот обуславливает способность V<sub>HH</sub> преимущественно связываться с эпитопами в структуре антигена, имеющего вогнутую структуру или так называемые «впадины». Вследствие отсутствия иммунного давления со стороны гуморального иммунитета, сформированного существенно большими по размеру каноническими антителами, как правило в таких труднодоступных сайтах находятся консервативные эпитопы большого числа вирусных антигенов, представляющих интерес с точки зрения практической разработки средств терапии вирусных инфекций широкого спектра действия.

Подтверждением актуальности использования однодоменных антител в практической медицине служит большое число исследований, направленных на разработку средств диагностики и терапии различных заболеваний, начавшихся в последнее десятилетие во всем мире, ряд из которых в настоящее время проходят клинические исследования [Boulenouar H. et al. 2020]. В частности, в 2017 году Xiang Ren с соавторами разработали препарат на основе наноантител, специфически связывающихся с аполипопротеином E (ApoE) и имеющим перспективы использования в диагностике болезни Альцгеймера [Ren et al., 2017]. В других исследованиях были исследованы препараты на основе VHH в фазах I и II клинических испытаний в качестве терапевтических средств. В настоящее время проводится крупное исследование двух бивалентных антител, ALX-0081 и ALX-0061. ALX-0081 связывается с фактором Фон Виллебранда в качестве антитромботического агента для пациентов с острым коронарным синдромом и коронарным вмешательством. ALX-0061 блокирует рецептор интерлейкина-6 и исследуется в качестве противовоспалительного средства для пациентов с ревматоидным артритом. Кроме того, проводится ряд исследований, направленных на изучение возможности использования однодоменных антител при создании средств терапии опухолевых заболеваний и диагностики болезни Паркинсона [Roberts et al., 2015]. В исследованиях противоопухолевой активности VHH авторами были получены ряд молекул специфических различным мишеням, таким как VEGF, HER-2, и EGFR [Alibakhshi et al., 2017, Van Audenhove and Gettemans, 2016, Guardiola et al., 2018], в которых показана возможность применения антител для направленного таргетирования опухолевых клеток.

Однако, несмотря на активные исследования в области разработки и применения VHH в качестве средств терапии, изучение возможности использования однодоменных антител и/или молекул на их основе для борьбы с инфекционными заболеваниями, в настоящее время ограничены. В частности, в клинических исследованиях 2 фазы было показано, что препарат ALX-071, представляющий собой в качестве активной действующего вещества молекулу

тримера VHH, специфически связывающегося с белком слияния респираторно-синцитиального вируса, показал высокую нейтрализующую активность *in vitro* по сравнению с моноклональным каноническим антителом павилизумаб, используемым для предотвращения инфекции RSV [Detalle et al. др., 2016, Stohr и др]. В связи с этим проведение комплексных исследований, направленных на разработку средств борьбы с инфекционными заболеваниями на основе однодоменных антител является важной и актуальной задачей, а структурные особенности строения и физико-химические свойства однодоменных антител делают эти исследования обоснованными как с экономической точки зрения, так и для решения задач разработки средств широкого спектра нейтрализующей активности.

### **Цель и задачи исследования**

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

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

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

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

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

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

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

#### **Научная и практическая значимость**

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

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

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

- препараты «ГамЭмаб» и «ГамЭзумаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии лихорадки Эбола, созданные на основе полученных моноклональных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола. В настоящее время завершены клинические исследования безопасности препаратов на здоровых добровольцах. Оба препарата признаны безопасными.

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

- Завершены доклинические исследования эффективности и безопасности препарата для терапии ботулизма на основе оригинальных однодоменных антител, обладающих высокой нейтрализующей активностью в отношении ботулинического токсина А *C.botulinum*. Методом молекулярного докинга и молекулярной динамики предложена возможная мишень для связывания нейтрализующих антител – ганглиозид связывающий сайт, участвующий в рецептор опосредованном транспорте токсина в клетки. Использование подходов, направленных на модификацию полученных антител (получение димеров однодоменных антител и молекул, слитых с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека), позволило значительно повысить терапевтический потенциал отобранных антител (терапевтическая доза менее 1 мкг/мышь). В

2024г начались клинические исследования безопасности и эффективности с участием добровольцев.

Впервые получены однодоменные антитела, связывающиеся с поверхностным антигеном *M. hominis*, и идентифицирована специфическая мишень – субстрат-связывающий белок ABC-транспортера *M. hominis*. Впервые показано, что молекулы на основе специфических VHH могут быть использованы для детекции *M. hominis*, в том числе методом проточной флуориметрии. Впервые показано, что модификация VHH, содержащая Fc-фрагмент иммуноглобулина мыши типа IgG2a, приводит к транспорту химерных молекул антител на поверхность слизистой оболочки уrogenитального тракта. Кроме того, введение аденовирусного вектора, несущего нет однодоменного антитела, обеспечивает защитный эффект на модели экспериментальной инфекции *M.hominis* у мышей.

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

- Получены оригинальные однодоменные антитела, связывающиеся с CROPS доменом токсина TcdB *C.difficile*. Впервые показана возможность их использования для разработки биосенсоров для детекции токсина *Clostridioides difficile* методом плазмонного резонанса. В сравнительном исследовании показана более высокая стабильность биосенсоров на основе однодоменных антител по сравнению с биосенсором на основе канонических антител за счет более высокой устойчивости к регенерации. Разработаны и утверждены ТУ, эскизный и технические проекты, а также проведены испытания тест-системы на основе разработанных биосенсоров. Впервые было показано, что полученные антитела, а также мультимерные конструкции на их основе обладают прямым противотоксическим действием в эксперименте *in vitro*.

Создание платформы основано на ряде оригинальных находок. В том числе

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

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

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

При разработке технологической платформы однодоменных антител и изучении возможности ее использования для создания средств диагностики и терапии инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител и молекул на их основе были получены 9 патентов на изобретения:

- №2768044 «Экспрессионный вектор на основе аденоассоциированного вируса, обладающий защитными свойствами против интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А» Есмагамбетов И.Б., Рябова Е. И., Деркаев А.А., Довгий М.А., Бырихина Д. В., Носков А. Н., Чемоданова И. П., Государев А. И., Щепляков Д. В., Народицкий Б. С., Логунов Д. Ю., Гинцбург А. Л.;

- №2644202 «Однодоменные антитела к белку GP вируса Эбола для иммунотерапии лихорадки Эбола» Щепляков Дмитрий Викторович (RU), Егорова Дарья А., Логунов Д. Ю., Шмаров М. М., Белый Ю. Ф., Зубкова О. В., Фаворская И. А., Щербинин Д. Н., Должикова И. В., Тухватулин А. И., Сыромятникова С. И., Пантюхов В. Б., Шатохина И. В., Воронина О. Л., Борисевич С. В., Народицкий Б. С., Гинцбург А. Л.;

- №2562158 «Рекомбинантная псевдоаденовирусная частица, продуцирующая модифицированные наноантитела, узнающие микоплазму *M.hominis*, фармацевтическая композиция на ее основе и способ ее использования для терапии микоплазмозов» Бурмистрова Д. А., Щепляков Д.

В., Раковская И. В., Тиллиб С. В., Шмаров М. М., Логунов Д. Ю., Народицкий Б. С., Гинцбург А. Л.;

- №2777073 «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.

- №2766348 «Однодоменное антитело и его модификации, специфически связывающиеся с ботулиническим нейротоксином типа А, и способ их применения для терапии или экстренной профилактики интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А» Есмагамбетов И. Б., Щебляков Д. В., Деркаев А. А., Годакова С. А., Носков А. Н., Виноградова И. Д., Рябова Е. И., Алексеева И. А., Фаворская И. А., Логунов Д. Ю., Народицкий Б. С., Гинцбург А. Л.;

- №2777404 «Экспрессионный вектор на основе аденоассоциированного вируса и способ его применения для экстренной профилактики и профилактики заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV-2 (варианты)» Гинцбург А.Л., Народицкий Б. С., Логунов Д. Ю., Щебляков Д. В., Должикова И. В., Есмагамбетов И. Б., Фаворская И. А., Деркаев А.А., Алексеева И.А., Рябова Е. И., Прокофьев В. В., Зорков И. Д., Довгий М. А., Бырихина Д. В., Государев А.И.;

- №2769223 «Средство и способ терапии и экстренной профилактики заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV-2 на основе рекомбинантного антитела и гуманизированного моноклонального антитела» Щебляков Д.В., Есмагамбетов И.Б., Фаворская И.А., Должикова И.В., Лебедин Ю.С., Деркаев А.А., Рябова Е.И., Прокофьев В.В., Алексеева И.А., Воронина Д.В., Зорков И.Д., Ковыршина А. В., Илюхина А.А., Ботиков А.Г., Карпов А.П., Лубенец Н.Л., Зубкова О.В., Семихин А. С., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л.;

- №2763001 «Однодоменное антитело и его модификации, специфически связывающиеся с RBD S белка вируса SARS-CoV-2, и способ их применения для терапии и экстренной профилактики заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV-2» Фаворская И. А., Щебляков Д.В., Есмагамбетов И. Б., Деркаев А. А., Алексеева И. А., Рябова Е. И., Воронина Д. В., Прокофьев В. В., Должикова И.В., Зорков И. Д., Илюхина А. А., Ботиков А.Г., Гроусова Д. М., Егорова Д. А., Народицкий Б. С., Логунов Д. Ю., Гинцбург А. Л.;

- №2765731 «Гуманизированное моноклональное антитело, специфически связывающиеся с RBD S белка вируса SARS-CoV-2, средство и способ для терапии и экстренной профилактики заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV-2» Есмагамбетов И. Б., Щебляков Д.В., Лебедин Ю.С., Фаворская И. А., Должикова И.В., Деркаев А. А., Рябова Е. И., Прокофьев В. В., Алексеева И.А., Воронина Д.В., Зорков И. Д., Ковыршина А. В., Илюхина А. А., Ботиков А. Г., Карпов А. П., Лубенец Н. Л., Зубкова О.В., Семихин А. С., Народицкий Б. С., Логунов Д. Ю., Гинцбург А. Л.

### **Внедрение полученных результатов в практику**

Выполненная работа представляет собой законченное научное исследование, имеющее выраженную прикладную направленность. По результатам исследования был разработан препарат для терапии интоксикации ботулотоксином на основе нейтрализующих однодоменных антител, слитых с Fc-фрагментом иммуноглобулина. Проведены доклинические исследования в полном объеме. По результатам исследования были разработаны препараты ГамЭмаб и ГамЭзумаб для экстренной профилактики и этиотропной терапии лихорадки Эбола. Проведенные доклинические исследования препаратов позволили получить разрешение на проведение клинических исследований. В настоящее время завершены клинические исследования 1 фазы [NCT03428347], по результатам которых будет подготовлен и подан пакет документов для получения разрешения на регистрацию препарата для медицинского применения. Также в результате исследования был разработан препарат ГамКовиМаб для экстренной профилактики и этиотропной терапии

заболевания COVID-19. В настоящее время завершены клинические исследования 1 фазы, а также получено разрешение на проведение исследования 2 фазы «Открытое исследование безопасности и описания параметров эффективности лекарственного препарата для экстренной профилактики и ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, при однократном применении у пациентов с верифицированным диагнозом COVID-19». По результатам которых будет подготовлен и подан пакет документов для получения разрешения на регистрацию препарата для медицинского применения.

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

**Методология и методы исследования.** При выполнении исследования были использованы современные методологические подходы, теоретические и

экспериментальные наработки в области разработки средств диагностики и терапии инфекционных заболеваний на основе моноклональных антител. В ходе проведения исследований применялись современные иммунологические, биотехнологические, молекулярно-биологические, биохимические, вирусологические, методы молекулярного моделирования и молекулярной динамики, а также методы прикладной статистики и методы работы с животными.

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

Обсуждение результатов представлено с использованием актуальных исследований в области изучения неканонических антител и их применения в терапии различных заболеваний. Научные положения и выводы, изложенные в диссертации, обоснованы и подтверждены фактическим материалом.

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

**Положения, выносимые на защиту:**

- На основе проведенных исследований разработана универсальная технологическая платформа, позволяющая получать однодоменные антитела заданной специфичности (получать иммунные библиотеки неканонических однодоменных антител, характеризующихся большим разнообразием; эффективно проводить селекцию однодоменных антител, а также обеспечивать создание разнообразных модифицированных молекул на их основе для усиления терапевтического потенциала);

- Универсальность технологической платформы на основе однодоменных антител, а также простота модификаций молекул антител, направленных на

увеличения времени циркуляции антител в организме, усиление нейтрализующей активности, а также расширение спектра активности в отношении различных мишеней, позволяет создавать препараты для эффективной борьбы с инфекционными заболеваниями;

- Созданные на основе платформы однодоменные антитела, специфичные поверхностным гликопротеинам вирусов (вирус Эбола, коронавирус SARS-Cov-2) способны блокировать связывание вирусов с клеткой хозяина и как следствие подавлять развития вирусной инфекции;

- Однодоменные антитела, специфические к бактериальным антигенам (на моделях *M.hominis*, *C.difficile*), показывают высокую чувствительность в различных диагностических приложениях (ИФА, иммуоблоттинг, иммуоцитохимическое окрашивание клеток, проточная цитофлуориметрия, а также при создании биосенсоров) и могут быть использованы для создания тест-систем для обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов;

- Однодоменные антитела, специфичные в отношении бактериальных токсинов, могут обладать высокой нейтрализующей активностью и могут быть использованы для терапии летальной интоксикации;

- Разработанные препараты на основе однодоменных антител и их модификаций не обладают токсичностью в доклинических исследованиях на животных, а также обладают хорошим профилем безопасности в клинических исследованиях с участием добровольцев.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на III Объединенном иммунологическом форуме (Нижний Новгород, 2013); I Международной молодежной биотехнологической школе-конференции «Биотехнология: от бактериофагов до вакцин» (Барнаул, 2014); на 19-ой Международной Пушинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пушино, 2015); на Международном конгрессе «Инновационные технологии в иммунологии и аллергологии» (Москва, 2015); на научной сессии НИЯУ МИФИ (Москва, 2015); на III Московском Конгрессе кардиологов (Москва, 2021); на IX Научно-практической конференции

«Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии», проведенной в рамках XI всероссийского фестиваля науки (Москва, 2021); на 45 Конгрессе FEBS “Molecules of Life: Towards New Horizons“ (2021, Любляна, Словения); на XI Ежегодной международной цифровой научно-практической конференции «Аллергология-иммунология: от традиции к инновациям» (Москва, 2022г); на IX Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (г. Сочи, 2022); на I Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (2023, Москва); на Первом Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (РКММИ) (г.Москва, 2023г.); на втором Саммите разработчиков лекарственных препаратов «Сириус.Биотех» (г. Сочи, 2024), на VI Международной конференции ПОСТГЕНОМ’2024 (г. Москва, 2024). Аprobация диссертации прошла на совместной конференции отделов Иммунологии, Медицинской микробиологии и Генетики и молекулярной биологии бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России 21 марта 2024 года.

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

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

**Объем и структура диссертации.**

Диссертация написана на 358 листах, содержит 85 рисунков, 25 таблиц и 315 источников литературы.

**Личный вклад автора.** Автор непосредственно разработал основные экспериментальные подходы, лежащие в основе технологической платформы, позволяющей получать однодоменные антитела заданной специфичности из иммунных библиотек верблюдовых. Автор отработал наиболее эффективные схемы иммунизации верблюдовых (альпака, двугорбый верблюд) с использованием как рекомбинантных белков, так и рекомбинантных аденовирусных векторов, несущих гены целевого белка мишени и их комбинаций, позволяющих получать иммунные библиотеки неканонических однодоменных антител, характеризующихся большим разнообразием индивидуальных клонов. Автор непосредственно отработал условия проведения селекции однодоменных антител методом фагового дисплея с применением различных фагов-помощников и способов проведения элюции, позволяющих минимизировать содержание неспецифических фагов в библиотеке. Автор применил подход к проведению скрининга специфических однодоменных антител, включающий выполнение двухэтапного анализа способности клонов связываться с белком мишенью в формате фаговых частиц и лизата клеток продуцентов *E.coli*, позволяющий минимизировать возможность получения ложно-положительных результатов. Автором были отработаны условия продукции и очитки препаратов однодоменных антител, позволяющие проводить быструю оценку специфической активности антител.

Автором осуществлялась организация и планирование описанных в работе исследований, а также проведение аналитической оценки полученных результатов и их рецензирование.

Автором непосредственно был получен препарат, содержащий липид-ассоциированные мембранные белки (ЛАМБ) *M.hominis*, используемый в качестве мишени для отбора однодоменных антител. Автор разработал ТУ, эскизный и технические проекты тест-системы «ОДНОДОМЕН-БИО» для индикации и идентификации патогенных биологических агентов на основе панели однодоменных антител, а также провел валидационные, технические и клинические испытания зарегистрированных наборов реагентов для

иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-Cov-2 «SARS-Cov-2-RBD-ИФА-Гамалеи» №РЗН 2020/10393 и №РЗН 2021/14488.

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

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Моноклональные антитела их виды и модификации

Моноклональные антитела – иммуноглобулины, продуцируемые из единичной В клетки и обладающие способностью связываться со специфической мишенью (антигеном). Открытие структуры и функций иммуноглобулинов определили развитие целого ряда направлений исследований, посвященных разработке средств диагностики и терапии на основе иммуноглобулинов разных классов и их фрагментов.

Одним из ключевых этапов в использовании моноклональных антител в клинической практике стала разработка гибридной технологии в 1975г. [Kohler G, 1975], которая позволила получать очищенные препараты моноклональных антител в больших количествах, значительно расширив объем фундаментальных исследований и потенциал для их клинического использования.

Развитие методов клеточной биологии, генетической инженерии и технологии фагового дисплея привели к разработке и внедрению рекомбинантных препаратов на основе антител, широко применяемых в области онкологических, аутоиммунных, сердечно-сосудистых и инфекционных заболеваний. И на сегодняшний день, в различных исследованиях показана возможность применения как канонических антител, так и различных модификаций на их основе и/или отдельных фрагментов моноклональных антител (рисунок 1).

Канонические моноклональные антитела представляют собой структуру, состоящую из 2-х тяжелых и 2-х легких цепей иммуноглобулинов. Подобная комплексная структура обуславливает необходимость поиска функциональной комбинации тяжелых и легких цепей, что является неотъемлемой частью технологии и может значительно затруднять работу по получению молекул с заданной специфической активностью. Кроме того, размер канонического антитела составляет около 150 кДа (гидродинамический радиус около 10-14 нм), что может лимитировать эффективность проникновения в различные ткани

[Descotes, 2009b; Hansel и др., 2010; Shah, Betts, 2013; Tabrizi, Bornstein, Suria, 2010]. Эти ограничения послужили началом целого ряда исследований, направленных на изучение возможности использования различных антигенсвязывающих фрагментов антител меньшего размера (в англоязычной научной литературе эту тенденцию называют «downsizing») (рисунок 1).

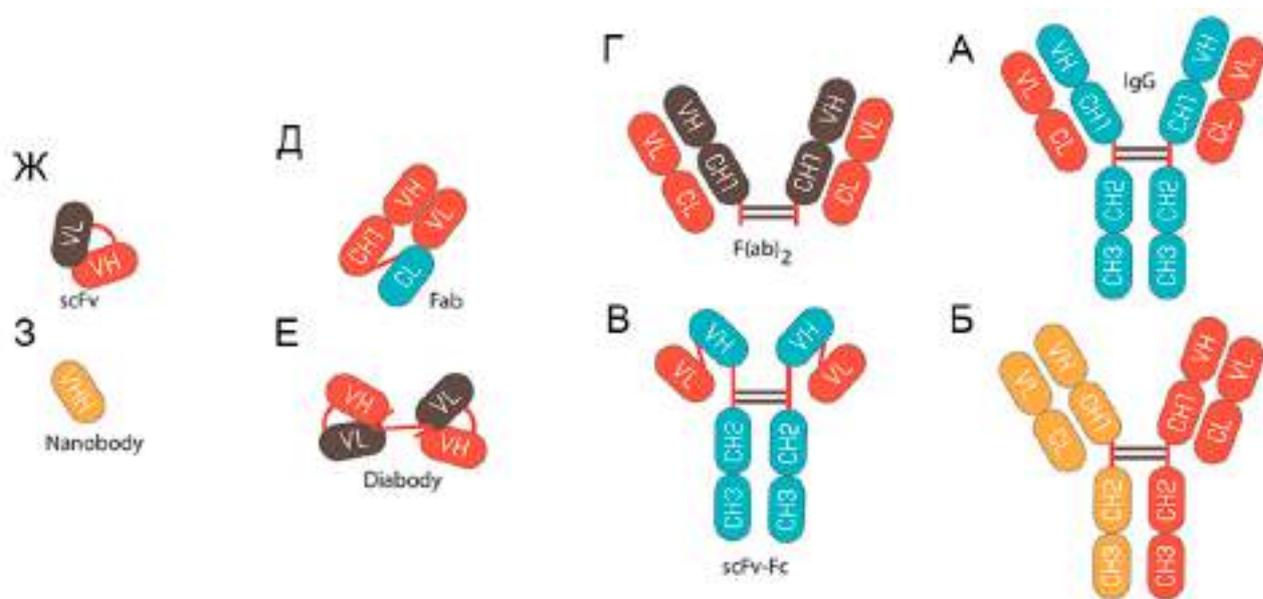


Рисунок 1. Различные типы моноклональных антител. А – иммуноглобулины, имеющие каноническую структуру; Б – биспецифические антитела; В – одноцепочечные антитела, связанные с Fc-фрагментом иммуноглобулина G; Г – F(ab)<sub>2</sub> фрагмент; Д – Fab фрагмент; Е – диабоды; Ж – одноцепочечные антитела scFv; З – однодоменные антитела (VНН).

Среди большого количества различных производных моноклональных антител на сегодняшний день наибольшее распространение получили Fab фрагмент (~57кДа) и одноцепочечные антитела scFv (~27кДа) фрагменты (антигенсвязывающие фрагменты, лишённые большей части константных доменов тяжёлых цепей и их производные, соединённые в единую полипептидную последовательность соответственно). Эти типы препаратов на основе моноклональных антител способны эффективно проникать в ряд тканей организма, но часто оказываются малорастворимыми, склонны к агрегации и

вызывают сложности при получении в препаративных количествах [Holliger, Hudson, 2005; Jain, Kamal, Batra, 2007].

В начале 1990 годов у представителей семейства *Camelidae* наряду с иммуноглобулинами канонической структуры были обнаружены неканонические антитела, состоящие из димеров только тяжелых цепей иммуноглобулинов класса G [Hamers-Casterman и др., 1993]. Антигенсвязывающий домен этих антител сформирован переменными участками только тяжелой цепи (рисунок 2). Таким образом, подобные неканонические антитела являются своего рода природным примером тенденции уменьшения размера иммуноглобулинов. Вскоре аналогичные антитела были также обнаружены у акул, скатов и некоторых других хрящевых рыб [Greenberg и др., 1995]. Однодоменная природа антигенсвязывающих фрагментов таких иммуноглобулинов позволила свести процедуру их получения к селекции только функциональных фрагментов тяжелых цепей, так называемых однодоменных антител, наноантител или V<sub>HH</sub>.

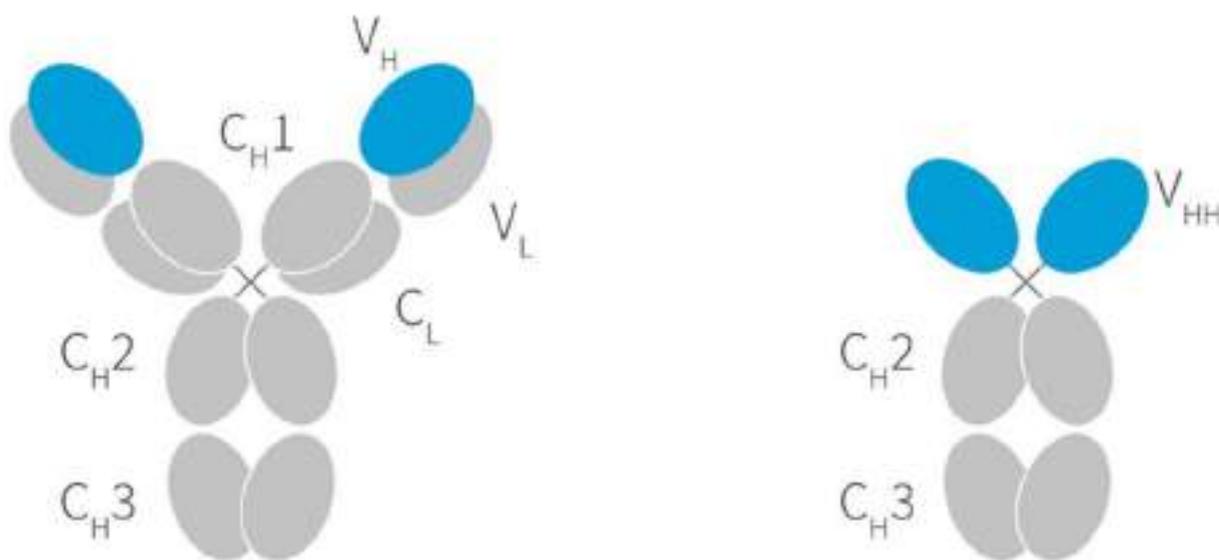


Рисунок 2. Канонические и неканонические антитела.

Дальнейшие исследования показали, что подобные структуры, сформированные в ходе эволюционного процесса и прошедшие аффинное созревание *in vivo*, обладают высокой стабильностью, растворимостью и

другими физико-химическими и термодинамическими характеристиками, позволяющими эффективно связываться с антигенами различной природы [Dumoulin и др., 2002; Linden R.H. и др., 1999]. Кроме того, антиген-распознающие петли таких неканонических антител (CDR), в особенности CDR3, как правило содержат большее число аминокислот в сравнении с каноническими антителами (до 20-25 аа). Такое свойство строения неканонических антител верблюдовых позволяет сохранить высокую аффинность взаимодействия с антигеном, сравнимую с каноническими антителами, за счет увеличения площади контакта [Muyltermans и др., 1994]. Кроме того, за счет формирования длинных CDR петель V<sub>H</sub>H способны связываться с эпитопами, часто находящимися в труднодоступных для канонических антител регионах антигена. Дополнительно, небольшой размер (2-3 нм) V<sub>H</sub>H позволяет им эффективно проникать в различные ткани организма и, в некоторых случаях, даже проходить гематоэнцефалический барьер [Muruganandam и др., 2001].

После открытия однодоменных антител, многие исследовательские группы в разных странах начали работу по изучению возможности их применения при разработке средств диагностики и терапии различных заболеваний. На сегодняшний день, некоторые продукты, полученные на основе однодоменных антител, были успешно коммерциализованы компаниями Ablynx (в 2020 году принадлежит компании Sanofi) и GenWayBiotech, и сейчас находятся на завершающих стадиях клинических испытаний. А в 2019 году FDA одобрило клиническое применение первого препарата на основе однодоменных антител (Кабливи (caplacizumab)) для терапии тромбоцитопенической пурпуры. Фирмой Ablynx в 2003 году было введено новое обозначение V<sub>H</sub>H – «nanobodies», подчеркивающее размеры этих молекул и их высокую аффинность связывания с антигенами [Wolfson, 2006]. Название «nanobodies» (русскоязычный перевод – «наноантитела»), хотя и является товарным знаком, получило очень широкое распространение для обозначения V<sub>H</sub>H и зачастую используется в качестве термина в научной литературе. Общее же количество публикаций,

посвященных VHH, в международной базе данных WebofScience насчитывает несколько десятков тысяч статей за последние 10 лет, опубликованных научными коллективами из более чем 300 организаций по всему миру [Vanlandschoot и др., 2011]. Такой высокий уровень интереса к VHH обусловлен не только возможностью применения в различных областях, но и эффективной и воспроизводимой технологией получения. Большая часть публикаций, предметом которых являются VHH, относятся к таким областям, как молекулярная биология, иммунология, гематология и экспериментальная медицина.

## **1.2 Особенности молекулярной структуры однодоменных антител**

Наряду с каноническими иммуноглобулинами класса G (IgG), часть IgG2 и IgG3 в организме представителей семейства Camelidae (верблюды, ламы, альпаки, викуньи) представлены неканоническими формами, состоящими только из тяжелых цепей и не содержащих константные домены CH1 в варибельной части. Такие неканонические антитела, состоящие из тяжелых цепей, называются hcAb (heavy-chain antibody). Антигенсвязывающий сайт hcAb расположен на VHH-домене, причем VHH-домен полностью сохраняет свою структуру и функции независимо от других структурных элементов таких антител [Namers-Casterman и др., 1993].

Выравнивания последовательностей VHH с VH-доменами канонических антител показали, что они сходны по организации аминокислотных остатков, а основные отличия локализованы в гиперварибельных петлях (CDR – complementarity determining regions) и Fr2 регионе (framework-2 region) [Muyltermans и др., 1994] (рисунок 3).

Причины возникновения hcAb и закрепления их в ходе эволюционного процесса у верблюдовых и некоторых видов хрящевых рыб до сих пор вызывают дискуссии. Тем не менее, общепризнанными является ряд гипотетических механизмов молекулярной эволюции hcAb [Flajnik, Deschacht, Muyltermans, 2011]. Согласно этим предположениям, точечная мутация на 5'

конец интрона последовательности СН1 привела к исчезновению консенсусного сигнала сплайсинга мРНК, что привело к потере СН1.

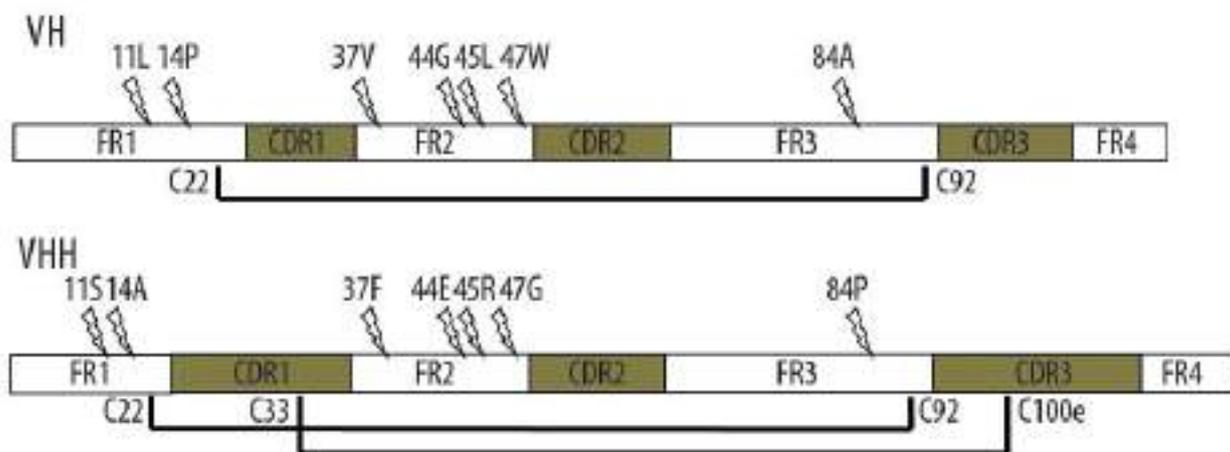


Рисунок 3. Характерные отличия аминокислотных последовательностей VNH от VH фрагментов канонических иммуноглобулинов.

В результате еще нескольких точечных мутаций гидрофобные аминокислоты в позициях 37, 44, 45 и 47 FR2 региона были заменены на гидрофильные. В результате этих изменений укороченные и более растворимые тяжелые цепи перестали эффективно связываться с белками-шаперонами и стали выделяться из эндоплазматического ретикула клетки в растворимой форме. Гипервариабельные домены CDR3, как правило, представлены большим числом аминокислотных остатков по сравнению с каноническими иммуноглобулинами. Увеличение числа аминокислот подразумевает большую вариабельность последовательностей, что дает VNH возможность связывать альтернативные эпитопы различных антигенов. Однако более гибкая молекулярная структура обладает большей энтропией, поэтому CDR3 в структуре VNH стабилизируется дополнительной дисульфидной связью [Flajnik, Deschacht, Muyltermans, 2011]. Этими структурными аспектами CDR3 объясняется феноменальная способность иммунной системы верблюдовых вырабатывать большое число антител, блокирующих активность ферментов за счет конкурирования с субстратами или лигандами за связывание с активными

ферментативными центрами [Chavanayarn и др., 2012; Desmyter и др., 1996; Desmyter и др., 2002]. Поскольку для терапевтического использования во многих случаях необходимы антитела, обладающие как раз такого рода биологической активностью, то VHH представляют исключительный интерес для биомедицины не только как инструменты для специфической детекции антигенов, но и как терапевтические агенты.

### **1.3 Технология получения однодоменных антител**

Технология получения VHH фрагментов заданной специфичности является воспроизводимой процедурой, не требующей дорогостоящего оборудования, а весь процесс может быть реализован в течение нескольких месяцев [Kastelic и др., 2009; Pardon и др., 2014]. Отчасти именно поэтому прогресс в области получения и использования VHH развивается весьма быстрыми темпами. Однако, несмотря на первичную простоту, технология продолжает активно развиваться и усовершенствоваться для повышения эффективности создания библиотек с большим разнообразием, селекции антител с высокой афинностью к различным мишеням, продукции молекул VHH, а также изучения различных подходов для модификации однодоменных антител с целью повышения их терапевтического потенциала.

Технология получения VHH в общем виде состоит из нескольких ключевых этапов, каждый из которых может быть реализован с помощью как общепринятых методик и подходов, так и с использованием оригинальных решений в зависимости от целей, задач и объектов исследования (рисунок 4).

Первый этап в получении VHH фрагментов заданной специфичности – это иммунизация животного. Неканонические антитела образуются в организме всех животных семейства *Camelidae*, а также некоторых видов хрящевых рыб. Относительная доля таких антител варьирует в пределах нескольких десятков процентов.

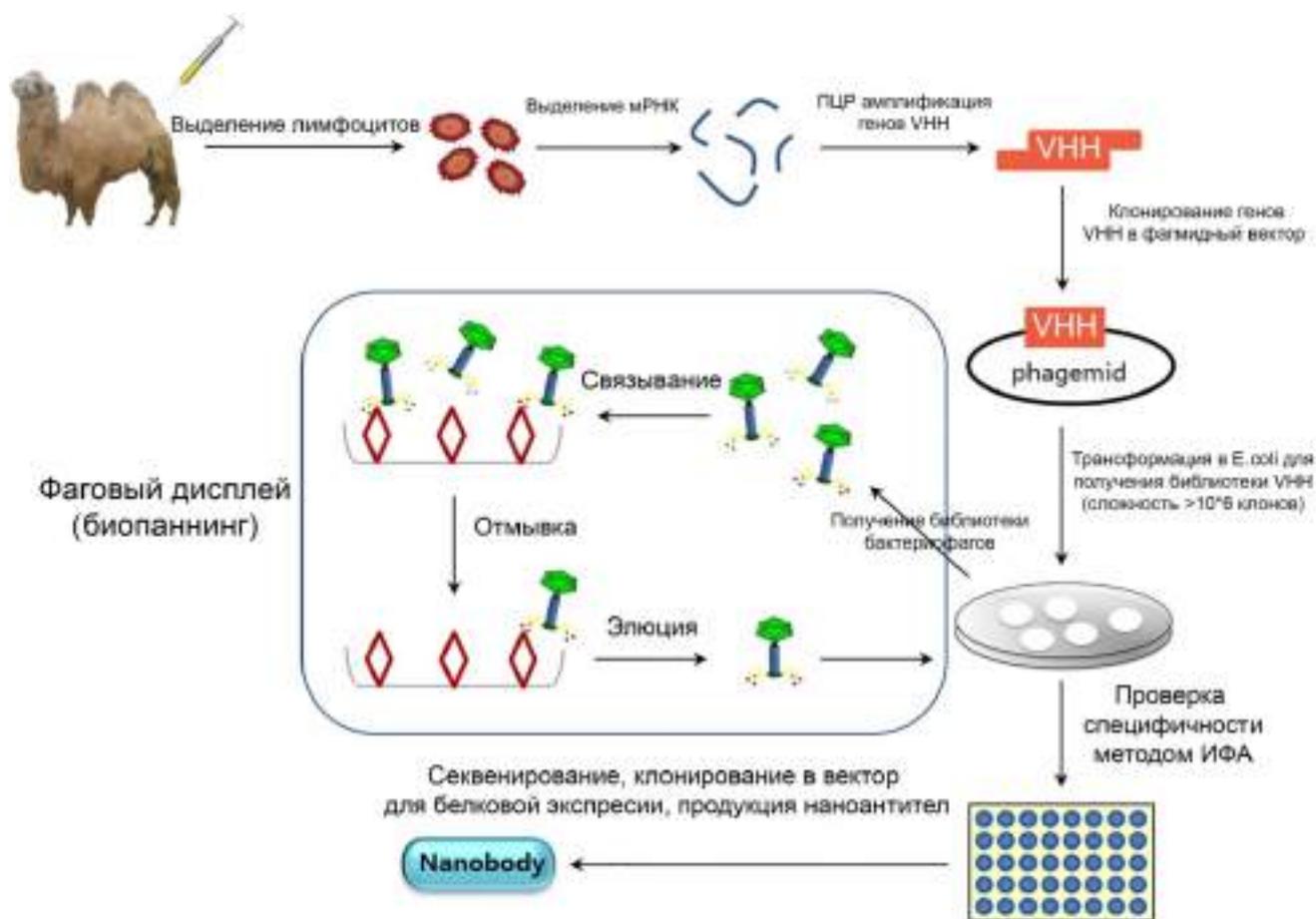


Рисунок 4. Общая схема технологии отбора специфических однодоменных антител.

Как и в большинстве иммунологических исследований, на этапе иммунизации решающую роль играет структура антигена, выбор адъюванта, способ его введения и схема иммунизации. Как правило, в большинстве работ эффективно применяют последовательную иммунизацию очищенными белковыми антигенами с добавлением хорошо известных адъювантов, таких как адъювант Фройнда или соединения алюминия [Spickler, Roth, 2003]. Максимальный титр иммуноглобулинов класса G наблюдается в таких случаях примерно на 6-10 неделе после иммунизации [Ferrari и др., 2012]. Тем не менее, в случаях, когда невозможно или нецелесообразно получение очищенного белкового препарата в достаточном количестве или целью исследования является получение VHH к неизвестному антигену, присутствующему в том или ином материале, используют в качестве иммуногена многокомпонентные препараты (смесь белков, целые бактерии и вирусы, лизаты клеток или даже

целые клетки) [Garaicoechea и др., 2008] [Maussang, Mujčić-Delić, Descamps, 2013]. Также для иммунизации используются различные генетические векторы (рекомбинантные аденовирусы, вирусы везикулярного стоматита и др), обеспечивающие доставку и продукцию целевого антигена. При введении в организм таких рекомбинантных векторов, за счет экспрессии гена интереса в клетках хозяина, обеспечивается длительная продукция иммуногена и, как следствие, формирование напряженного иммунного ответа.

Второй этап заключается в получении библиотеки генов, кодирующих последовательности VHH фрагментов антител. Для этого у иммунизированного животного проводят отбор крови и выделяют из нее моноклеарные клетки, в том числе лимфоциты. Необходимо отметить, что в ряде работ исследователи не ограничивались периферической кровью, а также использовали селезенку или лимфоузлы [Maass и др., 2007]. Особенностью указанного этапа, помимо общих требований к лабораторной практике и качеству образцов, является использование достаточного количества исходного материала для обеспечения большого разнообразия специфических для VHH мРНК, выделенных из В лимфоцитов. Полученный материал используют для выделения мРНК и синтеза кДНК, на матрице которой осуществляют амплификацию VHH-кодирующих последовательностей. Поскольку нуклеотидные последовательности канонических и неканонических антител обладают высокой степенью гомологии, то важной задачей является дифференциация VHH и VH последовательностей. Для этого различными авторами было разработано несколько стратегий ПЦР [Pardon и др., 2014]. Отсутствие CN1 региона у неканонических антител позволяет разделить соответствующие ампликоны по размеру, а затем, изолировав необходимый пул продуктов ПЦР, провести второй раунд амплификации, необходимый для клонирования ПЦР продуктов в фагмидный вектор. Помимо гнездовой ПЦР, также описаны праймеры, позволяющие напрямую амплифицировать последовательности, соответствующие только VHH [Pardon и др., 2014]. Амплифицированные последовательности, кодирующие VHH, затем клонируют в фагмидный вектор.

Фагмидные векторы, которые используют для клонирования последовательностей VHH, разнообразны [Qi и др., 2012]. Практически всегда используются фагмиды содержащие ген белка рIII бактериофага M13. Основной принцип использования фагмид заключается в том, что вставку VHH проводят в рамку считывания рIII белка бактериофага M13. Поскольку фагмиды содержат два сигнала начала репликации, то они могут реплицироваться как в форме двуцепочечной плазмидной ДНК, так и в виде одноцепочечной ДНК, способной упаковываться в капсид бактериофага M13. В бактериальной клетке, содержащей фагмиду со вставкой VHH, происходит синтез белка рIII, слитого с последовательностью VHH. В тоже время в этой клетке присутствует одноцепочечная форма этой фагмиды. В случае если в этой клетке появится источник синтеза всех остальных структурных белков бактериофага, произойдет сборка вирионов, причем в головку бактериофага будет упакован химерный белок, состоящий из белка рIII, слитого с VHH, а в капсид будет упакована одноцепочечная ДНК, содержащая последовательность, кодирующую этот химерный белок. На этом дуализме фагмид основан принцип фагового дисплея как подхода для изоляции специфических белок-кодирующих последовательностей [Hammers, Stanley, 2014].

Как правило, помимо общих элементов, таких как ген селективного маркера устойчивости к антибиотику, фагмиды часто содержат различные короткие аминокислотные последовательности (Тэги) в рамке считывания VHH-рIII для удобства детекции экспрессии белка, а также дальнейшей очистки и использования VHH в диагностике. В большинстве случаев это следующие тэги или их комбинации: His-tag, HA-tag, c-Myc-tag, Strep-tag, FLAG-tag и E-tag [Qi и др., 2012] (Рисунок 5).

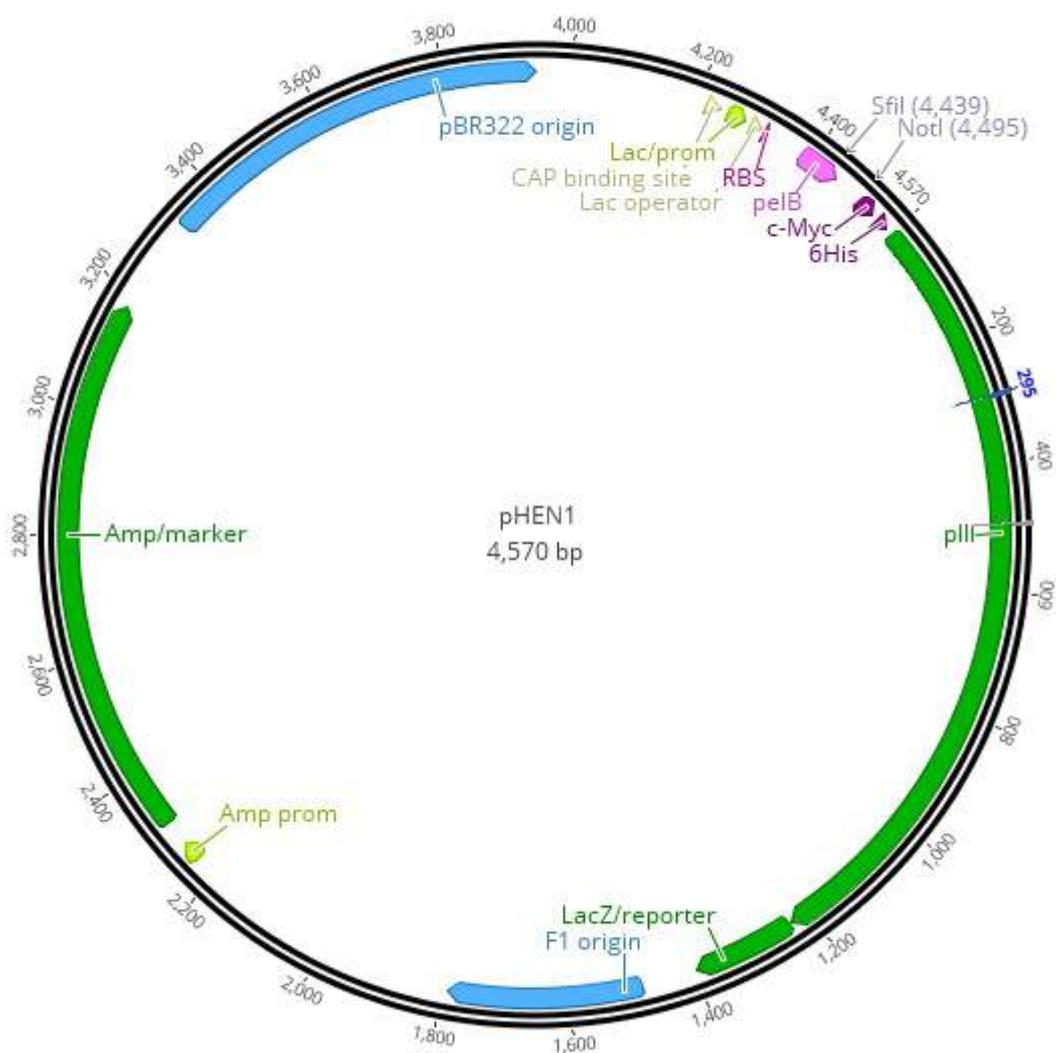


Рисунок 5. Карта фагмидного вектора pHEN.

Также, в некоторых фагмидах предусмотрен участок кодирующий сайт трипсинолиза, располагающийся между последовательностями VHN и pIII [Ваек и др., 2002]. С использованием таких конструкций становится возможным проведение этапа специфической элюции связавшихся с антигеном фаговых частиц с помощью обработки трипсином. К тому же отщепление VHN от головки фага снижает риск влияния VHN на его инфекционность.

Помимо разнообразных фагмидных векторов при конструировании и использовании фаговой библиотеки применяются различные фаги-помощники. В результате проведения стадии инфекции фагом-помощником клеток *E.coli*,

трансформированных фагмидными векторами, происходит экспрессия всех структурных белков и сборка рекомбинантных фаговых частиц. Одним из самых распространенных фагов-помощников, применяемых в селекции, является фаг M13KO7. M13KO7 является производным фага M13, содержащим точку начала репликации P15A и ген устойчивости к канамицину, встроенный в домен В точки начала репликации. Ген устойчивости к канамицину позволяет проводить отбор клеток, суперинфицированных фагом-помощником. M13KO7 характеризуется высоким уровнем продукции плазмид-содержащих частиц для секвенирования ДНК, мутагенеза (методы на основе Кункеля) и фагового дисплея. Однако, отсутствие каких-либо модификаций не позволяет проводить специфическую элюцию фаговых частиц, полученных на основе данного фага-помощника, что существенно повышает риск попадания в элюат неспецифических фагов. Для повышения эффективности проведения селекции, рядом исследователей и компаний были получены фаги-помощники, содержащие модификации, позволяющие устранить недостатки фага M13KO7. В частности, фаг-помощник KM13 [Peter Kristensen and Greg Winter 1998] и его аналоги. Фаг-помощник KM13 содержит чувствительный к трипсину линкер между доменом N2 и доменом СТ минорного белка оболочки III. При воздействии трипсина домены N1N2 вырезаются, и белок III становится неспособным опосредовать трансдукцию ДНК фага в клетки бактерий. Трипсинизация самого фага KM13 приводит к уменьшению количества БОЕ/мл на  $1 \times 10^6$ . Таким образом, трансдукция после обработки трипсином во время стадии элюции будет происходить почти исключительно за счет рекомбинантных фагов, несущих устойчивый к трипсину белок III дикого типа, который кодируется фагмидным вектором. Таким образом, использование фага KM13 позволяет проводить более эффективный и селективный биопаннинг. Так же, в последнее время, широкую популярность получил фаг-помощник Hyperphage M13 KO7ΔpIII (Progen). Hyperphage имеет фенотип pIII дикого типа и поэтому способен с высокой эффективностью инфицировать клетки F+ *Escherichia coli*; однако отсутствие у них функционального гена pIII означает,

что слитый белок рIII-VНН, кодируемый фагмидой, является единственным источником рIII при сборке фага. Это приводит к значительному увеличению доли фаговых частиц, несущих на своей поверхности фрагмент антитела. Антигенсвязывающая активность фагов, полученных при помощи данного фага-помощника, увеличена примерно в 400 раз за счет присутствия олиговалентных антител на каждой фаговой частице. На модельной библиотеке было показано, что после двух раундов паннинга более 50% фага связываются с антигеном по сравнению с 3% при использовании обычного фага-помощника M13KO7 [Susanne Rondot, 2001]. Таким образом, Hyperphage особенно полезны в стехиометрических ситуациях, когда мало шансов, что один фаг обнаружит желаемый антиген.

Таким образом, существует большое многообразие фагмидных векторов и фагов-помощников, которые позволяют исследователям выбрать оптимальное решение для их экспериментальных задач.

Ключевым завершающим звеном этапа селекции является трансформация полученной библиотеки VНН в фагмидном векторе в соответствующий штамм *E.coli* и получение библиотеки индивидуальных клонов-трансформантов.

Наряду с библиотеками, полученными из В-клеток животных (иммунные библиотеки), современные технологии позволяют получать синтетические библиотеки антител и их фрагментов большого разнообразия. Такие библиотеки позволяют отобрать специфические VНН к различным мишеням, в том числе на антигены, иммунизация которыми затруднительна или невозможна [Frigotto и др., 2015; Yan и др., 2014]. Однако работа с такими библиотеками на начальных этапах трудоемка, а также всегда существует вероятность отбора последовательностей, которые могут быть стабильны только в составе слитого белка VНН-рIII, тогда как собственно VНН не будут обладать необходимыми свойствами. Более того, исследования разнообразия последовательностей VНН с использованием высокопроизводительного секвенирования, показали, что широкая вариабельность аминокислотных остатков характерна не только для CDR петель, но затрагивает и константные

области, что не учитывается при конструировании синтетических библиотек. Тем не менее, подобные синтетические библиотеки представляют собой в некоторой степени универсальный источник VHH [Finlay, Almagro, 2012; Ponsel и др., 2011; Sidhu, Fellouse, 2006].

Третий этап технологии получения VHH определенной специфичности представляет собой собственно процедуру фагового дисплея. Как уже описывалось выше, фагмидные вектора обладают двумя важнейшими свойствами, на которых основан фаговый дисплей: обеспечивают экспрессию слитого белка VHH-pIII в клетках *E.coli* и имеют в своей структуре функциональный сигнал начала репликации бактериофага M13, то есть могут существовать в форме одноцепочечной ДНК, которая может быть упакована в головку бактериофага M13. Однако, для сборки частиц бактериофага необходим источник всех остальных структурных белков. В процедуре фагового дисплея в качестве такого источника используется бактериофаг-помощник. Как правило, бактериофаг-помощник представляет собой функциональный бактериофаг на основе M13, имеющий в своем составе все необходимые детерминанты для сборки фаговых частиц. При инфицировании таким бактериофагом-помощником клетки *E.coli*, уже трансформированной фагмидой, создается система, в которой присутствуют все элементы для сборки частиц бактериофага. В этих условиях головка бактериофага собирается как из белков дикого типа (наличие которых обеспечено фагом-помощником), так и из слитых белков VHH-pIII (наличие которых обеспечено фагмидой). Упаковка в фаговую частицу одноцепочечной ДНК также происходит либо с фагмидной ДНК, либо с ДНК фага-помощника. Таким образом, из одной клетки *E.coli*, трансформированной фагмидой и инфицированной фагом-помощником выходит несколько вариантов фаговых частиц: с головкой содержащей или не содержащей VHH-pIII и с одноцепочечной ДНК фагмиды или фага-помощника. Одной из главных задач совершенствования процедуры фагового дисплея является смещение равновесия в сторону сборки фаговых частиц, содержащих ДНК фагмиды и VHH-pIII слитого белка. Основным направлением для решения

этой задачи является модификация фага-помощника таким образом, чтобы его ДНК была как можно менее репликативно компетентной, а белок рIII с меньшей вероятностью упаковывался в головку бактериофага. Существует значительное количество работ, посвященных созданию мутантных форм фагов-помощников обладающих подобными свойствами. Проблема упаковки одноцепочечной ДНК не фагмидного происхождения достаточно эффективно решается селекцией на средах, содержащих соответствующий антибиотик. Описан ряд мутаций, снижающих уровень упаковки белка рIII. Необходимо отметить, что подобные мутанты, должны, при всех модификациях, обеспечивать возможность продукции достаточного количества фага-помощника на этапах, предшествующих инфекции клонов *E.coli*, трансформированных фагмидой, а также обладать достаточной инфекционностью для осуществления этого процесса. Одним из успешных вариантов таких модификаций является создание фагов-помощников, геном которых содержит делецию гена белка рIII [Rondot и др., 2001]. Такие бактериофаги требуют для продукции в препаративных количествах модифицированных штаммов *E.coli*, комплементирующих отсутствие рIII в геноме бактериофага. Широкое распространение фагмид, содержащих сайт протеолиза между VNN и рIII, обеспечило почву для создания серии фагов-помощников, рIII белок которых также содержит такие сайты [Shukla, Krag, 2010; Gupta и др., 2013]. После обработки таких бактериофагов трипсином рIII белок теряет свою функциональность, и фаговые частицы, головка которых не содержала рIII-VNN варианта, становятся неинфекционными. После получения частиц бактериофага с экспонированными в составе его головки VNN-рIII белка и несущих в геноме фагмиду, детерминирующую экспрессию именно этого варианта VNN, проводят биопаннинг. Биопаннинг заключается в добавлении библиотеки бактериофагов к антигену и изоляции только тех вариантов, которые с ним связываются. В большинстве работ антиген иммобилизуют на поверхности твердой фазы (аналогично тому, как это делают в процедурах иммуноферментного анализа). Используют как неспецифическую

сорбцию антигена на той или иной поверхности за счет электростатических взаимодействий, так и путем ковалентных иммобилизаций, а также с использованием биотинилирования [Matz, Chames, 2012]. Как правило, под твердой фазой подразумевают поверхность лунок планшета или пробирки, но в ряде работ используют суспензию твердых частиц с антигеном на поверхности (часто магнитных частиц) [McConnell и др., 1999]. Использование суспензии частиц позволяет добиться лучшего перемешивания и избежать прекоцентрацию бактериофагов у поверхности раздела твердой и жидкой фазы за счет осаждения в результате длительной инкубации. В случае работы с антигенами в составе мембранных комплексов (например, рецепторов эукариотических клеток) паннинг возможно проводить в суспензии клеток, в том числе с использованием флуоресцентных меток и сортеров клеток [Even-Desrumeaux, Chames, 2012; Sørensen, Kristensen, 2011]. Отдельного внимания заслуживают работы, в которых паннинг проводят с использованием проточных систем. В качестве примера можно привести работу, в которой антиген (в данном случае Pb<sup>2+</sup>) был иммобилизован на сорбенте, а бактериофаги пропускались с током буферного раствора через колонку, содержащую этот сорбент, мониторинг процесса селекции проводили при помощи хроматографического оборудования [Nian и др., 2010]. Интересны также работы, в которых принцип проточной системы селекции бактериофагов реализовывали с использованием прибора для детекции изменений поверхностного плазмонного резонанса [Malmberg и др., 1996].

Связавшиеся с антигеном частицы бактериофага затем элюируют и используют для заражения клеток *E.coli*, которые после высева на чашки с селективным антибиотиком дают множество колоний, составляющих обогащенную специфическими VHH библиотеку фагмид. Элюцию обычно проводят с использованием экстремальных значений pH (например, pH=2 или pH=11) или, если использованы соответствующие фагмиды, при помощи трипсина [Koh и др., 2010; Pardon и др., 2014]. Дополнительно к этим двум методам существуют оригинальные способы, такие как прямая инфекция

клеток *E.coli* без элюции фагов, или, например, использование ультразвука [Lunder и др., 2008]. Следует отметить, что в ряде случаев оправдано использование конкурентной элюции, когда бактериофаги вытесняются из комплексов с антигенами путем добавления других аффинных связывающих агентов [Tabares-da Rosa и др., 2011].

После элюции фаговые частицы, как уже говорилось выше, используют для заражения клеток *E.coli*, которые после посева на чашки с селективным антибиотиком дают множество колоний, составляющих обогащенную специфическими VHH библиотеку фагмид. Затем эту библиотеку используют для проведения следующего раунда паннинга. Путем нескольких повторений паннинга добиваются максимального обогащения специфическими последовательностями VHH. Скрининг индивидуальных клонов проводят различными способами, которые включают как общепринятые лабораторные методы, такие как ИФА и вестерн-блот гибридизацию, так и специфические подходы, направленные на решение конкретных задач (например, функциональный скрининг на модулирование свойств и активности антигена) [Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А. 2010; Inoue и др., 2007; Ratier и др., 2008].

Таким образом, с помощью разнообразных модификаций технологии фагового дисплея, удастся изолировать последовательности, кодирующие VHH связывающиеся с целевым антигеном.

### ***Продуценты однодоменных антител***

Канонические антитела и большую часть их фрагментов, как правило, получают в продуцентах на основе эукариотических культур клеток (СНО, НЕК293, Sf9). Для получения белковых препаратов VHH также успешно могут использоваться эукариотические клетки [Bazl и др., 2007]. Тем не менее, технология использования эукариотических культур клеток весьма трудоемка и отличается высокой стоимостью получаемых продуктов. Поскольку VHH обладают уникальным потенциалом для продукции в бактериях, грибах и растениях, то использование альтернативных систем экспрессии является

одним из основных преимуществ VHH по сравнению с каноническими антителами [Harmsen, Naard, 2007].

В большинстве работ, посвященных использованию VHH, в качестве продуцента используют бактериальные системы экспрессии на основе бактерий *E.coli* [Arbabi-Ghahroudi, Tanha, MacKenzie, 2005][Baral, Arbabi-Ghahroudi, 2012]. Это обусловлено тем, что *E.coli* была и до сих пор остается самой доступной и изученной системой экспрессии рекомбинантных белков с множеством возможностей масштабирования и адаптации [Georgiou, Segatori, 2005; Rosano, Ceccarelli, 2014; Swartz, 2001]. Уровень продукции VHH в *E.coli* в некоторых случаях может достигать 200 мг/л [Zarschler и др., 2013]. При экспрессии в периплазму, в отличие от цитоплазмы, формируются дисульфидные связи, что положительно сказывается на стабильности и биологической активности препаратов, но снижает уровень продукции VHH [Govaert и др., 2012]. Успешным подходом для повышения уровня экспрессии VHH может быть коэкспрессия различных молекул, таких как мальтоза-связывающий белок, хитин-связывающий белок и сульфгидрил-оксидаза [Salema, Fernández, 2013; Veggiani, Marcode, 2011; Та и др., 2015]. Таким образом, *E.coli* является наиболее изученным продуцентом VHH молекул. Однако наличие эндотоксина и отсутствие гликозилирования рекомбинантных белков ограничивает использование *E.coli* в качестве продуцента биологически активных рекомбинантных белков и, в частности, VHH, содержащих Fc фрагмент иммуноглобулина.

Среди продуцентов рекомбинантных белков грибы занимают промежуточную позицию между бактериями и культурами эукариотических клеток. Обсуждая продуценты VHH, относящиеся к грибам, как правило, подразумевают системы экспрессии в дрожжах (*Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris*), тем не менее, имеются работы и по продукции VHH в грибах, относящихся к роду *Aspergillus* [Hisada и др., 2013]. Уровень экспрессии в этих системах по данным различных авторов варьирует от 1 до 100 мг/литр и коррелирует с эффективностью секреции VHH, а также их гидрофильно-

гидрофобными свойствами [Gorlani, Haardde, Verrips, 2012; Meyer и др., 2015; Frenken и др., 1998; Frenken и др., 2000; Joosten и др., 2003]. Важным преимуществом продукции VHH в дрожжах является возможность вторичных модификаций белков, таких как N-гликозилирование. Хотя гликозилирование и не является необходимым условием для продукции функциональных VHH, в литературе имеются данные о том, что подобная модификация увеличивает удельную биологическую активность VHH [Harmsen, vanSolt, Fijten, 2009].

Растения и культуры растительных клеток в некоторых случаях также рассматриваются в качестве продуцентов VHH. Одной из уникальных перспектив использования растительных продуцентов является возможность использования семян как резервуаров для длительного хранения рекомбинантных белков, а также использование плодов, побегов и листьев в качестве съедобных систем доставки VHH в организм человека и животных [Viridi и др., 2013; Viridi, Depicker, 2013]. При этом уровень накопления VHH в различных тканях растений варьирует в широких пределах и в некоторых случаях может достигать 30% от общего уровня растворимых белков [Teh, Kavanagh, 2010]. Для повышения уровня накопления VHH возможно присоединение последовательностей стабилизирующих белков [Lentz и др., 2012]. Также один из удачных подходов заключался в подавлении уровня экспрессии эндогенных растительных белков методом РНК-интерференции [Tokuhara и др., 2013]. На основе VHH и растительной системе экспрессии была основана технологическая платформа создания Agrobody® для защиты растений от вредителей и инфекций, которая реализуется бельгийской фирмой AgroSafe в тесном сотрудничестве с фирмой Ablynx (лидером в области продуктов на основе VHH и владельцем товарного знака Nanobody®) (<http://agrosavfe.be/technology/>).

Помимо описанных систем, которые широко используются в биотехнологии для продукции рекомбинантных белков, имеются оригинальные решения для экспрессии VHH, например, в *Magnetospirillum gryphiswaldense*,

лактобациллах, *Brevibacillus choshinensis* и других менее распространенных системах экспрессии.

#### **1.4 Применение однодоменных антител в диагностике.**

Антитела и их производные являются одним из самых распространенных типов молекул для детекции патогенов и диагностики инфекционных заболеваний. Антитела, могут использоваться в качестве распознающих молекул при проведении диагностических исследований различными методами, такими как иммуноферментный анализ, гистологические и цитохимические исследования, а также в различных биосенсорах. С развитием технологического оборудования все более доступными становятся методы диагностики с использованием проточной флуориметрии, *in vivo* визуализации и микрочиповых технологий. Благодаря своим физико-химическим особенностям и высокому технологическому потенциалу, продукты на основе VHH могут быть успешно использованы во всех этих типах исследований. VHH обладают высокой стабильностью и устойчивостью к колебаниям температур, изменениям pH, повышенным концентрациям детергентов. Более того, стандартные препараты VHH можно получать в бактериальных продуцентах, а значит, их производство экономически целесообразно в большинстве случаев и может быть легко реализовано в промышленных масштабах. Также немаловажно отметить, что на базе VHH последовательностей можно легко получать различные производные, например, последовательности с различными тэгами и линкерами или с присоединенными флуоресцентными белками, а также проводить такие модификации как биотинилирование и конъюгацию с другими веществами небелковой природы. Все это делает VHH привлекательным инструментом для создания диагностических тест-систем, в том числе для *in vivo* диагностики патологических процессов [Bannas и др., 2015a; Bannas и др., 2015b; Crasson и др., 2015; Cui и др., 2015; Pia, Martinez, 2015; Rashidian и др., 2015].

Различными группами исследователей опубликовано значительное количество работ, в которых получено множество VNH и производных на их основе, специфически связывающих с теми или иными мишенями бактериального и вирусного происхождения, в том числе поверхностными антигенами, а также секретуемым токсином, а также к мишеням, применяемым в диагностике опухолевых, аутоиммунных и воспалительных заболеваний. Практически во всех этих работах продемонстрирована эффективная детекция антигенов с помощью VNH в формате ИФА и вестерн-блот гибридизации. Некоторые инфекционные агенты, представляющие интерес с медицинской точки зрения, являющиеся объектами этих работ, представлены в таблице 1.

Таблица 1. Однодоменные антитела в диагностике.

Антиген (мишень)	Применение	Метод диагностики	Источник литературы
<b>Диагностика паразитов или грибковой инфекции</b>			
Малярийный апикальный мембранный антиген-1	Детекция <i>Plasmodium falciparum</i>	Иммунофлуоресценция	[Nuttall 2004]
Трипаносомальная пируваткиназа	Детекция <i>Trypanosoma congolense</i>	ИФА и тест-полоски	[Pinto Torres 2018]
Паражгутиковый стержневой белок	Все виды трипаносом ( <i>Trypanosoma evansi</i> , <i>Trypanosoma congolense</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Trypanosoma vivax</i> )	ИФА и иммунофлуоресценция	[Obishakin 2014]
Супероксид дисмутаза железа 1, трипаредоксин 1, фактор ядерного	Детекция <i>Leishmania infantum</i>	ИФА	[Abeijon 2018]

транспорта 2			
Экскреторный секреторный белок фасциол	Детекция <i>Fasciola hepatica</i>	ИФА	[Barreto2018 ]
Диагностический гликопротеин <i>Taenia solium</i> 14 кДа	Детекция <i>Taenia solium</i>	Сендвич ИФА	[Deckers 2009]
Экскреторный секреторный белок	Детекция <i>Toxocara canis</i>	Сендвич ИФА и электрохимический магнитный сенсор	[Morales-Yáñez 2019, Morales-Yáñez 2020, Morales-Yáñez FJ 2019]
Альтернариозный микотоксин тенуазоновая кислота	Детекция <i>Alternaria</i>	Хемилюминесцентный иммуноферментный анализ	[Wang F 2020]
<b>Детекция бактериальной инфекции</b>			
Шаперонин GroEL	Детекция Бруцеллы	ИФА	[Abbady AQ 2012]
Флагелла	Детекция <i>Campylobacter jejuni</i> или <i>Listeria monocytogenes</i>	Флуоресцентная микроскопия/иммуноблоттинг, ИФА	[Riazi A 2013, Hussack G 2014]
Шига токсин 2 типа	Детекция <i>Shigella dysenteriae</i>	ИФА	[Melli LJ 2020]
Холерный токсин	Детекция холерного вибриона	ИФА	[Liu JL 2007]
<b>Детекция вирусных инфекции</b>			

Белок NS1 Вируса Денге типа 2	Детекция Вируса Денге	Тест-полоски	[Fatima A 2014]
H5N1	Детекция вируса гриппа H5N1	ИФА	[Zhu M 2014]
Белок оболочки E2/E3E2	Детекция Вируса западного энцефалита лошадей	ИФА	[Liu JL, 2018]
Белок FMDV 3ABC	Детекция Вируса Ящура	Конкурентный ИФА	[Gelkop S 2018]
Белок PEDV N	Детекция Вируса эпидемической диареи свиней	Блокирующий ИФА	[Ma Z 2019]
Нуклеопротеин Вируса Эбола	Детекция Вируса Эбола штамма Заир	ИФА	[Goodchild SA 2011]
<b>Диагностика заболеваний человека или злокачественных образований</b>			
Глипофорин А (CD235a) человека	Антитела к антигену p24 ВИЧ-1	Анти-CD235a наноантитела слитые с белком p24 ВИЧ-1 для реакции агглютинации в диагностике ВИЧ инфекции	[Habib I 2013]
Альфа-фетопротеин	Опухолевый биомаркер	ИФА и иммуно ПЦР	[Chen J 2016]
Гликопротеин 2 секреторных зимогенных гранул поджелудочной железы	Болезнь Крона	ИФА и ИГХ	[Schlör A 2018]
Раково-эмбриональный	Опухолевый биомаркер	Биосенсор	[Liu JL 2017]

антиген (CEA)			
Прокальцитонин	Сывороточный маркер бактериальной инфекции	Электрохемилюминисценция	[Li H 2014]
Гормон роста	Анализ на допинг	ИФА	[Murad H 2017]
CD22	В-клеточная лейкемия	ИФА, проточная цитофлуориметрия	[Saerens D 2005]
CD38	Растворимый CD38 при диагностике множественной миеломы	ИФА	[Li T 2018]
Бета-2-микроглобулин человека	Диагностика амилоидоза	Флуоресцентное окрашивание	[Huang C 2019]
<b>Не инвазивная диагностика <i>in vivo</i></b>			
EGFR	Солидные опухоли	Однофотонная эмиссионная компьютерная томография/компьютерная томография (ОФЭКТ/КТ)	[Gainkam LO 2011]
CD33	Острая миелоидная лейкемия	Неинвазивная ПЭТ/ОФЭКТ	[Romão E 2020]
HER2	Опухоль молочной железы	ОФЭКТ/КТ и ПЭТ	[Keyaerts M 2016]
CD20	Неходжкинская лимфома	тераностика	[Krasniqi A 2017]
Фибронектин	Опухоль молочной железы, меланома	КТ/ПЭТ	[Jailkhani N 2019]

Учитывая низкую стоимость производства и высокую стабильность наноантител (термостабильность, длительный срок хранения даже при отсутствии холодной цепи), в настоящее время предполагается, что VHH могут стать предпочтительным аффинным реагентом в будущем при производстве тест-полосок. Однодоменные антитела, возможно, менее применимы для диагностикумов типа «тест на беременность», но более применимы для анализов, которые используются для мониторинга инфекционных заболеваний у животных (как сельскохозяйственных, так и диких), живущих в отдаленных районах. Так, в исследованиях успешно были предприняты попытки мониторинга трипаносом и лихорадки Денге с использованием наноантител [Fatima A 2014, Pinto Torres 2018]. Кроме применения наноантител для получения тест-полосок, VHH активно исследуются в качестве диагностикумов для обнаружения различных мишеней в методах на основе ИФА. Несмотря на то, что получение наноантител против гаптенных является сложной задачей, были идентифицированы VHH против множества небольших органических соединений [Ladenson RC 2006, Fraile S 2013, Zhang YQ 2018]. Эти наноантитела в сочетании с технологиями высокочувствительной детекции или в форматах конкурентного ИФА, по-видимому, являются ценным инструментом для мониторинга загрязняющих веществ в почве или продуктах питания. Для этого, во-первых, из почвы или пищи должны быть извлечены загрязняющие гербициды, фунгициды или инсектициды. Многие из этих примесей гидрофобны и плохо растворимы в водных растворах, а их экстракция в диметилсульфоксиде, метаноле, ацетоне и других органических растворителях несовместима с белковыми зондами. Однако, молекулы VHH в ряде случаев могут быть устойчивыми к воздействию таких нефизиологических растворов [Kim HJ 2012].

Как известно, диагностической чувствительности методов иммунохроматографии (тест-полоски) и ИФА для трудно детектируемых мишеней (например, гликозилированных биомаркеров, присутствующих в чрезвычайно низких концентрациях), может быть недостаточно. В таких случаях может

потребуется переход на более чувствительные методы обнаружения, такие как хемилюминесцентный иммуноферментный анализ (CLEIA), биолюминесцентный иммуноферментный анализ (BLEIA), или более сложные новые диагностические инструменты, такие как (магнито-) электрохимические сенсоры [Huo J 2019, Li H 2014, Liu JL 2017]. Простота модификаций антител и их малый размер позволяют их использовать для направленного связывания на поверхности магнитных частиц [Saerens D 2005, Liu X 2018]. Например, биосенсор основанный на наноантителах специфических простат-специфическому антигену (ПСА) имеет предел обнаружения 0,08 нг/мл и диапазон 0,1–100 нг/мл, в то время как анализ методом поверхностного плазмонного резонанса для ПСА имеет предел обнаружения 0,3 нг/мл [Saerens D 2005, Liu X 2018]. Это контрастирует с более высокими пределами обнаружения различных автоматизированных платформ с использованием обычных антител [Bock JL 2004]. Аналогичные преимущества в чувствительности наблюдались при анализе гормона роста с использованием однодоменных антител, где был достигнут диапазон обнаружения 0,5–110 нг/мл [Murad H 2017].

Несмотря на значимые успехи в разработке и внедрению однодоменных антител в стандартные тест-системы, основанные на методе ИФА для мониторинга различных биомаркеров, будет чрезвычайно сложно заменить хорошо зарекомендовавшие себя классические моноклональные антитела в этих приложениях. Тем не менее, в случае использования для диагностики у однодоменных антител может быть заметное преимущество при неинвазивная визуализация *in vivo* [Vaneysken I 2011]. Небольшой размер мономерных молекул наноантител позволяет им быстро выходить из сосудов и равномерно распределяться в ткани для достижения своих целей. В то же время избыток однодоменных антител быстро выводится из крови через почки (около 30 минут). Таким образом, меченые радионуклидами однодоменные антитела, вводимые внутривенно, распределяются по всему организму, в то время как почечный клиренс удаляет несвязавшиеся молекулы антител. Меченные

наноантитела могут проникать в очаги поврежденной, инфицированной или воспаленной ткани, которые можно отслеживать с помощью ПЭТ или однофотонной эмиссионной компьютерной томографии всего тела. Этот многообещающий неинвазивный метод визуализации использовался в исследованиях на мышах с однодоменными антителами к онкомаркерам. В частности, опубликованы результаты клинического исследования исследования фазы I для однодоменных антител, специфичных HER2 у пациентов с раком молочной железы [Keyaerts M 2016]. Таким образом, обзор исследований однодоменных антител показывает, что их применение в диагностических целях в клинических лабораториях, особенно в контексте диагностики инфекционных заболеваний и визуализации является перспективным направлением.

### **1.5 Применение однодоменных антител в терапии.**

Благодаря достижениям в области иммунологии, молекулярной генетики и биотехнологии в настоящее время существует большое разнообразие моноклональных антител и их производных, применяемых для терапии различных заболеваний. В настоящее время моноклональные антитела активно используются в различных областях клинической практики: иммунотерапия опухолей, терапия заболеваний, связанных с воспалением, аутоиммунных заболеваний и др. [Pérol and Agrin, 2011]. При этом, активно ведутся исследования в области разработки новых препаратов на основе моноклональных антител и расширения показаний к их применению. Однако, высокая стоимость разработки и производства, трудоемкость при получении модифицированных молекул, а также низкая скорость проникновения в определенные ткани и частая неспособность связывания с труднодоступными эпитопами определяет некоторые ограничения для их терапевтического использования. В настоящее время актуальным является возможность достижения схожей аффинности (от пикомолярной до наномолярной), используя только переменный домен (VНН) антител верблюдовых и

хрящевых рыб [Hamers-Casterman et al., 1993; Greenberg et al., 1995; Dooley et al. 2003]. Простая структурная организация однодоменных антител, широкий спектр возможности по селекции и модификаций, а также низкая стоимость производства антител в формате V<sub>НН</sub> с использованием бактериальных продуцентов, послужили основой для начала исследований в области разработки средств диагностики и терапии на их основе. Действительно, несколько компаний специализирующихся на производстве наноантител, включая бельгийскую компанию «Ablynx», в последствие вошедшую в состав Sanofi, в настоящее время проводят ряд клинических исследований препаратов на основе однодоменных антител, а в 2008 году FDA впервые одобрила для клинического применения первый препарат на основе однодоменных антител для терапии тромбоцитопенической пурпуры [Wolfson, 2006 г.].

Благодаря развитию генной инженерии, иммунологии и биотехнологии в последние годы достигнут значительный прогресс в области селекции однодоменных антител, заданной специфичности, для терапевтического использования. При этом, за счет применения различных модификаций, для отбора таких неканонических молекул могут использоваться различные способы селекции (фаговый, бактериальный или дрожжевой дисплей [Ghahroudi et al., 1997; Ryckaert et al., 2010]. Кроме того, была исследована возможность применения однодоменных антител для перорального введения за счет высокой стабильности молекул в широком диапазоне значений рН. Основные текущие клинические испытания с использованием однодоменных антител обобщены в таблице 2. Благодаря большому потенциалу использования однодоменные антитела применяются в различных секторах, включая диагностику и особенно терапию различных заболеваний, таких как некоторые вирусные инфекции, воспаления, нейродегенеративные заболевания и рак.

Таблица 2. Препараты на основе однодоменных антител в клинических исследованиях.

Наноантитела	Механизм	Показания к	Стадия	Разработ
--------------	----------	-------------	--------	----------

	действия/мишени	применению	клинических исследований	чик/спонсор
ALX – 0761	Антитела к ИЛ-17A/F	Псориаз среднего и тяжелого течения	Фаза 1	Merk
Caplacizumab (ALX-0681)	Бивалентные однодоменные антитела, специфичные фактору фон Виллебранда (VWF)	Лечение приобретенной тромботической тромбоцитопенической пурпуры (aTTP)	Одобрено для клинического применения	Ablynx
ALX-0171	Тривалентные однодоменные антитела, специфичные белку F респираторно-сентициального вируса	Лечение острой инфекции, вызванной респираторным-сентициальным вирусом (RSV)	Фаза 2	Ablynx
ALX-0061	Однодоменные антитела, специфичные рецептору ИЛ-6	Терапия ревматоидного артрита	Фаза 2б	Ablynx
Vobarilizumab	Биспецифические однодоменные антитела к ФНО-α и сывороточному альбумину человека	Терапия ревматоидного артрита	Фаза 2	Taisho
Ozoralizumab (ATN-103) [72] Anti-HER2 5F7 Наноантитело	Антитела к HER-2, клон 5F7	Визуализация экспрессии HER2 рецептора клетками опухоли	Фаза 1	Ablynx
M6495	Антитела к белку ADAMTS-5	Терапия остеоартрита, повреждение хрящевой ткани	Фаза 1	Merk
ALX-0962	Биспецифические	Терапия аллергической	Доклинически	Ablynx

	однодоменные антитела к IgE и сывороточному альбумину человека	астмы тяжелого течения	е исследования	
ALX-0141	Однодоменные антитела к RANKL	Остеопороз, заболевания костной ткани, ассоциированной с злокачественным новообразованием	Фаза 1	Ablynx
ATN-192	Тривалентные биспецифические однодоменные антитела	Терапия системной красной волчанки	Фаза 1	Ablynx
DR5Nb1	Антитела, специфические DR5 рецептору человека	Лечение толстой кишки и рак поджелудочной железы и опухоль ксенотрансплантаты	Фаза 1	Novartis
ALX-0651	Бивалентные антитела к CXCR4	Лечение неходжкинской лимфомы и множественной миеломы	Фаза 1	Ablynx
ALX-0081	Однодоменные антитела, специфичные фактору фон Виллебранда (VWF)	Лечение острого коронарного синдрома	Фаза 2	Ablynx

Однодоменные антитела обладают простой структурой и соизмеримой с каноническими антителами афинностью к многочисленным антигенным эпитопам, часть из которых может находиться в труднодоступных местах в структуре антигена для большинства канонических антител. Это делает

однодоменные антитела перспективными молекулами при создании средств терапии инфекционных заболеваний. Действительно, Stohr et al. разработали препарат ALX-071, представляющий собой тримерное антитела, специфичное белку RSV (респираторно-синцитиальный вирус). В исследовании было показано, что разработанные однодоменные антитела в клинических исследованиях показали более высокую нейтрализующую активность по сравнению препаратом павилизумаб, который в настоящее время используется для терапии инфекции, вызванной респираторно-синцитиальным вирусом [Detalle et al., 2016]. В другом исследовании авторам удалось получить однодоменные антитела, нейтрализующие ВИЧ-1. В настоящее время авторы связывают перспективы применения разработанного препарата для терапии СПИД [Koch et al., 2017]. Можно отметить исследования, в котором авторам удалось выделить молекулу однодоменных антител, обладающую нейтрализующей активностью в отношении вируса Денге – заболевания, широко распространенного на африканском континенте [Morgan, 2019]. Исследования в области возможности применения однодоменных антител для терапии активно продолжаются и с использованием других инфекционных агентов, таких как вирус гепатита В, ротавирус полиовирус и др. [Vanlandschoot et al. 2011].

Однако, несмотря на наличие исследований, направленных на разработку средств терапии инфекций на основе однодоменных антител, на сегодняшний день большинство разработок ведется в отношении воспалительных заболеваний человека, злокачественных новообразований, нейродегенеративных заболеваний и др. Так, в частности, ведется разработка препарата для лечения болезни Альцгеймера (БА). Благодаря своему небольшому размеру и наличию гидрофильных остатков в каркасном регионе FR2 однодоменные антитела обладают способностью преодолевать гематоэнцефалический барьер [Farrington et al., 2014]. Эти характеристики делают однодоменные антитела мощными терапевтическими инструментами, которые следует учитывать при борьбе с неврологическими заболеваниями.

Среди этих заболеваний болезнь Альцгеймера представляет собой серьезную социальную проблему, при которой важно выявить биомаркеры, представляющие собой нейрохимические индикаторы, используемые для оценки риска или наличия этого заболевания. Аполипопротеин Е (АроЕ) остается фактором риска БА, который может приводить к избыточному образованию амилоида в головном мозге. В 2017 году Xiang Ren et al. разработали препарат на основе однодоменных антител, направленных против АроЕ, действующие как иммунодетекторы (Ren et al., 2017), которые могут иметь потенциал для клинической диагностики и мониторинга прогрессирования АД в режиме реального времени. Еще одним нейродегенеративным заболеванием, для терапии которого разрабатывается препарат на основе однодоменных антител, является болезнь Паркинсона (БП). В исследовании 2015 года авторам удалось выделить два однодоменных антитела: NbSyn2 и NbSyn87, связывающихся с С-концевой областью белка  $\alpha$ S [Roberts et al., 2015]. Оба антитела показали способность ингибировать образование фибрилл fibrS за счет конформационного изменения более стабильной олигомерной формы в менее стабильные олигомеры  $\alpha$ S.

Различные препараты на основе однодоменных антител в настоящее время находятся в клинических испытаниях фазах I и II в качестве терапевтических молекул. В частности, на завершающей стадии исследования находятся два препарата на основе однодоменных антител - ALX-0081 и ALX-0061. ALX-0081 содержит антитела, специфические фактору фон Виллебранда и применяются для терапии пациентов с острым коронарным синдромом. ALX-0061 связывается с рецептором интерлейкина-6 и применяется в качестве противовоспалительного средства для пациентов с ревматоидным артритом. При этом, простота модификации однодоменных антител потенциально может решить проблему быстрой фармакокинетики молекул VHH [Van Bockstaele et al., 2009].

Несмотря на успешное применение моноклональных антител в иммунотерапии рака, их высокая стоимость разработки и биотехнологического

производства с использованием эукариотических продуцентов является значительным ограничением и является причиной поиска альтернативных терапевтических агентов. Однодоменные антитела, за счет их характеристик, описанных выше, могут быть одной из альтернатив в том числе и в качестве таргетной терапии и/или иммунотерапии опухоли (PD-1, CTLA4, VEGF, HER-2 и EGFR) [Alibakhshi et al., 2017]. Их можно рассматривать как многообещающие инструменты для диагностики и таргетирования опухолевых клеток. Однодоменные антитела также считаются эффективными инструментами для исследования опухолей, поскольку они могут обеспечивать специфические изменения опухолевых мишеней, а также ферментативных и неферментативных белков [Van Audenhove and Gettemans, 2016]. В исследовании 2018 года авторы отобрали однодоменные антитела Nb1, Nb6, способные блокировать связывание эпидермального фактора роста с рецептором, часто ассоциированным с опухолевой прогрессией [Guardiola et al., 2018]. При этом однодоменные антитела, специфические к рецепторам EGFR и HER-2 можно использовать и таргетной доставки терапевтического агента к опухолевым клеткам. Как показано в исследовании с использованием антител к HER-2 для функционализации полимерных частиц на основе ПЭГ-бета-поликапролактона, которые могут воздействовать с клетками опухоли молочной железы, имеющих высокий уровень экспрессии рецептора HER-2 [Zou et al., 2015]. Кроме того, некоторые мультивалентные однодоменные антитела могут использоваться в качестве носителей радионуклидов в радиоиммунотерапии [Dekempeneer et al., 2016] и неинвазивной визуализации опухолевых клеток [Du et al., 2018, Vaneysken et al., 2011].

Получение однодоменных антител для целей визуализации включает как получение молекул, содержащих флуоресцентные белки, так и получение молекул, связанных с радиоэлементами [Vaneysken et al., 2011] и флуорохромами [Wang et al., 2015]. Принцип заключается в слиянии таких антител с флуоресцентным белком, экспрессируемым в клетках млекопитающих. Цель состоит в том, чтобы пометить антигены *in vivo* в

различных субклеточных компартментах на протяжении клеточного цикла. Кроме того, однодоменные антитела можно использовать для высокочувствительной визуализации мишени [Albrecht et al., 2015]. Однодоменные антитела, содержащие флюоресцентные метки можно использовать для исследования клеточной локализации белков, и динамики их взаимодействий с другими молекулами. Кроме того, простота модификаций однодоменных антител позволяет получать конъюгаты с золотыми наночастицами и их применения в качестве фототермических терапевтических агентов [Wang et al., 2016].

Благодаря своему малому размеру однодоменные антитела могут проникать через гематоэнцефалический барьер, при этом достаточно быстро выводиться из системной циркуляции через почки. Это дает изображения с отличным сигналом/шумом и быстрое выведение маркера из организма. В отличие от обычных антител, для интерпретации изображения требуется от 2 до 4 дней после инъекции. Более того, размер канонических моноклональных антител значительно превышает порог почечного клиренса, а наличие Fc-фрагмента обуславливает способность канонических антител связываться с Fc-рецепторами (и в частности с рецептором FcRn), что приводит к увеличению длительности циркуляции антител в системном кровотоке (до 3-4 недель) [Huang et al., 2010].

Как было описано выше, однодоменные антитела, специфические маркерам, связанным с развитием опухолевых заболеваний, могут использоваться не только в таргетной терапии, но и при диагностических исследованиях. Например, однодоменные антитела, специфические рецептору эпидермального фактора роста, типа 2 (HER2) можно использовать для неинвазивной диагностики рака молочной железы, рака желудка и яичников, а также в их метастазах. Этот метод под названием «Иммуно-ПЭТ» может использоваться в качестве вспомогательного инструмента при проведении таргетной терапии опухолей с высоким уровнем экспрессии HER2. Авторы в исследовании продемонстрировали, что анти-HER2 меченные однодоменные

антитела являются подходящими индикаторами для оценки экспрессии HER2 [Vaidyanathan et al., 2016, Zhou et al., 2017]. Благодаря малому размеру, высокой проникающей способности в ткани, а также короткой фармакокинетики, однодоменные антитела в настоящее время рассматриваются в качестве перспективного инструмента при проведении визуализации опухолевых клеток *in vivo* с использованием радиоактивной метки.

Таким образом, однодоменные антитела представляют собой новое поколение антител с особыми преимуществами размера, структуры, аффинности, стабильности и простоты производства в больших масштабах. Они могут быть эффективной терапевтической альтернативой каноническим моноклональным антителам, которые часто имеют ограниченную эффективность и высокую стоимость производства. Действительно, несколько препаратов на основе однодоменных антител уже проходят клинические испытания фазы I, II, III фаз для терапии различных заболеваний человека. Описанные свойства однодоменных антител делают их перспективным инструментом при их использовании в качестве средства диагностики и терапии.

Однако, несмотря на высокий диагностический и терапевтический потенциал препаратов на основе однодоменных антител, на сегодняшний день возможность их комплексного применения для визуализации и терапии инфекционных заболеваний изучена недостаточно. В связи с этим, в данной квалификационной работе основной целью являлась разработка технологической платформы однодоменных антител и изучение возможности ее использования для создания средств диагностики и терапии инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител и молекул на их основе. И в качестве моделей для оценки диагностического и терапевтического потенциала платформы были выбраны как бактериальные (*M.homonis*, *C.difficile*, *C.botulinum*) так и вирусные (Вирус Эбола, коронавирус SARS-Cov-2) инфекционные агенты. При этом задачей научного исследования заключалась в выборе мишеней для действия однодоменных антител, отбора специфических уникальных молекул однодоменных антител, а также изучения их

диагностического потенциала и терапевтической активности как в случае бактериальных так и вирусных мишеней на моделях *in vitro* и *in vivo*. Одной из первых моделей, выбранных для исследования, был вирус лихорадки Эбола.

### **1.6 Вирус Эбола. Выбор мишени для нейтрализующих однодоменных антител.**

Болезнь, вызываемая вирусом Эбола (БВВЭ) — инфекционное заболевание человека и приматов, характеризуется тяжелым течением и летальностью до 90% [Sanchez et. al., 2006]. Возбудителем данного заболевания является вирус рода Эбола (Ebolaviruses) из семейства Филовирусов (Filoviridae) [Beer et.al., 1999]. Род Ebolaviruses насчитывает 6 видов: Bundibugyo ebolavirus (BDBV), Zaire ebolavirus (ZEBOV), Reston ebolavirus (RESTV), Sudan ebolavirus (SUDV), Tai Forest ebolavirus (TAFV), Bombali ebolavirus (BOMV). Наиболее патогенными для человека из перечисленных являются ZEBOV, SUDV и BDBV [Должикова и соавт., 2017].

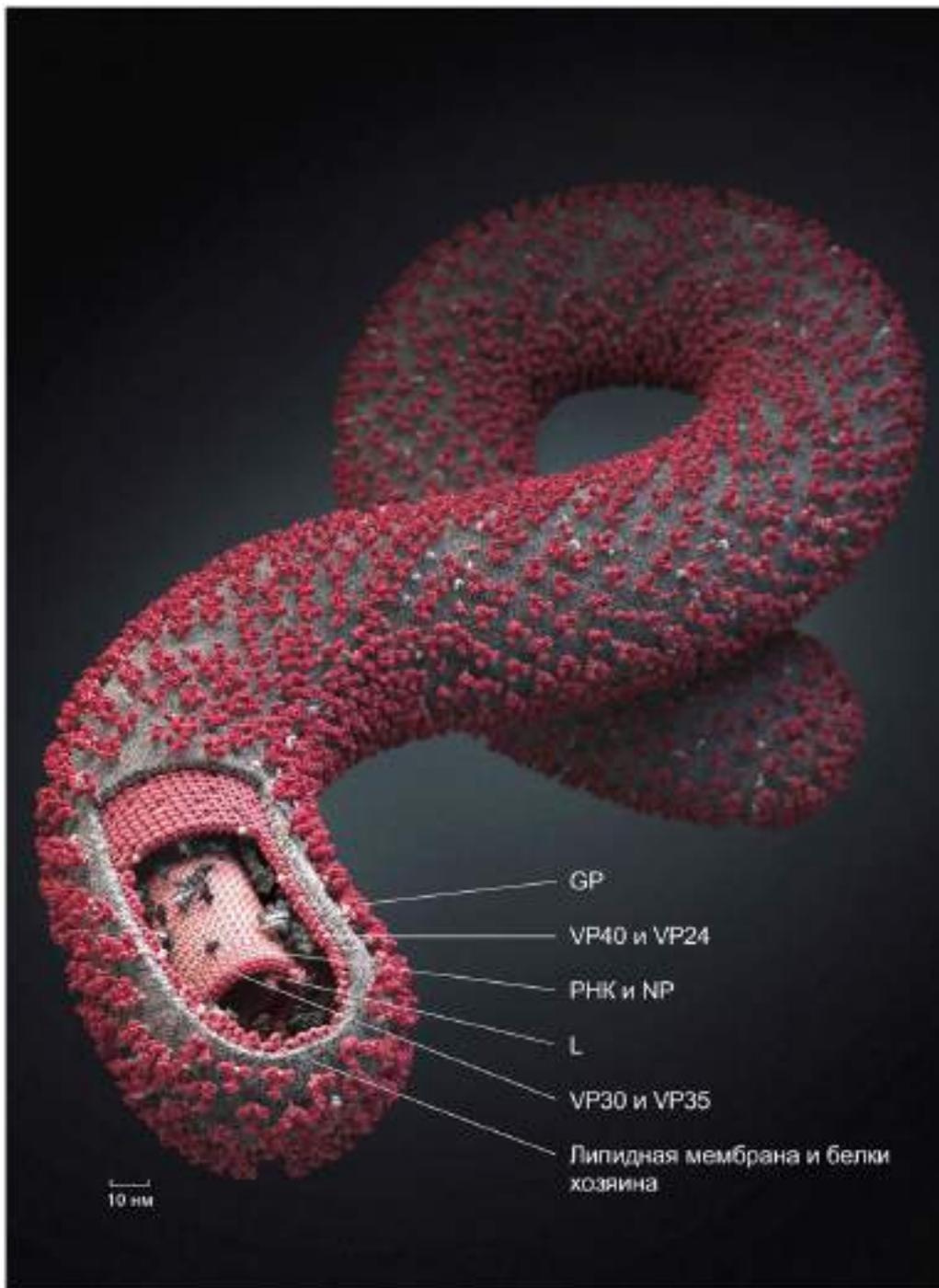
Болезнь протекает с повышения температуры, озноба, головной боли до развития симптомов, связанных с нарушением функции ЖКТ (тошнота, рвота, диарея), нарушением работы дыхательной системы (кашель, одышка, боль в груди), а также сердечно-сосудистой системы (гипотензия) [El Sayed et.al., 2016]. К более поздним симптомам заболевания относят кровоизлияния, геморрагии, поражение тканей организма, нарушение свертываемости. В случае осложнения нередко заболевание завершается полиорганной недостаточностью, приводящей к летальному исходу обычно через 5-10 дней от появления первых признаков инфицирования. При этом, инкубационный период составляет от 3 до 20 дней. Самая крупная вспышка болезни, вызванной вирусом Эбола произошла в 2014 году в Западной Африке в Гвинее и распространилась на территории других стран: Либерии, Сьерра-Леоне, Нигерии, Сенегала, а также за пределы африканского континента. С начала возникновения вспышки заболевания БВВЭ начались многочисленные

исследования по разработке и внедрению средств профилактики и терапии инфекции, вызванной вирусом Эбола [Попова и соавт., 2015].

Разработка средств профилактики и терапии на основе моноклональных антител связана с поиском подходящей мишени, являющейся перспективной для формирования протективного иммунного ответа в случае вакцины и являющейся мишенью для нейтрализующих антител. Вирионы вируса Эбола имеют сложное строение и включают оболочку, содержащую поверхностные гликопротеины, нуклеокапсид, полимеразный комплекс и матрикс [Bharat et.al., 2012]. Структурные белки вириона кодируются одноцепочечной вирусной РНК, которая находится в комплексе с нуклеопротеином NP и белками нуклеокапсида VP30. Кроме того, вирион содержит вирусную полимеразу L, обеспечивающую синтез вирусных белков в клетках хозяина (рисунок 6) [Gutsche et.al., 2015].

Оболочечный гликопротеин GP, заякоренный в вирусный липидный бислой, формирует вирусные шипики, необходимые для распознавания рецепторов на поверхности клеток хозяина. Оболочка вириона представлена липидным бислоем, который формируется из плазматической мембраны клетки хозяина во время отпочковывания вириона от клетки [Gutsche et.al., 2015].

Первичный контакт вируса с поверхностью клетки хозяина, а также его проникновение внутрь клеток происходит за счет взаимодействия с различными рецепторами. Среди идентифицированных рецепторов выделяют: рецептор фолиевой кислоты, асиалогликопротеиновый рецептор гепатоцитов, альфа эндотелиальных клеток, лектины С-типа, и лектины макрофагов, специфичные для N-ацетилгалактозамина.



**Рисунок 6.** Вирус Эбола, структурная организация [<http://visual-science.com/projects/ebola/poster/>]

Интернализация вируса происходит путем эндоцитоза клеток хозяина после первичного взаимодействия поверхностного гликопротеина вируса Эбола с клеточными рецепторами. В эндосомах клетки хозяина, в условиях повышения рН происходит ферментативное расщепление поверхностного гликопротеина GP, связывание вируса с рецептором NPC1 и последующее слияние мембран

вируса и эндосомы. После чего происходит высвобождение высвобождение нуклеокапсида вируса Эбола в цитоплазму (рисунок 7, 8) [Сизикова и соавт., 2015;].

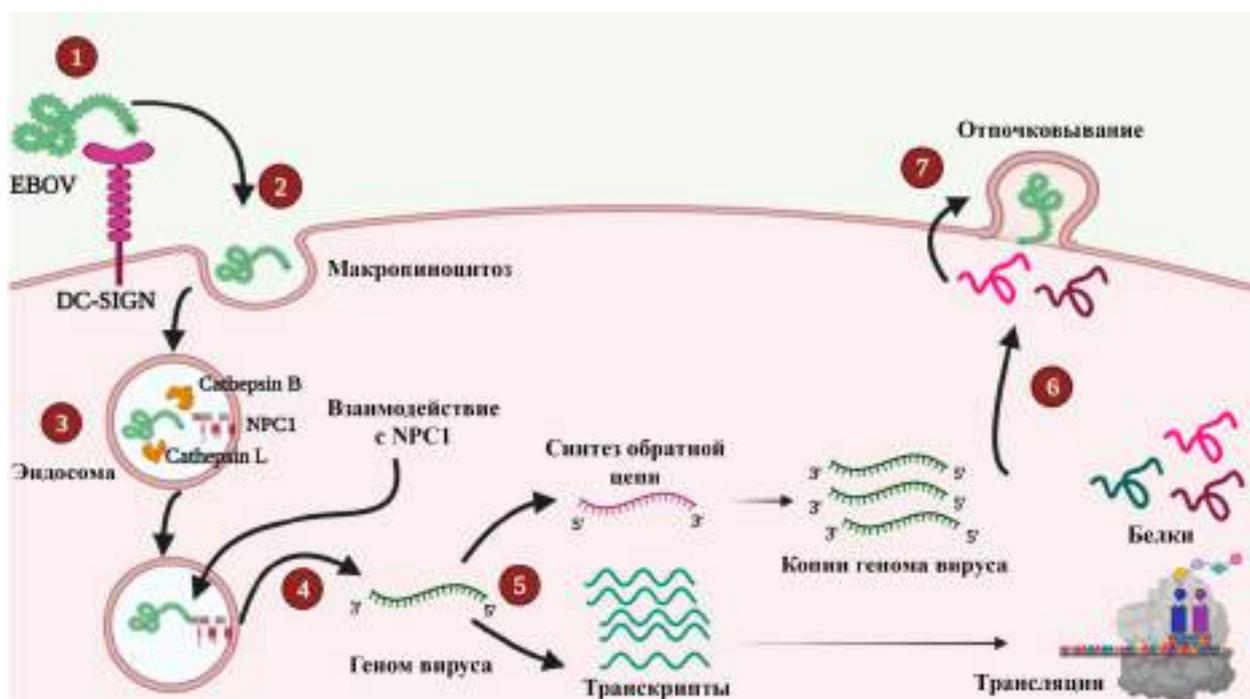


Рисунок 7. Жизненный цикл вируса Эбола

### **Белки GP**

Среди гликопротеинов вируса Эбола выделяют 3 белка: секретируемый гликопротеин (sGP), структурный гликопротеин (GP1,2), являющийся частью вириона и малый растворимый секретируемый гликопротеин (ssGP), который составляет всего около 4% от общего количества синтезируемых гликопротеинов) [Audet, Kobinger, 2015].

Секретируемые формы гликопротеинов (sGP, ssGP) не являются перспективными мишенями при создании средств терапии на основе нейтрализующих антител и выполняют «защитную» функцию для вируса, поскольку помогают ускользать вирусу от гуморального иммунного ответа [Sanchez et. al., 1998]. Большая часть нейтрализующих антител, находящихся в системном кровотоке, связываются с секретируемыми формами белка GP, что приводит к значительному снижению их защитной концентрации и как следствие ускользанию вируса от иммунитета хозяина. Кроме того, антитела,

специфические секреторным формам sGP и ssGP часто ассоциированы с эффектом, называемым антитело-зависимое усиление инфекции (ADE эффект). Этот эффект в первую очередь связан с тем, что образующиеся антитела, как правило не являются нейтрализующими, при этом, за счет наличия Fc-фрагмента могут обеспечить проникновение вируса в иммунокомпетентные клетки (макрофаги, дендритные клетки) и последующую диссеминацию возбудителя в организме [Takada et. al., 2001].

Как было описано выше, только структурный поверхностный гликопротеин GP участвует в первичном взаимодействии вируса с клеткой хозяина, а также последующем расщеплении катепсинами (CatL и CatB) в поздних эндосомах. В результате ферментативного расщепления гликопротеин GP вируса эбола, в отсутствие муцин-подобного домена, связывается с рецептором NPC1 (транспортер холестерина Ниманна-Пика) и выходит в цитоплазму после слияния вирусной и эндосомальной мембраны [Сизикова и соавт., 2015] (рисунки. 7,8).

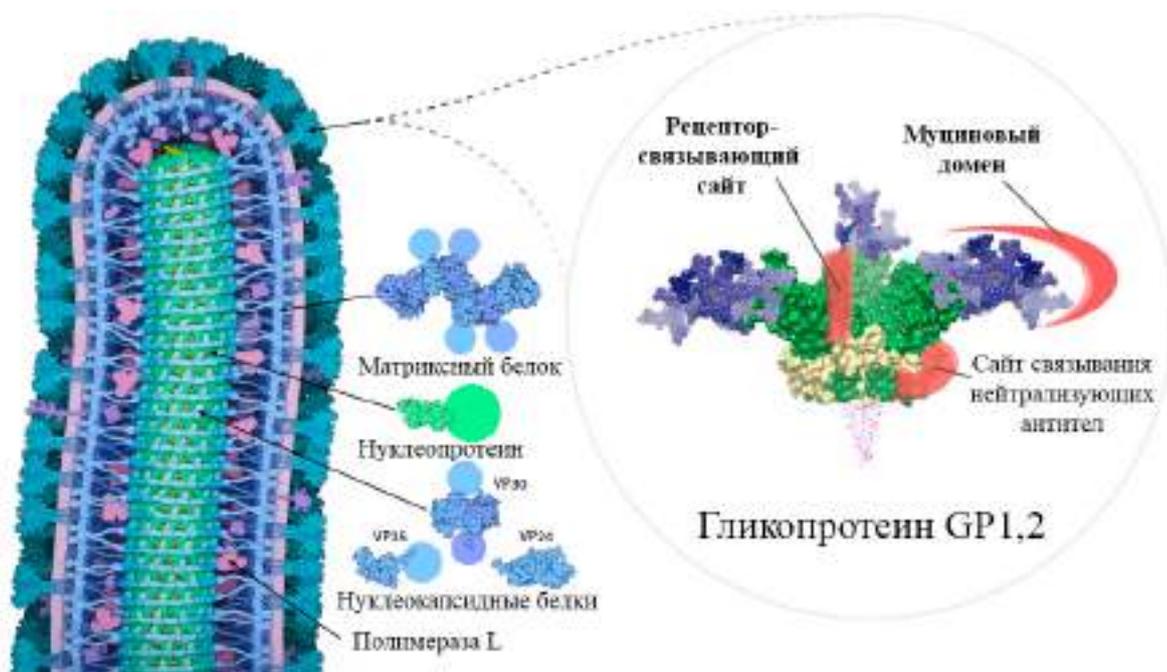


Рисунок 8 Структура гликопротеина GP вируса Эбола

Белок GP вируса Эбола, в отличие от его секреторных форм, является одной из основных мишеней для разработки средств терапии лихорадки Эбола

на основе нейтрализующих моноклональных антител. Моноклональные антитела с высокой специфичностью к белку GP вируса Эбола, обладающие вируснейтрализующей активностью, рассматриваются в качестве кандидатов в высокоэффективные противовирусные препараты [Moekotte et al., 2016]. В настоящее время разработано и охарактеризовано около 20 канонических моноклональных антител к EBOV GP, которые продемонстрировали многообещающие результаты при изучении моделей на животных [González-Gonzalez et al., 2015]. Например, MAb KZ52, выделенное из человека, перенесшего лихорадку Эбола, успешно защищало мышей и морских свинок от смертельной инфекции, но не защищало нечеловекообразных приматов (NHP) в качестве монотерапии [Murin et al., 2014]. Наиболее многообещающими препаратами являются коктейли из нескольких MAb: MB-003, ZMAb, MIL77E, MAb114/MAb100, которые нацелены на EBOV GP и показали 100% защиту на модели летальной инфекции вируса Эбола у приматов NHPs [Moekotte et al., 2016]. Первым препаратом для лечения пациентов с лихорадкой Эбола был ZMapp, состоящий из коктейля из трех химерных мышинных MAb, разработанный в 2014 году. Однако дальнейшие исследования показали, что ZMapp специфически нейтрализует штамм Заир и не действует на штамм Судан [Moekotte et al., 2016].

Помимо канонических моноклональных антител в течение последних 20 лет вызывает интерес возможность использования однодоменных антител (неканонических форм моноклональных антител верблюдовых) и их модифицированных производных в лечении инфекционных заболеваний [Wu Y. 2017]. Однако исследований по разработке препаратов однодоменных антител против БВВЭ немного [Darling T. L. 2017]. Основными преимуществами однодоменных антител являются относительно простая технология получения и их способность связываться со скрытыми антигенными эпитопами. Недостатки однодоменных антител связаны с их быстрым выведением почками и отсутствием у Fc-фрагмента самостоятельной эффекторной функции. Fc-фрагмент IgG требует некоторой модификации для

улучшения фармакокинетических и эффекторных свойств нанотел [De Vlieger D., 2018] и повышения их авидности за счет димеризации молекулы.

В представленной работе была изучена возможность отбора антител, специфических GP белку, а также получение на их основе молекул, обладающих нейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола.

### **1.7 Коронавирус SARS-Cov-2. Выбор мишени для разработки средства терапии заболевания COVID-19.**

Коронавирусная инфекция COVID-19 – тяжелая острая респираторная инфекция. Впервые заболевание было выявлено в декабре 2019 года в Ухане, столице китайской провинции Хубэй, и с тех пор распространилось по всему миру, что привело к продолжающейся пандемии COVID-19 в 2019-2022 годах. Возбудителем заболевания COVID-19 является коронавирус SARS-Cov-2.

Коронавирусы представляют собой оболочечные вирусы, геном которых представлен одноцепочечной РНК длиной 26–32 т.п.н [Masters, P. S. 2006]. Коронавирусы относятся к подсемейству *Coronaviridae Orthocoronavirinae* включают четыре рода: альфа-коронавирусы, бета-коронавирусы, гамма-коронавирусы и дельта-коронавирусы [Weiss, S. R. 2005]. Бета-коронавирус в свою очередь подразделяется на пять подродов. Хотя вирус инфекционного бронхита был первым коронавирусом, выделенным в куриных эмбрионах в 1937 году [Cavanagh, D 2005], только в 1960-х годах эти вирусы, особенно респираторные коронавирусы человека [Hamre, D. 1966], были охарактеризованы с помощью электронной микроскопии. Шиповидные белки или гликопротеины S, находящиеся на поверхности вириона формируют солнечную корону, откуда эти вирусы в последствие и получили свое название.

Коронавирусы характеризуются высокой скоростью генетической рекомбинации и мутаций, значительно превышающую даже характерную для вируса гриппа А, что обуславливает их разнообразие и распространение среди различных видов животных и человека [Cui, J., 2019]. Среди коронавирусов человека выделяют семь видов: 229E, OC43, NL63 и HKU1. Указанные вирусы

в структуре заболеваний ОРВИ составляют ежегодно от 10 до 30% [Fung, T. S. 2019]. При этом, коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома (SARS-CoV), коронавирус ближневосточного респираторного синдрома (MERS) и коронавирус тяжелого острого респираторного синдрома 2 (SARS-CoV-2) не получили такого широкого распространения за счет низкой контагиозности, однако способны вызывать тяжелые респираторные заболевания человека, с высокой смертностью. В 2002–2003 гг. SARS-CoV привел к 8096 зарегистрированным случаям заболевания и 774 смертельным исходам (коэффициент летальности ~10%) [de Wit, E. 2016]. В конце декабря 2019 г. были зарегистрированы кластерные случаи тяжелой пневмонии, а этиологический агент был выделен и идентифицирован как новый бета-коронавирус, названный SARS-CoV-2, который примерно на 80% похож по последовательности генома на SARS-CoV [Wu, F. et al 2020]. SARS-CoV-2 вызывает заболевание COVID-19 с такими симптомами, как лихорадка, кашель, утомляемость, тошнота и одышка [Harrison, A. G. 2020]. На сегодняшний день во всем мире зарегистрировано более 160 миллионов подтвержденных случаев заболевания COVID-19 и более 3 миллионов связанных с ним смертей [Johns Hopkins Coronavirus Resource Center, 2021].

В связи со стремительным и непрерывным распространением COVID-19 во всем мире с начала пандемии большое количество исследований было направлено на изучение структуры SARS-Cov-2 с целью определения и изучения мишени для лекарств и средств профилактики. Геном SARS-CoV-2 имеет размер около 30 kb, представлен одноцепочечной РНК и кодирует 29 вирусных белков, среди которых выделяют 16 неструктурных белков (NSP), участвующих в репликации и транскрипции вируса, а также структурные белки, которые включают нуклеокапсид (N), шиповидный белок (S), белок мембраны (M) и белок оболочки (E), которые обеспечивают сборку вириона и ускользание вируса от иммунной системы хозяина [Chen, Y. 2020]. Кроме того, геном вируса SARS-Cov-2 содержит ряд генов, кодирующих белки,

участвующие в регуляции вирусной инфекции. К ним относятся белки ORF3a, ORF3b, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8b, ORF9b и ORF14.

При попадании вируса SARS-Cov-2 в организм хозяина происходит первичное взаимодействие поверхностного гликопротеина S вируса с рецептором ACE2, экспрессируемым на мембране клеток человека. Далее, в результате конформационных изменений гликопротеина S происходит слияние вирусной и клеточной мембран и высвобождение вирусной РНК в цитоплазму. На следующем этапе, используя рибосомальный комплекс клеток хозяина происходит синтез основной протеазы M<sub>pro</sub> и папаин-подобной протеазы PL<sub>pro</sub>, которые обеспечивают формирование 16 зрелых неструктурных вирусных белков. Далее, неструктурные белки формируют комплекс репликации и транскрипции, обеспечивающий начало вирусной репликации РНК. После синтеза оцРНК вируса SARS-Cov-2 и основных структурных белков происходит формирование зрелых вирионов, которые высвобождаются в межклеточное пространство методом экзоцитоза. Новые вирусные частицы далее способны инфицировать клетки хозяина в следующем раунде жизненного цикла SARS-Cov-2 (Рисунок 9) [Harrison, A. G. 2020].

### ***Шиповидный белок (S) и его роль проникновении вируса в клетку.***

Белок S представляет собой гомотример, который представлен на поверхности вириона в виде короны. Шиповидный белок S имеет несколько сайтов гликозилирования, имеет несколько конформационных состояний и представлен на поверхности вириона. Как было указано выше, S белок обеспечивает первичный контакт с ACE2 рецептором на поверхности клетки хозяина [Belouzard, S. 2012]. В нативном состоянии шиповидный белок S находится в нескольких конформациях - «prefusion» и «postfusion».

S-белок SARS-CoV-2 состоит примерно из 1200 аминокислотных остатков и может быть расщеплен фуриноподобной протеазой на две функциональные субъединицы, S1 и S2, которые отвечают за прикрепление к клеткам-хозяевам и слияние мембран соответственно [Walls, A. C. et al 2020]. Во время

интернализации вируса субъединицы S1 и S2 остаются связанными друг с другом посредством нековалентных взаимодействий. Субъединица S1 включает рецептор-связывающий домен (RBD) и N-концевой домен (NTD) (Рисунок 10).

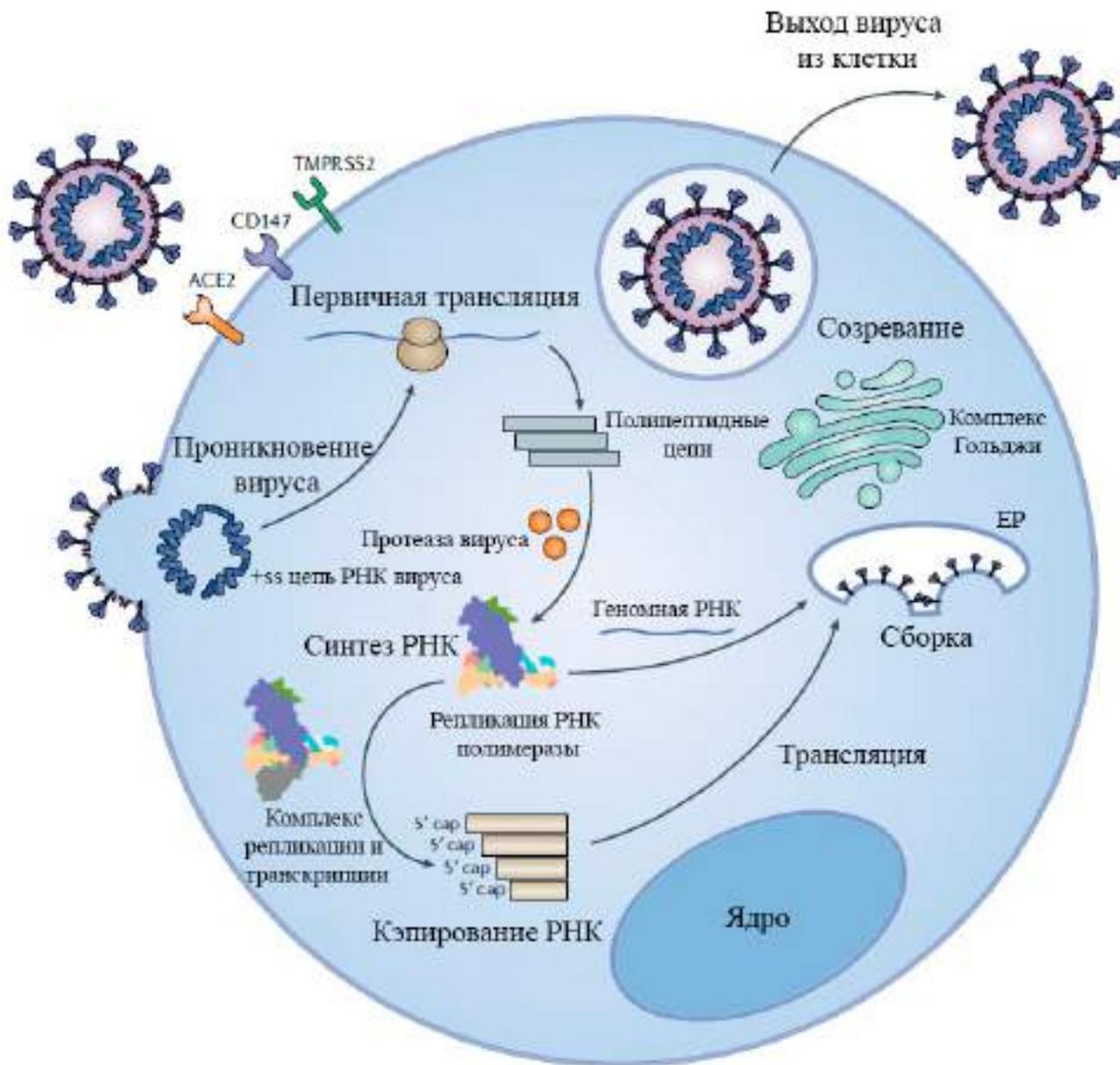


Рисунок 9. Жизненный цикл вируса SARS-CoV-2.

Рецептор связывающий мотив (RBM), находящийся в средней части рецептор-связывающего домена формирует основной интерфейс связывания шиповидного белка и ACE2 рецептора. Как было отмечено выше, рецептор-

связывающий домен (RBD) находится в двух конформационных состояниях: закрытое «нижнее» состояние и открытое «верхнее» состояние [Wrapp, D. et al. 2020]. В закрытом состоянии RBD расположен близко к центральной плоскости тримера и таким образом интерфейс взаимодействия с ACE2 рецептором находится в недоступной конформации. При этом, при формировании «открытой» конформации шиповидного белка благодаря своей подвижности становится доступным сайт связывания с ACE2 на клеточной мембране хозяина. При этом, роль N-концевого домена NTD не до конца изучена, однако известно, что он выполняет вспомогательную роль при первичном взаимодействии вируса с клеткой. Шиповидный белок S включает также субъединицу S2, включающую достаточно консервативные участки, к которым относятся пептид слияния, два гептадных повтора (HR1 и HR2) и трансмембранный домен.

В результате структурной перестройки от метастабильной конформации «pre-fusion» к конформации «post-fusion», S-белок выполняет свою функцию в регуляции слияния вирусной мембраны с мембраной клетки-хозяина. Слияние запускается, когда субъединица S1 связывается с hACE2 (Рисунок 10B). Как видно в сложной структуре, N-концевая спираль hACE2 взаимодействует с внешней поверхностью RBM в субъединице S119-22. Во взаимодействии участвуют 16 остатков в RBD и 20 остатков в hACE2, что образует сеть, состоящую из 14 водородных связей и одного солевого мостика. Связывание hACE2 с RBD может блокировать RBD в открытой конформации и запускать отщепление S1, которое опосредовано протеолитическим расщеплением TMPRSS2 хозяина и катепсином В или катепсином L. Таким образом, три спирали HR1 тримерного S2 взаимодействуют со спиралью HR2 и составляют стабильный шестиспиральный пучок. В этом уникальном спиралевидном пучке три спирали HR2 упакованы в гидрофобные бороздки ядра HR1-тримера антипараллельно. Это конформационное расположение сближает мембраны вируса и клетки-хозяина и облегчает последующее слияние мембран. Из-за незаменимой функции S-белка он является привлекательной мишенью для ингибирования нейтрализующими антителами (nAb), а характеристика

структуры S-белка предоставляет информацию на атомарном уровне для рационального дизайна вакцины или средств терапии.

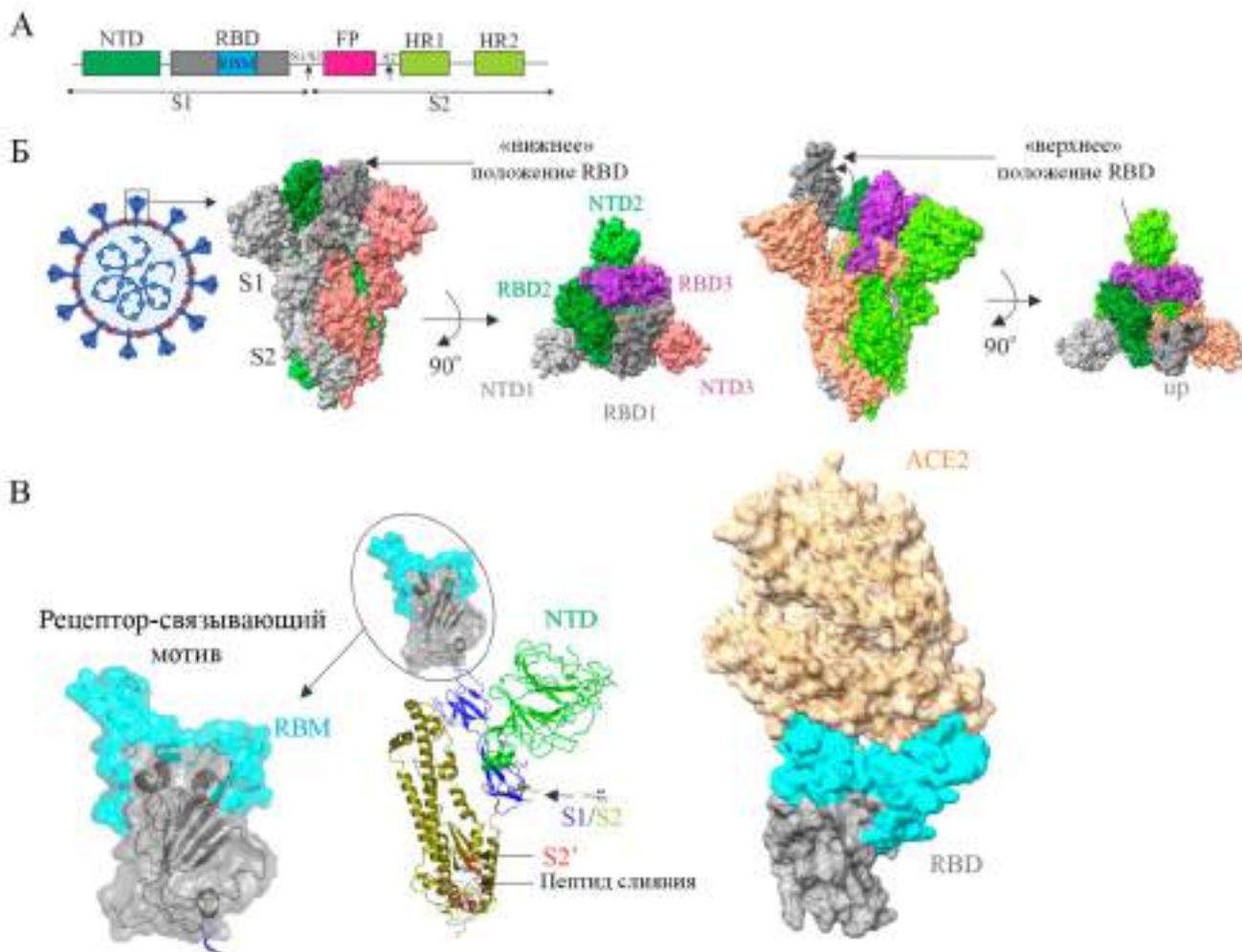


Рисунок 10. Структура тримера шиповидного белка S вируса SARS-CoV-2. А) схема генетической последовательности, кодирующей шиповидный белок S вируса SARS-CoV-2; Б) Слева: тримерный шиповидный белок в «закрытой» конформации RBD; справа: вид сверху на тримерный шиповидный белок; В) Схематическое расположение шипового белка показано вверху. Справа: структура мономера, демонстрирующего RBD в открытой конформации. В структуре спайкового белка субъединица S1, связывающаяся с рецептором, и субъединица S2, связывающаяся с мембраной, разделены сайтом фуриноподобной протеазы (S1/S2). Различные субдомены шиповидного белка: NTD (зеленый), RBD (серый), содержащий RBM (голубой) вверху, пептид слияния (розовый). Ножницы представляют собой границу S1/S2 в положении аминокислоты 685. Слева: открытая конформация RBD выделяет 3 различных

области: гребень, связывающий рецептор, плоскую поверхность и петлю 443–450 RBM, которые образуют ACE2-связывающую область. ACE2, ангиотензинпревращающий фермент 2;

### ***Шиповидный белок как мишень для действия нейтрализующих антител***

Антитела, нейтрализующие S-белок (nAb) вируса SARS-CoV-2, продемонстрировали защиту от вирусной инфекции на животных моделях и проходят испытания в качестве терапевтических средств у людей. Эти антитела как правило включают человеческие моноклональные антитела, выделенные от выздоравливающих доноров COVID-19 или гуманизированные аналоги антител, полученных из гибридом. Рентгеноструктурный анализ комплексов nAb с S-тримером позволил идентифицировать механизмы нейтрализации вируса. Хотя некоторые nAb нацелены на NTD или S2, большинство nAb связываются с RBD, который в свою очередь может быть дополнительно классифицирован на четыре отдельных класса (классы I, II, III и IV) на основе характеристик связывания nAb-RBD. nAb класса I могут связываться с RBD только в «открытой» конформации (рисунок 11). В результате прямой конкуренции с hACE2 nAb этого класса будут создавать стерические препятствия при связывании с RBD, блокируя присоединение hACE2. CB6 [Shi, R. et al. 2020], C105 [Barnes, C. O. et al 2020], CV30 [Hurlburt, N. K. et al 2020], B38 [Wu, Y. et al 2020], CC12.1, CC12.3 [Yuan, M. et al. 2020], PR1077 [Fu, D. et al. 2021] и P4A1 [Guo, Y. et al. 2021] nAb принадлежат к этому классу. Большинство из них содержат тяжелые цепи, кодируемыеIGHV3-53 или IGHV3-66. Нейтрализующие антитела класса II также связываются с RBD в «открытой» конформации, но не перекрывают сайт связывания hACE2. CR3022 [Yuan, M. et al. 2020], EY6A32 [Wrapp, D. et al. 2020] принадлежат к этому классу. Область связывания расположена в нижней части RBD и пространственно отделена от сайтов связывания hACE2. Структурный анализ показал, что RBD подвергается вращению, которое обнажает эпитопы для этих

nAb. Считается, что такая перестройка вызывает преждевременное превращение белка S из pre-fusion состояния в post-fusion. В результате нестабильная конфигурация белка S приводит к инактивации SARS-CoV-2.

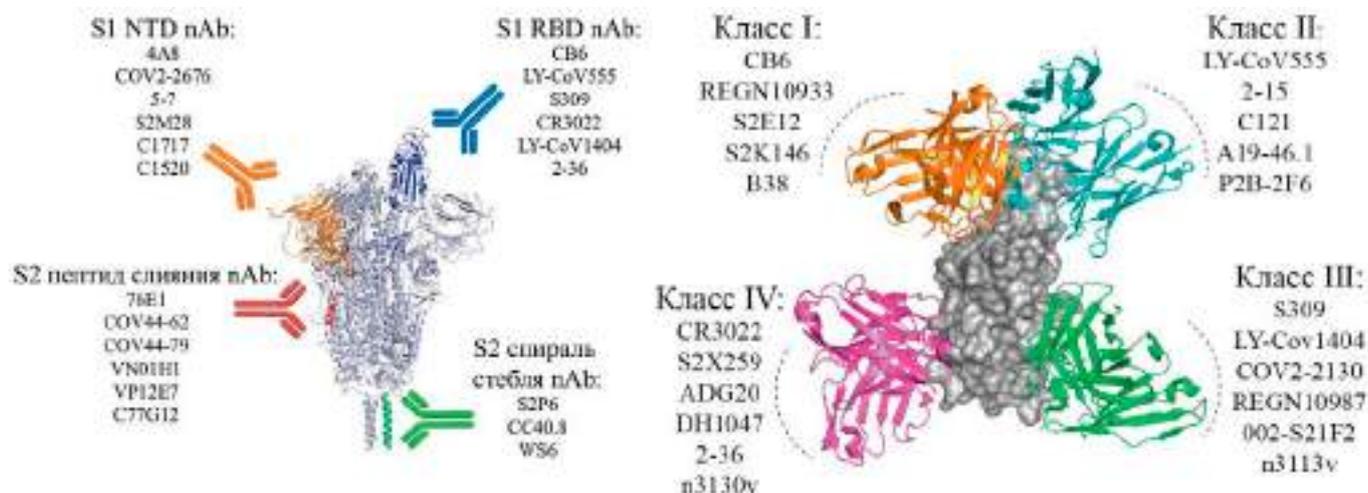


Рисунок 11. Нейтрализующие антитела, направленные против шиповидного белка SARS-CoV-2. Различные группы нейтрализующих антител (nAb), нацеленных на S-белок. nAb, нацеленные на N-концевой домен S1 (NTD), рецептор-связывающий домен S1 (RBD) и области стержневой спирали S2 и пептида слияния S2. nAb, специфичные RBD можно разделить на четыре основных класса в зависимости от эпитопов, с которыми они связываются.

Нейтрализующие антитела класса III могут связываться с RBD только в «закрытой» конформации. Предполагается, что N-гликановые цепи играют значительную роль в стабилизации связывания nAb класса III с RBD в такой конформации. Кроме того, эпитопы некоторых nAb могут частично перекрываться с NTD. В совокупности, взаимодействие антител с такой конформацией RBD приводит к его блокированию, что препятствует его стерическому доступу hACE2. Нейтрализующие антитела класса II могут распознавать как «открытую» так и «закрытую» конформацию RBD. Как правило, это три эпитопа, в основном расположенных на противоположной стороне RBM по сравнению с эпитопами nAb класса I. Частично перекрываясь с сайтом связывания hACE2, эти антитела также стерически блокируют

связывание hACE2 с RBD. При этом, антитело S309 относящееся к классу III, взаимодействует на регион, отличный от RBM. Его эпитоп включает спираль  $\alpha 1$ , участок цепи  $\beta 1$  и две петли, образованные остатками 358–361 и 333–335. RGEN10987 — еще одно nAb класса VI, которое связывается дистальнее сайта связывания hACE2. Связывание этого nAb пространственно препятствует прикреплению hACE2.

Что касается субъединицы S2, то сообщалось только о нескольких моноклональных антителах обладающих нейтрализующим действием. Было обнаружено, что антитело 1A9 [Zheng, Z. et al. 2020] взаимодействует с субъединицей S2, но не может нейтрализовать SARS-CoV-2. В недавнем исследовании было обнаружено, что nAb CC40.8 нейтрализует SARS-CoV-2 и специфически распознают субъединицу S2 [Song, G. et al. 2021].

Таким образом, многочисленные исследования показывают, что шиповидный белок S вируса SARS-Cov-2 и, в частности, его рецептор-связывающий домен могут быть перспективной мишенью для разработки средств терапии на основе нейтрализующих моноклональных антител. В настоящее время несколько моноклональных антител уже получили разрешение на экстренное использование для лечения COVID-19 и постконтактной профилактики. Этими антителами являются бамланивимаб/этесевимаб, казиривимаб/имдевивимаб, сотровивимаб и регданвивимаб [Dougan M., 2021; Gupta A 2021; Weinreich DM. 2021; Lee JY 2021]. Однако, эволюция вируса SARS-CoV-2 привела к появлению вариантов вируса, которые стали более трансмиссивными и менее чувствительными к нейтрализующим антителам. Распространение этих новых вариантов вируса снизило эффективность вакцин и некоторых терапевтических антител. Список этих вызывающих озабоченность вариантов (VOC) постоянно дополняется и состоит из большого числа штаммов: B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), B.1.1.28/P.1 (Gamma), B.1.617.2 (Delta) и B.1.1.529 (Омикрон) варианты (январь 2022 г., ВОЗ) и др. Снижение нейтрализующей активности антител вызвана мутациями в S гликопротеине, включая K417N/T, L452R, T478K, E484K и замены N501Y

[Harvey W.T., 2021]. Вариант Омикрон имеет более 30 мутаций в гликопротеине S, которые обеспечивают значительный уход от нейтрализации антителами [Planas D., 2021]. В связи с этим необходимость выделения антител, нейтрализующая активность которых не снижается из-за наблюдаемых мутаций или снижается незначительно, на сегодняшний день сохраняется.

В представленном исследовании были идентифицированы и охарактеризованы панель однодоменных антител, выделенных из библиотеки неканонических антител верблюда, которые специфически связывают RBD гликопротеина S. Была проведена оценка нейтрализующей активности выделенных антител в анализе микронейтрализации с живым SARS-CoV-2 и выбраны наиболее активные варианты. Для повышения терапевтического потенциала эти клоны были модифицированы в гомодимерные и гетеродимерные формы, и была исследована нейтрализующая активность в отношении разных вариантов SARS-CoV-2. На основе полученных данных был разработан препарат «ГамКовиМаб», для экстренной профилактики и этиотропной терапии заболевания COVID-19.

### **1.8 Ботулизм. Роль ботулотоксина А (BoNT/A) *C.botulinum* в развитии ботулизма**

Ботулизм – это тяжелое заболевание человека и животных, возникающее в результате системного действия экзотоксина нейропаралитического действия, продуцируемого грамположительными, спорообразующими, облигатными анаэробными бактериями *Clostridium botulinum* (атипичные штаммы бактерий *Clostridium butyricum* и *Clostridium baratii* также способны продуцировать ботулинические токсины (BoNT) различных типов [Gill D., 1982].

*C.botulinum* представляет собой гетерогенный вид бактерий, который разделяется на четыре фенотипические группы (группы I, II, III и IV) на основе физиологических характеристик. *C.botulinum* I и II групп чаще всего являются причиной ботулизма у человека [Arnon, S., 2001]; III группа вызывает

заболевание у различных видов животных; IV группа бактерий не вызывает ботулизм у животных и человека [Yao G., 2017].

*C. botulinum* образует терmostойкие споры, которые прорастают в анаэробных условиях при наличии богатого питательными веществами субстрата, после чего превращаются в бациллы, продуцирующие BoNT [Graham, R. 1929].

Ботулинический токсин считается самым летальным из известных токсинов из-за его высокой активности со смертельной дозой от 1 нг до 3 нг токсина на 1 кг массы тела [Jeffery I.A., 2022]. Типичными симптомами интоксикации являются вялый мышечный паралич; часто изначально затуманенное зрение, за которым следует острый симметричный нисходящий двусторонний паралич, который, в случае отсутствия терапии, приводит к параличу дыхательных или сердечных мышц. Если тяжелые случаи не приводят к летальному исходу, то полное выздоровление может занять месяцы или годы.

Существует 6 форм ботулизма в зависимости от пути интоксикации: пищевой, раневой, младенческий, ингаляционный формы ботулизма, а также кишечная колонизация у взрослых [Sobel J., 2005]. Младенческий ботулизм — это инфекция, связанная с размножением бактерии и образованием BoNT в кишечнике; раневой ботулизм — связан с размножением бактерии и образованием BoNT в ране. Пищевой ботулизм — это интоксикация, вызванная употреблением уже образованного в пище BoNT. Пищевая форма ботулизма в основном связана с употреблением консервированных или ферментированных овощей, мяса или рыбы, домашних продуктов из фасоли, колбасы, хлопьев и любыми мясными продуктами [Sobel J., 2005].

Всего идентифицировано семь типов ботулинических токсинов (A, B, C, D, E, F и G), которые были обнаружены в течение 1919–1970 гг. [Sobel J., 2005]; большинство штаммов *C. botulinum* продуцируют только один тип токсина, хотя были идентифицированы штаммы, продуцирующие два типа токсинов [Maslanka S.E., 2016]. Все типы BoNT имеют сходную структуру, состоящую из

одной легкой цепи (цинк-зависимая эндопептидаза) (молекулярный вес 50 кДа) и одной тяжелой цепи (молекулярный вес 100 кДа), соединенных друг с другом одной дисульфидной связью (Рисунок 12).

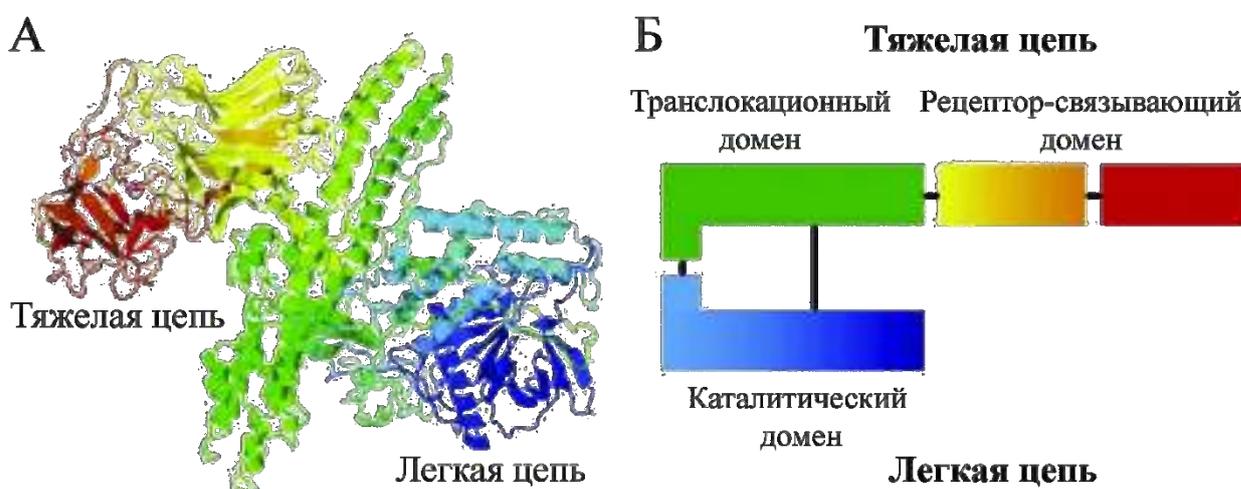


Рисунок 12 – Структура молекулы BoNT/A (А) и схематичное изображение его структуры с указанием основных доменов (Б). Адаптировано из [92].

Легкая цепь представляет собой активную часть, которая взаимодействует с одним из транспортных белков (SNARE) и препятствует высвобождению ацетилхолина, что приводит к нарушению передачи нервного импульса. Тяжелая цепь обладает высоким сродством к определенным рецепторам на пресинаптической мембране, обеспечивая быстрое и специфическое связывание BoNT с рецепторами на плазматической мембране холинергических аксонов. Это позволяет токсину эффективно блокировать передачу нервных импульсов, вызывая неврологические симптомы.

Ботулинический токсин попадает в кровеносную систему и транспортируется к окончаниям периферических холинергических нервов, включая нервно-мышечные соединения, окончания постганглионарных парасимпатических нервов и периферические ганглии [Humeau Y., 2000]. Все типы токсинов вызывают сходный клинический синдром паралича черепно-мозговых нервов с последующим нисходящим симметричным вялым параличом различной степени тяжести [Rao A.K., 2017].

Механизм действия BoNT включает первичное связывание тяжелой цепи с рецепторами на нервной клетки, интернализацией посредством рецептор-опосредованного эндоцитоза, а также транспортом токсина в цитоплазму клеток. В клетках благодаря наличию ферментативного домена токсин индуцирует гидролиз белков SNARE (SNAP-25, VAMP или синтаксин), участвующих в транспорте ацетилхолина пресинаптической мембраной [Rao A.K., 2021]. Вялый паралич возникает в результате блокирования передачи ацетилхолина через нервно-мышечные соединения путем ингибирования высвобождения ацетилхолина из пресинаптических окончаний мотонейронов [Humeau Y., 2000]. Большой молекулярный размер BoNT, вероятно, препятствует его проникновению через гематоэнцефалический барьер в центральную нервную систему [Rao A.K., 2021]. Ботулинический токсин может транспортироваться в центральную нервную систему аксонным транспортом, подобно столбнячному токсину, хотя прямого воздействия на центральную нервную систему у людей не зарегистрировано [Caleo M., 2018]. Восстановление паралича происходит после прорастания новых нервных окончаний.

Токсины серотипов А, В, Е и (реже) F вызывают ботулизм у человека. Токсин типа А вызывает наиболее тяжелый синдром с наибольшей долей пациентов, которым требуется искусственная вентиляция легких [Chatham-Stephens K., 2017]. Токсин типа В обычно вызывает более легкое заболевание, чем тип А [Chatham-Stephens K., 2017]. Сообщалось только о двух случаях заболевания людей от токсина типа С и одной вспышке, вызванной токсином типа D, все в 1950-х годах [Demarchi J., 1958]. Хотя токсин типа С блокирует нервно-мышечную передачу в тканях человека в лабораторных экспериментах, этот тип токсина не может всасываться в желудочно-кишечном тракте человека [Coffield JA., 1997]. Также сообщалось, что токсин типа D не блокирует нервно-мышечную передачу [Coffield JA., 1997]. О случаях заболевания людей токсином типа G не сообщалось. Интоксикация токсином типа Е, обычно связанная с употреблением в пищу продуктов водного происхождения,

вызывает ботулизм различной степени тяжести, который часто включает желудочно-кишечные симптомы. Случаи ботулизма типом F редки и характеризуются быстрым прогрессированием, обширным параличом и дыхательной недостаточностью, но с более ранним выздоровлением.

Помимо поддерживающей терапии ботулизма, она может включать в себя введение ботулинического антитоксина. Раннее введение антитоксина может уменьшить степень и тяжесть паралича, в некоторых случаях может предотвратить паралич дыхания, а в других случаях - сократить продолжительность ИВЛ [Rao A.K., 2021]. Назначение антибиотиков не показано при пищевом ботулизме [Robinson J.P., 2004]. Антитоксин замедляет прогрессирование паралича и уменьшает его продолжительность. Антитоксин эффективен при введении ранее, чем через 24 часа после появления симптомов, поскольку он нейтрализует только те молекулы токсина, которые еще не связаны с нервными окончаниями [Lutwick, 2009]. Однако использование такого антитоксина лошадиного происхождения имеет множество побочных эффектов, включая анафилаксию, различные реакции гиперчувствительности и сывороточную болезнь [Lutwick, 2009].

На сегодняшний день в Европе чаще всего используется семивалентная лошадиная антитоксическая сыворотка НВАТ. Препарат содержит фрагменты IgG, специфичные против семи типов BoNT, полученных из лошадиной сыворотки, состоящей из <2% интактных IgG и  $\geq 90\%$  фрагментов Fab или F(ab')<sub>2</sub> (бивалентная форма Fab) иммуноглобулина для снижения реакций гиперчувствительности. Однако Fab и F(ab')<sub>2</sub> выводятся из кровотока быстрее, чем интактные IgG, что сокращает период полувыведения НВАТ из плазмы и может потребовать дополнительных введений при ботулизме или длительном воздействии BoNT [Fagan R.P., 2011].

Кроме того, существует метод терапии, связанный с введением очищенных терапевтических антител человека. Такой препарат BabyBIG применяется для лечения младенческого ботулизма и не подходит для терапии ботулизма у взрослых. Данный препарат был недавно снят с производства и будет заменен

новым препаратом, который в настоящее время находится на стадии клинических исследований. Другие препараты для терапии интоксикации ВоNT различных типов представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Препараты поликлональных антител и сыворотки, применяемые для лечения и экстренной профилактики ботулизма

<b>Название</b>	<b>Тип ботулинического токсина</b>	<b>Производитель</b>
ВАТ-АВ и ВАТ-Е	А, В и Е	Sanofi Pasteur
Гептавалентный лошадиный антитоксин (НВАТ)	А–G	Cangene Corporation (США)
Трехвалентный лошадиный антитоксин	А, В, Е	Behring (Германия)
Трехвалентный лошадиный антитоксин	А, В, Е	Biomed (Польша)
Трехвалентный лошадиный антитоксин	А, В, Е	Instituto Butantan (Бразилия)
Бивалентный лошадиный антитоксин EqВА	А, В	Argentina Public Department of Health (Аргентина)
Четырехвалентный лошадиный антитоксин	А, В, Е, F	Chiba Serum (Япония)
Иммуноглобулин человека (Baby-BIG)	А, В	California Department of Public Health (США)

В данном научном исследовании была изучена возможность применения однодоменных антител, эффективно нейтрализующих ботулотоксин серотипа А *C. botulinum in vitro* и *in vivo* с целью терапии ботулизма.

## **1.9 *C.difficile*, роль токсина В (TcdB) в развитии патологий ассоциированных с *C. difficile* (антибиотикоопосредованные диареи (АОД) и псевдомембранозный колит (ПМК))**

*Clostridioides difficile* – грамположительный, спорообразующий, анаэробный подвижный микроорганизм, образующих в неблагоприятных условиях овалы субтерминальные споры, которые устойчивы к нагреванию и способны к длительному (в течение нескольких лет) сохранению способности роста при неблагоприятных условиях среды. *C. difficile* имеют убиквитарное распространение в природе, достигая высоких титров в почве. Такое повсеместное распространение, по-видимому, стало причиной колонизации среды желудочно-кишечного тракта многих видов животных (домашних и диких), включая человека. Согласно опубликованным данным процент бессимптомных носителей *C. difficile* достигает 12% от всей популяции [Ozaki E., 2004]. Значительно больший процент (до 51%) асимптомных носителей данной бактерии выявлен среди пациентов различных медицинских учреждений (главным образом, больницы, лечебно-реабилитационные центры для пожилых людей) [Riggs M.M., 2007]. При этом было показано, что *C. difficile* обнаруживается у данных лиц также в испражнениях, на коже и на внешних объектах, с которыми происходил контакт. В этой связи асимптомные носители *C. difficile* рассматриваются в качестве одного из главных факторов распространения данной бактерии. Несмотря на такую высокую распространенность *C. difficile* в популяции без видимых патологических изменений данный микроорганизм нельзя отнести к представителям нормальной микрофлоры человека в силу того, что в определенных условиях данная бактерия становится причиной таких достаточно редких, однако тяжело поддающихся терапии заболеваний, как антибиотикоопосредованные диареи (АОД) и псевдомембранозный колит (ПМК).

Центр по контролю и предотвращению заболеваемости США (CDC) приводит следующие факторы риска развития патологий ассоциированных с *C. difficile*:

- пожилой возраст (более 80% смертей, вызванных *C. difficile* происходят у пациентов старше 65 лет),
- прием антибиотиков (риск инфекции *C. difficile* возрастает от 7 до 10 раз),
- проведенное интенсивное медицинское вмешательство (операции, медицинские манипуляции) или длительное пребывание в медицинском учреждении.

Только в США по данным CDC регистрируется более 0,5 млн случаев заболеваний, вызванных инфекцией *C. difficile*. В Российской Федерации по данным публикации 2018 года заболеваемость составила 78,3 случаев на 1000 пациентов в год [Сухина М. А., 2018]. Основными факторами риска клостридиальной инфекции служат антибиотикотерапия и госпитализация в стационар. Риск заболевания повышается в 7–10 раз во время проведения курса лечения антибиотиками и на протяжении месяца после их отмены и остается повышенным в 2–3 раза на протяжении 3 месяцев после завершения антибиотикотерапии. Каждая последующая неделя госпитализации увеличивает риск инфицирования на 8% [Spigaglia P., 2016] Анализ выборки пациентов с жалобами на диарею, находящихся на стационарном лечении, показал, что уже у 37,5% патология вызвана инфекцией *Clostridioides difficile* [Huang H., 2014]. 20% всех госпитализированных пациентов становятся носителями *Clostridioides difficile*, 30% из которых впоследствии страдают диареей и воспалительными повреждениями кишечника [Crobach M.J.T., 2018]. При этом в различных ретроспективных исследованиях отмечается тенденция к увеличению частоты распространения заболеваемости. Так, в США в период с 2001 года до 2010 частота инфекций, вызванных *C. difficile*, выросла с 45 до 82 случаев на 100.000 населения [Reveles K.R., 2014]. В Италии частота инфекционных патологий, ассоциированных с *C. Difficile*, с 2010 года по 2014 год выросла еще более значительно – с 0,54 до 30,4 случаев на 100.000 населения [Alicino C., 2016].

Помимо неблагоприятного эпидемиологического прогноза данной группы заболеваний следует отметить также существующие трудности в области терапии. Антибиотикотерапия остается одним из основных инструментов в

терапии данной патологии. Однако данный подход стремительно теряет свою эффективность. Исследователи отмечают тенденцию к появлению новых резистентных к антибиотикам штаммов *C. difficile*, а также увеличению частоты выявления данных штаммов у пациентов с АОД и ПМК. Так, например, согласно панквропейскому исследованию, проведенному в 2015 году, частота обнаруживаемых антибиотик-резистентных штаммов *C. difficile* достигла 50% [Freeman J., 2015]. Проведенный анализ частоты обнаружения штаммов *C. difficile* резистентных к 30 основным антибиотикам показал, что с 2012 года до 2015 года частота резистентных форм в отдельных странах к клиндамицину возросла с 8,3% до 100%, эритромицину с 13% до 100%, метронидазолу до 25% и ванкомицину до 58% [Peng Z., 2017]. Высокий процент распространенности как моно- так и полирезистентных форм *C. difficile* приводит к увеличению затрат на диагностику (определение антибиотикочувствительности) и, соответственно, терапию (требует применения более сложных схем антибиотикотерапии), а также применения антибиотиков в более высоких дозах, что в свою очередь повышает риск развития побочных эффектов. Так, согласно недавно проведенному исследованию в США средняя стоимость лечения пациентов с первичной и вторичной инфекцией *C. difficile* составила 13168 и 28218 долларов США [Shah D.N., 2016]. При этом эффективность такой терапии не является 100%. Согласно данным CDC в среднем у 1 из 6 пациентов, перенесших первичную инфекцию *C. difficile* развивается повторная (вторичная) инфекция в течение 2-8 недель.

В таких условиях крайне актуальным является поиск принципиально иных подходов в борьбе с заболеваниями, вызванными *C. difficile*. Согласно современным представлениям среди наиболее перспективных методов борьбы с инфекцией *C. difficile* является разработка новых препаратов для иммунотерапии [Giau V.V., 2019]. В частности разработанные препараты на основе моноклональных антител нейтрализующих токсин А (Actoxumab) и токсин В (Bezlotoxumab) показали не только 80% эффективность при индивидуальной терапии первично возникшей инфекции, но и почти 2-х

кратное снижение частоты возникновения последующих рекуррентных форм инфекций [Wilcox M.H., 2017]. Стоит отметить при этом, что стоимость одной дозы препарата Bezlotoxumab составляет 4,560 долларов США [Forster B., 2018], что накладывает существенные ограничения на широкое применение данного препарата. Отсутствие широкомасштабного применения препаратов для иммунотерапии и иммунопрофилактики инфекций вызванных *C. difficile* не позволяет переломить ухудшающуюся эпидемиологическую ситуацию по данной группе заболеваний.

Основными факторами патогенности *C. difficile*, играющими ключевую роль в патогенезе таких инфекционных заболеваний как АОД и ПМК, являются токсины А (TcdA) и В (TcdB). Данные токсины отличаются от подобных у других токсигенных бактерий включением рецептор-связывающего и каталитического домена в состав одной молекулы, что в свою очередь отразилось на размере белков: TcdA состоит из 2710 аминокислотных остатков и его молекулярная масса составляет 310 кДа, тогда как TcdB состоит из 2366 аминокислотных остатков и имеет массу 270 кДа. Общая доменная структура токсина В представлена на рисунке 13.

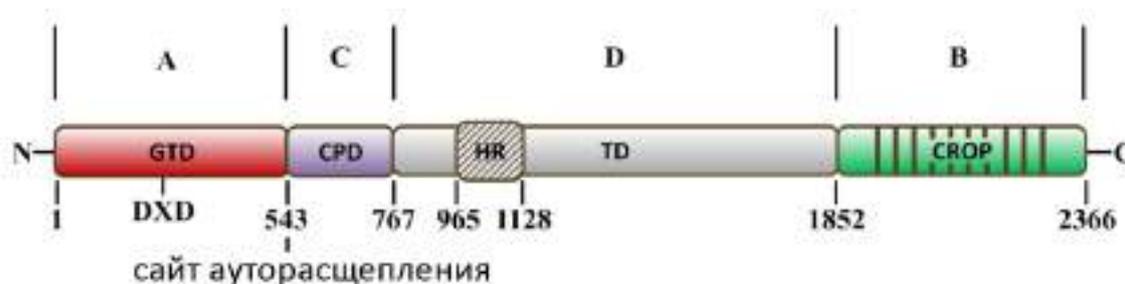


Рисунок 13 - ABCD модель строения токсина В *Clostridioides difficile*. А домен, содержащий DXD (Asp286/Asp288) мотив находится на N конце белка (с 1 по 543 а.к.), обозначен красным цветом. Обладает глюкозилтрансферазной активностью (GTD). Напротив, на С конце находится рецептор связывающий домен (с 1852 по 2366 а.к.), обозначенный зеленым цветом. Данный домен сформирован повторяющимися повторами, названными комбинированные олигопептидные повторы (CROPs). Фиолетовым цветом обозначен домен (с 544 до 767 а.к.) с цистеин протеазной активностью (CPD) позволяющий проводить

ауторасщепление полноразмерного токсина. Средняя часть является доменом (TD) позволяющим проводить транслокацию токсина внутрь эукариотической клетки. Данный домен участвует в формировании поры, конформационных изменений токсина, а также доставке глюкозилтрансферазы к внутриклеточным белковым мишеням.

Как и многие другие белковые бактериальные токсины, мишенями которых являются внутриклеточные молекулы эукариотических клеток токсины TcdA и TcdB *C. difficile* работают поэтапно:

- 1) связываются с рецепторами, расположенными на поверхности эукариотических клеток,
- 2) проходят стадию эндоцитоза в комплексе с рецептором,
- 3) проводят транслокацию через мембрану эндосом клетки в цитоплазму,
- 4) подвергаются стадии процессинга (протеолизу), позволяющему высвободить фрагмент токсина, обладающий каталитической активностью,
- 5) модифицируют целевую молекулярную мишень нарушая функционирование последней.

С точки зрения разработки иммунопрофилактических средств особый интерес представляет С-концевой участок, называемый доменом В или CROPs доменом. Он ответствен за взаимодействие молекулы токсина с рецепторами эукариотических клеток: хондроитин сульфат протеогликан 4 (CSPG4), а также представители семейства Frizzled рецепторов (FZD). Название “CROPs” – C-terminal combined repetitive oligopeptides обозначает, что данный участок образован СООН-концевыми комбинированными повторяющимися олигопептидами.

Для токсинов *C. difficile* также была получена 3D структура наглядно демонстрирующая дистанцирование домена CROPs от остальной части токсина, что предоставляет данному участку максимальную свободу для взаимодействия с рецепторами клеток организма-хозяина. На рисунке 14 представлена кристаллическая структура TcdB.

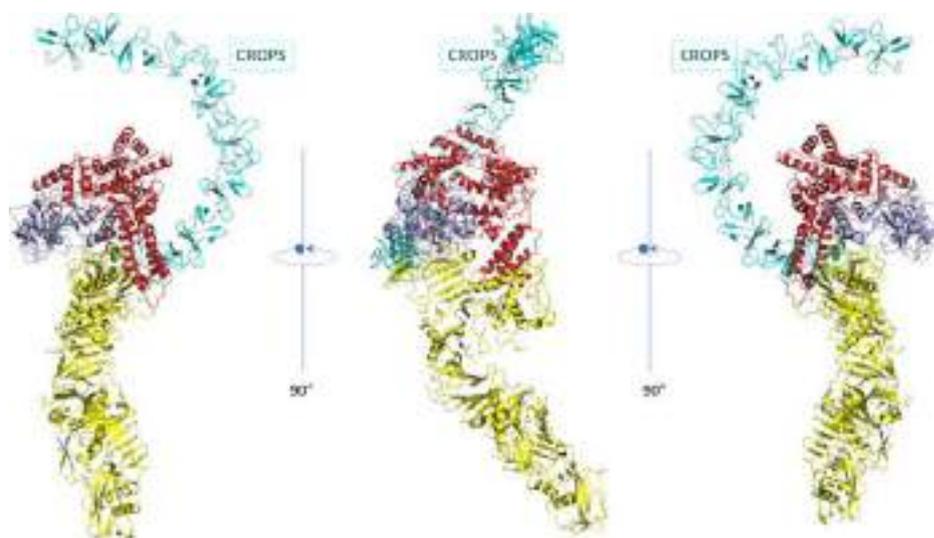


Рисунок 14 — Кристаллическая структура токсина TcdB *C. difficile*. Голубым выделена аминокислотная последовательность CROPs домена

Перспективным подходом позволяющим снизить вирулентность *C. difficile* является нейтрализация токсигенной активности TcdA и TcdB за счет связывания доменов CROPs. Блокирование взаимодействия токсинов с клеточными рецепторами способно предотвратить их токсигенное действие еще на внеклеточном этапе их присутствия в организме человека. Для связывания доменов CROPs могут быть использованы как рекомбинантные моноклональные антитела, вводимые в терапевтическом режиме, так и антитела секретируемые плазмочитами хозяина. Стоит отметить, что оба зарегистрированных для клинического применения препарата антител на основе моноклональных антител нейтрализующих токсин А (Actoxumab) и токсин В (Bezlotoxumab) имеют места связывания как раз в структуре доменов CROPs TcdA и TcdB, соответственно [Hernandez L.D., 2017]. Данные препараты антител показали не только 80 % эффективность при индивидуальной терапии первично возникшей инфекции, но и почти 2-х кратное снижение частоты возникновения последующих рекуррентных форм инфекций [Wilcox M.H., 2017]. В данном научном исследовании была изучена возможность получения однодоменных антител, эффективно нейтрализующих токсин В *C. difficile*.

### **1.10 *Mycoplasma hominis* и ее роль в патогенезе урогенитальной инфекции человека**

*Mycoplasma hominis* – первый вид микоплазм, изолированный из материала, полученного от человека. *M. hominis* обнаруживается в образцах из нижней части урогенитального тракта. При этом часто наблюдается бессимптомная персистенция *M. hominis*. Частота таких случаев варьирует в зависимости от пола, расы, возраста, сексуальной активности, гормонального статуса и может достигать десятков процентов [Arya и др., 2001]. Отчасти именно из-за такой высокой частоты обнаружения среди здоровых людей *M. hominis* было принято считать микроорганизмом-комменсалом и компонентом нормальной микрофлоры генитального тракта. Тем не менее в резонансной работе коллектива авторов, в том числе из ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи», была показана ассоциация *M. hominis* со злокачественными опухолями простаты [Вагукова и др., 2011]. Предположительный механизм вовлечения *M. hominis* в процесс онкотрансформации связан с хроническим провоспалительным статусом тканей, зараженных микоплазмой, а также с возможным супрессорным действием микоплазмы на нормальные механизмы клеточной гибели [Gudkov 2011].

Тревожные опасения при обнаружении *M. hominis* у беременных женщин связаны с высоким риском инфицирования плода –вероятность передачи новорожденным может достигать 60% [Sobouti и др., 2014]. Показана этиологическая роль *M. Hominis* в постабортивных и постродовых осложнениях, а также в преждевременных родах и недостаточном весе новорожденных [Agger и др., 2014]. Также хроническая инфекция *M. hominis* может играть роль в воспалительных заболеваниях урогенитального тракта, которые приводят к бесплодию [Moghadam и др., 2014].

Одной из наиболее часто встречающихся патологий, с симптомами которых ассоциировано выявление *M. hominis*, является бактериальный вагиноз. Хотя *M. hominis* не является этиологическим агентом заболевания, она часто обнаруживается в высоком титре в вагинальных образцах у женщин с

таким диагнозом [Keane и др., 2000]. Современные представления о нормальном функционировании организма свидетельствуют о ключевой роли микрофлоры в этом процессе. В последние годы активное изучение микробиома человека привело к пониманию сложности взаимодействий микроорганизмов различных групп в условиях колонизации различных экологических ниш в организме человека. Роль *M. hominis* во взаимодействии с микроорганизмами других видов пока остается неизученной. Тем не менее, имеется несколько важных работ, которые позволяют предполагать, что *M. hominis* активно взаимодействует с другими микроорганизмами. Так, показано, что *M. hominis* может проникать внутрь клеток *Trichomonas vaginalis* и реплицироваться в ассоциации с этим простейшим [Dessi и др., 2006]. Более того, в свете полученных данных, подобные взаимоотношения в ключе патогенеза обоих организмов носят взаимовыгодный характер. Синергизм *M. hominis* и *T.vaginalis* не только обеспечивают инфицирование эукариотических клеток, но и обладает потенциалом к созданию необходимого провоспалительного статуса инфицированных тканей [Fiogi и др., 2013].

Особый интерес представляет недавняя работа российских ученых, которые обнаружили ассоциацию *M. hominis* с офтальмологическим заболеванием – хроническим синдромом «сухого глаза» [Voiko и др., 2014]. Это исследование является примером патогенетической роли микоплазмы в заболевании слизистой оболочки вне урогенитального тракта.

Помимо патологий, ассоциированных со слизистыми оболочками, *M. hominis* может вызывать инфекции мягких тканей, главным образом у пациентов с иммунодефицитным статусом и после операционного вмешательства [Miranda и др., 2005].

Несмотря на широкий спектр патологических состояний, определенную роль в формировании которых играет *M. hominis*, единственным средством терапии до сих пор является антибиотикотерапия. К антибиотикам, которые назначают при микоплазменных инфекциях, относятся препараты из групп тетрациклинов, макролидов, фторхинолонов, линкозаминов и

аминогликозидов. Большинство из этих препаратов имеет строгие ограничения при назначении отдельным группам пациентов, главным образом детям и беременным женщинам, для которых *M. hominis* представляет особую угрозу. Более того среди микоплазм наблюдается растущая антибиотикорезистентность [Parvege, Rahman, Hossain, 2014]. Приведенные данные свидетельствуют о необходимости разработки новых препаратов, а поиск мишеней для направленного действия таких препаратов является актуальной задачей. В конце 2014 года была опубликована работа, в которой был проведен комплексный геномный анализ для идентификации новых потенциальных мишеней противомикоплазменных препаратов. В этом исследовании учитывались не только видоспецифичность потенциальных белков-мишеней и их необходимость для жизнедеятельности *M. hominis*, но и локализация в клетке, а также учитывался опыт разработки лекарств против других бактериальных патогенов. В результате были выделены потенциальные группы белков, вовлеченные в жизненно необходимые метаболические цепочки, которые включали в себя 5 наиболее многочисленных групп относящихся к функционированию рибосом, гомологичной рекомбинации, АВС-транспортерам, биосинтезу вторичных метаболитов и биосинтезу аминокислот [Parvege, Rahman, Hossain, 2014]. Одним из наиболее потенциально успешных классов препаратов для блокирования функции этих систем, на наш взгляд, могут являться препараты на основе неканонических антител представителей семейства верблюдовых (VНН или nanobody®), обзору которых посвящен предыдущий раздел.

Таким образом, получение однодоменных антител к антигенам *M. hominis*, является актуальной задачей. Специфические однодоменные антитела могут быть использованы для создания диагностических тест-систем, а также могут быть использованы для пассивной иммунизации от инфекций, вызванных *M. hominis*.

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### 2.1. Материалы, использованные в диссертационной работе

#### 2.1.1 Оборудование

В работе использовали стандартное лабораторное оборудование: набор автоматических дозаторов переменного объема серии PIPETMAN L (Gilson, США); Дозаторы пипеточные электрические Easypet (Eppendorf, Германия); термостат воздушный RS 422 (Binder, Германия); термостат твердотельный с термостатируемой крышкой «Гном» (ДНК-технология, Россия) и Bio TDB-100 (BioSan, Латвия); вортекс Reax Top (Heidolph, Германия); шейкер орбитальный с набором держателей PSU-20i (BioSan, Латвия); ротатор для пробирок Multi Bio RS-24 (BioSan, Латвия); весы аналитические Explorer EX224 (MettlerToledo, Германия); весы Scout Pro SPS601F (MettlerToledo, Германия); магнитная мешалка MMS-3000 (BioSan, Латвия); водяная баня WB-4MS (BioSan, Латвия); рН-метр с электродом FE20-Kit (MettlerToledo, Германия); автоклав горизонтальный 2340МК (Tuttnauer, Германия), 2540ML (Tuttnauer, Германия); термошейкер для планшетов PST-60HL-4 (BioSan, Латвия); шейкер инкубатор термостатируемый ES-20/60 (BioSan, Латвия); инкубатор-шейкер термостатируемый с охлаждением Ecotron (Infors, США); CO<sub>2</sub>-инкубатор мультигазовый WJ 3425 (Thermo, США); холодильные установки Carboma R700 (Полюс, Россия), морозильная (-20°C) и низкотемпературная (-70°C) MDF-DU300H-PE (PHSci, Сингапур); установки для работы с эукариотической культурой клеток также использовали инвертированный флуоресцентный микроскоп СКХ41 (Olympus, Япония), шейкер-инкубатор для культур клеток Multitron (Infors HT, Швейцария), волновой биореактор Biostat CultureBag RM (Sartorius, Германия). Ламинарные боксы БАВп-01 Ламинар-С II класса защиты (Ламинарные системы, Россия); шкаф ламинарный 2-го класса защиты Laminar Flow Cabinat (Esco, Сингапур); УФ-бокс для ПЦР (Биоком, Россия); аспираторы с колбой-ловушкой FTA-1 (BioSan, Латвия); камеры для горизонтальных электрофорезов в комплекте Mini-Sub cell GT и Sub-Cell® Model 96 (Bio-Rad, США); камера для вертикальных электрофорезов в комплекте Mini-

PROTEAN® (Bio-Rad, США); источник питания PowerPac™ Universal Power Supply (Bio-Rad, США) и Эльф-4 (ДНК-Технология, Россия); ПЦР-амплификатор C1000 ThermalCycler с подключаемым блоком для ПЦР в реальном времени CFX96 (Bio-Rad, США); водяная баня WB-4MS (BioSan, Латвия); мультимодальный ридер Varioscanner LUX (Thermo Scientific, США); планшетный спектрофотометр Multiskan EX (Thermo Scientific); концентрацию ДНК и белков определяли при помощи спектрофотометра NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США); денситометр Den-1 (BioSan, Латвия); результаты электрофорезов визуализировали путем проявления гелей с помощью Gel Doc EZ (Bio-Rad, США); установка для очистки воды ELIX-5 (Millipore, США); перенос белков для иммуноблоттинга проводили с помощью системы Trans-Blot Turbo Transfer System (Bio-Rad, США); СВЧ-печь ME73M1KR (Samsung, Малайзия); кюветный электропоратор MicroPulser Electroporator (Bio-Rad, США); проточный цитофлуориметр (Beckman Coulter, США); для визуализации результата иммуноблоттинга использовали анализатор Amersham Imager 600 (GE, США); подсчет клеток осуществляли с помощью автоматического счетчика TC20 (Bio-Rad, США); замороженные культуры эукариотических клеток хранили в криохранилище CY50945-70 (Thermo Scientific, США); для биослойной интерферометрии использовали прибор Octet RED96 (Sartorius, Германия) и сенсоры с иммобилизованным белком A Protein A (Sartorius, Германия) и Ni-NTA (Sartorius, Германия); для оценки аффинности взаимодействия антител с мишенями методом плазмонного резонанса использовали биосенсор Biacore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция); хроматографическую очистку BoNT/A, TcdB, белка GP вируса Эбола, RBD вируса SARS-Cov-2 и антител проводили с помощью хроматографических систем АКТА Start и АКТА Pure 25 (Cytiva, США); центрифуга с набором сменных роторов Centrifuge 5424 (Eppendorf, Германия); ультрацентрифуга L7 55 (Beckman Coulter, США); центрифуга с охлаждением с набором сменных роторов Centrifuge 5804 (Eppendorf, Германия); настольная мини-центрифуга-вортекс FVL-2400N (BioSan, Латвия), центрифуги Allegra 25R (Beckman Coulter,

США), Centrifuge 5804R и микроцентрифуга Centrifuge 5417C (Eppendorf, Германия), мини-центрифуга-вортекс FVL-2400N (BioSan, Латвия). Для доклинических исследований на животных использовали следующее оборудование: гематологический анализатор Гемалайт 1280 (Dixon, Россия), биохимический анализатор ERBA XL-100 (Erba Mannheim, Германия), анализатор мочи на тест-полосках URiСКАН-strip (Эйлитон, Россия), беспроводная система регистрации и анализа ЭКГ Физиобелт (Нейробиотикс, Россия), установка «Открытое поле» для крыс (OpenScience, Россия), анализатор коагулометрический АПГ4-03-Пх (Эмко, Россия), станция вырезки LDB2000 (LEEC Limited, Великобритания), тканевый процессор Leica TP1020 (Leica Biosystems, США), станция для заливки в парафин HistoCore Arcadia C (Leica Biosystems, США), ротационный микротом Leica RM2265 (Leica Biosystems, США), водяная баня для расправления срезов Leica HI1210 (Leica Biosystems, США), нагревательный столик Leica HI1220 (Leica Biosystems, США), автомат окрашивания Leica Autostainer XL ST5010 (Leica Biosystems, США).

### **2.1.2. Микроорганизмы и рекомбинантные вирусные векторы**

*M. arginini*, *M. pneumoniae*, *M. fermentans*, *M. arthritidis*, *M. orale*, *U. Urealiticum*, *M. Hominis* (H-34) и клинические изоляты 1, 2, 3, используемые для анализа специфической активности антител были предоставлены Раковской И.В. (лаборатория микоплазм и Л-форм бактерий ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ);

Клинический изолят *M. hominis* 1862.3 *TetR*, используемый в *in vivo* экспериментах был предоставлен В.Н.Лазаревым (лаборатория генной инженерии ФГБУН «НИИ физико-химической медицины ФМБА России»).

*C. botulinum* штамм А98, используемый для выделения ботулотоксина (BoNT/A), получен из коллекции группы клостридиозов (рук. Носков А.Н.) лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи».

*Escherichia coli* DH10B (NEB) *F*<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *endA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara leu*) 7697 *galU* *galK* *rpsL* *nupG*  $\lambda$ <sup>-</sup>, используемый для процедур молекулярного клонирования;

*E. coli* ER2738 (NEB) *F'**proA*+*B*+ *lacIq*  $\Delta$ (*lacZ*)*M15* *zzf::Tn10(TetR)/ fhuA2* *glnV*  $\Delta$ (*lac-proAB*) *thi-1*  $\Delta$ (*hsdS-mcrB*)5, используемый для получения бактериофагов;

*E. coli* TG1 (Lucigen, Middleton, WI, USA), используемый для получения рекомбинантных бактериофагов, был предоставлен Белым Ю.Ф. (лаборатория молекулярных основ патогенности ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ);

*E. coli* Rosetta (DE3) *pLysSF-* *ompThsdSB(RB- mB-)* *galdcml*(DE3 [*lacIIacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5*]) *pLysSRARE (CamR)*, используемый для продукции рекомбинантных белков, был предоставлен Белым Ю.Ф. (лаборатория молекулярных основ патогенности ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ);

*E. coli* BL21 cells (NEB, Ipswich, MA, USA) используемый для продукции рекомбинантных белков;

*E. coli* BJ5183 (Stratagene) *recB recC sbcB sbcC endA galK met thi-1 bioT hsdR rpsL(strR)*, используемый для гомологичной рекомбинации плазмид;

Штамм *Bacillus megaterium*, используемый для продукции CROPS *C.difficile*, был предоставлен Белым Ю.Ф. (лаборатория молекулярных основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ);

Рекомбинантный аденовирус Ad5-GP, несущий ген белка GP вируса Эбола (*H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1 isolate*; GenBank Accession No. KM233056) получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

Вирус Эбола вид Заир (ФГБУ «48 ЦНИИ» Министерства обороны России), используемый для оценки нейтрализующей активности однодоменных антител.

Рекомбинантный вирус везикулярного стоматита rVSV-GP, псевдотипированный белком GP вируса Эбола (*H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-*

G3735.1 isolate; GenBank Accession No. KM233056) получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

Коронавирусы SARS-CoV-2 вариантов В.1.1.1 (hCoV-19/Russia/Moscow\_PMV1-1/2020), В.1.351 (hCoV-19/Russia/SPE-RII-27029S/2021), В.1.617.2 (hCoV-19/Russia/SPE-RII-32758S/2021) и В.1.1.529 (hCoV-19/Russia/MOW-Moscow\_PMVLO16/2021) были выделены из назальных смывов в лаборатории государственной коллекции ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ (рук. Должикова И.В.);

Коронавирусы SARS-CoV-2 вариантов В.1.1.7 (hCoV-19/Netherlands/NoordHolland\_20432/2020) и В.1.1.28/P.1 (hCoV-19/Netherlands/NoordHolland\_10915/2021) были получены из Глобального Европейского архива вирусов;

Бактериофаг помощник KM13, получен Patrick Chames («Лаборатория разработки средств терапии на основе моноклональных антител и иммунотаргетинг» - the Cancer Research Center of Marseille, France);

Бактериофаг помощник M13 Hyperphage M13 K07ΔpIII (Progen, Germany, Cat No. PRHYPE);

### **2.1.3. Линии клеток млекопитающих, использованные в диссертационной работе.**

HEK-293 клетки эмбриональной почки человека, несущие в своем геноме E1 область аденовируса 5 серотипа;

A549 эпителиальные клетки аденокарциномы человека;

CHO-S клетки яичников китайских хомячков (Thermo Fisher Scientific, USA, Cat No. R80007);

Vero E6 клетки эпителия почек зеленой обезьяны (Chlorocebus sp. (ATCC CRL 1586) и GMK-AN-1(D) (CVCL\_L878) получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург, Россия, <https://www.incras.ru/institut/struktura/ckp/rossijskaja-kollekcijakletochnyh-kultur/>).

#### **2.1.4 Животные**

Мыши линий Balb/c, DBA/2 самки, 18-20 гр., получены из питомника «Пушино».

hACE2 трансгенные мыши линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J, получены из Jackson Laboratory, США.

Макаки резус получены из ФГБНУ «НИИ МП».

#### **2.1.5. Плазмидные векторы.**

pHEN-1 фагмидный вектор, используемый в процедуре фагового дисплея, получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pAL-TA-aMh06-ILZ и pAL-TA-PLAP-aMh06-FcG2a, содержащие последовательности, кодирующие соответствующие белки были синтезированы на коммерческой основе (ЗАО Евроген, Россия);

pSh-CMV и pAd-easy, используемые для получения рекомбинантных аденовирусов получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pVSV1-GP, pBs-N, pBs-P, pBs-L используемые для получения рекомбинантного вируса везикулярного стоматита;

pShuttle-CMV-Mab114HC, pShuttle-CMV-Mab114LC, используемые для продукции контрольного антитела Mab114, получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pET28c (Novagen, США), pET30b (Novagen, США), pHis1522 (MoViTec), используемые для экспрессии рекомбинантных белков были предоставлены Белым Ю.Ф. (лаборатория молекулярных основ патогенности ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ) а также получены на коммерческой основе (ЗАО Евроген, Россия);

pET30-B11, pET30-B11-dimer, pET30-G3, pET30-G3-dimer, используемые для продукции однодоменных антител клоны B11 и G3, а также их димерных

вариантов, были получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pFuse-Puro-G3-Fc, pFuse-Puro-B11-Fc, используемые для продукции однодоменных антител клоны B11 и G3, слитых с Fc-фрагментом IgG человека, были получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pHis1522 TcdB CROPS, используемый для продукции CROPS домена токсина В *C.difficile*, получен Белым Ю.Ф. (лаборатория молекулярных основ патогенности ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ);

pHEN1-D6.1-dimer, pHEN1-C7.2-dimer, pHEN1-A3.2-dimer, pHEN1-D6.1-C7.2, pHEN1-D6.1-A3.2, pHEN1-C7.2-A3.2, используемые для продукции димерных молекул однодоменных антител, специфичных CROPS домену токсина В *C.difficile* были получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pShuttle-CMV-GP, используемый для продукции белка GP вируса Эбола (Макона), получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pFuse-Puro-aEv6-Fc, используемый для продукции однодоменного антитела aEv6, слитого с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека, получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pSEP-RBD-SARS-CoV2, используемый для продукции рецептор-связывающего домена вируса SARS-Cov-2 (YP\_009724390.1 GenBank), получен в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pHEN1-(P2C5)2, pHEN1-(P2G1)2, pHEN1-(P5F8)2, pHEN1-P2C5-P2G1, pHEN1-P2C5-P5F8, pHEN1-P2G1-P2C5, pHEN1-P2G1-P5F8, pHEN1-P5F8-P2C5, pHEN1-P5F8-P2G1, используемые для продукции гомодимеров и гетеродимеров однодоменных антител, специфичных RBD вируса SARS-Cov-2,

получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pFuse-Puro-P2C5-Fc, pFuse-Puro-P2G1-Fc, pFuse-Puro-P5F8-Fc, используемые для продукции однодоменных антител, специфичных RBD вируса SARS-Cov-2, слитых с Fc-фрагментом иммуноглобулина человека, получены в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ;

pBlu2-Puro-P2C5-Fc, pBlu2-Puro-XR19-НС и pBlu2-Puro-XR19-LC, используемые для получения стабильных продуцентов моноклональных антител клонов P2C2 и XR19, входящих в состав препарата «ГамКовиМаб».

### **2.1.6. Антитела**

В работе использовали антитела, специфичные гистидиновому линкеру, конъюгированные с пероксидазой хрена Анти-His-HRP (Roche, 4905270001) и Анти-His-HRP (GenScript, A00612); антитела, специфичные НА-тагу, конъюгированные с пероксидазой хрена, Анти-НА-HRP (Roche, 11867423001); антитела, специфичные MBP-тагу, конъюгированные с пероксидазой хрена Анти-MBP-HRP (NEB, E8032); антитела, специфичные сMyc-тагу, конъюгированные с пероксидазой хрена, Анти-M13 (GE Healthcare, 27942101) и anti-Myc-tag (Abcam, 1326); антитела, специфичные белку рVIII бактериофага M13, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sino Biological, China).

В работе использовались антитела, специфичные к IgG мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, Анти-IgG-HRP (Sigma, A2554); Goat Anti-Rabbit Horseradish Peroxidase (Bio-Rad); антитела, специфичные к IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена anti-human IgG (Sigma, cat. no A8667); антитела, специфичные иммуноглобулинам ламы, конъюгированные с пероксидазой хрена (Bethyl, Cat No. A160-100P).

### **2.1.7. Рекомбинантные белки**

Гликопротеин вируса Эбола, вид Zaire, штамм H.sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15 (SinoBiological, Китай);

BCA (BSA) – бычий сывороточный альбумин (Sigma, США);

hACE2 – рекомбинантный ангиотензин-превращающий фермент человека (Хема, Россия);

В работе также использовались рекомбинантные белки, полученные в лаборатории иммунобиотехнологии: белок GP вируса Эбола (H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1), рецептор-связывающий домен вируса SARS-Cov-2 (YP\_009724390.1)

### **2.1.8. Различные реактивы для молекулярно-биологических процедур**

В работе использовали различные ферменты для выполнения генно-инженерных и биохимических реакций: эндонуклеазы рестрикции, лигазы, полимеразы, фосфатазы, нуклеазы, протеазы, обратные транскриптазы и другие ферменты и буферные растворы (NEB, Великобритания; Fermentas, Литва; Силекс, Россия; Invitrogen, США; Promega, США).

Для определения молекулярного веса фрагментов ДНК был использован маркер молекулярного веса Trans15K DNA Marker TransGen Biotech, , а также GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific, США; кат.№ SM1331). Для определения молекулярного веса белков был использован маркер молекулярного веса Kaleidoscope (Bio-Rad), 10-250 кДа, Dual Color (Bio-Rad).

Буферные растворы готовили с использованием солей и других реактивов (HEPES, диметилсульфоксид и др.) фирм Sigma (США, Германия, Китай), Applichem (Германия, США), Диа-М (Россия), ПанЭко (Россия).

### **2.1.9. Среды для культивирования бактерий**

Питательные среды, используемые при работе с *E.coli*: Luria-Bertani (LB), 2xYT, SOC (Sigma, США) с добавлением селективных антибиотиков и прочих добавок. При приготовлении твердой среды добавляли агар до 2%.

Питательные среды, используемые при работе с *B. megaterium*: Luria-Bertani (LB) с добавлением селективных антибиотиков и прочих добавок. При приготовлении твердой среды добавляли агар до 2%-ой концентрации.

Питательные среды, используемые при работе с *M. hominis*: Urea-Arginine LYO 2 broth (bioMérieux, Франция).

Среды стерилизовали автоклавированием при температуре 121°C, давлении 2 атмосферы в течение 30 мин. Добавки стерилизовали с помощью мембранных фильтров из полиэфирсульфона (PES) с размером пор 0,22 мкм (EMDMillipore, США).

#### **2.1.10. Среды для культивирования эукариотических клеток и реактивы для трансфекции**

Для культивирования клеточных линий эукариот использовали следующие среды:

- Культуральная среда для клеток CHO-S CSM46-P500 COSMOS (Florabio Teknoloji Sanayi Tic. A.S., Турция);

- Питательная добавка для клеток CHO-S CFA77-P100 COSMOS (Florabio Teknoloji Sanayi Tic. A.S., Турция);

- Питательная добавка для клеток CHO-S CFB24-P050 COSMOS (Florabio Teknoloji Sanayi Tic. A.S., Турция);

- Среда EmCD CHO®101 Basal Medium, 100L, (Eminence (Suzhou) Biotechnology, Китай);

- Среда EmCD CHO®101 Feed A Medium, (Eminence (Suzhou) Biotechnology, Китай);

- Среда EmCD CHO®101 Feed B, (Eminence (Suzhou) Biotechnology, Китай);

- Подпитка для клеток CHO, Eden F600bS, бессывороточная, (Bioengine, Китай);

- Среда SFM4CHO (HyClone), SFM4CHO (GE Healthcare, США) с добавлением 4мМ L-глутамин, бикарбоната натрия 2,2 г/ли поллоксомера 188 (конц. 1 г/л);

- Среда DMEM (минимальная среда Игла, модифицированная Дульбекко, HyClone, США), содержащая 10% эмбриональный телячьей сыворотки (HyClone, США), глутамин (584 мг/л) и антибиотики пенициллин и стрептомицин (ПанЭко, Россия).

- Среда RPMI (РАА Laboratories, Inc GE, Австрия), содержащая 10% эмбриональный телячьей сыворотки (HyClone, США), глутамин (584 мг/л) и антибиотики пенициллин и стрептомицин (ПанЭко, Россия).

Клетки хранили в сосуде Дьюара в жидком азоте с добавлением 10% DMSO.

Трансфекцию проводили с использованием реагента липофектамина Lipofectamine® 2000 Reagent (Thermo Fisher Scientific, США) или реагент для трансфекции MetafectenePRO (Biontech, Германия). Для трансфекции использовали коммерческую среду OptiMEM (Thermo Fisher Scientific, США) или TransFX-C (GE Healthcare, США). Для трансфекции клеток CHO-S в суспензии использовали реагент Polyethylenimine, Linear, MW 25000, Transfection Grade (PEI 25K) (Polyscience, США).

#### **2.1.11. Наборы**

Для выделения плазмидной ДНК использовали набор Plasmid Miniprep, BC021S (Евроген, Россия), Plasmid Midiprep, BC124 (Евроген, Россия). Набор для выделения геномной ДНК Wizard Genomic DNA Purification Kit (кат. № A1120). Выделение ДНК из агарозного геля осуществляли набором для элюции ДНК из агарозного геля Clean-Up mini (Евроген, Россия). Дегликозилирование белков проводили с помощью коммерческого набора «Protein Deglycosylation Mix (P6039)» (New England Biolabs, США) по протоколу фирмы-производителя. Синтез кДНК осуществляли SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, США) и SuperScript IV TM first-strand synthesis system (Invitrogen,

США) по протоколу фирмы-производителя с использованием, входящих в набор oligo-dT праймеров. Биотинилирование белков проводили с использованием набора EZ-Link Sulfo-NHS-Biotin (Thermo Scientific, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Оценку содержания остаточной ДНК клеток CHO в препаратах для клинических исследований осуществляли при помощи набора resDNASEQ™ Quantitative CHO DNA Kit (Thermo Fisher Scientific, США). Оценку содержания остаточного белка клеток CHO в препаратах для клинических исследований осуществляли при помощи набора Immunoenzymetric Assay for the Measurement of Chinese Hamster Ovary Host Cell Proteins F550 (Cygnus, США).

#### **2.1.12. Синтез нуклеотидных последовательностей, секвенирование**

Синтез олигонуклеотидов, а также оптимизированных нуклеотидных последовательностей, кодирующих гены рекомбинантных белков (белок GP вируса Эбола, RBD вируса SARS-Cov-2) и модифицированных антител был выполнен в ЗАО «Евроген» (Россия).

Секвенирование генов проводилось в Лаборатории анализа геномов в ФГБУ "НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздрава России (зав. О.Л. Воронина).

#### **2.1.13. Реактивы, используемые в иммунобиологических методах**

Для проведения ИФА использовали тетраметилбензидин жидкий субстрат ТМВ, готовый к применению (Sigma, Cat N T0440). Реакцию останавливали внесением в лунки по 100 мкл 2М серной кислоты (PanReac AppliChem A0655).

Для постановки иммуноблота и иммуноферментного анализа использовали следующие реактивы: готовые полиакриламидные (4-20% или 12%) гели Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels (Bio-Rad, США), для окрашивания гелей использовали реагент EZBlue™ Gel Staining Reagent (Sigma-Aldrich, США, кат. № G1041), буфер для внесения образцов по Лэммли (Sample Buffer, Laemmli, Sigma-Aldrich, США), буфер для электрофореза Tris/glycine/SDS Running Buffer 10X (Bio-Rad, США). Образцы смешивали с буфером для

внесения (0,125 М Tris-HCl (pH 7.4), 4% SDS, 20% глицерин и 0,004% бромфенолового синего), перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США) проводили в буфере Tris-CAPS (Bio-Rad, США), ингибирование неспецифического связывания антител проводили путем инкубация мембраны в растворе 5% обезжиренного молока (Sigma-Aldrich, США) в фосфатно-солевом буфере с 0,05% Твин20 (ТФСБ). Детекцию проводили при помощи обработки мембраны реагентами из набора Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad, США) и проявляли на пленку Hyperfilm® ECL™ (Amersham, GE, Великобритания).

## **2.2. МЕТОДЫ**

### **2.2.1 Получение антигенов для иммунизации**

#### **2.2.1.1 Культивирование *M.hominis* и выделение фракции ЛАМБ.**

Работы по культивированию микоплазмы проводились в лаборатории микоплазм и Л-форм бактерий ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ под руководством Раковской И.В. Культивирование *M. hominis* проводили в жидкой среде Urea-Arginine LYO 2 broth (bioMérieux, Франция) в воздушном термостате. Рост бактерий определяли по изменению цвета индикатора кислотности среды.

Выделение фракции ЛАМБ проводили согласно описанной ранее методики [Shimizu T. 2008]. Культуру микоплазмы в количестве 1 литра осаждали центрифугированием (12000g при  $t=4^{\circ}\text{C}$  в течение 40 минут). К образовавшемуся осадку добавляли Трис-фосфатный буфер, содержащий 1 мМ ЭДТА, после чего в раствор добавляли Тритон Х-114 до конечной концентрации 1%. Смесь инкубировали в течение 1 часа при температуре  $4^{\circ}\text{C}$ . Далее для разделения фаз раствор инкубировали в течение 10 минут при температуре  $37^{\circ}\text{C}$ . После центрифугирования (10000g в течение 20 минут) удаляли водную фазу и снова добавляли Трис-фосфатный буфер, содержащий 1 мМ ЭДТА до исходного объема. Процедуру разделения фаз повторяли 2 раза. Конечную фазу, содержащую детергент растворяли в исходном объеме Трис-

фосфатного буфера. Для осаждения ЛАМБ микоплазмы к раствору добавляли 2,5 объема метанола и инкубировали в течении 16 часов при температуре -20°C. После осаждения осадок растворяли в растворе диметилсульфоксида (ДМСО).

### **2.2.1.2 Получение нетоксичной субъединицы CROPS токсина *B. C.difficile*.**

Нуклеотидную последовательность размером около 2000 пн и содержащая целевой ген CROPS амплифицировали ПЦР с праймерами # 768 (5'-GTGCATTCATCATAGTCGACSTTTT-3') и #769 (5'-GGTAATGATTGGATCSTTATGTCAAC-3'), используя геномную ДНК *C.difficile*. Продукт реакции выделяли из реакционной смеси, обработанной эндонуклеазами BamHI и SalI и лигировали с линейризованным вектором pET28с. Целевой ген амплифицировали с использованием праймером #474 (5'-GCAGAGSTCATCATCATCATCACAG-3') и #475 (5'-STCAGGTACSTTTCGGGCTTTGTTAG-3'). Продукт реакции выделяли из реакционной смеси, обрабатывали эндонуклеазами SacI и KpnI и лигировали с вектором pHis1522, предназначенным для трансформации генов в штаммы грамположительных микроорганизмов. Полученная генетическая конструкция была трансформирована в клетки *B. Megaterium*.

Для продукции целевого белка полученный штамм-продуцент выращивали в жидкой питательной среде LB до оптической плотности OD600= 0.3, добавляли в качестве индуктора транскрипции 0.1% ксилозу и продолжали выращивание в течение ночи. После культивирования бактериальные клетки разрушали ультразвуком и подвергали металл-аффинной хроматографии на NiCl<sub>2</sub>-содержащем сорбенте HisTrap (GE Healthcare). Полученный белок для анализа качественных характеристик подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия в качестве детергента с последующей окраской нитратом серебра.

Работы по культивированию *B. Megaterium* и выделению CROPS домена для последующей иммунизации проводились в лаборатории молекулярных

основ патогенности ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» МЗ РФ под руководством Белого Ю.Ф.

### **2.2.1.3 Выделение ботулотоксина А *C.botulinum***

Ботулинический токсин А получали с использованием штамма *C. botulinum* A98. Штамм культивировали в анаэробных условиях в течение 5 суток. Бактериальную суспензию осаждали центрифугированием при 5000g в течение 30 мин при 10°C. Белки бактериальной культуры из фильтрата концентрировали кислотным осаждением при pH 3,8 в течение 45 мин. Осадок отделяли центрифугированием при 12000g в течение 30 мин при 10°C и растворяли в 47 мМ цитратно-фосфатном буфере с pH 5.6. Гель-фильтрацию S300 и ионообменную хроматографию проводили на системе АКТА start (GE Healthcare Lifesciences, США) с ДЭ-целлюлозой (Pharmacia, Швеция). Токсин (90–95%, 150 кДа) дополнительно очищали хроматографией с использованием диэтиламиноэтилцеллюлозы (ДЭАЭ-целлюлоза) (Pharmacia, Швеция) в боратном буфере с pH = 8. Элюцию проводили 50 мМ NaCl. Специфическую антигенную активность ботулотоксина А определяли по реакции с моноспецифическими антителами к BoNT/A (Лаборатория клостридиозов и лаборатория ФГБНУ "Научный центр экспертизы лекарственных средств РФ"). Очищенный BoNT/A проверяли с помощью SDS-электрофореза с 2-меркаптоэтанолом. Препарат токсина перед использованием фильтровали через шприцевой фильтр 0,22 мкм. Концентрацию BoNT/A определяли спектрофотометрически (УФ 280 нм) и калориметрически (анализ белка по Брэдфорду). ЛД50 определяли на 6-недельных самках мышей BALB/c (массой 18–20 г). Специфическую активность определяли стандартным методом анализа летальности мышей, описанным Мией Линдстрем и Ханну Коркеала [Lindstrom M., 2006]. Удельная активность варьировала от 10 до 30 пг/мышь среди партий BoNT/A. Перед иммунизацией альпака ботулотоксин инактивировали 0,05% раствором формальдегида при pH = 6 в течение 3–5 суток.

#### **2.2.1.4. Получение рекомбинантного аденовируса 5 серотипа, несущего ген белка GP вируса Эбола (rAd5-GP) и рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного белком GP вируса Эбола (rVSV-GP)**

Для получения векторов на основе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа клетки линии HEK293 трансфицировали линейризованным по сайту PacI плазмидным вектором pAd5-GP. Накопление рекомбинантных вирусных частиц rAd5-GP производили в клетках HEK293. Далее клетки собирали во флаконы для центрифугирования объемом 200 мл и осаждали центрифугированием при 300g, в течение 10 минут. Осадок клеток ресуспендировали в PBS. Клетки в полученной суспензии лизировали путем трехкратного перемораживания для высвобождения частиц rAd5-GP из клеток. Клеточные лизаты после трехкратного перемораживания центрифугировали при 1000g в течение 10 минут для осаждения клеточного дебриса, а супернатант отбирали для последующей очистки. Очистку rAd5-GP проводили методами эксклюзионной и ионнообменной хроматографии. Концентрацию аденовируса в полученном препарате определяли спектрофотометрически ( $\lambda=260$  нм), используя коэффициент пересчета 1 оптическая единица =  $1,12 \times 10^{12}$  вирусных частиц в 1 мл препарата.

Для получения векторов на основе рекомбинантного вируса везикулярного стоматита проводили трансфекцию клеток линии ВНК-21 после достижения плотности мономноя около 70-80% следующими плазмидными векторами:

pVSV1-GP (10 мкг), плазида, несущая геном рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, содержащего ген гликопротеина вируса Эбола вида Заир;

pVs-N (5 мкг), плазида, несущая ген нуклеопротеина вируса везикулярного стоматита;

pVs-P (3 мкг), плазида, несущая ген фосфопротеина вируса везикулярного стоматита;

pBs-L (1 мкг), плаزمида, несущая ген полимеразы вируса везикулярного стоматита.

Для получения rVSV-GP клетки инфицировали вирусом осповакцины LiVP-T7pol, несущим ген T7 полимеразы (1-5 БОЕ/клетку). Через 72 часа собирали культуральную среду, двукратно перемораживали при -70°C и центрифугировали при 10000g 5 минут для осаждения LiVP-T7pol. Далее отбирали надосадочную жидкость, разводили в 10, 100 и 1000 раз и добавляли ее к клеткам Vero E6 совместно с цитарабином (25мкг/мл), необходимым для ингибирования роста вируса осповакцины. Через 48 часов отбирали индивидуальные бляшки, титровали 10-кратным шагом и полученными препаратами трансдуцировали клетки Vero E6. Через 48 часов отбирали индивидуальные бляшки, разгоняли и анализировали их методом полногеномного секвенирования (под руководством к.б.н. Ворониной О.Л., лаборатория анализа геномов ФГБУ «НИЦЭМ им.Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России). Дальнейшую наработку рекомбинантных вирусных частиц rVSV-GP производили в клетках Vero(B). Очистку rVSV-GP проводили совместно с Зубковой О.В. методом ультрацентрифугирования (при 27000 об/мин) в растворе сахарозы (30%).

#### **2.2.1.5 Получение рекомбинантного белка рецептор-связывающего домена (RBD) коронавируса SARS-Cov-2**

Для синтеза рекомбинантного белка использовали генетическую последовательность последовательность поверхностного гликопротеина S вируса SARS-CoV2, вызвавшего вспышку заболевания COVID-19 в провинции Ухань (Китай). Данная последовательность имеет номер Sequence ID: YP\_009724390.1. Аминокислотная последовательность RBD: RVQPTEsIVRFPNITNLCPFGEVFNATRFASVYAWNRKRISNcVADYSVLyNS ASFSTFKCYGVSPTKLNDLCFTNVYADSFVIRGDEVrQIAPGQTGKIADYNY KLPDDFTGCVIAWNSNNLDSKVGgNYNYLYRLFRKSNLkPferDISTeIYQA

GSTPCNGVEGFNCYFPLQSYGFQPTNGVGYQPYRVVVLSFELLHAPATVCGP  
KKSTNLVKNKCVNF.

Далее, при помощи компьютерной программы Geneious 9 был выполнен дизайн генетической конструкции, позволяющей эффективно экспрессировать рецептор-связывающий домен RBD в клетках млекопитающих и выполнять его хроматографическую очистку. Разработанная генетическая конструкция была синтезирована в ЗАО «Евроген» и далее клонирована в плазмидный вектор pCEP и таким образом была получена плаزمида pCEP-RBD-SARS-CoV2.

Клетки для трансфекции CHO-S культивировали в питательной среде HyClone HyCell TransFx-C transfection media (GE Healthcare, США) с добавлением 8 мМ глутамин (ПанЭко, Россия), до достижения плотности  $2 \cdot 10^6$  кл/мл (1 литр суспензии). Далее, полученную суспензию трансфецировали плазмидным вектором pCEP-RBD-SARS-CoV2 при помощи реагента Polyethylenimine, Linear, MW 25000, Transfection Grade (PEI 25K) (Polyscience, США) раствор 1 мг/мл. Соотношение ДНК: трансфецирующий реагент на 1 мл клеточной суспензии = 1мкг ДНК : 5 мкл раствора реагента. Трансфекционную смесь готовили на среде Opti-MEM® I Reduced-Serum Medium – 500 ml (Thermo fisher scientific/ кат. № 31985070) из расчета 10% от объема клеточной суспензии. Смесь перемешивали и инкубировали 30 мин при комнатной температуре, после чего добавляли к клеточной суспензии. Далее суспензию инкубировали в Шейкер-инкубаторе Multitron (Infors HT, Швейцария) при 5% содержания CO<sub>2</sub>, 80%-ной влажности и скорости качания 120 об/мин.

Культивирование трансфецированной суспензии проводили в течение 7 дней в Шейкер-инкубаторе Multitron (Infors HT, Швейцария) при 5% содержания CO<sub>2</sub>, 80%-ной влажности и скорости качания 120 об/мин. Ежедневно клеточную суспензию подкармливают растворами Cell boost 7a и 7b (GE Healthcare, США) 3 и 0,3 % соответственно. Выживаемость клеток в суспензии определяли при помощи счетчика клеток TC20 Automated Cell Counter (Bio-Rad, США) и раствора трипанового синего (Bio-Rad/ кат. №

1450022). По истечении 7 дней культивирования клеточную суспензию осаждали центрифугированием 5000 об/мин. Культуральную жидкость осветляли при помощи фильтрации через шприцевые фильтры Millipore Express (PES) HP 0.45 мкм (Merckmillipore, Германия).

Хроматографическую очистку белка из осветленной культуральной жидкости проводили на приборе АКТА start (GE Healthcare, США). К прибору подключали хроматографическую колонку HisTag HP protein purification column (5 мл) и уравнивали буфером (20 mM фосфат натрия, 500 mM хлорид натрия, 20 mM иммидазол, pH=7.4). Далее осветленную культуральную жидкость (100 мл) разбавляли в несколько раз буфером (20 mM фосфат натрия, 500 mM хлорид натрия, 20 mM иммидазол, pH=7.4) и наносили на уравнивающую колонку со скоростью 5 мл/мин. После окончания нанесения, колонку промывали 100 мл буфера (20 mM фосфат натрия, 500 mM хлорид натрия, 20 mM иммидазол, pH=7.4) со скоростью 5 мл/мин. После окончания промывки связавшийся белок элюировали с колонки буфером (20 mM фосфат натрия, 500 mM хлорид натрия, 500 mM иммидазол, pH=7.4) со скоростью 1 мл/мин.

По результатам электрофореграммы подвижность белкового препарата RBD в денатурирующих условиях соответствует около 30 кДа, что обусловлено его гликозилированием (масса аминокислотной последовательности без учета гликозилирования составляет около 25кДа).

## **2.2.2 Получение иммунных библиотек однодоменных антител**

### **2.2.2.1 Иммунизация, отбор крови и выделение лимфоцитов.**

Иммунизацию с целью получения иммунных библиотек неканонических антител, проводили с использованием альпака (*Lama Pacos*) или двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*). Животных последовательно иммунизировали 5 раз путем подкожного введения по 100-200 мкг антигенного материала, смешанного с равным объемом полного адьюванта Фройнда при первой иммунизации и или неполного адьюванта Фройнда при остальных инъекциях).

Для проведения отдельных иммунизаций в качестве антигенов использовали LAMPs *M.hominis*, нетоксичную субъединицу CROPS токсина В (TcdB) *C. difficile*, анатоксин ботулотоксина *C.botulinum*, рекомбинантный белок GP вируса Эбола и рекомбинантный аденовирус 5 серотипа, несущий ген белка GP вируса Эбола, рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) вируса SARS-Cov-2. Иммунизации проводили по 5-кратной схеме инъекций с интервалами 10-14 дней. При получении однодоменных антител, специфичных белку GP вируса Эбола использовали следующую схему: введение рекомбинантного аденовируса 5 серотипа, несущего ген белка GP вируса Эбола, 3 раза с интервалом 21 день и бустирующая иммунизация рекомбинантным белком GP Zaire ebolavirus штамм *H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15* (Sino Biological, Китай, кат. № 40442-V02H) через 21 день после введения rAd5-GP. Взятие крови в объеме 100-150 мл проводили через 5-7 дней после последней инъекции.

Перед отбором крови для получения библиотеки проводили оценку титра специфических антител в сыворотках иммунизированных животных. Для этого соответствующие антигены сорбировали в лунки 96-луночного планшета в карбонат-бикарбонатном буфере (pH 9,6) в количестве 100 нг/лунку. В качестве отрицательного контроля использовали бычий сывороточный альбумин (BSA). Далее анализ проводили по общепринятому протоколу, представленному ниже. Планшет инкубировали при плюс 4°C в течение ночи. На следующий день планшет промывали раствором TPBS в объеме 200 мкл на лунку 5 раз. Далее для избавления от неспецифического связывания проводили обработку планшета 5% обезжиренным молоком, растворенном в TPBS, в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C в течение часа. Затем добавляли белковые препараты однодоменных антител с 5-кратным разведением в концентрации от 1мкг/мл до 320 пг/мл в растворе 5 % обезжиренного молока в TPBS и снова инкубировали час при тех же условиях. Затем планшет промывали раствором TPBS в объеме 200 мкл на лунку 5 раз, чтобы удалить несвязавшиеся антитела. Далее добавляли вторичные антитела

HRP Anti-Myc tag antibody (Abcam, Великобритания) специфичные к дополнительно введенному в последовательность антитела участку, конъюгированные с пероксидазой хрена, разведенные 1:10000 в 5 % растворе обезжиренного молока в TPBS в объеме 100 мкл на лунку. Инкубировали на шейкере при температуре 37°C на протяжении часа. Далее планшеты снова промывали раствором TPBS 5 раз, затем раствором PBS 2 раза. После этого в лунки добавляли субстрат пероксидазы хрена тетраметилбензидил (ТМВ) в объеме 100 мкл на лунку и выдерживали в темноте до приобретения раствором голубого цвета. Далее останавливали реакцию добавлением 100 мкл 1М серной кислоты и проводили измерение оптической плотности на планшетном спектрофотометре при длине волны света 450 нм. За титр антител в сыворотке принимали максимальное разведение сыворотки, в котором значение ОП исследуемого образца сыворотки животного после иммунизации превосходит значение ОП контрольной сыворотки (сыворотка животного до иммунизации) более чем в 2 раза.

Для предотвращения свертывания взятой крови добавляли ЭДТА (3 мМ). Образцы крови разбавляли питательной средой DMEM или фосфатно соевым буфером в соотношении 1:1. После чего наносили раствор крови в объеме 35 мл на раствор Histopaque-1077 с плотностью 1,077 г/мл объемом 15 мл. Для отделения моноклеарной фракции проводили центрифугирование в течение 20 мин при 800×g. Моноклеарные клетки (лимфоциты и моноциты) отбирали из сформировавшейся зоны на уровне разделения фазы плазмы крови и раствора Histopaque-1077. Клетки переносили в новую пробирку и разбавляли фосфатно соевым буфером. После центрифугирования осадок клеток использовали для выделения РНК.

#### **2.2.2.2 Выделение РНК из лимфоцитов и синтез кДНК.**

Тотальную РНК из лимфоцитов выделяли с помощью реагента TRIzol (Invitrogen, США) по протоколу фирмы-производителя. Концентрацию РНК определяли с помощью наноспектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, США). Качество и чистоту выделенной РНК проверяли с помощью

электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле и последующей визуализацией фрагментов РНК.

Синтез кДНК проводили на матрице полученной тотальной РНК в количестве 20 мкг с использованием набора SuperScript® III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, США) или SuperScript® IV First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen, США) по протоколу фирмы-производителя с использованием, входящих в набор oligo-dT праймеров. Полученную кДНК использовали для амплификации последовательностей VHN.

### **2.2.2.3 ПЦР-амплификация последовательностей VHN**

Последовательности VHN амплифицировали методом гнездовой ПЦР (nested-PCR) с использованием готовой смеси высокоточной полимеразы с горячим стартом Q5® HotStartHigh-Fidelity 2XMasterMix (NEB). Параметры ПЦР реакций (ПЦР I и II) были установлены в соответствии с протоколом фирмы-производителя фермента. Температура отжига праймеров во всех раундах амплификации была определена экспериментально и составляла 58 °С, количество циклов - 30.

Специфичность гнездовой амплификации определялась дизайном праймеров. Для первого цикла амплификации использовались праймеры VHN1,2,3,4-SfiI и CH2Forta4, количество кДНК составляло 3 мкг на реакцию. Продукты ПЦР I представляли собой два пула ампликонов, соответствующие VHN-CH1-CH2 (900 п.о.) фрагментам канонических антител и VHN-CH2 (600 п.о.) фрагментам неканонических антител. Продукты ПЦР I разделяли с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, ампликоны соответствующие VHN-CH2 (600 п.о.) фрагментам неканонических антител элюировали из геля с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, США) или Clean-Up mini (Евроген, Россия) по протоколу фирмы-производителя. Элюированные ампликоны использовали в качестве матрицы для второго раунда амплификации – ПЦР II.

Для второго цикла амплификации использовались праймеры VHN1,2,3,4-SfiI и VHN-NotI, количество ДНК-матрицы составляло 20 нг на реакцию.

Использованные праймеры содержат в своей последовательности сайты гидролиза эндонуклеазами рестрикции SfiI и NotI соответственно, которые необходимы для клонирования VHH последовательностей в фагмидный вектор pHEN1. Продукты ПЦР II разделяли с помощью электрофореза в 1,5%-ном агарозном геле, ампликоны соответствующие VHH (420 п.о.) фрагментам неканонических антител элюировали из геля с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) по протоколу фирмы-производителя.

Последовательности используемых праймеров представлены в таблице 4.

Таблица 4. Набор праймеров, используемых для первого и второго раундов ПЦР.

VH1-SfiI	CATGCCATGACTCGCGGCCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG
VH2-SfiI	CATGCCATGACTCGCGGCCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTCACCTTGAAGGAGTCTGG
VH3-SfiI	CATGCCATGACTCGCGGCCCCAGCCGGCCATGGCC GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG
VH4-SfiI	CATGCCATGACTCGCGGCCCCAGCCGGCCATGGCC CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG
CH2FORTA4	CGCCATCAAGGTACCAGTTGA
VHH-NotI	CCACGATTCTGCGGCCGCTGAGGAGACRGTGACC TGGGTCC

#### **2.2.2.4 Клонирование VHH последовательностей в фагмидный вектор pHEN1 и получение библиотеки клонов-трансформантов**

Клонирование ампликонов, полученных в результате второго раунда ПЦР в фагмидный вектор pHEN1 проводили по сайтам гидролиза специфическими эндонуклеазами рестрикции SfiI и NotI согласно общепринятой методологии молекулярного клонирования фрагментов ДНК. Лигазную смесь очищали с использованием набора QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) или CleanUp SCap (ЗАО Евроген). Очищенную смесь использовали для серии

электропорации электрокомпетентных клеток *E.coli* TG1 (проводили 15-20 реакций электропораций). Суспензию клеток после трансформации высевали по 3 мл на квадратные (25x25 см) агаризованные чашки со средой 2xTY, 2% глюкозой и селективным антибиотиком. Для оценки эффективности трансформации аликвоту клеток *E.coli* TG1 использовали для приготовления серии 10-кратных разведений и посева на стандартные чашки Петри (диаметром 9 см). После посева чашки инкубировали в термостате при 37 °С в течение 16 часов. После чего проводили подсчет колоний, с учетом разведений. Колонии с чашек 25x25см собирали шпателем, ресуспендировали в DPBS с 20% глицерином, аликвоты хранили при -70°С. Полученные клоны-трансформанты являются исходной библиотекой последовательностей неканонических антител. Для подтверждения наличия вставки, соответствующей VHH, проводили ПЦР реакции с случайно выбранными клонами. Для этого стерильной зубочисткой переносили колонию в 20 мкл буферного раствора, содержащего Taq ДНК-полимеразу, смесь dNTP (ЗАО Евроген) и специфические праймеры Lac-prom (СТТТАТГСТТССGGСТCGTATG) и rIII-R (СТТТССAGACGTTAGTAAATG). Проводили 25 циклов ПЦР после чего анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле.

#### **2.2.2.5 Получение библиотеки бактериофагов.**

Аликвоту библиотеки клонов-трансформантов размораживали в ледяной бане и добавляли в 25 мл 2xTY среды с 1% глюкозой и 100 мкг/мл ампициллина до ОД600 0,1. Бактериальную культуру растили при 37 °С и 210 об/мин до ОД600=0,5-0,6). Затем, к бактериальной культуре добавляли 20 МОИ бактериофага помощника (M13KO7, KM13 или Hyperphage) и инкубировали при 37 °С без перемешивания 30 минут. Затем суспензию центрифугировали при 4500g, 10 минут. Среду удаляли, бактериальные клетки ресуспендировали в 25 мл свежей 2xTY среды с ампициллином, без глюкозы, и подращивали 30 мин при 37°С и 210 об/мин. Затем 25 мл бактериальной культуры переносили в

100 мл свежей 2xTY среды с ампициллином и канамицином и инкубировали 16 часов при 30°C и 210 об/мин.

На следующий день культуру клеток переносили в ледяную баню на 30 минут и центрифугировали при 4500g, 30 минут, 4 °C. Супернатант переносили в новые пробирки и добавляли 1/6 объема 20% PEG8000/2,5M NaCl, перемешивали на вортексе, инкубировали во льду в течение 1-3 часов, затем снова центрифугировали при 4500g, 30 минут, 4 °C. Полученный осадок, содержащий бактериофаги, растворяли в 1/5 объема первоначальной культуры (т.е. в 25 мл) DPBS. Осаждали клеточный дебрис и не растворившиеся агрегаты путем центрифугирования 10000g 5 мин. Полученный супернатант переносили в новые пробирки и повторяли процедуру переосаждения 20% PEG8000 / 2,5M NaCl. Полученный осадок бактериофагов растворяли в 1/100 объема первоначальной культуры (1,25 мл) буфера для хранения бактериофагов (PhSB). Полученный раствор фаговых частиц хранили при -20 °C.

Титр рекомбинантных бактериофагов M13 определяли по количеству трансдуцирующих единиц, поскольку M13 является умеренным бактериофагом и вызывает лизогению. Для этого готовили десятикратные серийные разведения препарата (обычно до  $10^{-8}$ - $10^{-10}$ ) в объеме от 100 до 500 2xTY среды, затем добавляли равный объем суспензии *E.coli* TG1, находящейся в логарифмической фазе роста, смеси инкубировали при 37 °C в течении 30-45 минут без перемешивания, затем аликвоты по 100 мкл высевали на агаризованные чашки со средой 2xTY и селективным антибиотиком. Чашки инкубировали ночь в термостате при 37 °C. На следующий день проводили подсчет колоний с учетом разведений, на мл исходного препарата.

### **2.2.3 Проведение селекции бактериофагов, несущих на поверхности специфичные VHH (биопаннинг)**

Для проведения биопаннинга на антигене, от 1 до 5 мкг антигена (LAMPs *M. Hominis*, CROPS *C.difficile*, белок GP вируса Эбола, RBD вируса SARS-Cov-2) и BSA сорбировали на поверхность 96-луночного иммунологического планшета высокой сорбционной ёмкости (Corning MaxiSorb) в 50мМ

карбонатно-бикарбонатного буфере в течение 18 часов. На следующий день не связавшийся антиген удаляли и промывали поверхность лунки 3 раза PBS-T буфером. Далее блокировали неспецифические сайты связывания раствором 5% сухого молока или BSA в DPBS при 37 °C при медленном перемешивании в течении часа. Параллельно  $10^{11}$  фаговых частиц разводили в растворе 5% сухого молока в DPBS и блокировали при тех же условиях 1 ч в пробирке типа эппендорф при перемешивании. Далее, фаговые частицы переносили в лунку планшета с сорбированным BSA и инкубировали 1ч при 37 °C и медленном перемешивании. Затем переносили фаговые частицы в лунку с сорбированным антигеном и инкубировали 1 ч при 37 °C и медленном перемешивании. Для определения количества вносимых фаговых частиц для связывания (input) отбирали по 10 мкл проб для титрования (пробу хранили при 4 °C). После окончания инкубации, не связавшиеся бактериофаги отмывали 15 раз PBS-T буфером и удаляли в контейнер с дезраствором. Специфически связанные частицы элюировали свежеприготовленным 100мМ раствором триэтиламина (pH=11) (в случае использования фага-помощника M13KO7) в течение 10 мин или раствором трипсина в PBS 1мг/мл (в случае использования фага-помощника KM13 или Hyperphage). Элюат, содержащий триэтиламин переносили в эппендорф и нейтрализовали pH путем добавления  $\frac{1}{2}$  объема 1M Tris-HCl pH=7,4. Полученный элюат содержащий связавшиеся с антигеном фаги использовали для определения титра (output).

Для получения библиотеки обогащенных клонов элюированные бактериофаги добавляли к суспензии E.coli TG1 (обычно 10-20 мл), находящейся в логарифмической фазе роста, смесь инкубировали при 37 °C в течении 30-45 минут без перемешивания, затем аликвоты по 3 мл высевали на квадратные (25x25 см) агаризованные чашки со средой 2xTY и селективным антибиотиком. Чашки инкубировали ночь в термостате при 37 °C. На следующий день проводили подсчет колоний с учетом разведений на мл исходного препарата. Колонии собирали шпателем, ресуспендировали в DPBS с 20% глицерином, аликвоты хранили при -70 °C.

Для проведения последующего раунда селекции (всего проводили 3 раунда) процедуру повторяли.

#### **2.2.4 Анализ специфичности клонов однодоменных антител методами Фаг-ИФА и VHH-ИФА**

Клоны, полученные в виде индивидуальных колоний на чашках при титровании бактериофагов, полученных в результате элюции на заключительном раунде селекции, переносили при помощи стерильных зубочисток в глубоколоночный планшет, содержащий по 1 мл среды 2хТҮ с селективным антибиотиком. Планшет инкубировали 16 часов в термостате при 37 °С при перемешивании. На следующий день бактерии осаждали центрифугированием 4500g, 30 минут, удаляли среду, бактерии в каждой лунке ресуспендировали в 1 мл 2хТҮ с 20% глицерином. Подготовленный таким образом планшет представлял собой «masterplate», который хранили при -70С и использовали в качестве источника бактерий для последующих процедур скрининга.

##### *Анализ специфичности методом Фаг-ИФА.*

Для скрининга методом Фаг-ИФА из «masterplate» переносили по 20 мкл бактериальной суспензии в новый глубоколоночный планшет, содержащий по 1 мл среды 2хТҮ и селективным антибиотиком на лунку, далее подращивали бактерии до  $OD_{600} \sim 0,6$  в термостате при 37 °С с перемешиванием. Затем добавляли в каждую лунку бактериофаг-помощник (M13KO7 или KM13) в количестве 20 MOI, инкубировали планшет в термостате при 37 °С в течение 30 минут. Бактерии осаждали центрифугированием 4500g, 30 минут, удаляли среду, содержащую не связавшиеся бактериофаги. Осадок бактерий ресуспендировали в 1 мл 2хТҮ с двумя селективными антибиотиками. Планшет инкубировали ночь в термостате при 30 °С при перемешивании. На следующий день бактерии осаждали центрифугированием 4500g, 30 минут, среду использовали в качестве источника бактериофагов для постановки реакции ИФА. Параллельно с подготовкой бактериофагов 100 нг антигена и

эквивалентное количество BSA сорбировали в 50мМ карбонатно-бикарбонатном буфере в течение 18 часов на поверхности лунок иммунологического планшета высокой сорбционной ёмкости. Удаляли не связавшийся антиген и промывали поверхность пластика 3 раза PBST буфером, затем блокировали неспецифические сайты связывания раствором 5% сухого молока в DPBS при 37 °С и перемешивании в течение 1 часа. В каждую лунку переносили по 100 мкл среды с бактериофагами, инкубировали при 37 °С, медленном перемешивании в течение 2 часов. Далее лунки промывали 5 раз PBST буфером. Затем добавляли по 100 мкл раствора анти-M13-HRP антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, разведенных, согласно инструкции производителя, в 5000 раз в DPBS с 5% сухим молоком и инкубировали при 37 °С при медленном перемешивании в течение 1 часа. Промывали лунки планшетов 5 раз PBST буфером. В каждую лунку добавляли по 100 мкл ТМБ субстрата, инкубировали планшеты в темноте в течение 20 минут (до появления видимой окраски), реакцию останавливали добавлением 50 мкл 1М HCl. После чего проводили измерение оптической плотности раствора в лунках при длине волны 450нм с использованием планшетного спектрофотометра Varioscan (Thermo). Лунки с антигеном, сигнал в которых в 2 и более раз превышает аналогичный сигнал в лунках с BSA соответствовали положительным клонам в masterplate.

*Анализ специфичности методом ИФА с использованием VHH.*

Для скрининга клонов из «masterplate» аликвоты бактерий в объеме 20 мкл переносили в новый глубоколоночный планшет, содержащий по 1 мл среды 2хTY и селективным антибиотиком. Бактерии культивировали до достижения оптической плотности OD<sub>600</sub> ~ 0,6 в термостате при 37 °С при перемешивании. Далее, в каждую лунку планшета добавляли IPTG в количестве 0.3 мМ и инкубировали в течение 16-18 часов при температуре 30 °С и перемешивании. Далее, суспензию культуры клеток осаждали центрифугированием при 4500g в течение 30 минут. В надосадочной жидкости определяли наличие специфических однодоменных антител методом ИФА. Все последующие

процедуры проводили аналогично методике, описанной в разделе 2.2.2.1. Лунки с антигеном, сигнал в которых в 2 и более раз превышал аналогичный сигнал в лунках с BSA, соответствовали положительным клонам в masterplate.

Клоны, показавшие положительный результат в ИФА, использовались для наращивания и выделения плазмидной ДНК. Нуклеотидная последовательность 3'НН определялась секвенированием с праймерами Lac-prom и рIII-R.

### **2.2.5 Получения белковых препаратов однодоменных антител**

Для продукции рекомбинантных белков использовали клетки *E. coli* штамма BL21 (NEB, Великобритания), трансформированные рекомбинантными плазмидами рHEN1 или рЕТ30а. Бактериальную культуру подращивали при 37°C в режиме интенсивного перемешивания на LB – бульоне с селективным антибиотиком. Культивирование продолжали до достижения оптической плотности  $OD_{600} = 0,5 - 0,6$ . Активировали продукцию рекомбинантных белков добавлением в культуру 0.3 mM IPTG и инкубировали в течение ночи при интенсивной аэрации. Бактериальные клетки из двух литров культуры осаждали центрифугированием при 6,000 об/мин в течение 15 минут. Осадок лизировали с использованием гомогенизатора типа шаровой мельницы (MPbio, США) с наполнителем из частиц различного размера. Лизат центрифугировали 14000 об/мин в течение 20 мин при 4 °C. Очистку рекомбинантных белков проводили методом хроматографии. Для этого проводили дополнительное осветление лизата центрифугированием при 10000-15000g, 15 мин при 4°C для удаления из образца крупных частиц (включая нелизированные бактериальные клетки). Далее, непосредственно перед нанесением лизат фильтровали через фильтр с размером пор 0.22 мкм. Осветленный лизат бактериальных клеток разбавляли в 5 раз фазой А (20mM Трис pH 7.2-7.4, 150mM хлорида натрия, 10mM иммидазола).

Колонку Co SepFast 5мл (Biotoolomics, Великобритания) уравнивали 5 объемами фазы А со скоростью 5мл/мин. Для очистки использовали хроматографическую систему АКТА Avant или АКТА Pure (GE Healthcare, США). На уравновешенную колонку наносили разбавленный образец со

скоростью 5 мл/мин. После нанесения образца колонку снова промывали фазой А по 5 объемов в прямом и обратном направлении.

После отмывки, целевой белок элюировали в обратном направлении 5 объемами колонки фазой Б (20мМ Трис рН 7.2-7.4, 150мМ хлорида натрия, 150мМ иммидазола). Присутствие белка во фракциях подтверждали спектрофотометрически, измеряя оптическую плотность проб на NanoDrop 2000c UV-Vis Spectrophotometer при 280нм. Пик собирали при достижении значения UV280 более 20mAU. Концентрацию антител в образцах определяли после проведения диализа.

### **2.2.6 Определение аффинности клонов однодоменных антител методом плазмонного резонанса и оптической интерференции**

Характеристику взаимодействий по типу «антиген-антитело» проводили путем расчета констант реакции связывания на основании кинетических кривых реакций, полученных с использованием метода детекции изменений поверхностного плазмонного резонанса (SPRi) на приборе Biacore 3000 (GE, Швеция). Для этого типа исследований использовали сенсорные чипы CM5, а также наборы «Amine Coupling Kit» для ковалентной иммобилизации белков на поверхности чипа, «Regeneration Scouting Kit» для подбора условий регенерации поверхности чипа. Рекомбинантные белки (CROPS, белок GP вируса Эбола или RBD вируса SARS-Cov-2) в концентрации 20 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере (рН 5.0) ковалентно иммобилизовали на поверхности оптического чипа CM5 с помощью набора Amine Coupling Kit (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция). Уровень иммобилизации лиганда в рабочем канале оптического биосенсора составлял до 1500 RU.

Анализ кинетики осуществляли путем инъекции пятикратных разведений образцов однодоменных антител в диапазоне концентраций от 2.0 мкМ до 0 нМ через контрольный (без иммобилизованного лиганда) и рабочий каналы в течение 3 минут с постоянной скоростью потока 15 мкл/мин. В качестве рабочего буфера был использован HBS-EP (0.01 М HEPES рН 7.4, 0.15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0.005% v/v Surfactant P20). Время диссоциации после нанесения

образцов составляло 10 мин. После каждого измерения проводили регенерацию поверхности чипа с помощью инъекции буфера, содержащего 100 мМ Tris-HCl pH 1.3, в течение 40 сек при скорости потока 30 мкл/мин. Все измерения проводили при температуре 25°C не менее двух 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 Bio-Sciences AB, Швеция).

Для определения аффинности методом оптической интерференции на первом этапе рекомбинантные белки биотинилировали при помощи набора EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotinylation Kit (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя.

Для оценки константы равновесной диссоциации выбранных клонов однодоменных антител с биотинилированным антигеном использовали систему Octet Red 96 (Sartorius, ФРГ) и биосенсоры Streptavidin (SA) biosensors (Sartorius, ФРГ). Анализ проводили в 96-луночных черных плоскодонных полипропиленовых микропланшетах (Greiner Bio-One, Австрия). Биотинилированный антиген разводили до концентрации 10 мкг/мл. Связывание с поверхностью сенсоров проводили в 1х кинетическом буфере (ФСБ с 0,002% Tween-20 и 1 мг/мл БСА). Связывание исследуемых клонов однодоменных антител в концентрациях 100, 50, 25 и 0 мкг/мл также осуществляли в 1X кинетическом буфере. Для каждого клон однодоменных антител проводили отдельный анализ. Программное обеспечение Data Analysis 10.0 было использовано для оценки констант диссоциации клонов однодоменных антител и антигенов.

### **2.2.7 Оценка нейтрализующей активности однодоменных антител в отношении токсина В *C.difficile*.**

Для определения нейтрализующей активности отобранных клонов однодоменных антител использовали клетки Vero E6 при добавлении токсина TcdB *C. difficile*. В качестве ростовой среды использовали среду DMEM

(HyClone, США), содержащую 10 % инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (HyClone, США), глутамин (584 мг/л) и антибиотики пенициллин и стрептомицин (ПанЭко, Россия).

Клетки рассевали в лунки 96-луночного планшета для культур клеток по  $10^4$  клеток/лунку и помещали в инкубатор (параметры культивирования: 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). Через 24 часа в лунки планшета к клеткам Vero E6 добавляли полученный рекомбинантный токсин TcdB *C. difficile* в концентрации 250 пг/мл, смешанный с различными концентрациями однодоменных антител. В качестве отрицательного контроля использовали лунки без добавления токсина (интактные клетки). Затем клетки возвращали в инкубатор. Результаты эксперимента оценивали визуально методом микроскопирования (инвертированный микроскоп Olympus, Япония) с увеличением x20 через 24 часа после добавления токсинов.

### **2.2.8 Получение однодоменных антител в форме димеров и слитых с Fc-фрагментами иммуноглобулина G.**

Для получения однодоменных антител в форме димеров синтезировали нуклеотидные последовательности (ЗАО Евроген), содержащие гены переменных доменов, соединенных глицин-сериновым линкером (Gly4Ser)<sup>3</sup>. Генетические конструкции клонировали в плазмидный вектор pET30 для экспрессии в *E.coli*. Экспрессию и очистку белков проводили по методикам, описанным в разделе 2.2.5. Нуклеотидные последовательности генов однодоменных антител, слитых с Fc-фрагментом IgG человека, синтезировали и клонировали в плазмиду pShuttle-CMV-FUSE (Stratagene, La Jolla, CA, USA) или pFuse-Puro (Invivogen, США). Культуру клеток CHO-S (ThermoFisher, Waltham, MA, USA, R80007) трансфицировали плазмидами с использованием CHO Gro System (Mirus Bio, Madison, WI, USA) в соответствии с протоколом производителя. В качестве контроля использовали плазмиду, несущую ген зеленого флуоресцентного белка в количестве 10%. Эффективность трансфекции оценивали с помощью Axio Imager Z1 (Carl Zeiss, Оберкохен, Германия) и определяли по количеству флуоресцирующих клеток по

сравнению с их общим количеством, которое составляло 90%. Клетки культивировали в колбах при 125 об/мин, 5% CO<sub>2</sub>, влажности 80%, при 37°C во время трансфекции и при 32°C через 24 ч после трансфекции в течение 10 дней. Начиная с третьего дня, добавляли Cell boosts 7a (3%), 7b (0,3%) (HyClone, Сан-Андреас, Техас, США) и 1% Sigma Bioreactor Feed (Sigma, Сент-Луис, Миссури, США). Антитела очищали аффинной хроматографией на системе АКТА start (Cytiva, Швеция), используя колонки MAbSelect SuRe 1 мл (Cytiva, Швеция) в соответствии с протоколом производителя. Дополнительную очистку и замену буфера проводили на колонке ХК 26/100 (Cytiva, Швеция), упакованной сорбентом Superdex 200 (Cytiva, Швеция). Чистоту полученных препаратов антител определяли методом вертикального электрофореза в полиакриламидном геле в неденатурирующих и денатурирующих условиях.

### **2.2.9 Оценка протективной активности однодоменных антител на модели летальной интоксикации ботулотоксином *in vivo*.**

Мышей BALB/c в возрасте 5–6 недель и массой тела 18–20 г случайным образом распределяли на группы (по 3-5 особей в группе). Мышей из всех групп помещали в стандартные клетки-изоляторы в стандартных условиях и вводили различные дозы ботулотоксина (1ЛД ~ 30 пг ВоNT/A) внутривентриально. Для оценки профилактической протективности вводили однократно внутримышечно однодоменные антитела, или фосфатно-солевой буфер (для группы отрицательного контроля) за 1 или 3 часа до введения ВоNT/A. Для оценки терапевтической эффективности препараты антител вводили через 2 часа после интоксикации. Для предварительной оценки нейтрализующей способности однодоменных антител использовали рекомбинантные бактериофаги, несущие на своей поверхности VNN. Фаги предварительно смешивали с соответствующим количеством токсина и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Все мыши получали одну внутривентриальную инъекцию смеси фагов с токсином в объеме 500 мкл. Мышей контролировали на наличие клинических симптомов с интервалами: 0, 4, 8, 26, 48 и 72 ч после заражения. Оценку клинических симптомов проводили

по шкале: 0 баллов (отсутствие симптомов), 1 балл (легкие симптомы), 2 балла (умеренные симптомы), 3 балла (тяжелые симптомы = гуманная конечная точка). Время гибели животного определяли как время, когда мышь была найдена мертвой или была подвергнута эвтаназии путем удушения углекислым газом с последующим смещением шейного отдела позвоночника в гуманной конечной точке.

#### **2.2.10 Модель вагинальной инфекции *M. hominis*.**

Модель описана в кандидатской диссертации Бурмистровой Д.А., научный руководитель Щебляков Д.В. Оценку терапевтических свойств рекомбинантных аденовирусов, несущих ген однодоменного антитела аMh06, слитого с Fc-фрагментом IgG проводили путем интравагинальной инокуляции культуры *M. hominis* в дозе  $10^7$  КОЕ/мышь. Для этого использовались мыши линии DBA/2 с предварительно синхронизированным гормональным циклом путем еженедельного подкожного введения препарата синэстрола в дозе 0,5 мкг/мышь. В качестве заражающей культуры использовали клинический изолят *M. hominis* 1862.3 TetR. Оценку количества *M. hominis* в вагинальных смывах мышей проводили методом ПЦР в реальном времени с использованием набора АмплиСенс® *M. hominis*-скрин-титр-FL и методом титрования в жидкой среде с индикацией роста по изменению pH среды с использованием Urea-Arginine LYO 2 broth и планшетов с микролунками объемом 50 мкл (bioMérieux, Франция). Для этого с помощью микропипетки брали вагинальные смывы в объеме 50 мкл, полученный смыв разделяли на 2 части. Одну часть использовали для выделения ДНК и постановки ПЦР. Другую часть помещали в среду для культивирования микоплазм и использовали для приготовления серийных 10-кратных разведений. По 50 мкл каждого разведения помещали в лунку планшета и покрывали каплей вазелинового масла, планшет инкубировали при 37С, спустя 10 суток проводили учет результатов. Порядок последнего разведения культуры принимали за значение титра исходного образца и выражали в CCU (colour change units). Данный подход основан на общепризнанной методике для титрования микоплазм, разработанной D Taylor-

Robinson [Taylor-Robinson D и др., 1966]. Исследование проб от каждого животного проводилось индивидуально.

#### **2.2.11. Оценка нейтрализующей активности однодоменных антител, специфичных белку GP вируса Эбола методом определения титра антител, вызывающего 50%-е снижение количества бляшек на инфицированном вирусом монослое культуры клеток.**

Разведения вируса (rVSV-GP или вирус Эбола) готовили с использованием буфера (10 mM Tris-HCl pH=7,5, 1 mM ЭДТА, 10% сахарозы). Смесь равных объемов моноклональных антител и штаммов вируса инкубировали в течение 60 минут при 37°C, а затем наносили на однодневный монослой клеток Vero E6 (для VSVGP) или GMK-AN-1(D) (для вируса лихорадки Эбола). После адсорбции комплекса антитело+вирус на клетках в течение 120 минут при 37°C наносили агаровое покрытие. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 часов (Vero E6) или 7 дней (GMK-AN-1(D)). Результаты оценивали путем подсчета количества бляшек под микроскопом. Анализ проводили в трехкратной повторности. Для определения бляшкообразующих единиц (БОЕ) использовали следующую формулу: БОЕ/мл = (среднее количество БОЕ/0,2 мл) × коэффициент разбавления. Работа с вирусом Эбола проводилась в ФГБУ ЦНИИ 48 Министерства обороны РФ.

#### **2.2.12 Изучение фармакокинетики однодоменных антител**

Фармакокинетику однодоменных антител и их модификаций изучали с использованием различных видов животных (макаки-резусы, мыши). Трех интактным макакам резусам (*Macaca mulatta*), полученным из НИИ медицинской приматологии (Веселое, Россия), внутривенно вводили 10 мг/кг антитела аЕv6-Fc со скоростью инфузии 10 мл/ч. Образцы крови отбирали до инфузии и спустя 1, 4, 8, 16, 24, 48, 96 ч и через 7, 14, 21 дней после инфузии. Концентрацию аЕv6-Fc в крови оценивали методом непрямого ИФА с использованием различных разведений аЕv6-Fc в качестве стандартов. Фармакокинетические параметры рассчитывали с использованием программы Microsoft Excel и PKSolver softs.

При проведении анализа фармакокинетики антител, специфичных ботулотоксину группе из пяти мышей Balb/c внутривенно (в/в) вводили 100 мкг G3, B11, G3-димера, B11-димера, G3-Fc или B11-Fc в хвостовую вену. Кровь забирали из глазного синуса через 0, 1, 4, 24, 48, 96, 168, 240, 336 ч. Сыворотки отделяли и хранили при 20°C до дальнейшего использования. Концентрации молекул антител в собранных образцах измеряли методом ИФА. Для этого BoNT/A сорбировали в лунки иммунологического планшета (Nunc) в течение ночи при 4°C в концентрации 100 нг/лунку в 50 мМ бикарбонатном буфере. После трехкратной промывки TPBS планшеты блокировали 5% сухим молоком в PBS на один час при 37°C. Затем в лунки добавляли 200-кратно разведенную сыворотку с последующей инкубацией в течение одного часа. Антитела против His-метки [HRP] (1:1000) (GenScript, Piscataway, NJ, USA) использовали для обнаружения мономеров и димеров антител G3 и B11 в сыворотке мышей. Антитела против IgG человека (Fc-специфическое) [HRP] (1:2000) (Merck, Kenilworth, NJ, USA) использовали для обнаружения антител G3-Fc и B11-Fc в сыворотке мышей. Серийные разведения антител в сыворотке мыши использовали для построения стандартной кривой анализа концентрации антител с использованием компьютерной программы ИФА-Мастер (АлкорБио, Санкт-Петербург, Россия).

### **2.2.13 Анализ нейтрализующей активности однодоменных антител в отношении коронавируса SARS-CoV-2 методом микронейтрализации.**

Однодоменные антител разводили двукратно, начиная с 20 мг/мл до 1,2 нг/мл, в полной среде Игла, модифицированной Дульбекко (DMEM), с добавлением 2% инактивированной нагреванием фетальной телячьей сыворотки (HI-FBS). Каждое разведение (в трех повторах) смешивали со 100 TCID<sub>50</sub> (средняя инфекционная доза культуры клеток) SARS-CoV-2 и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После инкубации образцы добавляли к монослою клеток Vero E6 и инкубировали в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 96-120 часов. Цитопатический эффект (ЦПД) вируса оценивали визуально. Минимальную нейтрализующую концентрацию определяли как

наименьшую концентрацию антитела (самое высокое разведение антител), которая полностью ингибировала ЦПД вируса в двух из трех воспроизводимых лунок. В анализе использовались следующие штаммы SARS-CoV-2: B.1.1.1, B.1.1.7, B.1.351, B.1.1.28/P.1, B.1.617.2 и B.1.1. 529. Все эксперименты проводились в помещении уровня биобезопасности 3 (BSL-3).

#### **2.2.14 Исследование протективности однодоменных антител на модели летальной инфекции SARS-Cov-2 на мышах.**

Все исследования были одобрены Комитетом по биомедицинской этике Центра имени Гамалеи (протокол № 24 от 21.04.22). В исследовании использовали hACE2-трансгенных мышей (20–25 г, самки). Мыши получены от скрещивания трансгенных самцов B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Prlmn/J (Jackson Laboratory, SOPF) и нетрансгенных самок C57BL/6 (SPF). Животные содержались в системе Tecniplast Isocage N и имели свободный доступ к пище и воде. Животных заражали интраназально под ингаляционным наркозом в количестве  $1 \times 10^5$  -  $5 \times 10^5$  - TCID<sub>50</sub> (25-50 мкл на животное), контрольные группы (Mock) инокулировали равным объемом PBS. После контрольного заражения оценивали динамику массы животных в течение 21 дня, а также вирусную нагрузку, макроскопический и гистопатологический анализ в легких инфицированных животных на 4-й день после заражения. Для оценки протективности антитела, в количестве 10мг/кг вводили внутривенно за сутки до инфицирования (профилактический режим), а также через 24 часа после инфицирования (терапевтический режим).

##### *Определение вирусной нагрузки в легких инфицированных животных*

Вирусную нагрузку определяли в гомогенатах органов, приготовленных с использованием гомогенизатора MPBio. Для определения титра инфекционного вируса гомогенаты титровали 10-кратно в клетках Vero E6, развитие цитопатического эффекта в клеточном монослое регистрировали визуально через 96 часов. Титр вируса определяли по методу Рида и Менча. Для определения вирусной нагрузки с помощью ПЦР РНК выделяли из 10% гомогенатов органов с использованием набора QIAamp® Viral RNA Mini Kit.

ПЦР проводили с использованием набора «Полививир SARS-CoV-2 Express» («Литех», Россия). Определение концентрации вирусной РНК в образцах проводили с помощью калибровочной кривой, основанной на 10-кратных разведениях вирусной РНК с известной концентрацией в той же ПЦР. Для контроля выделения РНК использовали праймеры для гена бета-актина мыши и хомяка (мыши: F: СТАТТGGCAACGAGCGGTTC, R: CGGATGTCAACGTCACTTTC, P: ROX-GCTCTTTTCCAGCCTTCTCTTG-BHQ2; хомяки: F: АСТGCCGCATCCTTCTTCT, R: TCGTTGCCAATGGTGATGAC, P: FAM-CCTGGAGAAGAGCTAGAGCTGCCTGATG -BHQ1 [Zivcec M., 2011]).

#### **2.2.15. Доклинические исследования безопасности**

Доклинические исследования безопасности препаратов ГамЭзумаб и ГамКовиМаб, разработанных при выполнении работы были выполнены согласно Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. А.Н. Миронова, Часть вторая /. – М.: Гриф и К, 2012, а также согласно Правилам надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств, утв. Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 №81; Правилам проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза, утв. Решением Совета ЕЭК от 03.11.2016 №89 и Руководству по доклиническим исследованиям безопасности в целях проведения клинических исследований и регистрации лекарственных препаратов, утв. Решением Коллегии ЕЭК от 26.11.2019 №202. Исследования включали: - исследование токсичности при однократном введении на мышах и крысах; - Исследование токсичности при многократном введении на крысах и кроликах; - исследование иммунотоксичности; - изучение аллергизирующих свойств; - исследование фармакокинетики; - исследование репродуктивной токсичности.

### **2.2.16 Клинические исследования**

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

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

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

В результате проведенных исследований был разработан комплекс методических подходов, позволяющий проводить эффективный поиск молекул однодоменных антител заданной специфичности, а также создавать препараты на их основе, пригодные для проведения доклинических и клинических исследований. На рисунке 15 представлена схематичное изображение такого комплекса, который можно разделить на 3 основных блока:

#### *1. Получение антигена и разработка оптимальной схемы иммунизации*

Этот блок включает получение целевого антигена (мишень) и разработку схем иммунизации. В рамках проведения исследований была продемонстрирована возможность использования для индукции напряженного гуморального иммунного ответа с формированием пула неканонических антител не только антигенов в виде рекомбинантных белков или инактивированного патогена, но методов пассивной иммунизации, основанных на доставке генов, кодирующих вирусные или бактериальные антигены при помощи рекомбинантных аденовирусов или молекул мРНК. В рамках отработки схем иммунизации были исследованы основные показатели, обеспечивающие необходимый уровень ответа в зависимости от типа используемого антигена (кратность, временные интервалы, количество вводимого антигена, тип используемого адьюванта). Описание отдельных схем представлено в разделах 3.2 и 3.3

#### *2. Селекция однодоменных антител заданной специфичности*

Этот блок включает работу по выделению В клеток иммунизированного животного, выделение РНК и получения кДНК из В-клеток крови, амплификация последовательностей, кодирующих переменные домены неканонических антител, с использованием специальных праймеров, обеспечивающих наибольшее разнообразие клонов. В рамках разработки этапа

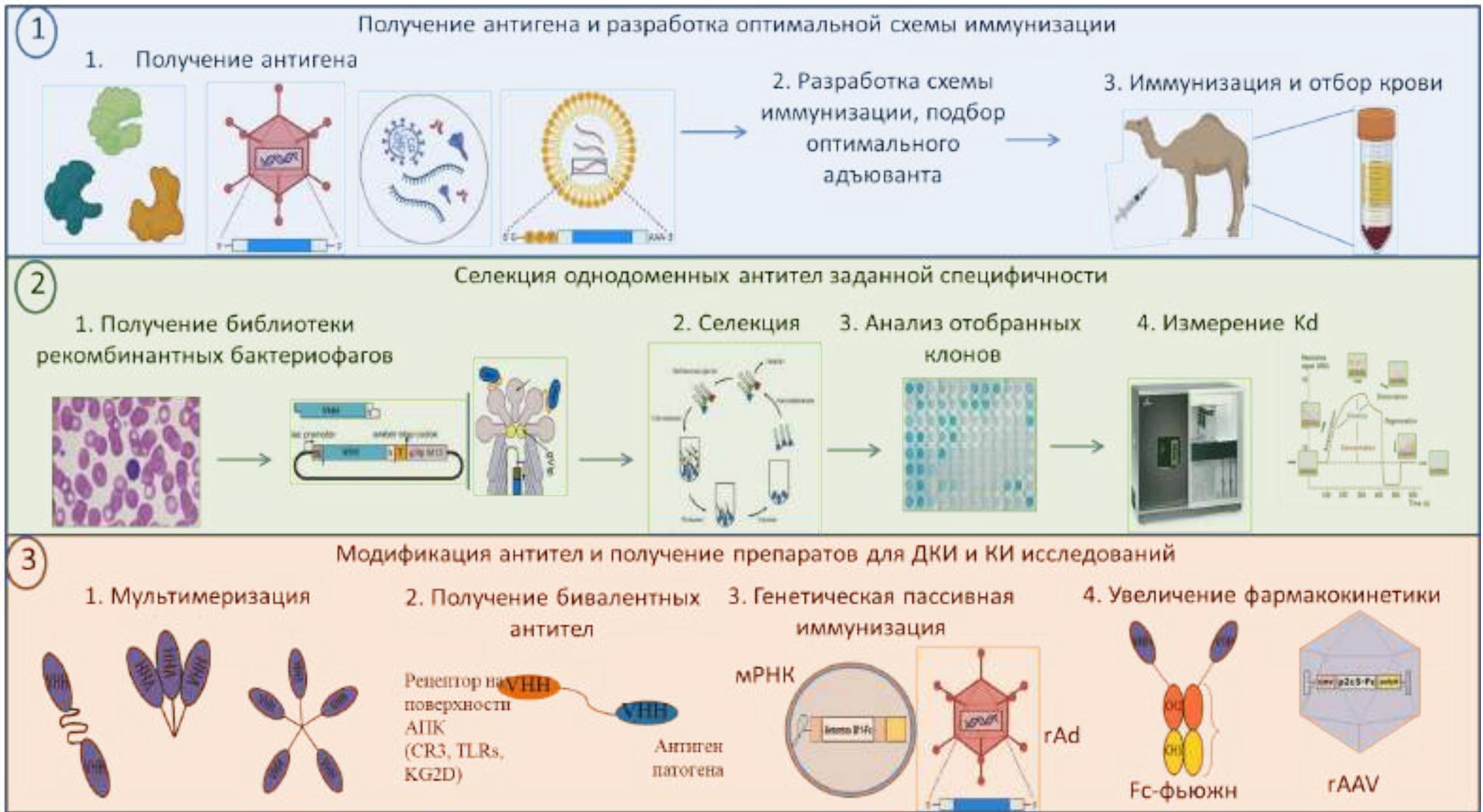


Рисунок 15. Схема универсальной технологической платформы

селекции были проведены исследования по подбору оптимальных условий получения библиотек рекомбинантных бактериофагов, несущих на своей поверхности белок р3, слитый с однодоменным антителом, изучена эффективность применения различных фагов-помощников, а также способов проведения селекции, позволяющих получать панели антител с большим разнообразием по специфичности.

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

3 блок, важный с точки зрения разработки лекарственных препаратов включает модификации однодоменных антител и получение препаратов для доклинических и клинических исследований. Однодоменная структура антител позволяет применять различные подходы по модификации в зависимости от задач. В рамках проводимых исследований применены следующие модификации: для повышения авидности были сконструированы мультимерные или мультивалентные молекулы, сочетающих специфичность к разным эпитопам в рамках одной молекулы; для доставки антител в организм применялись подходы генетической пассивной иммунизации – доставки генов терапевтических антител в составе вирусных векторов или молекул РНК, а также методы, позволяющие существенно увеличить время циркуляции антител в организме, что имеет особое значение при создании средства терапии на основе однодоменных антител, применяемых *in vivo*. В ходе исследований были применены различные подходы, направленные на увеличение фармакокинетики: это получение молекул антител, слитых с Fc-фрагментом, что позволяет увеличить время до нескольких недель, а также способы продукции антител в составе вирусных векторов, значительно увеличивающих время продукции антител. Описание отдельных модификаций представлено в разделах 3.2 и 3.3.

С использованием описанной платформы были проведены исследования возможности ее применения для разработки средств терапии и диагностики как

вирусных (вирус Эбола, коронавирус SARS-Cov-2) так и бактериальных инфекций (*C.botulinum*, *C.difficile*, *M.hominis*)

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

Моноклональные антитела (в том числе однодоменные) могут использоваться как в качестве диагностических молекул, так и как средства нейтрализации различных мишеней, в том числе и бактериальной и вирусной природы. Однако, в ряде случаев, для их эффективного применения требуется проведение ряда модификаций, направленных на изменение фармакокинетики, увеличение афинности и авидности, управление эффекторными функциями антител, реализуемых через взаимодействие Fc-фрагмента с различными рецепторами и т.д. В частности, перспективный класс неканонических однодоменных антител (наноантител), несмотря на очевидные преимущества, имеет ряд недостатков, существенно снижающих их терапевтический потенциал. Из-за небольшого размера молекул (2-3 нм) время циркуляции однодоменных антител в организме составляет 30-40 минут. При этом отсутствие Fc-фрагмента не позволяет задействовать дополнительные эффекторные защитные свойства антител (АЗЦТ, КЗЦТ и др.). Высокий клиренс молекул однодоменных антител, а также отсутствие дополнительных эффекторных доменов может снижать эффективность препаратов на основе однодоменных антител для терапии инфекционных заболеваний. В связи с этим, для повышения терапевтического потенциала однодоменных антител в исследованиях *in vivo*, можно использовать комплекс подходов, направленных на модификацию молекул антител, повышающих их время циркуляции в организме, а также включение дополнительных эффекторных механизмов нейтрализации патогена (получения рекомбинантных вирусных векторов, несущих гены антител, мультимеризация, получение V<sub>HH</sub>-Fc-конъюгатов – «fusionbody», создание мультивалентных молекул и т.д.). Применение различных подходов, направленных на усиление терапевтического потенциала

однодоменных антител, можно рассмотреть на примере разработки средств терапии вирусных инфекций, а также интоксикаций, вызванных бактериальными токсинами.

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

### **3.2.1. Получение однодоменных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола**

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

Коктейли из моноклональных антител, специфичных к EBOV GP, могут обеспечить полную защиту нечеловеческих приматов от БВВЭ, и некоторые из них (Zmapp, MAb114, REGN-EB3) в настоящее время проходят клинические испытания [Moeckotte A. L. 2016; Corti D. et al, 2016]. Помимо моноклональных антител, в последние 20 лет интерес вызывает возможность применения наноантител (неканонические формы моноклональных антител семейства Верблюдовых), а также их модификаций в терапии инфекционных заболеваний [Wu Y. 2017]. Однако существует лишь несколько исследований, направленных на разработку препаратов для лечения БВВЭ на основе наноантител [Liu J. L., 2017]. Основные преимущества наноантител – относительная простая технология получения, а также способность связываться с труднодоступными антигенными эпитопами [Liu J. L., 2017]. В то же время недостатки

наноантител связаны с их быстрым выведением почками и отсутствием самостоятельной эффекторной функции у Fc-фрагмента. Для улучшения фармакокинетических и эффекторных свойств наноантител [De Vlieger D., 2018], а также для увеличения их avidности за счет димеризации молекулы необходима модификация Fc-фрагментом IgG.

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

Для получения панели однодоменных антител использовали технологию, включающую: (1) иммунизацию альпака Ad5-GP; (2) получение панели наноантител, специфичных к гликопротеину вируса Эбола (EBOV GP); (3) отбор клона с оптимальной активностью *in vitro*; (4) модификацию выбранного клона для улучшения его фармакокинетических и иммунологических свойств; (5) оценку защитной активности выбранных клонов *in vivo*. Кроме того, методом фагового дисплея также был проведен отбор рекомбинантных антител, имеющих каноническую структуру переменного фрагмента.

В результате проведенной работы были отобраны и охарактеризованы наиболее перспективные клоны – aEv6 (тяжелопепочечное антитело), p2c5 и

6g3 (рекомбинантные антитела, имеющие каноническую структуру переменного фрагмента). Протективность модифицированных форм этих клонов антител (aEv6-Fc, hp2c5-Fc, h6g3-Fc) оценивали на модели летальной инфекции иммуносупрессивных мышей rVSV-GP, а также на модели летальной инфекции приматов вирусом лихорадки Эбола.

Для моделирования иммуносупрессии в случае использования модели летальной инфекции rVSV-GP мышам вводили дексаметазон и циклофосфамид. Такой подход использовали ранее [Marathe V. M., 2017] для оценки активности противовирусных препаратов, а также для изучения факторов патогенеза вируса лихорадки Эбола. В нашем исследовании показана способность антител aEv6-Fc и h6g3-Fc защищать мышей от летальной инфекции rVSV-GP, что может говорить о его потенциальной противовирусной активности в отношении вируса Эбола. В исследовании протективности на модели летальной инфекции приматов вирусом лихорадки Эбола было показано, что совместное введение рекомбинантных антител hp2c5-Fc и h6g3-Fc обеспечивает 100% защиту приматов при введении через 24 часа после инфицирования.

### ***3.2.1.1 Получение панели рекомбинантных антител, специфичных к EBOV GP***

Панель однодоменных антител, специфичных к EBOV GP, получали путем иммунизации альпака (V. pacos) рекомбинантным аденовирусом Ad5-GP и рекомбинантным белком GP в соответствии со схемой, представленной на рисунок 16А.

На 5-й день после бустирующей иммунизации отбирали 150 мл крови альпака и выделяли сыворотку, в которой определяли титр антител, специфичных к EBOV GP, для подтверждения эффективности иммунизации. Титр антител к EBOV GP определен в разведении 1:16000, что свидетельствует о высоком иммунном ответе у иммунизированного животного (рисунок 15Б).

Для создания иммунной библиотеки однодоменных антител отбирали мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). Нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные фрагменты наноантител,

полученных из РВМС альпака, клонировали в фагмидный вектор рНЕН1. Специфичные антитела отбирали методом фагового дисплея как описано в [Godakova S. A., 2019].

Результаты отбора анализировали с помощью поликлонального фаг-ИФА (рисунок 16В). В дальнейшей работе использовали библиотеку второго раунда селекции с целью предотвращения уменьшения разнообразия наноантител. Нуклеотидные последовательности наноантител идентифицировали при помощи секвенирования нового поколения (NGS).

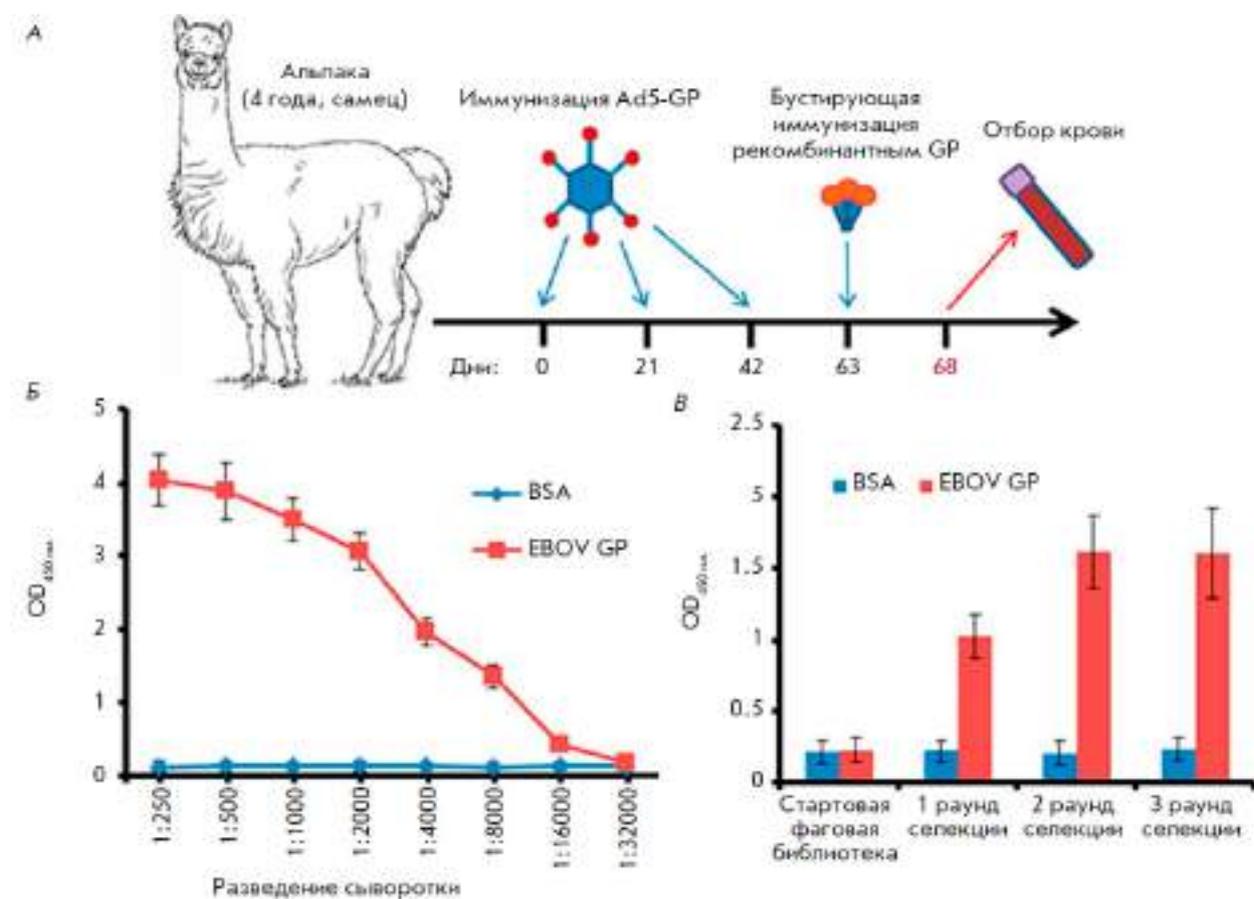


Рисунок 16. Схема иммунизации альпака (*V. pacos*) для получения панели наноантител (А), определение титра антител к EBOV GP в сыворотке иммунизированного альпака (Б) и результаты поликлонального фаг-ИФА (В). Б – в иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл (1 мкг/мл) EBOV GP (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). В качестве конъюгата использовали антитела 5× anti-Lama IgG (Bethyl, A160-100P). В – в иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл EBOV GP (1 мкг/мл) (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). В качестве конъюгата использовали антитела –

HRP-конъюгированные anti-M13 phage IgG (Abcam, Великобритания), разведенные в блокирующем буфере в соотношении 1 : 500.

В результате анализа идентифицировали 18 клонов неканонических однодоменных антител (aE1-18) (таблица 5). Фактор амплификации 16 клонов после двух раундов селекции составил более 20, что указывает на их специфическое накопление в результате связывания с EBOV GP. В то же время анализ библиотеки показал, что отобранные клоны составляют около 51% всех ампликонов библиотеки после селекции, тогда как в стартовой библиотеке число этих клонов было менее 1% (рисунок 17А и 17Б).

Таблица 5. NGS анализ однодоменных антител

Номер клона VHH	Частота прочтения последовательности при NGS секвенировании, %		Фактор амплификации	CDR3 регион (аминокислотная последовательность)
	Стартовая библиотека	Библиотека после селекции		
aEV1	0.33	18.89	57.8	NVQLGRFGILE
aEV2	0.31	7.81	24.9	KSRRYGVDYW
aEV3	0.01	3.7	282.6	AAVNSWAVYSLSRNYDY
aEV4	0.05	2.01	38.4	AMRRGGVSYTYW
aEV5	0.01	3.71	283.5	AVRSERYTRRYDH
aEV6	0.01	0.42	31.7	YVDARYGALHTYRS
aEV7	0.08	1.6	20.4	NAHYWSRD
aEV8	0.01	3.38	258.5	KVTRGDFLGRRTDY
aEV9	0.01	0.2	14.9	AARPGSYSRDARRYD
aEV10	0.03	2.08	79.6	NAQLSRSVLWGRY
aEV11	0.01	1.29	98.8	QKQYAGRLY
aEV12	0.05	0.97	18.59	AADRVLTSSSRNWDY
aEV13	0.01	1.54	117.93	YARRRTYLAAY
aEV14	0.01	0.61	46.7	AAGRSSMGLLDATDWRH
aEV15	0.01	0.85	65.3	NSRGRHDWNRYN
aEV16	0.01	0.42	32.2	AASPRTSMLVVGNDH

aEV17	0.01	1.39	106.6	NAQSHFFGSNY
aEV18	0.05	0.14	2.72	AARPEYYSGTASYVSTSYD

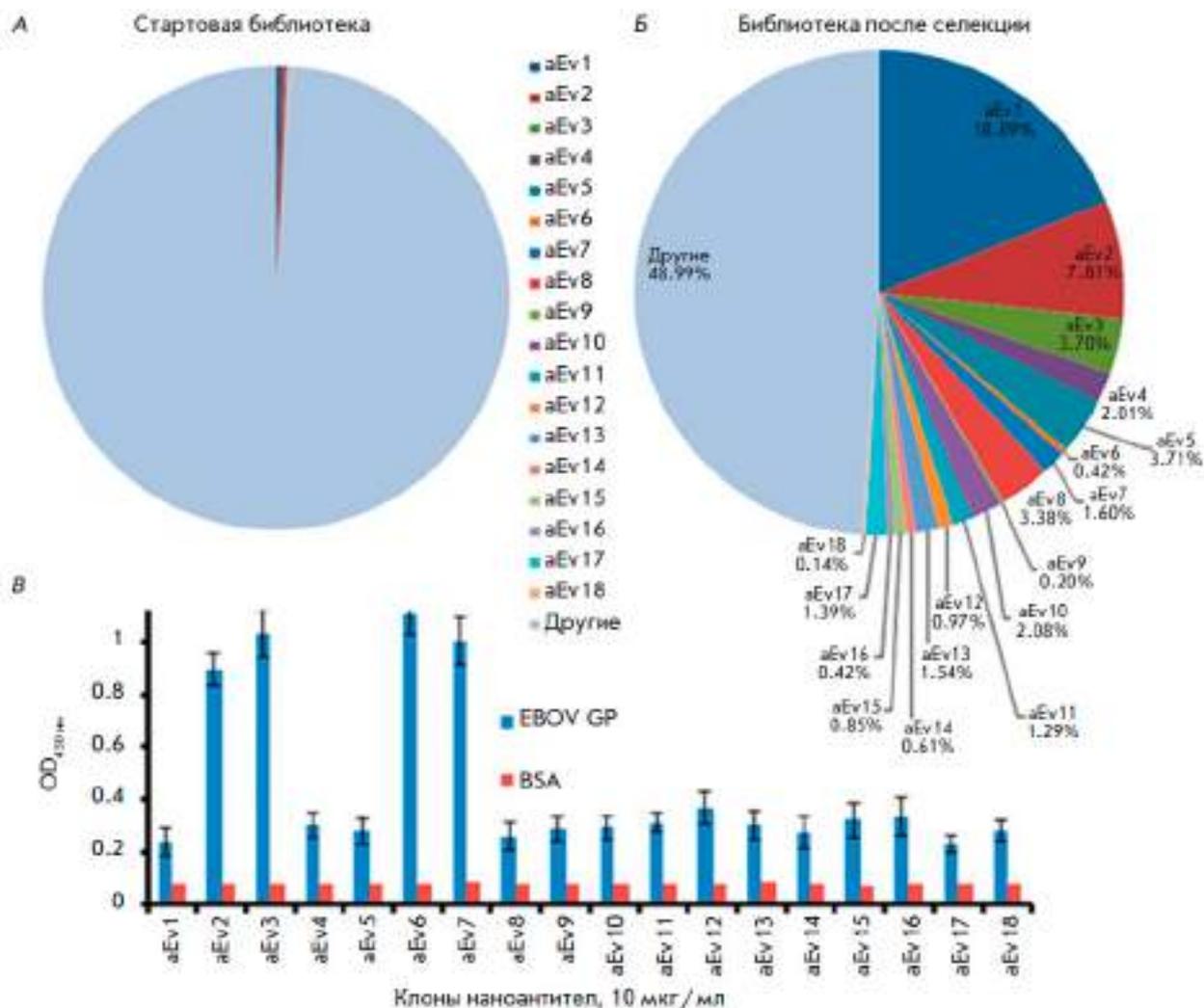


Рисунок 17. Результаты сравнительного анализа соотношения специфических однодоменных антител в библиотеках до и после отбора. *А* – процент клонов в стартовой библиотеке. *Б* – процент клонов в библиотеке после селекции. *В* – скрининг отобранных клонов в непрямом ИФА. аЕv1–18 – клоны отобранных наноантител, EBOV GP – рекомбинантный EBOV GP, BSA – бычий сывороточный альбумин (отрицательный контроль).

По результатам непрямого ИФА с EBOV GP в качестве антигена отобрали четыре клонa неканонических однодоменных антител (аЕv2, аЕv3, аЕv6, аЕv7) как наиболее специфичные (рисунок 17В). На иммунологические

планшеты сорбировали 100 мкл (1 мкг/мл) EBOV GP (H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15). На следующий день лунки промывали 5 раз 0.1% ФСБ-Т, затем блокировали 5% обезжиренным молоком, растворенным в ФСБ-Т. Образцы отобранных клонов (10 мкг/мл) добавляли в лунки и инкубировали при 37°C в блокирующем буфере в течение 1 ч. После пятикратной промывки добавляли HRP-конъюгированные anti-Мус-tag IgG-антитела в блокирующем буфере (1 : 5000) на 1 ч при 37°C. После пятикратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты.

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

В результате работы было получено 600 индивидуальных клонов. После начального скрининга с помощью непрямого ИФА было отобрано 49 клонов, продуцирующих специфические антитела к GP1 (с OD450  $\geq$  2,5). На следующем этапе клоны оценивали в световом микроскопе по размеру и состоянию клеток, а также по OD450 ( $\geq$  3,0) в непрямом ИФА (рисунок 18А). Наконец, было отобрано 6 клонов (2с8, 3а12, 6г3, 8с2, 1а5, 4б9), которые использовали для предварительной продукции и очистки антител в количестве 5-10 мг. Специфичность связывания с эпитопами в структуре GP белка отобранных антител оценивали методом конкурентного ИФА. В результате исследования было установлено, что только два из четырех клонов обладают

способностью связывать разные эпитопы EBOV GP (рисунок 18Б). По-видимому, 6g3 и 4b9 связывали один и тот же эпитоп EBOV GP, а также 2c8 и 8c2, поэтому клоны 6g3 и 2c8 показали себя как наиболее перспективными кандидатами для создания молекул, обладающих защитными свойствами в отношении вируса Эбола.

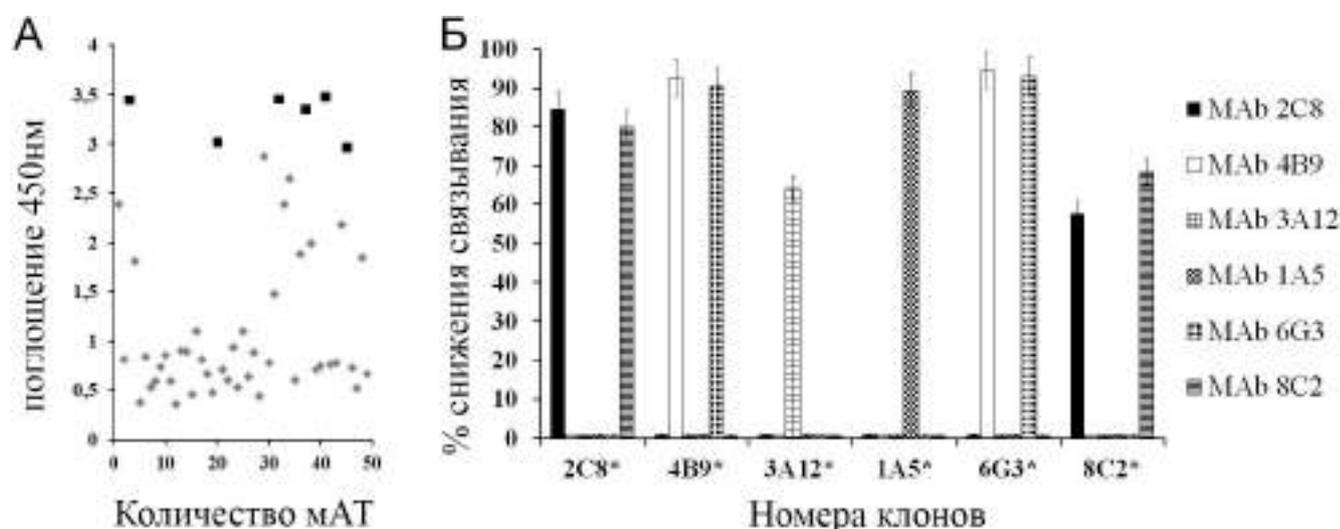


Рисунок 18. Результаты скрининга 49 клонов методом прямого ИФА (А) и анализа перекрестного ингибирования 6 выбранных МКА методом конкурентного ИФА (Б).

А. Микропланшеты с высоким связыванием покрывали белком EBOV GP1 (H.sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1) в количестве 100 нг/лунку. На следующий день добавляли кондиционированные среды из культур клеток и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. После промывки добавляли конъюгированное с пероксидазой хрена антитело анти-IgG мыши на 1 час при 37°C. После пятикратной промывки добавляли субстрат ТМВ и оценивали результаты. Б. Микропланшеты с высоким связыванием покрывали белком EBOV GP1 (H.sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1) в количестве 100 нг/лунку. На следующий день лунки промывали 5 раз 0,1% раствором TPBS, а затем блокировали 5% обезжиренным молоком на TPBS. МАТ, разведенные в блокирующем растворе, добавляли в концентрации 0,1 мг/мл и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Затем добавляли те же клоны МАТ, но конъюгированные с пероксидазой хрена, в разведениях для получения

оптической плотности в пределах 1 – 1,5 единиц при взаимодействии с антигеном в отсутствие конкурирующих антител.

### **3.2.1.2 Оценка аффинности и нейтрализующей активности отобранных клонов антител**

Иммунологические свойства отобранных клонов aEv2, aEv3, aEv6 и aEv7, 2c8 и 6g3 изучали с поверхностного плазмонного резонанса SPR (измерение констант аффинности, KD) и реакции нейтрализации в условиях *in vitro*.

Белковые препараты рекомбинантных антител были использованы для определения констант связывания с антигеном методом измерения поверхностного плазмонного резонанса. Для этого на поверхности декстранового матрикса чипа CM5 был ковалентно иммобилизован рекомбинантный белок GP вируса Эбола (EBOV GP (H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15)). Анализ изменений поверхностного плазмонного резонанса оценивали при использовании различных разведений антител в качестве аналитов. Расчет констант связывания проводили с помощью программы BiaEvaluation, полученные данные представлены в таблице 6.

Таблица 6. Константы связывания рекомбинантных антител с белком GP вируса Эбола.

	<b>ka, 1/ms</b>	<b>kd, 1/s</b>	<b>KD, nM</b>	<b>Rmax</b>	<b>Chi2</b>
aEv2	3,16e-4	2,26e-2	713	107	11,3
aEv3	9,4e-5	5,2e-2	55,3	196	1,74
aEv6	9,88e-5	1,85e-4	0,187	56,3	3,2
aEv7	440	1,06e-5	24	500	1,96
6g3	2,23e-4	3.23e-4	3,78	157	13.7
2c8	8,93e-3	8,25e-4	92,4	15,6	1,57

Самые высокие значения показал клон аЕv6 ( $1.87 \times 10^{-10}$  М), далее клоны 6g3, аЕv7, аЕv3 и 2с8 со значениями  $KD = 3,78 \times 10^{-9}$ ,  $2,4 \times 10^{-8}$ ,  $5,53 \times 10^{-8}$  и  $9,24 \times 10^{-8}$  М соответственно. Клон аЕv2 показал самую низкую аффинность к белку GP вируса Эбола -  $KD = 7.13 \times 10^{-7}$  М.

Далее, предварительно была проведена оценка нейтрализующей активности отобранных клонов антител на двух моделях – подавление цитопатического действия, вызванного добавлением рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного белком GP вируса Эбола на клетках VERO Е6 и подавление бляшкообразования, индуцированного добавлением вируса Эбола к культуре клеток GMK-АН-1(D). Для этого около 100 БОЕ вируса (EBOV или VSV-GP) и около 100 мкг МАТ смешивали и добавляли к клеткам GMK-АН-1(D) или Vero Е6, соответственно. В результате были выявлены пять антител с выраженной вируснейтрализующей активностью в отношении вируса Эбола и три антитела с выраженной вируснейтрализующей активностью в отношении VSV-GP (Таблица 7).

Таблица 7. Первичный скрининг выбранных клонов моноклональных антител с помощью анализов вируснейтрализующей активности.

Клоны	Вирус Эбола	Вирус rVSV-GP
аЕv2	Отсутствие нейтрализации	Отсутствие нейтрализации
аЕv3	Отсутствие нейтрализации	Отсутствие нейтрализации
аЕv6	нейтрализация	Нейтрализация
аЕv7	Отсутствие нейтрализации	Отсутствие нейтрализации
6g3	нейтрализация	Нейтрализация
2с8	нейтрализация	Отсутствие нейтрализации
4b9	нейтрализация	Нейтрализация
3a12	Отсутствие нейтрализации	Отсутствие нейтрализации
1a5	Отсутствие нейтрализации	Отсутствие нейтрализации
8с2	нейтрализация	Отсутствие нейтрализации

Учитывая результаты аффинности, нейтрализующей активности, а также данные конкурентного ИФА клоны аЕV2,3,7, 1а5 и 3а12, 8с2, 4b9 были исключены из дальнейших исследований. При этом клоны аЕV6, 6g3 и 2с8 были отобраны для проведения дальнейшей модификации и оценки протективной активности на летальных моделях инфекции, вызванных вирусом везикулярного стоматита rVSV-GP и вирусом лихорадки Эбола на приматах.

### ***3.2.1.3 Получение модифицированных моноклональных антител, содержащих Fc-фрагмент IgG1 человека и изучение их вируснейтрализующих свойств***

На основе отобранных клонов аЕv6, 6g3 и 2с8 были получены модифицированные молекулы моноклональных антител, слитых с Fc-фрагментом IgG1 человека для улучшения их иммунологических и фармакокинетических свойств.

Для получения плазмидных векторов, экспрессирующих гены тяжелоцепочечного антитела, содержащего вариабельный домен клона аЕv6, а также гены тяжелых и легкой цепей клонов 6g3 и 2с8 использовали вектор pAB-пуго, полученный в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ. Плазмидный вектор pAB-пуго содержит ген устойчивости к антибиотику пурамицину с контрольными элементами для экспрессии в клетках млекопитающих, генетические элементы обеспечивающие репликацию и устойчивость к ампициллину в бактериальной системе, а также генетические элементы, обеспечивающие высокий уровень экспрессии генов рекомбинантных антител в клетках СНО.

Последовательности ДНК, кодирующие антитела аЕv6-hFc, h6g3-hFc и h2с8-hFc были получены модификацией исходных последовательностей путем замены константных участков на последовательности ДНК, характерные для человеческих IgG2, а так же внесения дополнительных мутаций, снижающих аффинность к Fc-рецепторам иммунокомпетентных клеток (E233P, L234V, L235A, A327G, A330S, P331S – где цифра указывает порядковый номер аминокислоты, буквы обозначают исходную и конечную АК при мутации).

Мутации проводились согласно Armour K.L., 1999 и Shields R.L., 2001. Мутации использовались для снижения возможного негативного влияния эффекта антитело-зависимого усиления инфекции при использовании *in vivo*.

Полученные конструкции ДНК были синтезированы *de novo* и клонированы в рамку считывания экспрессионной кассеты плазмидного вектора pAB-puro в ЗАО «Евроген» (для каждой последовательности были получены отдельные конструкции, соответствующие тяжелым и легким цепям моноклональных антител). Синтезированные конструкции использовали для получения стабильных продуцентов антител на основе клеток СНО. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности, кодирующие гипервариабельные участки отобранных антител, представлены в таблице 8.

Таблица 8. Аминокислотные и нуклеотидные последовательности вариабельных доменов антител aEv6, h2c8 и h6g3.

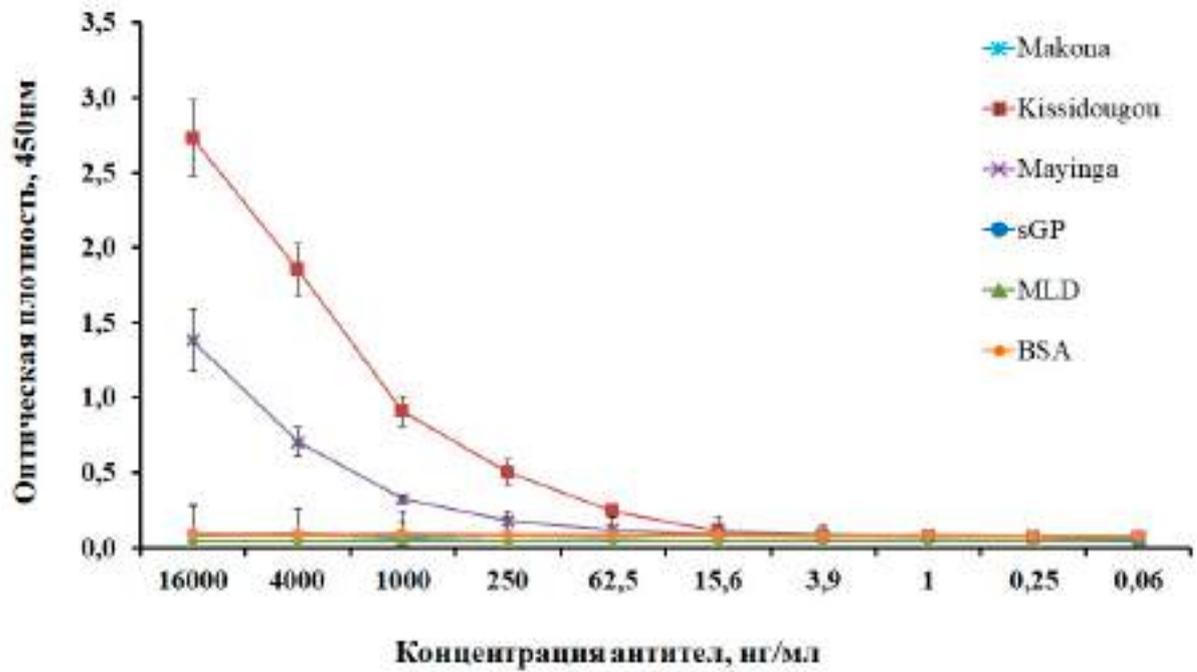
Название цепи	Аминокислотные и нуклеотидные последовательности, кодирующие гипервариабельные участки моноклональных антител изотипа IgG2 человека
<b>Hcv_aEV 6-Fc</b>	CDR1:GRTFSSYV (GGACGCACCTTTAGTAGTTATGTC) CDR2: ITRDGDRT (ATTACCAGGGATGGTGATAGGACA) CDR3:AAVNSWAVYSLSRNYDY (GCAGCAGTGAACAGCTGGGCGGTATATAGTCTATCAAGGAA TTATGACTAT)
<b>Hcv_6g3 h</b>	CDR1:GFNIKATY (GGCTTCAACATCAAGGCAACCTAC) CDR2: IGPANGNI (ATCGGACCTGCCAATGGCAACATC) CDR3:AGYPLIYYDYDFPY (GCTGGCTATCCCCTGATCTACTACGACTACGACTTTCCCTAC)
<b>Lcv_6g3h</b>	CDR1:SSVSY (AGCAGTGTGAGCTAC) CDR2: TTS (ACTACCAGC) CDR3:HQWSSFPYT (CATCAGTGGAGTAGCTTTCCCTACACC)
<b>Hcv_2c8</b>	CDR1:GYTFTDYN (GGCTACACCTTCACCGACTACACC)

<b>h</b>	CDR2:IYPYNGYP (ATCTACCCCTACAACGGATATCCT) CDR3:GLLDYSAMDY (GGACTTCTGGACTACTCTGCCATGGACTAC)
<b>Lcv_2c8h</b>	CDR1:QSLLYTNGKTY (GACAGCCTTCTGTACACCAATGGCAAGACCTAC) CDR2:LVS (CTTGTGAGC) CDR3:LQSTHFPYT (CTGCAGAGCACCCACTTTCCTACACC)

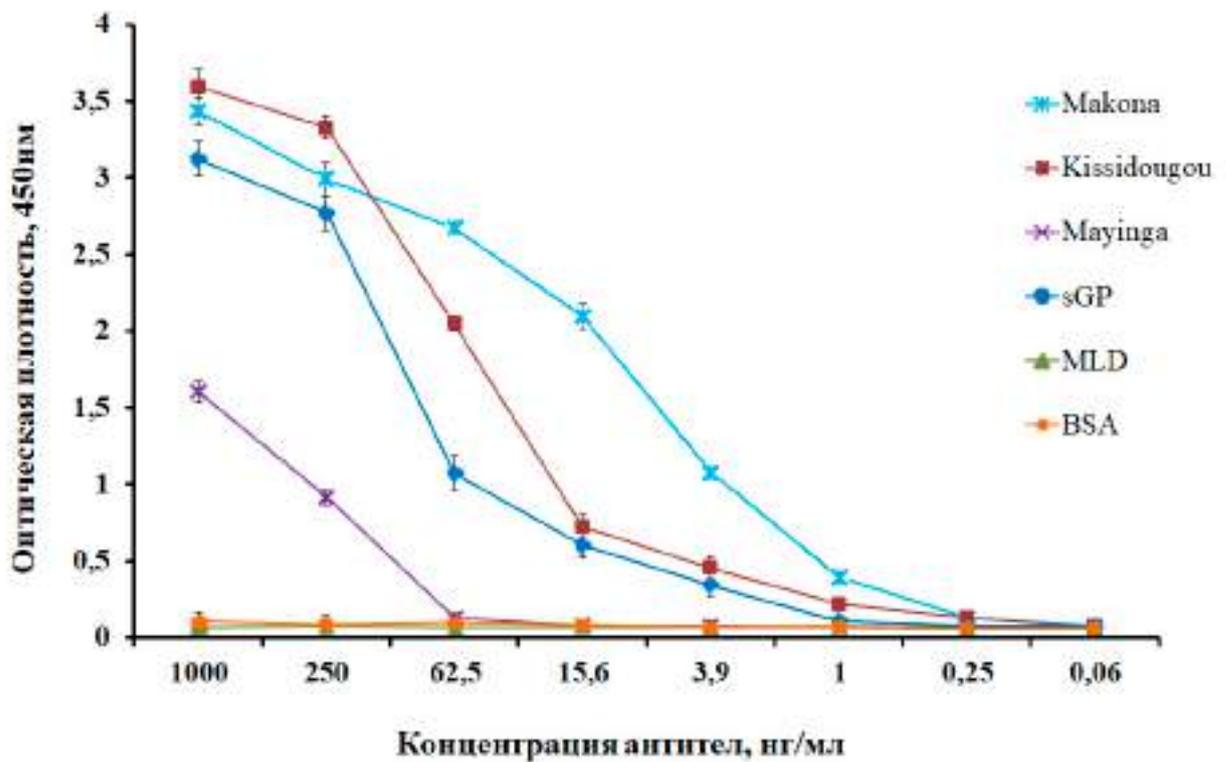
Далее синтезированные конструкции клонировали в плазмиду pAB-puro, содержащую ген устойчивости к антибиотику пурамицину, и таким образом были получены плазмидные конструкции pAB-aEV6-Fc, pAB-2c8hmut-NC, pAB-2c8hmut-LC, pAB-6g3hmut-NC и pAB-6g3hmut-LC соответственно, которые использовали для продукции антител в клетках CHO и их последующей очистки методами афинной и ионообменной хроматографии.

На первом этапе, методом непрямого ИФА была охарактеризована специфичность клонов aEv6, h2c8 и h6g3 к различным белкам вируса Эбола: белок GP штаммов Kissidougou, Mayinga, Makona, а также муциноподобному домену GP (MLD) и секретируемой форме sGP (Рисунок 19). В результате анализа было установлено, что что клон h2c8 достоверно связывался с белком GP штаммов Mayinga, Makona, муциноподобным доменом GP в титрах 1 нг/мл, 1 нг/мл, 3,9 нг/мл соответственно, слабо связывался с белком GP штамма Kissidougou в концентрации 1 мкг/мл и не связывался к секретируемой формой белка GP (sGP). Клон h6g3 связывался с белком GP штаммов Mayinga, Kissidougou, Makona и секретируемой формой sGP в титрах 250 нг/мл, 1 нг/мл, 1 нг/мл и 3,9 нг/мл соответственно и не связывался с муциноподобным доменом GP. В свою очередь клон aEv6 показал высокую специфическую активность в отношении белка GP штаммов Kissidougou и Mayinga (62,5 и 250 нг/мл) и при этом не связывался с MLD и секретируемой формой белка GP вируса Эбола (рисунок 19).

### aEV6-Fc



### h6g3-Fc



## h2c8-Fc

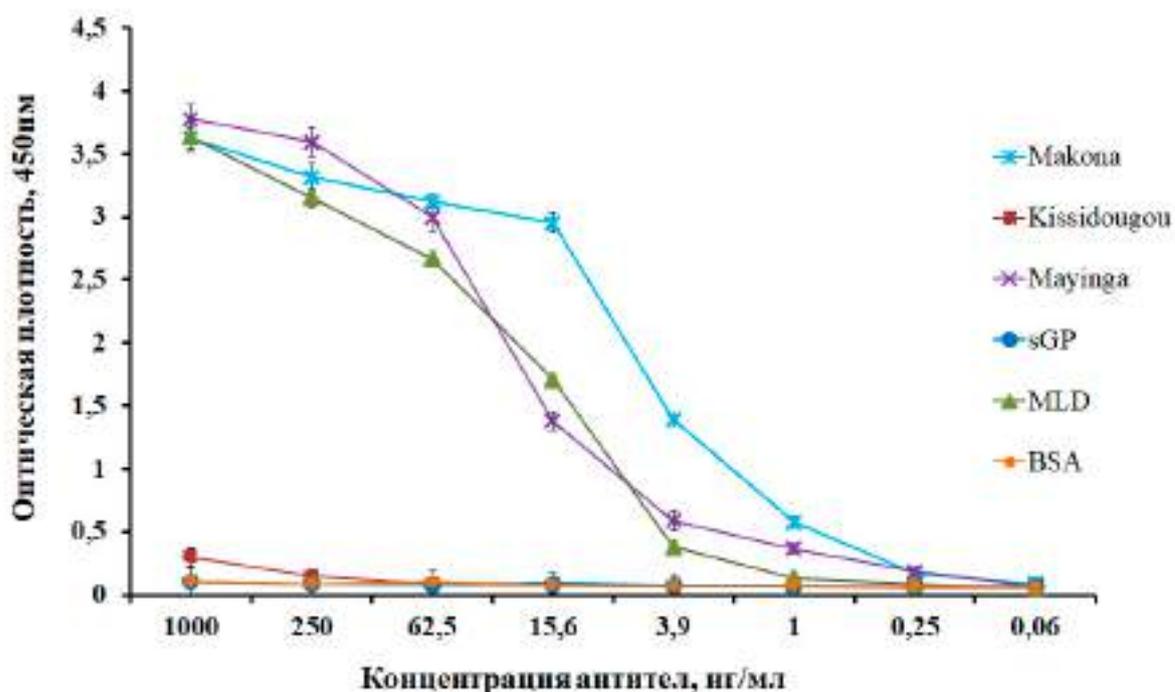


Рисунок 19. Анализ специфической активности моноклональных антител аEv6, h2c8 и h6g3 в отношении различных белков вируса Эбола.

Makona – белок GP вируса Эбола штамма Makona, Kissidougou – белок GP вируса Эбола штамма Kissidougou, Mayinga – белок GP вируса Эбола штамма Mayinga, sGP – секретируемая форма белка GP, MLD – муциноподобный домен, BSA – бычий сывороточный альбумин. Иммунологические планшеты с высоким связыванием сорбировали по 100 нг/лунку различных белков вируса Эбола. В качестве конъюгата использовали козы антитела против человеческого IgG (A0170, Sigma) в блокирующем растворе.

Далее в реакции вирусной нейтрализации с использованием rVSV-GP сравнили антитела аEv6-Fc, h2c8-Fc и h6g3-Fc (Рисунок 20). Для проведения реакции вирус-нейтрализации с использованием вируса везикулярного стоматита использовали линию клеток почки африканской зеленой мартышки VeroE6. Дозу псевдотипированного вируса везикулярного стоматита (rVSV-GP (Mayinga)) брали в расчете 100 БОЕ/лунку.

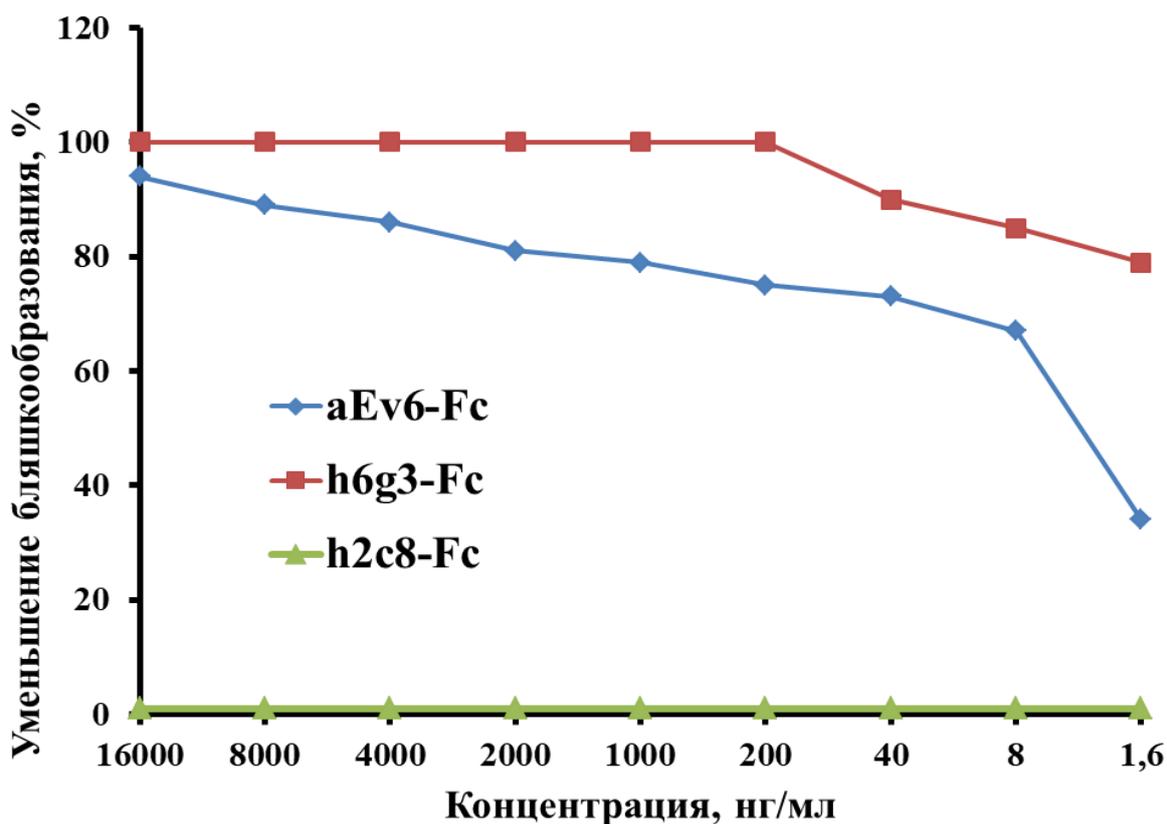


Рисунок 20. Изучение вируснейтрализующей активности моноклональных антител с использованием псевдотипированного вируса везикулярного стоматита.

Исследуемые разведения препаратов антител смешивали с одинаковым числом вирусных частиц псевдотипированного вируса везикулярного стоматита в объеме 100 мкл. Для образования комплекса АГ+АТ, смесь вирусных частиц и препарата инкубировали при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  в течение 60 мин и затем вносили в объеме 200 мкл на лунку к клеткам VeroЕ6 в 6-луночный планшет. Каждое разведение ставилось в трехкратном повторе. В качестве контрольного вируса использовали разведения псевдотипированного вируса с концентрацией 100 БОЕ/100 мкл без добавления препарата антител. Клетки инкубировали при  $t = 37^{\circ}\text{C}$  в течение 2-3 часов. После инкубации среду с комплексом АГ+АТ удаляли из лунок, лунки промывали однократно фосфатно-солевым буфером, затем вносили 3 мл покрытия, содержащего 0,4 % агарозу разведенной в ростовой среды DMEM с 5% эмбриональной телячьей

сыворотки, и оставляли на 48 часов в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при t = 37°C и 100% влажности. Результаты учитывали через 48 часов. Проводили подсчет вирусных бляшек в каждом разведении. За титр вирус-нейтрализующих антител принимали максимальное разведение, дающее снижения вирусных бляшек более чем на 50% по сравнению с контрольным вирусом (PRNT50).

В результате анализа было установлено, что антитело h2c8-Fc не обладает вируснейтрализующей активностью на модели подавления бляшкообразования rVSV-GP, антитело aEv6-Fc имеет подавляет бляшкообразование в концентрации 8нг/мл, в то время как антитело h6g3-Fc показало вируснейтрализующую активноть до концентрации 1,6 нг/мл.

На заключительном этапе была проведена оценка вируснейтрализующей активности моноклональных антител с использованием вируса Эбола. Для этого разведения моноклональных антител: 40, 8, 4, 2,5, 1,25 и 0 мкг/мл смешивали со 110 БОЕ вируса Эбола и добавляли к клеткам GMK-AN-1. Через 7 дней культивирования оценивали результаты (рисунок 21). За титр вирус-нейтрализующих антител принимали максимальное разведение, дающее снижения вирусных бляшек более чем на 50% по сравнению с контрольным вирусом (PRNT50). В результате анализа было установлено, что PRNT50 для клона h2c8-Fc составляет не менее 8 мкг/мл, для клона h6g3-Fc не менее 4 мкг/мл, для клона aEv7-Fc не менее 2,5 мкг/мл. Примечательно, что наибольшую нейтрализующую активность показала смесь двух клонов h2c8-Fc и h6g3-Fc, при смешивани которых с вирусом PRNT50 составила не менее 1,25 мкг/мл.

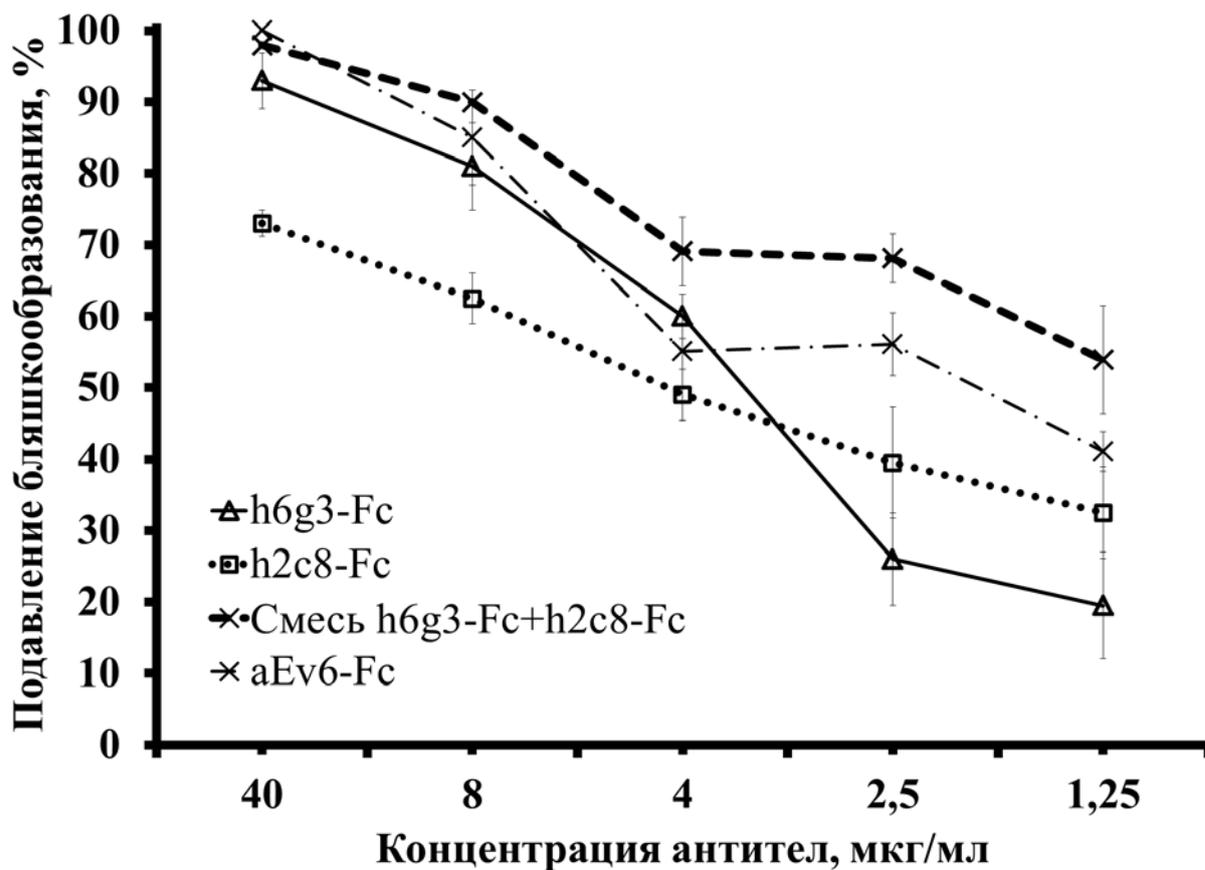


Рисунок 21. Результаты анализа вируснейтрализующей активности моноклональных антител с использованием вируса Эбола.

#### 3.2.1.4 Оценка протективной активности антител на модели летальной инфекции мышей rVSV-GP

На последнем этапе оценивали защитные свойства aEv6-Fc, h2c8-Fc и h6g3-Fc на модели летальной инфекции мышей rVSV-GP. В лаборатории иммунобиотехнологии был получен рекомбинантный вирус rVSV-GP псевдотипированный белком GP вирус Эбола для проведения испытаний. Поскольку rVSV-GP не является патогенным для мышей, перед инъекцией вируса мышам вводили дексаметазон и циклофосфамид для иммуносупрессии [Marathe V. M., 2017]. Эксперимент проводили следующим образом: отбирали пять групп мышей по шесть особей в каждой. Животных из всех групп подвергали иммуносупрессивной терапии в течение 10 дней, после чего мышам

из первой группы проводили заражение вирусом, а животным из опытных групп вводили смесь вирус и антитела.

На 11 день мышам внутривенно вводили  $10^9$  БОЕ rVSV-GP как в отсутствие, так и в присутствии антител aEv6-Fc, h2c8-Fc или h6g3-Fc в нескольких временных диапазонах: предварительно смешанного с вирусом в течение 1 ч при 37°C; смешанного с вирусом непосредственно перед инъекцией; введенного внутривенно спустя 2 ч после инфицирования; введенного внутривенно спустя 5 ч после инфицирования. Схема эксперимента показана на рисунке 22А. За мышами наблюдали в течение 5 дней после заражения. Мыши контрольной группы, которым не вводили антитела, погибли на второй день после заражения. Введение антител спустя 5 ч после заражения также не смогло предотвратить или отсрочить гибель животных. Введение антител спустя 2 ч после заражения обеспечило выживание двух из шести мышей. Предварительная инкубация вируса с антителами aEv6-Fc или h6g3-Fc в течение часа, а также смешивание этих антител с rVSV-GP перед введением полностью защитило животных. При этом антитела h2c8-Fc не показали защитной активности. Результаты эксперимента представлены на рисунке 22Б.

Для более детальной оценки защитных свойств антител на модели инфекции rVSV-GP у мышей, на примере антитела aEv6-Fc, определяли число БОЕ в крови и органах зараженных животных. Для проведения эксперимента были отобраны три группы животных по четыре особи в каждой. Первая группа иммуносупрессированных мышей оставалась интактной. Мыши второй группы были инфицированы rVSV-GP. Третья группа была инфицирована rVSV-GP, предварительно нейтрализованным aEv6-Fc. Затем, спустя 1 и 2 дня, определяли присутствие rVSV-GP в мозгу, печени, почках, селезенке, кишечнике и крови зараженных мышей, используя культуру клеток Vero E6. Результаты эксперимента показаны в таблице 9.

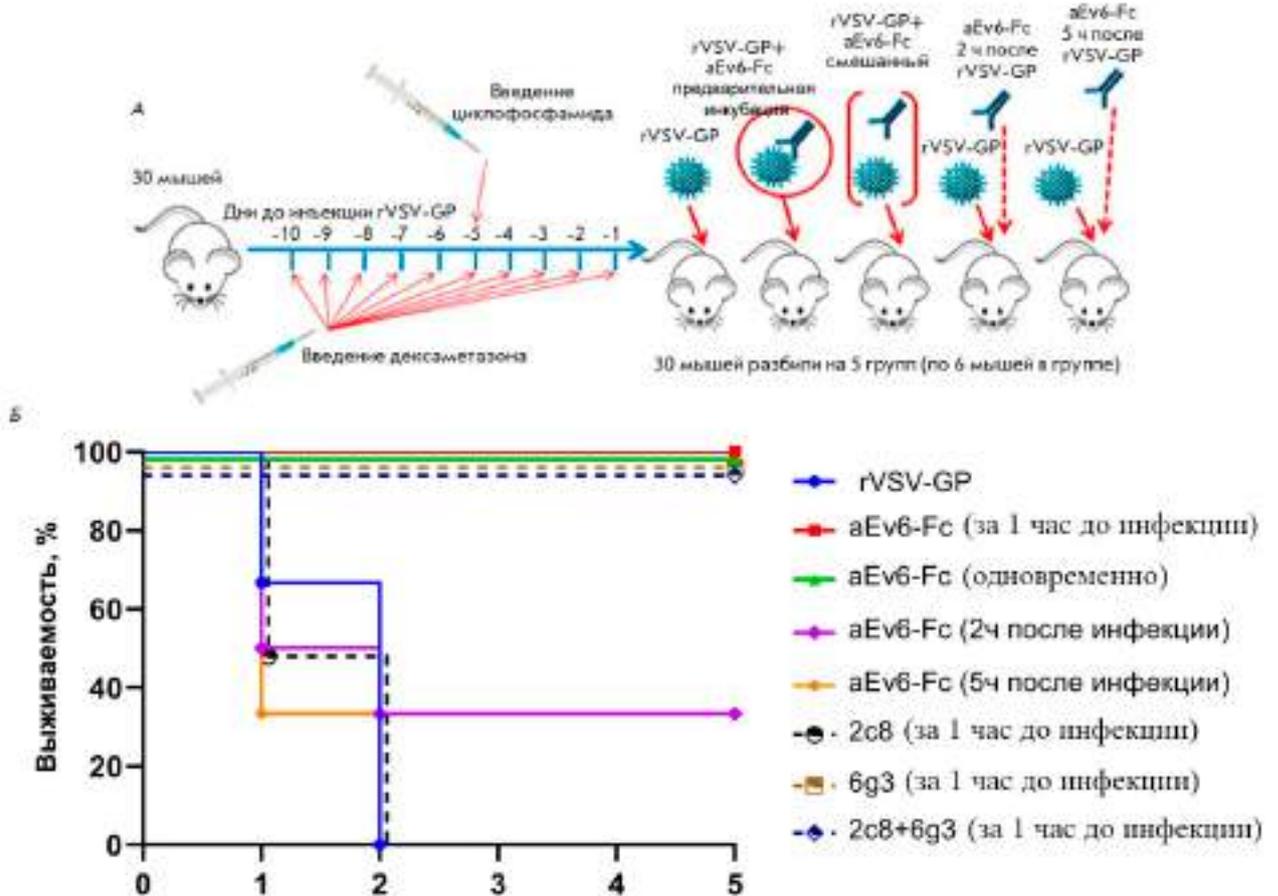


Рисунок 22. Оценка протективной активности антител на модели летальной инфекции rVSV-GP. А – схема эксперимента; Б – результаты эксперимента. А – rVSV-GP – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, псевдотипированный гликопротеином вируса Эбола (*H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1*); Б – rVSV-GP – мыши, инфицированные rVSV-GP ( $10^9$  БОЕ/мышь); aEv6-Fc, 2c8, 6g3, 2c8+6g3 (за 1 час до инфекции) – мыши, получившие rVSV-GP ( $10^9$  БОЕ/мышь), ранее смешанный и инкубированный в течение часа с 300 мкл антител aEv6-Fc, h2c8-Fc, h6g3-Fc или их смеси, соответственно; rVSV-GP+aEv6-Fc (одновременно) – мыши, получившие rVSV-GP ( $10^9$  БОЕ/мышь), смешанный с 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл) перед введением; rVSV-GP+aEv6-Fc (2 ч после заражения) – мыши, получившие 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл) через 2 часа после заражения rVSV-GP ( $10^9$  БОЕ/мышь); rVSV-GP+aEv6-Fc (5 ч после заражения) – мыши, получившие 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл) через 5 часов после заражения rVSV-GP ( $10^9$  БОЕ/мышь).

В тканях и органах иммуносупрессированных мышей, не зараженных rVSV-GP (отрицательный контроль), признаки присутствия вируса не обнаружены. У животных второй группы (иммуносупрессированные мыши, инфицированные rVSV-GP) вирус обнаружен в крови, печени, почках, селезенке в первый день после его введения. На второй день титр rVSV-GP стал значительно больше в крови и печени, в то время как в органах и тканях мышей, которым rVSV-GP вводили вместе с антителами aEv6-Fc (группа 3), вирус не был обнаружен.

Таблица 9. Титры rVSV-GP в некоторых органах инфицированных мышей

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

Таким образом, экспериментальные данные на модели летальной инфекции мышей рекомбинантным вирусом везикулярного стоматита показали, что антитела aEv6-Fc и h6g3-Fc обладали вируснейтрализующей и протективной активностью. В данном исследовании впервые показана принципиальная возможность получения наноантител и их модификаций, специфичных к поверхностному гликопротеину вируса лихорадки Эбола и обладающих выраженной противовирусной активностью в летальной модели мышей, инфицированных псевдотипированным вирусом везикулярного стоматита. Полученные результаты могут быть использованы при разработке средства терапии лихорадки Эбола.

### ***3.2.1.5 Оценка протективной активности антител на модели летальной инфекции макак-резусов вирусом лихорадки Эбола***

Исследования проводились в ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Подробные схемы, описание и результаты исследования приведены в отчётах о

научно-исследовательских работах «ПРОВЕДЕНИЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ТЕРАПИИ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА», «ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ В КОМБИНИРОВАННОЙ ТЕРАПИИ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА» и «ОЦЕНКА ПРОТЕКТИВНОСТИ ГУМАНИЗИРОВАННЫХ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ В ТЕРАПИИ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА» Федерального Государственного Бюджетного Учреждения «48 центральный научно-исследовательский институт» Министерства Обороны Российской Федерации (ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России).

Защитную способность клонов аЕv6-Fc, h2c8-Fc или h6g3-Fc оценивали с помощью пассивной внутривенной иммунизации самцов макак-резусов (5 животных в группе), зараженных внутримышечно 15LD50 EBOV за 24 часа до начала терапии. Эксперимент включал группы, которым вводили аЕv6-Fc, h2c8-Fc или h6g3-Fc отдельно и группу животных которым вводили смесь h2c8-Fc и h6g3-Fc, поскольку в эксперименте по изучению вируснейтрализующих свойств антител на модели подавления бляшкообразования смесь этих двух клонов показала большую активность. Интактных животных использовали в качестве положительного контроля, а животных, получавших плацебо (PBS), использовали в качестве отрицательного контроля. Животным из групп аЕv6-Fc, h2c8-Fc или h6g3-Fc вводили соответствующие антитела в дозе 50 мг/кг 5 раз на 1, 3, 5, 7 и 9 день после заражения (рисунок 23). В результате исследования было установлено, что животные из группы положительного контроля оставались живыми до конца эксперимента. Все животные из групп контрольной дозой вируса и плацебо умерли на 8 и 10 день соответственно. Все животные, получавшие аЕv6-Fc и h2c8-Fc, погибли на 7 и 12-й день, соответственно, тогда как только 2 из 3 животных, получавших h6g3-Fc, погибли. Наилучшие результаты были получены в группе, получавшей смесь h2c8-Fc и h6g3-Fc, в которой ни одно животное не погибло до конца эксперимента, что свидетельствует о синергическом эффекте защитной

способности указанных антител. Результаты эксперимента представлены на рисунке 24. Таким образом, в результате эксперимента была продемонстрирована 100% выживаемость инфицированных животных при введении коктейля из 2-х моноклональных антител, одно из которых специфично к муциновому домену белка GP вируса Эбола



Рисунок 23. Схема заражения животных летальной дозой вируса Эбола и схемой пассивной иммунизации моноклональными антителами.

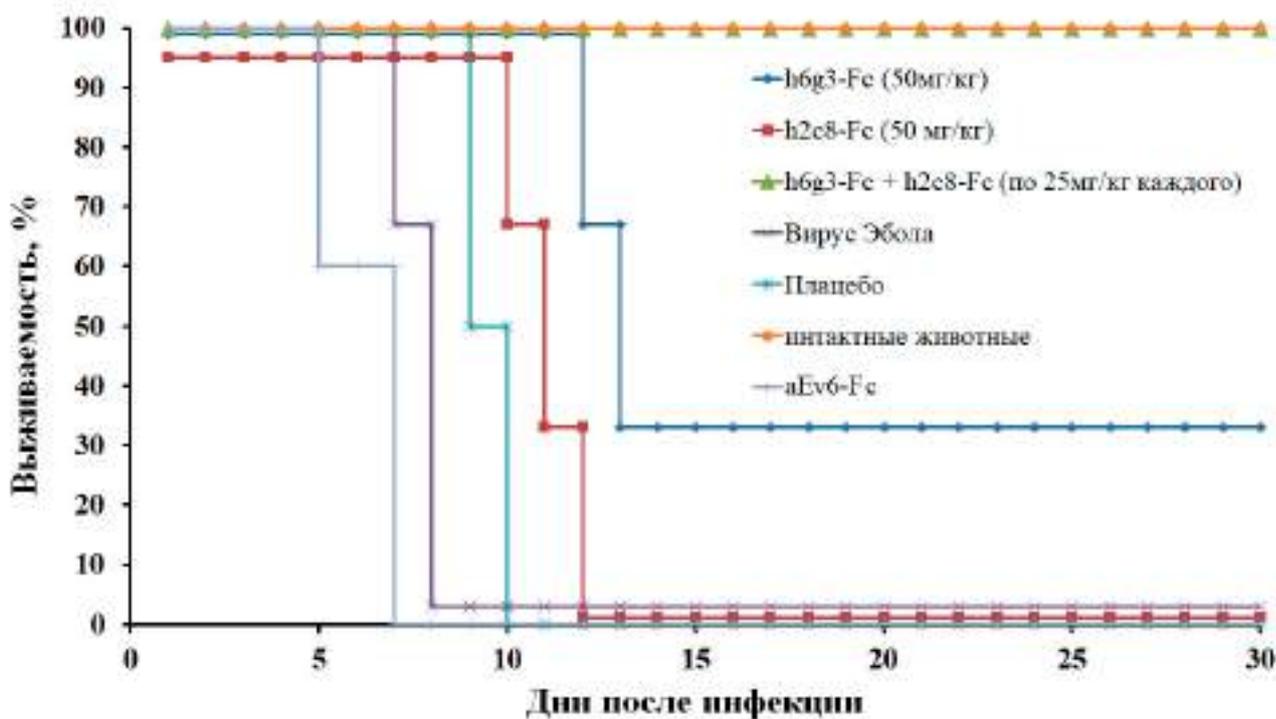


Рисунок 24. Защитная активность моноклональных антител на модели летальной инфекции макак-резусов вирусом лихорадки Эбола.

Специфичность гибели животных определяли по наличию вируса в образцах печени. Отрицательные колонии специфической морфологии, образованные вирусом Эбола в культуре клеток, свидетельствовали о специфичности гибели животных.

### **3.2.1.6 Доклинические исследования безопасности и фармакокинетики препарата ГамЭзумаб**

На основе анализа протективной активности моноклональных антител был разработан препарат для экстренной профилактики и этиотропной терапии лихорадки Эбола на основе смеси 1:1 двух клонов h2c8-Fc и h6g3-Fc. В рамках последующей разработки был проведен полный спектр доклинических исследований безопасности препарата, включающий: изучение острой и хронической токсичности; иммунотоксичности и аллергизирующих свойств, а также репродуктивной токсичности. Ниже представлены основные результаты исследования.

#### ***Доклинические исследования фармакокинетики препарата***

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

Доза вводимого препарата составляла 50 мг/кг (терапевтическая доза, вводимая приматам на модели летальной инфекции). Фармакокинетика препарата изучалась при однократном внутривенном способе введения. Для оценки распределения препарата использовали показатель кажущегося объема распределения, который определяется как отношение содержания препарата в организме к его концентрации в крови. Т.е. под объемом распределения понимается условный объем, в котором может быть распределен препарат, при условии, что его концентрация везде такая же, как и в плазме. Для определения количества препарата в сыворотке крови использовали метод иммуноферментного анализа связывания с антигеном, сорбированном на твердой фазе. Полученные значения оптической плотности пересчитывали в концентрацию препарата на основании калибровочной кривой. Препарат

вводили мышам в хвостовую вену в дозе 50 мг/кг. Точки отбора проб крови включали: 2 часа после полного введения препарата, 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов, 7 дней, 10 дней, 14 дней, 21 день. На каждую временную точку использовали по 3 животных. Сыворотку исследовали на предмет количества препарата методом иммуноферментного анализа на антигене.

Таблица 10. Фармакокинетические параметры.

Параметры	Единицы	Значение
Lambda_z	1/h (часы)	0,0106
t1/2	h (часы)	65,3970
Tmax	h (часы)	2,0000
Cmax	мкг/мл	529,0961
T_infusion	Часы	0,0010
Clast_obs/Cmax		0,0141
AUC 0-t	мкг/мл*часы	63 665,5203
AUC 0-inf_obs	мкг/мл*часы	64 370,5493
AUC 0-t/0-inf_obs		0,9890
AUMC 0-inf_obs	мкг/мл*часы ^2	8 534 558,6210
MRT 0-inf_obs	Часы	132,5843
Vz_obs	(мг)/(мкг/мл)	0,0013
Cl_obs	(мг)/(мкг/мл)/часы	0,000014
Vss_obs	(мг)/(мкг/мл)	0,0019

Lambda\_z - константа реакции элиминации; t1/2 – период полувыведения; Cmax – максимальная концентрация; Clast\_obs/Cmax – доля вещества в последней точке наблюдения относительно максимальной концентрации; AUC 0-t – экспериментальная площадь под кривой концентрация-время; AUC 0-inf\_obs - площадь под кривой концентрация-время с учетом экстраполяции данных; AUC 0-t/0-inf\_obs – доля экспериментальной площади под кривой концентрация – время от площади с учетом данных экстраполяции; AUMC 0-inf\_obs - площадь под первый момент кривой концентрация-время; MRT 0-inf\_obs - среднее время пребывания (удерживания); Vz\_obs - объем распределения; Cl\_obs метаболический клиренс; Vss\_obs - кажущийся объём распределения в равновесном состоянии.

Фармакокинетические параметры были рассчитаны на основании математической модели, которая предполагает внутривенное введение препарата и не учитывает компартментализацию, что обосновано отсутствием в нормальных тканях антигена для антител, входящих в состав препарата.

Общий объем распределения препарата ( $V_{ss\_obs}$ ) составил чуть более 1,85 мл/кг ( $0,00185 \text{ (мг/кг)/(мкг/мл)}$ ), что подтверждает 100% биодоступность препарата и свидетельствует о том, что он полностью распределен в крови мышей. Константа реакции элиминации ( $\lambda_z$ ) составила 0,01/час; метаболический клиренс ( $Cl_{obs}$ ) - 0,0014 мл/час ( $0,0000139815 \text{ (мг/кг)/(мкг/мл)/час}$ ); время полувыведения ( $t_{1/2}$ ) - 65 часов; максимальная концентрация в плазме крови ( $C_{max}$ ) - 529 мкг/мл; среднее время удержания препарата ( $MRT_{0-inf\_obs}$ ) - 132,6 часов; при этом площадь под экспериментальной кривой концентрация-время ( $AUC_{0-t}$ ) составила 63665,5 мкг/мл\*час, что отличается от площади с учетом экстраполяции данных менее чем на 5 % ( $AUC_{0-t/0-inf\_obs}$ ).

Таким образом, общий объем распределения препарата ( $V_{ss\_obs}$ ) составил чуть более 1,85 мл/кг ( $0,00185 \text{ (мг/кг)/(мкг/мл)}$ ), что подтверждает 100% биодоступность препарата и свидетельствует о том, что он полностью распределен в крови мышей. Константа реакции элиминации ( $\lambda_z$ ) составила 0,01/час; метаболический клиренс ( $Cl_{obs}$ ) - 0,0014 мл/час ( $0,0000139815 \text{ (мг/кг)/(мкг/мл)/час}$ ); время полувыведения ( $t_{1/2}$ ) - 65 час; максимальная концентрация в плазме крови ( $C_{max}$ ) - 529 мкг/мл; среднее время удержания препарата ( $MRT_{0-inf\_obs}$ ) - 132,6 часов; при этом площадь под экспериментальной кривой концентрация-время ( $AUC_{0-t}$ ) составила 63665,5 мкг/мл\*час, что отличается от площади с учетом экстраполяции данных менее чем на 5 % ( $AUC_{0-t/0-inf\_obs}$ ).

Препарат характеризуется линейной фармакокинетикой, 100% биодоступностью, объемом распределения соответствующим объему циркулирующей крови и периодом полувыведения 65 часов.

## *Исследование пирогенности препарата на основе гуманизированных моноклональных антител для терапии болезни вызванной вирусом Эбола.*

Пирогенные вещества - это высокомолекулярные соединения липополисахаридной природы с молекулярной массой до 8000000 и размером частиц от 50 нм до 1 мкм, состоят из 3 частей:

1) общий полисахарид, он одинаков для многих грамотрицательных бактерий;

2) иммуноспецифическая полисахаридная цепь, характерная для каждого вида микробов;

3) липид А (токсичная часть) - именно он вызывает пирогенную реакцию организма. Представляет собой дисахарид глюкозамин, к которому амидными и эфирными связями присоединяются жирные кислоты (Rietschel E.T., 1975).

Липополисахариды являются термостабильными веществами. Они не разрушаются при температуре стерилизации 120°C и 132°C. Также они могут сохраняться в растворах, прошедших стерилизацию фильтрованием (Dressel H., 1979). Поэтому при приготовлении лекарственных форм для инъекций очень важно строгое соблюдение асептики.

Испытанию подлежат инъекционные лекарственные средства, предназначенные для внутривенного, внутримышечного, подкожного введения и введения в полости. Испытание на пирогенность инъекционных растворов и субстанций, из которых они изготавливаются, может проводиться двумя методами: ферментативным и биологическим. Ферментативный метод позволяет выявить присутствие эндотоксинов с помощью лимулус-амебоцитного лизата (ЛАЛ-тест) [Vanhaecke E., 1987].

Биологический метод заключается во введении исследуемого препарата кроликам с дальнейшим определением температуры тела кроликов до и после инъекции. Испытания на пирогенность препаратов проводили в соответствии с методикой, указанной в ГФ РФ XII. Испытания на пирогенность препаратов проводили в соответствии с методикой, указанной в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств

(Иммунобиологические лекарственные препараты). Часть вторая / Под ред. А.Н. Миронова. -М.: Гриф и К, 2012. - § 2.4.1. По данной методике испытание лекарственного средства проводили поэтапно. На каждом этапе использовали трех кроликов. По результатам изучения пирогенности лекарственного средства на основе гуманизированных рекомбинантных моноклональных антител на кроликах было установлено, что препарат при введении кроликам внутривенно является апирогенным.

По результатам изучения препарата на основе гуманизированных рекомбинантных моноклональных антител методом ЛАЛ-теста было установлено, что препарат не содержит бактериальных эндотоксинов и является апирогенным.

***Исследование острой токсичности препарата на основе гуманизированных моноклональных антител для терапии болезни вызванной вирусом Эбола***

Острую токсичность изучали на мышах и кроликах (самцах и самках). Мышам исследуемый препарат вводили внутривенно и подкожно, кроликам – внутривенно.

Мышам препарат вводили три раза с перерывом между введениями 2 часа в максимально возможных объемах: при внутривенном введении – 0,5 мл, при подкожном – 1 мл. Суммарные дозы составили: при внутривенном введении 1,5 мл (в среднем 650 мг/кг), при подкожном введении 3 мл (в среднем 1300 мг/кг) и превысили предполагаемую суточную дозу для человека (14 мг/кг) в среднем в 46 раз и 92 раза соответственно.

Кроликам препарат на основе гуманизированных антител вводили однократно в максимально возможном объеме – 20 мл. Средние дозы составили 100 мг/кг и превысили предполагаемую суточную дозу для человека в среднем в 7 раз.

На протяжении эксперимента все животные оставались живы.

В процессе эксперимента ни у одного животного не было выявлено признаков интоксикации. Во всех группах животные выглядели здоровыми,

охотно поедали корм, реагировали на внешние раздражители. Мышечный тонус не отличался повышенной возбудимостью. Животные были средней упитанности, истощением не страдали. Шерстный покров густой, ровный и блестящий, плотно прилегал к поверхности тела, выпадения или ломкости шерсти не выявлено. Область живота в объеме не увеличена. Дыхание ровное, обычного ритма, незатрудненное. Слюноотделение без патологии. Ушные раковины без корок, не воспалены, подергиваний не замечено. Зубы обычного цвета, поломок не наблюдалось. Частота мочеиспускания, цвет мочи, желудочно-кишечные показатели, мышечный тонус, рефлексы соответствовали физиологической норме. Зоосоциальное поведение опытных животных не отличалось от контрольных.

Оценка динамики массы тела показала, что препарат на основе моноклональных антител не оказывает влияния на данный показатель.

Некропсия, проведенная через 14 дней после введения тестируемого препарата, не показала отклонений в структуре и массе внутренних органов. При макроскопическом исследовании отчетливого влияния препарата на основе моноклональных антител на состояние внутренних органов мышей и кроликов не установлено, различий между контрольными и опытными группами не обнаружено.

Таким образом, данные наблюдений за экспериментальными животными, а также данные некропсии свидетельствуют об отсутствии токсического действия препарата на основе гуманизированных моноклональных антител для терапии болезни вызванной вирусом Эбола на организм животных.

***Исследование токсичности при повторном введении препарата на основе гуманизированных моноклональных антител для терапии болезни вызванной вирусом Эбола***

Исследования проводили на половозрелых крысах и кроликах (самцах и самках). Тестируемый препарат вводили крысам внутрибрюшинно, кроликам внутривенно через день в течение 28 дней. Крысам вводили предполагаемую

дозу для человека (14 мг/кг) и десятикратную дозу (140 мг/кг), кроликам терапевтическую и пятикратную терапевтическую (70 мг/кг) дозы.

Во время проведения эксперимента гибели животных не зарегистрировано. При наблюдении за животными не было замечено симптомов интоксикации.

Анализ данных гематологических показателей выявил некоторые отклонения у животных опытных групп по сравнению с контрольными. Однако все отклонения колебались в пределах референсных значений или не были значимы по отношению к фоновым показателям.

Анализ данных биохимических показателей сыворотки крови крыс показал обратимое повышение активности АЛТ, щелочной фосфатазы и количества общего билирубина у самцов, у кроликов самцов – повышение билирубина.

Все остальные показатели, снимаемые у животных на протяжении исследования (динамика массы тела, ректальная температура, потребление корма и воды, показатели сердечно-сосудистой, выделительной систем, поведенческие реакции), находились в пределах физиологической нормы и не отличались между группами.

При проведении некропсии, как через сутки после последнего введения препарата, так и после отставленного периода, не наблюдали патологических изменений во внутренних органах животных.

При гистологическом исследовании было установлено, что повышенные дозы препарата на основе моноклональных антител могут вызывать функциональные изменения в печени, селезёнке, почках, легких и тимусе, выражающиеся в тканевом увеличении межклеточного пространства, полнокровием сосудов, изменением формы клеток.

В отставленных группах крыс, выведенных из эксперимента через 14 суток после отмены препарата, происходит практически полное восстановление тканей всех исследуемых органов.

В рамках данного исследования не было выявлено местно-раздражающего действия препарата на основе моноклональных антител.

## *Исследование алергизирующих свойств и иммуотоксического действия препарата*

Для изучения алергизирующих свойств тестируемого препарата использовали стандартные методы исследования *in vivo* и *in vitro*. Были проведены следующие тесты: оценка анафилактогенной активности, конъюнктивальная проба, реакция дегрануляции тучных клеток.

Эксперименты *in vivo* проводили на морских свинках, как наиболее чувствительных, в видовом отношении, животных. Исследование *in vitro* проводили на тучных клетках крысы.

Оценку анафилактогенной активности изучали при постановке реакции общей анафилаксии на морских свинках. Учет интенсивности анафилактогенного шока вели в индексах по Weigle.

Конъюнктивальную пробу оценивали на морских свинках, которым вводили тестируемый препарат в двух дозах: предполагаемой терапевтической дозе – 14 мг/кг и десятикратной терапевтической дозе – 140 мг/кг. Конъюнктивальная проба является очень чувствительным тестом и в ряде случаев позволяет выявить реакцию животных на алерген при слабой алергизации.

Для выявления сенсбилизации у животных использовали тест *in vitro* – реакцию дегрануляции тучных клеток. Для проведения реакции использовали тучные клетки крысы.

Исследование иммуотоксичности препарата на основе моноклональных антител включало в себя оценку гуморального иммунного ответа, клеточного иммунного ответа и фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов. Эксперименты проводили на здоровых половозрелых мышах линий СВА и мышах-гибридах первого поколения (СВА × С57ВL/6)F1 после однократного и курсового введения препарата. При однократном введении препарата использовали диапазон доз: от десятикратной до 250 раз увеличенной терапевтической дозы. При курсовом введении препарат вводили в течение 20

дней в двух дозах: терапевтической дозе (14 мг/кг) и дозе на порядок выше (140 мг/кг).

Для выявления возможного иммуотропного потенциала тестируемого препарата проводили предварительную оценку в тесте выработки антителообразующих клеток (АОК) при иммунизации Т-зависимым антигеном (ЭБ). Препарат на основе моноклональных антител вводили животным однократно в возрастающих дозах: 140 мг/кг (ТДх10), 700 мг/кг (ТДх50), 3500 мг/кг (ТДх250).

Гуморальный иммунный ответ при курсовом введении оценивали по определению титра антител в реакции гемагглютинации. В качестве антигена использовали эритроциты барана (ЭБ).

Для оценки влияния препарата на основе моноклональных антител на клеточный иммунный ответ использовали реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к гаптену – тринитробензосульфоновой кислоте (ТНБС).

Оценку фагоцитарной активности проводили на перитонеальных макрофагах мышей. Для фагоцитоза использовали нейтральный красный.

В рамках данного исследования было установлено, что препарат, введенный животным, как в терапевтической дозе, так и в 10 раз ее превышающей, может вызывать слабую анафилаксию у морских свинок.

При постановке теста «конъюнктивальная проба» у животных не было выявлено гиперчувствительности как немедленного, так и замедленного типа.

В тесте реакции дегрануляции тучных клеток *in vitro* на тучных клетках крысы, с использованием сыворотки сенсibilизированных тестируемым препаратом животных, количество дегранулирующих клеток не превысило 20%-й уровень, что позволяет считать реакцию отрицательной.

Исследование, проведенное в объеме первого этапа оценки иммуотоксичности, показало, что препарат на основе моноклональных антител не стимулирует повышенную выработку антителообразующих клеток и не изменяет содержание антител в сыворотке крови иммунизированных

эритроцитами барана мышей. Полученные данные позволяют заключить, что тестируемый препарат не имеет активности в отношении пролиферации лимфоцитов и не влияет на формирование гуморального звена иммунитета.

При постановке реакции гиперчувствительности замедленного типа было выявлено, что индекс реакции опытных мышей превышает индекс реакции контрольных животных почти в 2 раза. Полученные данные свидетельствуют о том, что в тестируемых дозах введение препарата оказывает Т-лимфоцитзависимое иммуностимулирующее действие.

Введение препарата на основе моноклональных антител оказывало иммуностимулирующее влияние и на функциональную активность макрофагов перитонеального экссудата мышей, что сопровождалось увеличением показателей поглотительной способности фагоцитов.

Результаты проведенного исследования позволяют сделать вывод, что препарат на основе гуманизированных моноклональных антител для терапии болезни вызванной вирусом Эбола обладает иммуностимулирующими свойствами, но может вызывать слабую анафилактическую реакцию у животных.

### ***Исследование репродуктивной токсичности препарата***

Изучение репродуктивной токсичности (токсического действия на репродуктивную функцию самцов и самок, эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в пренатальном периоде, аномалий и задержек развития эмбрионов, эмбриотоксического и тератогенного действия в антенатальном периоде) было проведено на крысах. Исследуемый препарат на основе моноклональных антител вводили животным внутрибрюшинно через день (экспериментальный аналог внутривенного введения для мелких лабораторных животных) в двух дозах:

- 14 мг/кг – предполагаемая терапевтическая доза для человека;
- 140 мг/кг – десятикратная терапевтическая доза.

На протяжении исследования все животные оставались живы. В результате исследования было установлено, что применение препарата на основе

моноклональных антител на стадии гаметогенеза не нарушает генеративной функции животных, не вызывает эмбриотоксического и тератогенного действия и не приводит к нарушению развития потомства в постнатальном периоде развития.

Проведенные исследования позволяют сделать вывод, что препарат на основе гуманизированных моноклональных антител для терапии болезни вызванной вирусом Эбола не оказывает отрицательного действия на организм животных в дозах, предполагаемых для клинического использования и может быть рекомендовано для проведения дальнейшего изучения в условиях клинических исследований с целью регистрации в Российской Федерации.

### **3.2.1.7 Клинические исследования безопасности и фармакокинетики препарата ГамЭзумаб на здоровых добровольцах**

В рамках продолжения разработки было проведено «Открытое исследование безопасности и фармакокинетики лекарственного препарата для экстренной профилактики и терапии болезни вызванной вирусом Эбола на основе гуманизированных моноклональных антител, раствор для инфузий, при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы».

В рамках исследования изучена безопасность препарата при однократном введении. Терапевтическая доза рассчитана исходя из противовирусной активности моноклональных антител входящих в состав препарата. Для обеспечения безопасности добровольцев введение препарата было начато с 1/10 терапевтической дозы (из расчета 1,4 мг/кг). Эскалация дозы проводилась поэтапно: на первом этапе изучена безопасность препарата в дозе 1/10 от терапевтической дозы у 5 добровольцев, на втором – 1/2 (из расчета 7 мг/кг), у 5 добровольцев, на третьем – полная доза (из расчета 14 мг/кг), у 15 добровольцев. На третьем этапе было включено 15 добровольцев по 5 человек в когорте.

Для предотвращения инфузионных реакций, известных нежелательных явлений, типичных для препаратов моноклональных антител, добровольцы по

решению главного исследователя могли получать ацетаминофен (парацетамол) 500 мг и дифенгидрамин 50 мг однократно перорально, за 30 мин - 1 час до инфузии. Такая схема премедикации рутинно используется при лечении препаратами моноклональных антител [Connie Henke Yarbrow 2005]. Выбор контингента добровольцев обусловлен требованиями Федерального закона от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Руководств по проведению клинических исследований лекарственных средств (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ, том 1, 2), а также рекомендациями ВОЗ (1994 г., 2004 г., 2016 г.)

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

Распределение добровольцев в группы:

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

Исследование для каждого участника состояло из 3 периодов:

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

Всего состоялось 9 визитов, включая визит скрининга, из которых 1 визит осуществлен в рамках стационарного наблюдения, а 7 визитов являлись амбулаторными.

Во время визитов добровольцы проходили обследование в соответствии с планом исследования. Дизайн исследования был одинаковым для всех добровольцев, за исключением режима дозирования.

Популяцию исследования составили 25 здоровых добровольцев мужского и женского пола в возрасте от 19 до 43 лет (включительно), отобранные в соответствии с критериями включения и не имеющие критериев невключения.

Все добровольцы завершили участие в исследовании согласно Протоколу, за исключением добровольца №018, который досрочно завершил участие в исследовании по причине «Пациент не соответствует критериям включения/невключения». Далее кратко представлены результаты исследования.

У препарата ГамЭзумаб, раствор для инфузий (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) установлен благоприятный профиль безопасности на всех исследуемых уровнях дозирования (1/10 и 1/2 (из расчета 7 мг/кг) от терапевтической дозы, а также полная доза (из расчета 14 мг/кг)). Основанием послужило отсутствие достоверных различий жизненно-важных показателей (ЖВП), параметров инструментальных (ЭКГ) и лабораторных исследований (ОАК, БхАК, иммунологического анализа крови и ОАМ). Выявленные статистически значимые различия отдельных параметров были отнесены к статистическим ошибкам 1 типа ( $\alpha$  - «ложноположительный результат»), поскольку встречались во всех исследуемых группах и носили разнонаправленный характер.

Всего в ходе исследования было зарегистрировано 302 НЯ, связанных с соматическим статусом и изменением лабораторных показателей добровольцев. По степени тяжести 257 из 302 случаев (85,1 %) отнесены к легкой степени тяжести, 40 из 302 случаев (13,2 %) – к умеренной и 5 из 302 случаев (1,7 %) – тяжелой. Причинно-следственная связь с препаратом оценена как «определенная» в 51 из 302 случаев (16,9 %), «вероятная» – в 51 из 302 случаев (16,9 %), «возможная» – в 128 из 302 случаев (42,4 %), «сомнительная» – в 22 из 302 случаев (7,3 %), «условная» – в 4 из 302 случаев (1,3 %) и «не подлежащая классификации» – в 1 из 302 случаев (0,3 %). НЯ были связаны преимущественно с нарушениями со стороны сердца – 3 из 302 случаев (1,0 %), в 7 случаях (2,3 %) – с желудочно-кишечными нарушениями, в 22 случаях (7,3

%) – с общими нарушениями в месте введения, в 204 случаях (79,5 %) – с лабораторными и инструментальными данными, в 3 случаях (1,0 %) – с нарушениями со стороны мышечной, скелетной и соединительной ткани, в 4 случаях (1,3 %) – с нарушениями со стороны нервной системы, в 3 случаях (1,0 %) – с нарушениями со стороны дыхательной системы, органов грудной клетки и средостеня, в 19 случаях (6,3 %) – с нарушениями со стороны сосудов и в 1 случае (0,3 %) – с инфекцией - коронавирусной инфекцией COVID-19. Анализ данных показал, что у добровольцев, получавших препарат в дозе 1/10 от терапевтической дозы было зарегистрировано 26 из 302 НЯ (8,6 %), в дозе 1/2 от терапевтической дозы - 39 из 302 (12,9 %) и 237 из 302 (78,5 %) НЯ зарегистрировано у добровольцев, получавших полную терапевтическую дозу.

За время проведения исследования ни один из добровольцев не прекратил участие в исследовании по причине возникновения НЯ. Также не было выявлено статистически значимых различий между группами по показателям местной и общей переносимости препарата: кожные аллергические реакции (сыпь, зуд и др.); боль в мышцах; боли в спине; боль в суставах; недомогание; потливость; головная боль; тошнота; озноб; нарушения пищеварения; головокружение; боли в грудной клетке; лихорадка; чихание; затруднение дыхания; другие жалобы, а также гиперемия в месте введения препарата; отек; боль; оценка региональных лимфатических узлов, что также свидетельствовало об удовлетворительной переносимости препарата.

Также в ходе исследования не выявлено достоверных различий значений ЖВП и параметров ЭКГ. Исключение составило статистически значимое снижение уровня параметра ЖВП ДАД на 3 день ( $p=0,042$ ) утром в Г3 в сравнении с Г2 и повышение уровня параметра ЖВП САД через 36 ч ( $p=0,033$ ) и на 3 день ( $p=0,005$ ) в Г3 в сравнении с Г1, ДАД на Визите 8 ( $p=0,043$ ) в Г3 в сравнении с Г1 и на Визите 8 ( $p=0,022$ ) в Г3 в сравнении с Г2, ЧСС через 8 ч ( $p=0,021$ ) в Г3 в сравнении с Г1, ЧДД на 5 день утром ( $p=0,030$ ) и на Визите 7 ( $p=0,033$ ) в Г3 в сравнении с Г1, ТТ до введения препарата ( $p=0,032$ ) в Г3 в сравнении с Г2, через 1 ч ( $p=0,029$ ) и через 8 ч ( $p=0,010$ ) в Г3 в сравнении с Г1,

параметра ЭКГ QRS на 7 день ( $p=0,046$ ) в Г2 в сравнении с Г1 при межгрупповом сравнении. А также снижение уровня параметра ЖВП ТТ на 4 день утро ( $p=0,001$ ) и 7 день ( $p=0,045$ ) в Г3 после введения ИП ГамЭзумаб, раствор для инфузий (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) при внутригрупповом сравнении.

Значения лабораторных показателей также статистически не различались в исследуемых группах. Исключение составило статистически значимое снижение уровня параметра ОАК количество Лимфоцитов на 7 день ( $p=0,043$ ) в Г3 в сравнении с Г2, параметра БхАК Глюкоза в точке до введения ( $p=0,048$ ) в Г3 в сравнении с Г2, Глюкоза на 2 день ( $p=0,006$ ) в Г3 в сравнении с Г1, СРБ на 2 день ( $p=0,043$ ) в Г1 сравнении с Г2, СРБ на 2 день ( $p=0,002$ ) в Г2 сравнении с Г3, параметра иммунологического анализа крови количество CD16 (CD16+ /56+ - клетки (НК)) ( $p=0,009$ ) и Лимфоциты ( $p=0,038$ ) на 2 день в Г3 в сравнении с Г1, Лимфоциты на 7 день ( $p=0,036$ ) в Г3 в сравнении с Г2 и повышение уровня параметра БхАК АЛТ в точке до введения ( $p=0,043$ ) в Г3 в сравнении с Г1, ЩФ в точке до введения ( $p=0,031$ ), ЛДГ на 2 день ( $p=0,007$ ), СРБ в точке до введения ( $p=0,028$ ) в Г3 в сравнении с Г1, параметра иммунологического анализа крови доля CD16 (CD16+ /56+ - клетки (НК)) на 2 день в Г1 в сравнении с Г2 ( $p=0,043$ ) и Г3 ( $p=0,046$ ), доля CD16 (CD16+ /56+ - клетки (НК)) на 7 день ( $p=0,035$ ) в Г1 в сравнении с Г3, доля CD19 (CD19+ - клетки (В-лимфоциты)) на 2 день ( $p=0,040$ ) в Г2 в сравнении с Г1, доля CD19 (CD19+ - клетки (В-лимфоциты)) на 7 день ( $p=0,024$ ) в Г3, доля CD19 (CD19+ - клетки (В-лимфоциты)) на визите 5 ( $p=0,007$ ) в Г2, IgE на 2 день в Г2 ( $p=0,022$ ) и Г3 ( $p=0,011$ ) в сравнении с Г1, IgM на визите 3 ( $p=0,032$ ) в Г2 в сравнении с Г1 при межгрупповом сравнении. А также снижение уровня параметра ОАК Гемоглобин на визите 3 ( $p=0,003$ ) в Г3, Гематокрит на визите 5 ( $p=0,041$ ) в Г2, параметра БхАК Креатинин на визите 3 ( $p=0,011$ ), Общий билирубин на визите 3 ( $p=0,011$ ) в Г3, ЛДГ на 7 день ( $p=0,009$ ) в Г2, параметра иммунологического анализа крови количество CD16 (CD16+ /56+ - клетки (НК)) на 7 ( $p=0,013$ ) в Г3, количество CD19 (CD19+ - клетки (В-лимфоциты)) на Визите 3 ( $p=0,012$ ) в Г1,

количество CD19 (CD19+ - клетки (В-лимфоциты)) ( $p=0,005$ ), количество CD3 (CD3+ - клетки (Т-лимфоциты)) ( $p=0,001$ ), количество CD4 (CD3+ CD4+ - клетки (Т-хелперы)) ( $p=0,011$ ), количество CD8 (CD3+ CD8+ - клетки (цитотоксические лимфоциты)) ( $p=0,001$ ) на 2 день в Г3, IgE на 2 день ( $p=0,031$ ) в Г1, IgG на 2 день ( $p=0,013$ ) и во время визита 3 ( $p=0,038$ ) в Г3, Лимфоциты на 2 день ( $p=0,001$ ) в Г3 и повышение уровня параметра ОАК Эритроциты на 7 день ( $p=0,003$ ), Тромбоциты на визите 3 ( $p=0,009$ ) и доля Нейтрофилов п/я на 2 день ( $p=0,038$ ) в Г3, СОЭ на визите 5 ( $p=0,017$ ) в Г2 и на 7 день ( $p=0,016$ ) в Г3, параметра БхАК Общий белок ( $p=0,017$ ) в Г1 и в Г3 ( $p=0,016$ ) на 7 день, Мочевина на визите 5 ( $p=0,030$ ) в Г2, Глюкоза на 2 день ( $p=0,023$ ) в Г1, СРБ на 2 день в Г2 ( $p=0,023$ ) и в Г3 ( $p=0,001$ ), параметра иммунологического анализа крови IgA на 7 день ( $p=0,013$ ) в Г3, IgG на Визите 5 ( $p=0,031$ ) в Г1, IgM на 7 день ( $p=0,023$ ) в Г1, IgM на визите 3 ( $p=0,027$ ) в Г3 после введения ИП ГамЭзумаб, раствор для инфузий (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России) при внутригрупповом сравнении.

При этом статистически значимые различия отдельных параметров ЖВП, ЭКГ и лабораторных показателей были отнесены к статистическим ошибкам 1 типа ( $\alpha$  - «ложноположительный результат»), поскольку встречались во всех исследуемых группах и носили разнонаправленный характер.

**На основании вышеизложенного сделано заключение об удовлетворительной переносимости препарата ГамЭзумаб, раствор для инфузий (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России), у здоровых добровольцев.**

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

В январе 2020 года ВОЗ объявила эпидемию, связанную с распространением нового коронавируса SARS-CoV-2 и назвала ее чрезвычайной ситуацией в области здравоохранения международного значения. В марте 2020 года ВОЗ охарактеризовала распространение болезни как пандемию.

Заболевание, вызываемое вирусом SARS-CoV-2 (COVID-19) является острой респираторной инфекцией, которая может протекать как в легкой, так и в тяжелой форме, и сопровождаться такими осложнениями, как пневмония, острый респираторный дистресс-синдром, острая дыхательная недостаточность, острая сердечная недостаточность, острая почечная недостаточность, септический шок, кардиомиопатии, и др. По состоянию на 6 октября 2024 года число зарегистрированных случаев COVID-19 превысило 770 млн и более 7 млн случаев COVID-19 закончились летальным исходом. Очевидно, что в настоящее время сохраняется необходимость в разработке безопасных и эффективных средств профилактики и терапии заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2.

Одним из подходов к разработке эффективного терапевтического средства является получение моноклональных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении вируса SARS-CoV-2. С начала пандемии несколько препаратов на основе моноклональных антител получали разрешение на экстренное использование для лечения COVID-19 и постконтактной профилактики. К таким препаратам относятся бамланивимаб, этесевимаб, казирививимаб, имдевимаб, сотровивимаб и регданвивимаб [Dougan M., 2021; Gupta A 2021; Weinreich DM. 2021; Lee JY 2021] и другие. Однако, в настоящее время указанные препараты не используются по причине падения их эффективности в отношении вариантов вируса SARS-CoV-2, циркулирующих в 2024 году.

Эволюция вируса SARS-CoV-2 и его адаптация в условиях формирующегося иммунитета человека привела к появлению вариантов вируса, которые стали более трансмиссивными и менее чувствительными к нейтрализующим антителам. Распространение этих новых вариантов вируса снизило эффективность вакцин и некоторых терапевтических антител. Список этих вызывающих озабоченность вариантов (VOC) состоит из B.1.1.7 (Alpha), B.1.351 (Beta), B.1.1.28/P.1 (Gamma), B.1.617.2 (Delta) и Варианты B.1.1.529 (Omicron), ХВВ 1, 1.5., 1.9.1, 1.16, Jn.1, KS.1(октябрь 2024 г., ВОЗ) и продолжает увеличиваться по мере эволюции вируса. Снижение нейтрализации

антителами обусловлено мутациями в гликопротеине S, включая замены K417N/T, L452R, T478K, E484K и N501Y [Harvey W.T., 2021]. Появившийся в 2023 году вариант Омикрон имеет более 30 мутаций в гликопротеине S, что позволяет значительно ускользнуть от нейтрализации антителами [Planas D., 2021]. А вариант Пирола (Jn.1) содержит 59 аминокислотных замен в S антигене вируса SARS-Cov-2. В связи с этим в настоящее время существует необходимость выделения антител, или получения мультивалентных молекул на их основе, обладающих широким спектром нейтрализующей активности в отношении VOC.

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

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

На первом этапе исследования был получен высоко-очищенный препарат рекомбинантного рецептор-связывающего домена. Для этого был проведен дизайн генетической конструкции для экспрессии и очистки рецептор-связывающего домена RBD гликопротеина S вируса SARS-CoV2 в клетках млекопитающих. В качестве референсной последовательности был использован сиквенс YP\_009724390.1 международной базы данных NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Получен плазмидный вектор, экспрессирующий

рецептор-связывающий домен RBD гликопротеина S вируса SARS-CoV2. Проведена трансфекция и последующая селекция клеток, несущих генетическую вставку. Проведена продукция рецептор-связывающего домена RBD трансфицированными клетками в культуральную жидкость с последующей аффинной очисткой. Чистоту и подлинность RBD оценивали методом электрофореза в ПААГ (Рисунок 25).

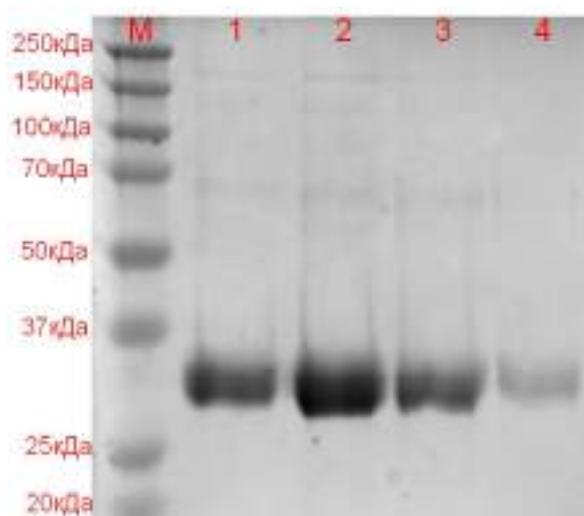


Рисунок 25. Электрофореграмма белкового препарата RBD после аффинной очистки. М – маркер молекулярного веса; 1- образец белка RBD 0.75 мкг/мкл; 2 - образец белка RBD 1 мкг/мкл; 3 - образец белка RBD 0.5 мкг/мкл; 4 - образец белка RBD 0.25 мкг/мкл.

По результатам электрофореза подвижность белкового препарата RBD в денатурирующих условиях соответствует около 30 кДа, что обусловлено его гликозилированием (масса аминокислотной последовательности без учета гликозилирования составляет около 25кДа). Таким образом, при первичном анализе препарата были подтверждена его ожидаемая молекулярная масса.

Полученный белковый препарат был использован для получения иммунной библиотеки наноантител. Кроме того, препарат очищенного RBD применялся при создании «Набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-CoV-2 «SARS-CoV-2-RBD-ИФА-Гамалеи» (РЗН 2020/10393 и РЗН 2021/14488).

Для получения библиотеки VHH двугорбого верблюда иммунизировали полученным RBD (100мкг на иммунизацию) 5 раз с промежутками в 10-14 дней. Через 5 дней после последней иммунизации определяли титр антител в сыворотке крови верблюда, который составил 1/1638400 (рисунок 26), а также проводили отбор крови для выделения моноклеорной фракции. Нейтрализующую активность сыворотки измеряли методом микронеutralизации с использованием живого вируса SARS-CoV-2 B.1.1.1, титр нейтрализующих антител составил 1/1280.

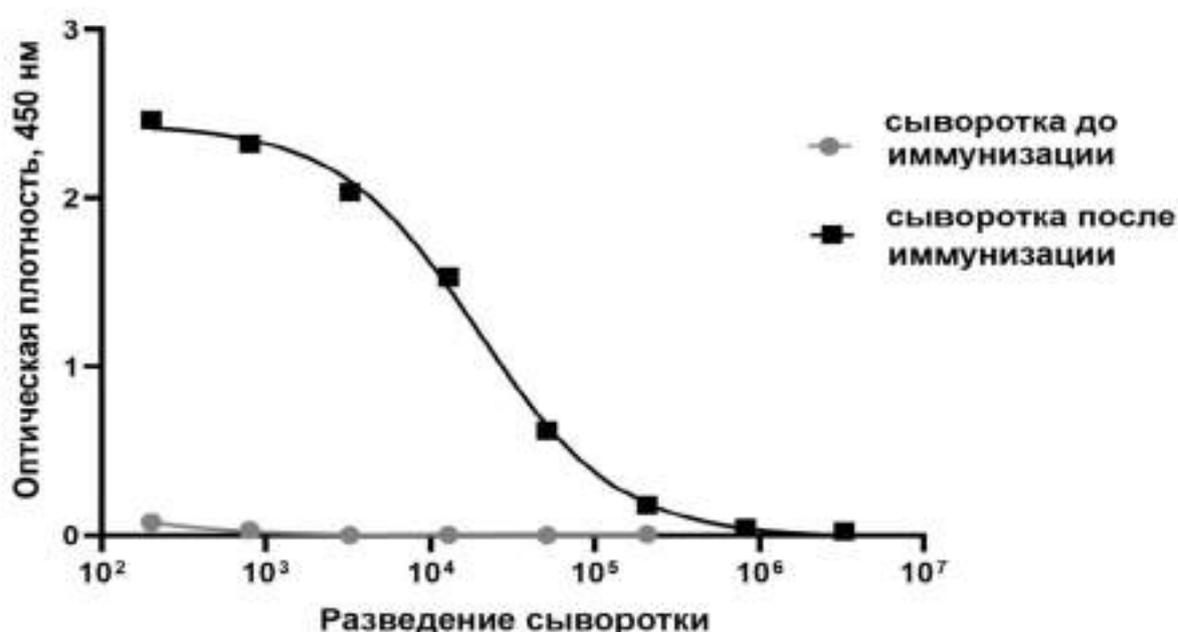


Рисунок 26. Данные по определению титра специфических антител к RBD в сыворотке крови верблюда после иммунизации рекомбинантным RBD.

Изолированные моноклеарные клетки использовали для выделения тотальной РНК. Выделенную РНК использовали в качестве матрицы для синтеза кДНК со случайными праймерами и ревертазой SuperScriptIII (Invitrogene, США). На матрице, полученной кДНК, ставили гнездовую ПЦР, позволяющую амплифицировать последовательности однодоменных антител, которые использовались для клонирования на следующем этапе.

Для отбора RBD специфических VHH была сконструирована библиотека

фагов путем клонирования последовательностей VNN из В-клеток иммунизированного верблюда в фагмидный вектор pHEN1. Был проведен один раунд селекции методом фагового дисплея с последующим скринингом отдельных клонов методом ИФА (тест-система P3H2020/10393) для идентификации клонов, специфически связывающихся с RBD.В Для проведения ИФА использовали как образцы индивидуальных фагов, несущих на поверхности VNN, так и белковые препараты этих клонов для оценки растворимости и специфической активности. По результатам анализа активности методом ИФА (Рисунок 27А) 212 клонов VNN были отобраны для секвенирования нуклеотидных последовательностей, кодирующих антитела.

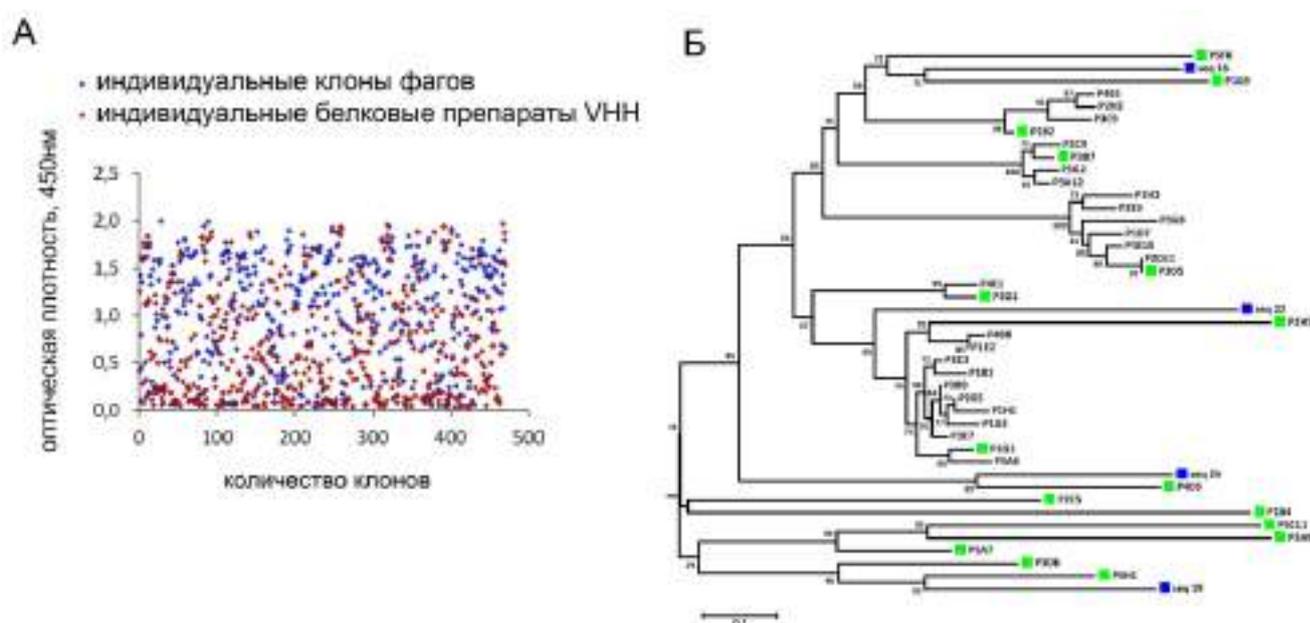


Рисунок 27. А – Скрининг VNN методом ИФА. Всего проанализировано 212 индивидуальных клонов. Клоны с сильным положительным сигналом ELISA отбирали для секвенирования. (Б) Филогенетическое дерево, показывающее разнообразие последовательностей 39 уникальных клонов VNN, в качестве сравнения использовали четыре ранее описанных однодоменных антитела *S. bactrianus*, синие квадраты – ранее описанные однодоменные антитела *S. bactrianus*, зеленые квадраты – клоны, отобранные для дальнейшего анализа.

В результате проведенного секвенирования было выделено 39 индивидуальных клонов, имеющих уникальную последовательность переменных петель (CDRs) в структуре переменного домена. Филогенетический анализ последовательностей позволил изолировать 16 клонов, относящиеся к разным клонотипам, для дальнейшего исследования (Таблица 11, рисунок 27Б). Далее, были получены белковые препараты антител, входящие в эту панель, путем продукции в *E.coli* и последующей очистки методом металл-аффинной хроматографии. Активность связывания RBD каждого антитела анализировали с помощью ELISA. В результате анализа была подтверждена специфическая активность 14 клонов, значения EC50 находились в диапазоне от 1,1 до 313,3 нМ (рисунок 28). Большинство антител (13 из 14) демонстрировали значительные положительные сигналы с EC50 ниже 22 нМ.

Таблица 11. Аминокислотные последовательности переменных регионов уникальных VHH, отобранных в результате селекции методом фагового дисплея, специфичных RBD.

<b>№ клона</b>	<b>CDR1</b>	<b>CDR2</b>	<b>CDR3</b>
P1B2	GYGYINKR	IYTATGST	DIPPWGGTWYQASHYKY
P1G1	GNTYSSYC	IDSDGST	DTAGVYCSGSWPLYEYKD
P1B4	GASFDDSD	ISSDGRT	ARPALWFGYAACDFDY
P1G9	GYTASVNF	IRTDGGRT	SKVHPWTSTQSLGVPETYNY
P2G1	GYTYSSYC	IGRDGMT	AGGNWYGYSLMEYDFGY
P2C5	GYTYCSYD	IIRRDGST	KSWACSSGEYLYQGD
P2H5	GPTYSRAC	HYTGDGT	SDPRAWYCSGATRTDFKY
P3D5	GLTSFC	ISATTHST	GPPGCGIGGDMDKRYNY
P3D6	GYIFKSCR	ITSDGTT	CSGPSYSAANYAY
P3B7	AHTYSSNY	IDPRTGSA	DPSGGTWFRALEPSKYRS
P3A9	GFSFSNYA	ISSDESRT	SKARNPYGGGDYDERDEDR
P4H1	GNIVSSCG	INTDGTT	CRVGGTSYYPPTLRY
P4D5	GLTLDDYV	TSRGGGIT	DRRWGITEKACGASSAFTY
P5A7	GFTFSTYA	IDTRDGNT	NNRFGIGSTAKYNY
P5F8	GDTDMTNS	IGGGGSTT	GTWDTYGYDYN
P5C11	GFTLSRVE	IVGGEVVRT	ATSEQAYPITTVGYKY

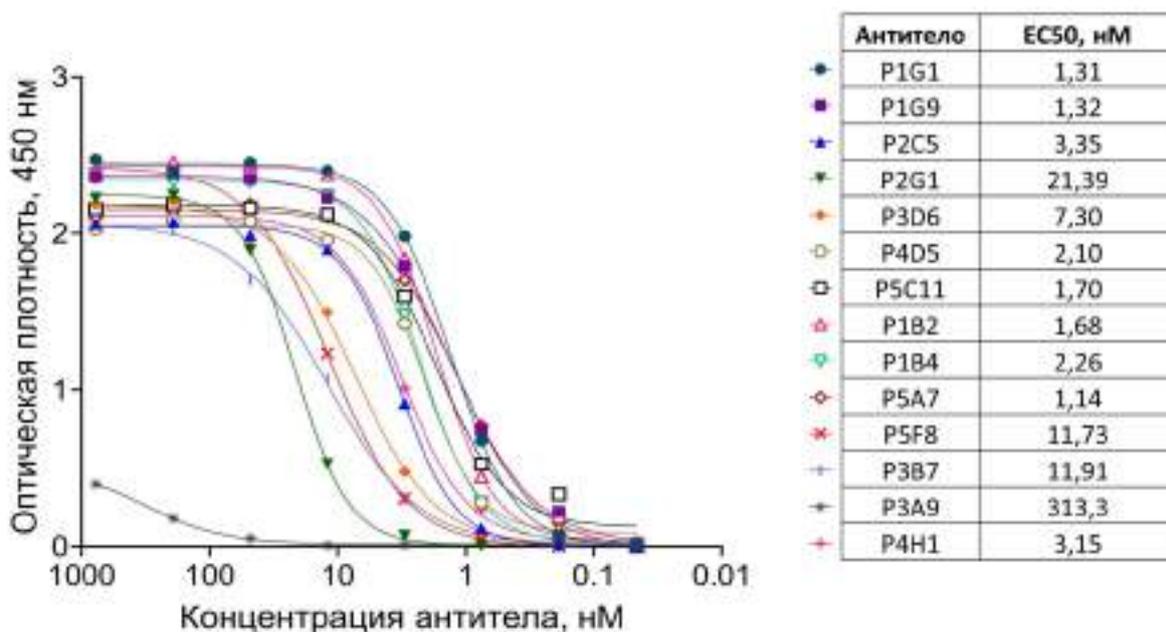


Рисунок 28. Результаты изучения специфической активности однодоменных антител в реакции непрямого ИФА.

### 3.2.2.2 Анализ вируснейтрализующей активности однодоменных антител и изучение ее механизма.

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

Способность антител нейтрализовать вирус SARS-CoV-2 преимущественно связана с предотвращением проникновения вируса в клетки-мишени в результате блокирования связывания S белка вируса с рецептором ACE2 на клетках. На следующем этапе работы была изучена способность полученных однодоменных антител блокировать взаимодействие RBD с ACE2 с помощью конкурентного ИФА. Для этого рекомбинантный hACE2 сорбировали в лунках иммунологического планшета. Однодоменные антитела смешивали с рекомбинантным RBD белком, конъюгированным с пероксидазой хрена HRP (концентрация белка 0,2 мкг/мл) до двух конечных концентраций антитела (0,5 мкг/мл и 0,1 мкг/мл) и инкубировали в течение 30 минут при 37

°C. После инкубации образцы (100 мкл) вносили в лунки иммунологического планшета, содержащие hACE2 белок, планшет инкубировали 30 минут при 37 °C. Далее проводили визуализацию результатов ИФА. Степень ингибирования связывания RBD с ACE2 определяли путем сравнения полученного сигнала в лунках с образцами однодоменных антител к RBD и контрольных лунках. В качестве отрицательного контроля использовали однодоменные антитела к токсину *B. C. difficile*. Анализ выявил снижение сигнала в конкурентном ИФА в случае большинства нейтрализующих антител, что указывает на наличие конкуренции между нейтрализующими антителами и ACE2 за связыванием с RBD. Наиболее выраженное снижение сигнала мы наблюдали в случае антитела P2C5, которое в концентрации 0.5 мкг/мл ингибировало взаимодействие ACE2-RBD более чем на 90%. Результаты анализа представлены на рисунке 29.

По результатам анализа, были отобраны клоны p1b2, p5a7, p2c5, p2g1, p1g1, p5c11, p4h1, p5f8 как показавшие наибольший процент ингибирования, для изучения их активности в реакции вирус-нейтрализации с нативным вирусом.

Для изучения способности анализируемой панели VHH нейтрализовать живой вирус SARS-CoV-2, мы провели анализ микронеutralизации с ингибированием цитопатического эффекта вируса в качестве маркера нейтрализации. Реакцию нейтрализации вируса SARS-CoV-2 ставили в варианте постоянная доза вируса – разведения образца однодоменных антител. Образцы однодоменных антител смешивали со 100 БОЕ вируса SARS-CoV-2, инкубировали 1 час при 37°C и добавляли к клеткам Vero E6. Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Через 96 часов производили учет развития цитопатического действия вируса на культуру клеток визуально по оценке нарушения монослоя клеток. За вируснейтрализующий титр однодоменных антител принимали высшее их разведение, при котором происходит подавление цитопатического действия в 2-х лунках из 3-х. Данные по

вируснейтрализующей активности выбранных антител представлены в таблице 12.

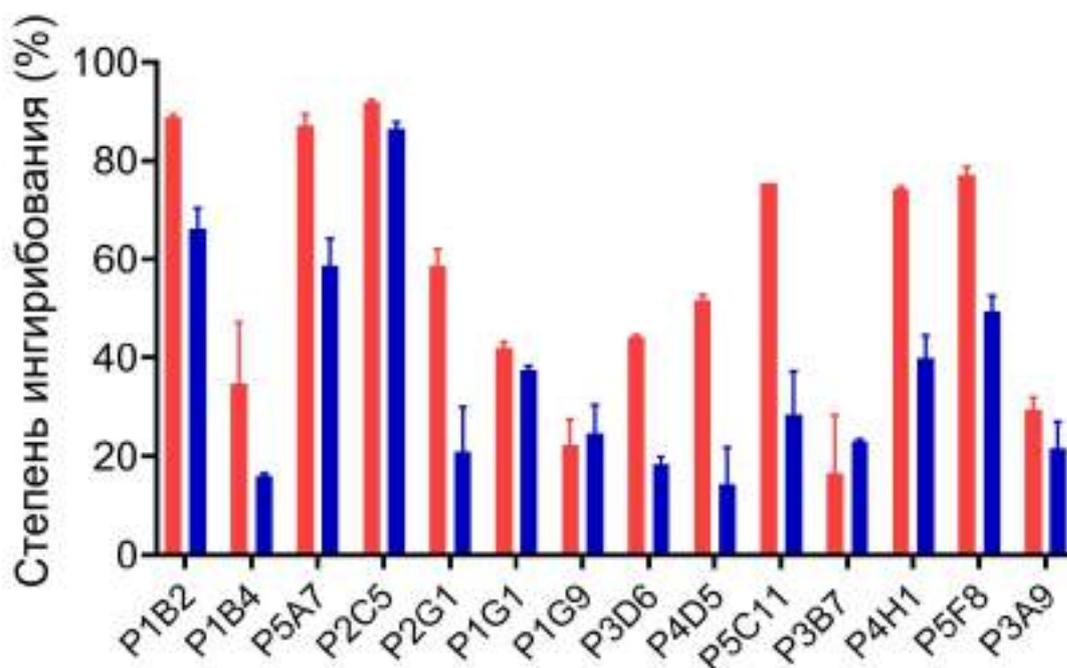


Рисунок 29. Результаты конкурентного ИФА с полученными клонами однодоменных антител. Красным – концентрация антител 0,5 мкг/мл; Синим – концентрация антител 0,1 мкг/мл.

Мы обнаружили, что 10 из 14 наноантител эффективно нейтрализовали вирус SARS-CoV-2 (B.1.1.1) в диапазоне концентраций от 12 нМ до 1540 нМ. Тремя наиболее сильными антителами были P2C5, P2G1 и P5F8, которые полностью ингибировали цитопатический эффект вируса при 24 нМ, 12 нМ и 48 нМ соответственно.

Таблица 12. Вируснейтрализующая активность полученных однодоменных антител.

Название образца антитела	Минимальная нейтрализующая концентрация, нМ/мл
Однодоменное антитело (P1G1)	192
Однодоменное антитело (P1G9)	>1540
Однодоменное антитело (P2C5)	24
Однодоменное антитело (P2G1)	12

Однодоменное антитело (P3D9)	384
Однодоменное антитело (P4D5)	769
Однодоменное антитело (P5C11)	>1540
Однодоменное антитело (P1B2)	769
Однодоменное антитело (P1B4)	>1540
Однодоменное антитело (P5A7)	769
Однодоменное антитело (P5F8)	48
Однодоменное антитело (P3B7)	>1540
Однодоменное антитело (P3A9)	>1540
Однодоменное антитело (P4H1)	384

Таким образом, в результате проведенной работы было получено три однодоменных антитела (клоны p2c5, p2g1, p5f8), обладающих высокой вируснейтрализующей активностью, которые были использованы для дальнейших исследований.

Дополнительно, отобранные клоны p2c5, p2g1, p5f8 были охарактеризованы по аффинности к рецептор-связывающему домену S гликопротеина вируса SARS-Cov-2 методом плазмонного резонанса.

Константы диссоциации (KD) определяли путем детекции изменения показателей поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore3000 (General Electric, Швеция). Для этого рекомбинантный RBD ковалентно иммобилизовали на поверхности декстранового матрикса чипа CM5 (General Electric, Швеция), а затем пропускали над поверхностью чипа различные концентрации полученных однодоменных антител. Обработку данных и вычисление констант проводили в автоматическом режиме при помощи программы Bioevaluation (General Electric, Швеция). Полученные данные представлены на рисунке 30А и таблице 13.

Полученные данные демонстрируют высокие значения констант равновесных диссоциаций отобранных однодоменных антител с рекомбинантным RBD (KD составляли 3,97 нМ, 5,36 нМ и 1,94 нМ для P2C5, P2G1 и P5F8 соответственно), что свидетельствует о высокой аффинности связывания однодоменных антител с RBD вируса SARS-CoV-2.

Таблица 13. Константа равновесной диссоциации полученных однодоменных антител с рекомбинантным RBD.

Антитело	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	$R_{max}$ (RU)	$K_A$ (1/M)	$K_D$ (M)	$\chi^2$
<b>P2C5</b>	$1.2 \times 10^5$	$4.74 \times 10^{-4}$	135	$2.52 \times 10^8$	$3.97 \times 10^{-9}$	8.5
<b>P5F8</b>	$1.13 \times 10^5$	$2.18 \times 10^{-5}$	90.7	$5.16 \times 10^8$	$1.94 \times 10^{-9}$	6.17
<b>P2G1</b>	$1.06 \times 10^5$	$5.94 \times 10^{-4}$	97.2	$1.86 \times 10^8$	$5.36 \times 10^{-9}$	1.74

Для оценки эпитопной специфичности, отобранных клонов, был проведен конкурентный иммуноанализ с использованием плазмонного резонанса. В результате анализа было идентифицировано две группы наноантител: антитела из первой группы имеют перекрывающиеся или конкурирующие эпитопы с клоном P2C5, а антитела из второй группы с клоном P2G1 (Рисунок 30Б). Кроме того, было установлено, что клон P2C5 конкурирует за связывание с моноклональным антителом касиривимаб, для которого методом рентгеноструктурного анализа показана специфичность к эпитопной группе класса I. При этом, клон P2G1 конкурирует с моноклональным антителом имдевимаб, специфичным к эпитопной группе класса III.

Таким образом, в результате исследования были отобраны клоны p2g1, p2c5, p5f8, которые показали высокое сродство к RBD вируса SARS-Cov-2, показали высокую вируснейтрализующую активность за счет блокирования взаимодействия вируса с ACE2 рецептором, связываются с неперекрывающимися эпитопами и являются перспективными кандидатами для создания препарата для экстренной профилактики и терапии заболевания COVID-19.

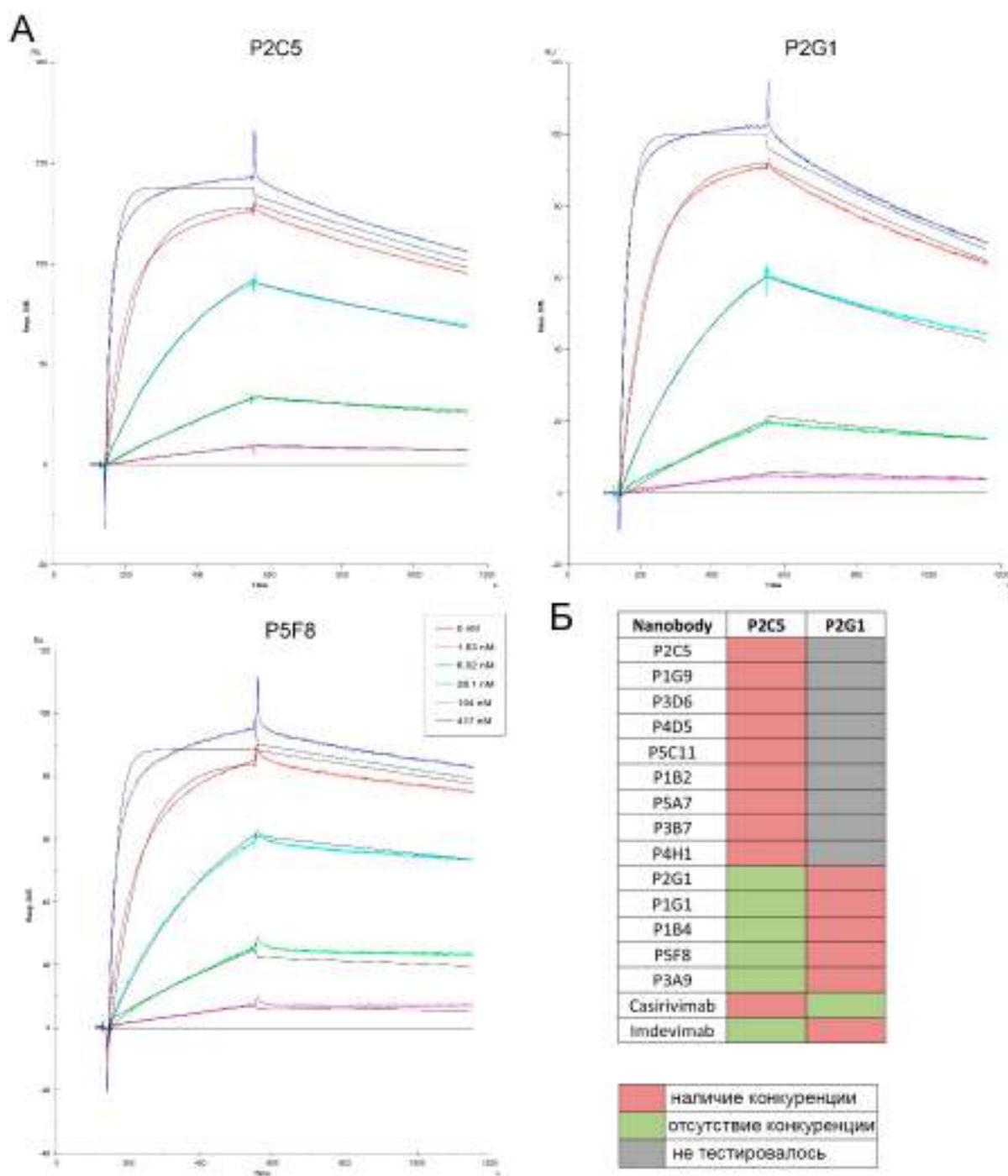


Рисунок 30. Результаты определения констант аффинности однодоменных антител p2g1, p2c5, p5f8 при помощи системы Viacore 3000.

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

Для повышения противовирусной активности отобранных антител на следующем этапе исследования нами были получены различные модификации нейтрализующих клонов P2C5, P2G1 и P5F8: моновалентные молекулы

димеров, гетеровалентные молекулы димеров, а также молекулы VHH, содержащие Fc-фрагмент иммуноглобулина человека (рисунок 31).

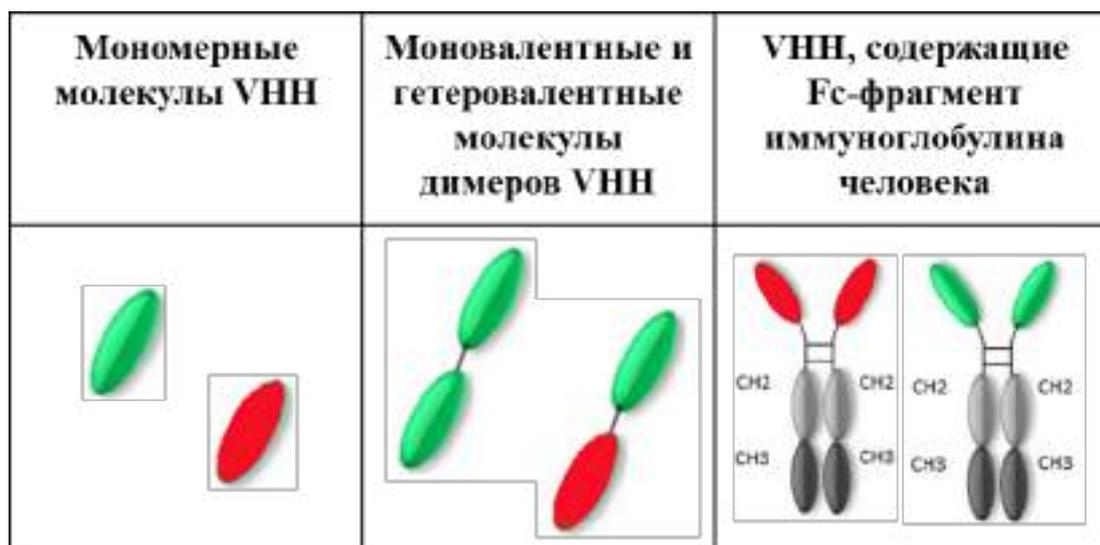


Рисунок 31. Схематичное изображение модифицированных молекул VHH.

Для получения димеров использовали глицин-сериновый линкер, обеспечивающий гибкое связывание двух мономерных молекул без потери их функциональных свойств, которые экспрессировали в виде единого белкового продукта. Для получения модификаций, содержащих Fc-фрагмент, использовали последовательность иммуноглобулина G человека изотипа IgG1. Способность всех полученных молекул связываться с RBD подтверждали методом ИФА. Анализ нейтрализующей активности молекул методом микронейтрализации показал выраженное усиление нейтрализующей активности некоторых димерных форм (таблица 14), также как их модификация, содержащая Fc-фрагмент. Так, P2C5-димер и P2C5-Fc варианты показали полное ингибирование цитопатического действия вируса SARS-Cov-2 (Ухань) в концентрации 89 пМ, что более чем в 200 раз по сравнению с мономером P2C5. Кроме того, было установлено, что молекула гетеродимера P2C5-P5F8 показала усиление нейтрализующей активности 100 раз по сравнению с мономерными формами этих клонов (178пМ) (Таблица 14).

Таблица 14. Оценка нейтрализующей активности различных модификаций VHH

Антитела		Минимальные нейтрализующие концентрации антител, нМ					
		B1.1.1	Alpha (B.1.1.7 )	Beta (B.1.35 1)	Gamma (B1.1.28/ P.1)	Delta (B.1.61 7.2)	Omicron (B.1.1.5 29)
Мономеры	P2C5	24,04	48,08	96,15	48,08	>1500	24,04
	P2G1	12,02	48,08	96,15	48,08	24,04	>1500
	P5F8	48,08	48,08	96,15	96,15	48,08	>1500
Гомодимеры	(P2C5)2	0,089	0,178	0,356	0,356	>1500	0,089
	(P2G1)2	11,36	22,73	45,45	45,45	45,45	>1500
	(P5F8)2	5,68	5,68	22,72	22,72	11,36	>1500
Гетеродимеры	P2C5- P2G1	0,709	0,356	2,84	2,84	11,36	0,709
	P2C5- P5F8	0,178	0,089	0,356	0,356	2,85	0,709
	P2G1- P2C5	2,84	2,84	11,36	5,68	45,45	2,84
	P2G1- P5F8	45,45	45,45	181,82	45,45	90,91	>1500
	P5F8- P2C5	5,68	11,36	22,73	22,72	90,91	5,68
	P5F8- P2G1	11,36	22,72	90,91	22,72	22,73	>1500
Fc- фьюжн молекулы VНН	P2C5-Fc	0,089	0,178	0,356	0,356	>1500	0,089
	P2G1-Fc	11,36	22,73	45,45	45,45	45,45	>1500
	P5F8-Fc	5,68	5,68	22,72	22,72	11,36	>1500

Таким образом, были отобраны клоны VНН, обладающие высоким сродством к рецептор-связывающему домену RBD гликопротеина S и обладающих нейтрализующей активностью в отношении различных штаммов вируса SARS-Cov-2 за счет блокирования связывания вируса с ACE2 рецептором на поверхности клеток хозяина. Кроме того, на основе отобранных клонов, были получены различные модификации молекул VНН, для ряда из

которых продемонстрировано значительное усиление нейтрализующего потенциала молекул. Для дальнейшей работы с целью разработки средства экстренной профилактики и этиотропной терапии COVID-19 была использована молекула P2C5-Fc, показавшая наибольшую нейтрализующую активность *in vitro* на различных штаммах, включая Омикрон вариант B.1.1.529.

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

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

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

Аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей антитела GamXRH19 были гуманизированы при помощи биоинформационного ресурса Abisys database (<http://www.abisys.org/abisys/>) с последующим анализом стабильности структуры гуманизированной молекулы методами молекулярной динамики. Полученные аминокислотные последовательности гуманизированного моноклонального антитела XR19 (GamXRH19) представлены в таблицах 15.

Таблица 15. Гуманизированные нуклеотидные и аминокислотные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепи антитела GamXRH19.

Гуманизированная аминокислотная	QVQLQQSGAELVKPGASVKVSCKASGYAF TNYLIEWVKQAPGQGLEWIGMINPGSGVT
------------------------------------	--

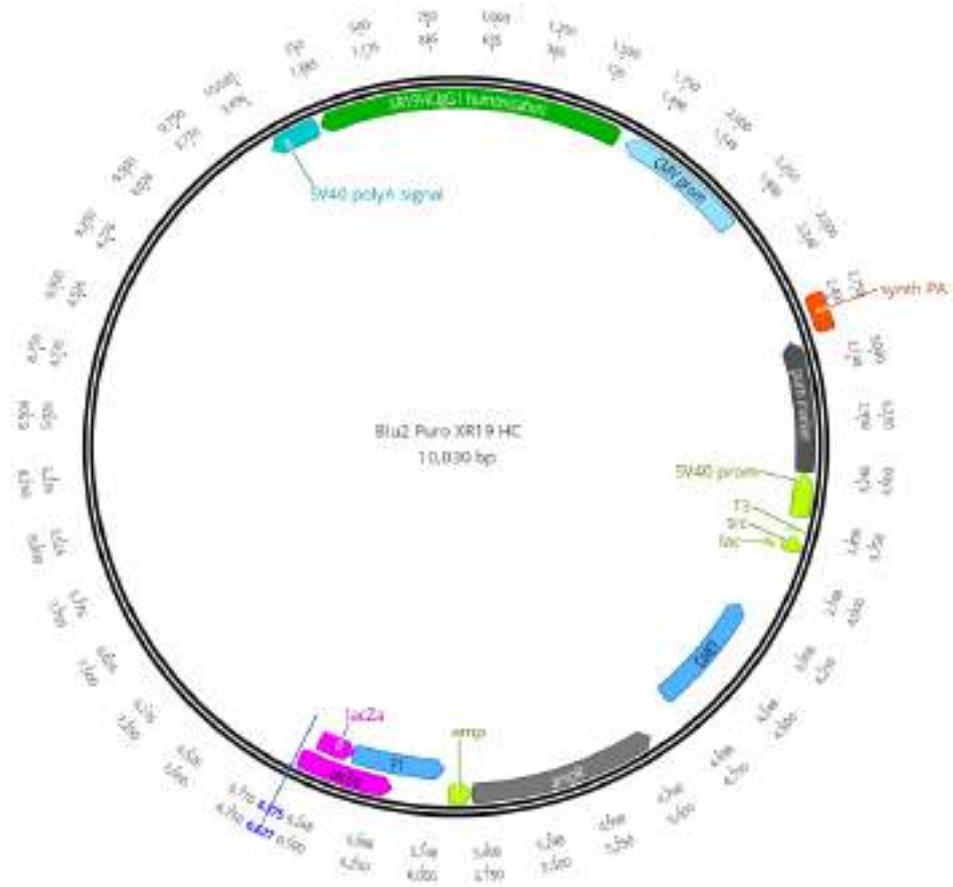
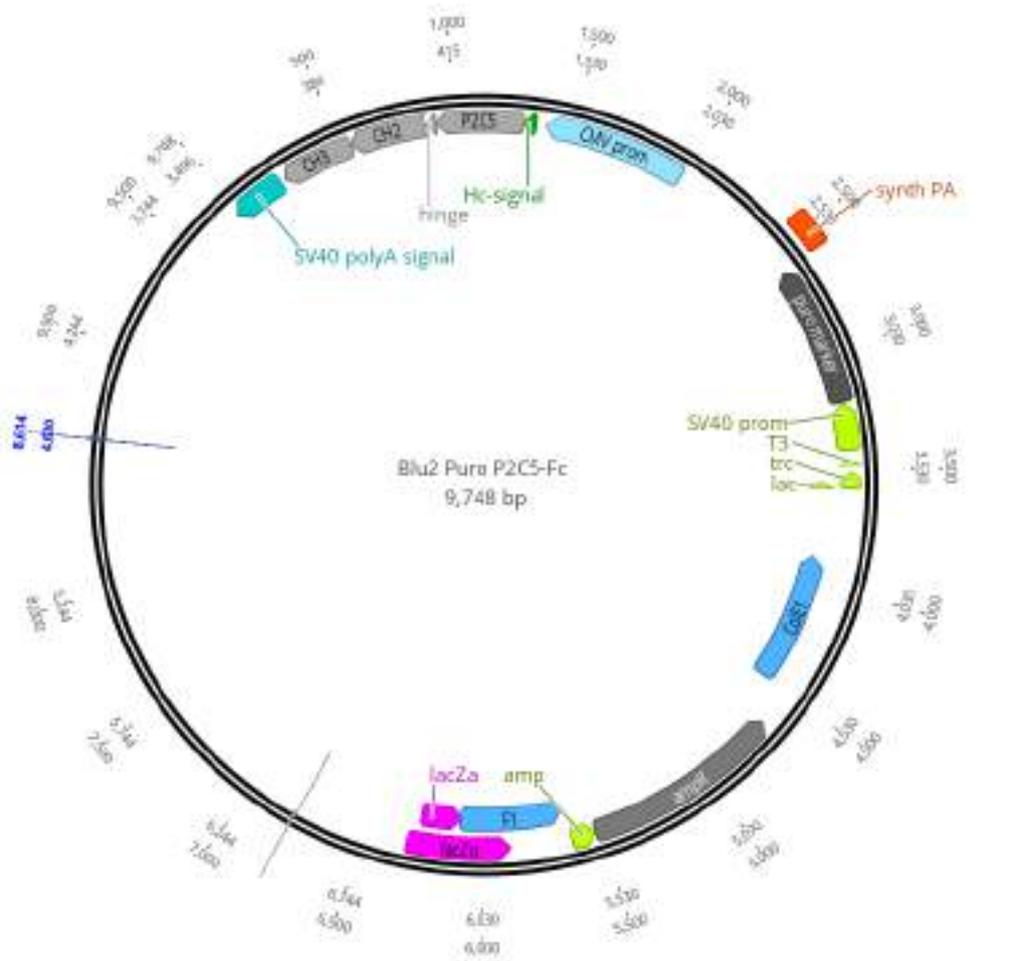
последовательность вариабельного домена тяжелой цепи	NYDEKFKGRVTLTADKSTSTVYMQSSLTS DDTAVYFCATYYRYDDAYWGQGLVTVS A
Гуманизированная аминокислотная последовательность вариабельного домена легкой цепи	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYG VLNWFYQRKPGKSPKLLIYGATNLDGMSS RFSGSGSGRQYTLTISSLQPEDFVATYYCQN VLS

Далее, был разработан дизайн аминокислотной последовательности полноразмерных тяжелых и легких цепей гуманизированного антитела XRH19. На основе аминокислотных последовательностей были синтезированы гены тяжелой и легкой цепей антитела XRH19 (ЗАО «Евроген»), а также тяжелой цепи клона P2C5 (GamP2C5) с учетом оптимизации экспрессии в клетках CHO. Синтезированные последовательности были клонированы в плазмидный вектор для эукариотической экспрессии.

Для продукции тяжелоцепочечного моноклонального антитела GamP2C5 (компонент I препарата ГамКовиМаб) и гуманизированного моноклонального антитела GamXRH19 (компонент II препарата ГамКовиМаб) были получены стабильные продуценты клеток CHO.

Для получения стабильных эукариотических продуцентов рекомбинантного антитела P2C5-Fc и XR19 были использованы плазмидные векторы pBlu2-Puro-P2C5-Fc, pBlu2-Puro-XR19-NC и pBlu2-Puro-XR19-LC (Рисунок 32) путем их линейаризации и трансфекции в клетки линии CHO. Далее, путем селекции на антибиотике пурамицине и анализу содержания антител GamP2C5 и GamXRH19 в культуральной жидкости были отобраны индивидуальные стабильные клоны-трансфектанты.

На основе отобранных клонов клеток-продуцентов антител были созданы системы банков клеточных линий CHO GamP2C5 клон 78 и CHO Gam XRH19 клон 11 (главный банк клеток ГБК, рабочий банк клеток РБК), которые после проведения аттестации использовались для производства и выпуска серий препарата для доклинических и клинических исследований.



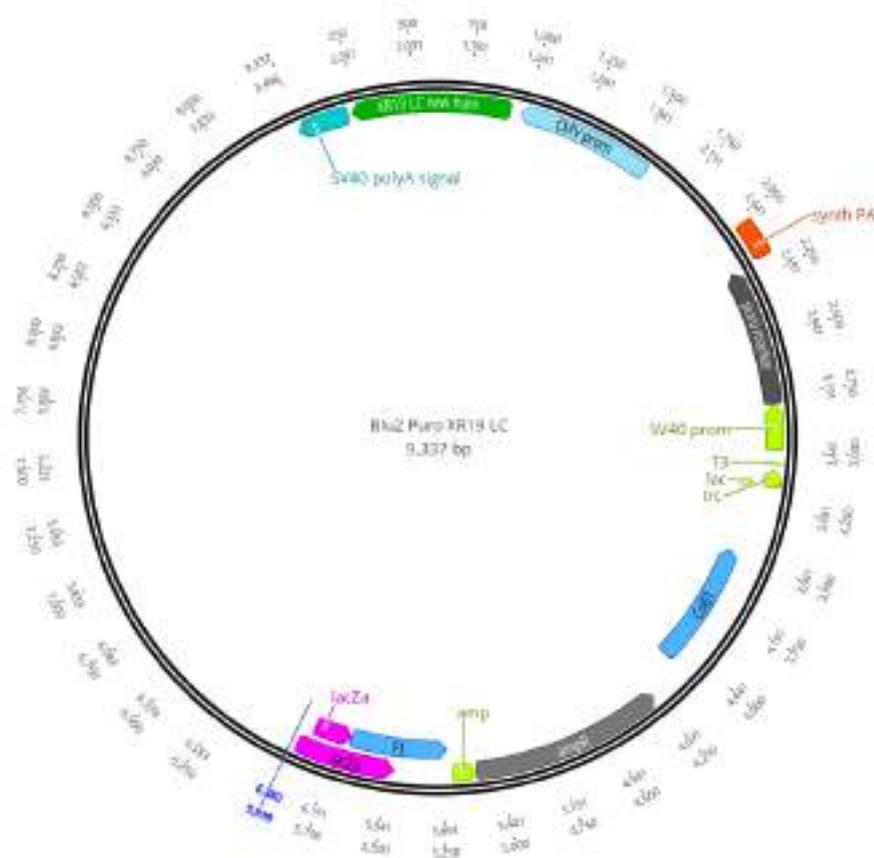


Рисунок. 32. Схематическое изображение плазмидных векторов pBlu2-Puro-P2C5-Fc, pBlu2-Puro-XR19-Hum-NC и Blu2 Puro XR19-Hum-LC

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

Нейтрализующую активность моноклональных антител изучали в реакции нейтрализации по эффекту подавления цитопатического действия вируса на культуру клеток. Реакцию нейтрализации ставили в варианте постоянная доза вируса – разведения препарата. В связи с появлением новых вариантов вируса, необходимо проводить постоянный мониторинг эффективности профилактических и терапевтических препаратов. В связи с этим исследование вируснейтрализующей активности антител проводили с использованием различных вариантов беспокойства вируса SARS-CoV-2 (variants of concern, VOC): В.1.1.1 (исходный вариант), В.1.1.7 (Альфа), В.1.351 (Бета), В.1.1.28/Р.1 (Гамма), В.1.617.2 (Дельта), В.1.1.529 (Омикрон).

На первом этапе работы подготовили образцы антител GamP2C5 и GamXRH19 в культуральной среде ДМЕМ с 2% инактивированной фетальной бычьей сывороткой: готовили двукратные разведения образцов антител в указанной среде. Затем полученные образцы антител (50 мкл) смешивали со 100 TCID<sub>50</sub> вируса SARS-CoV-2 различных вариантов (50 мкл), инкубировали 1 час при 37°C и добавляли к клеткам Vero E6. Клетки инкубировали при 37°C в 5% CO<sub>2</sub>. Через 96 часов производили учет развития цитопатического действия (ЦПД) вируса на культуру клеток визуально по оценке нарушения монослоя клеток. В случае, если в лунке наблюдались единичные «бляшки», такую лунку также считали за лунку с развившимся ЦПД. За вируснейтрализующий титр антитела принимали высшее разведение, при котором происходит полное подавление цитопатического действия в 2-х лунках из 3-х. В результате были определены следующие рабочие вируснейтрализующие концентрации, представленные в таблица 16.

Таблица 16. Вирус-нейтрализующие концентрации моноклональных антител GamP2C5 и GamXRH19, входящих в состав препарат ГамКовиМаб в отношении вируса SARS-CoV-2 различных штаммов.

Штамм вируса SARS-CoV-2	Минимальная вирус-нейтрализующая концентрация, клон GamP2C5	Минимальная вирус-нейтрализующая концентрация, клон GamXRH19
SARS-CoV-2 strains B.1.1.1 (PMVL-1, S: D614G; hCoV-19/Russia/Moscow_PMVL-1/2020)	≤9,8 нг/мл	≤16 нг/мл
B.1.1.7 (hCoV-19/Netherlands/NoordHolland_2043 2/2020, VOC 202012/01) Alpha	≤9,8 нг/мл	>1250 нг/мл
B.1.351 (hCoV-19/Russia/SPE-RII-27029S/2021) Beta	≤19,5 нг/мл	>1250 нг/мл
B.1.1.28/P.1 (hCoV-19/Netherlands/NoordHolland_1091 5/2021) Gamma	≤39,1 нг/мл	>1250 нг/мл
B.1.617.2 (hCoV-19/Russia/SPE-	>1250 нг/мл	≤32 нг/мл

RII-32758S/2021) Delta		
B.1.1.529 (hCoV-19/Russia/MOW-Moscow_PMVL-O16/2021) Omicron	≤9,8 нг/мл	>1250 нг/мл

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

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

Протективную активность препарата ГамКовиМаб на основе моноклонального антитела GamP2C5 (компонент I) и моноклонального антитела GamXRH19 (компонент II) определяли в эксперименте *in vivo* на модели летальной инфекции у hACE2-трансгенных мышей. Данные животные чувствительны к инфекции SARS-CoV-2 и являются наиболее релевантной моделью инфекции COVID-19. Летальность животных после заражения вирусом SARS-CoV-2 составляет 100%.

В работе использовали вирус SARS-CoV-2 исходного варианта B.1.1.1, а также вариантов B.1.617.2 (Delta) и Omicron B.1.1.529 изолированных в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, хранящийся в Государственной коллекции вирусов. Вариант Дельта был использован в связи с широким распространением данного варианта по всему миру и характеризующимся более тяжелым течением заболевания COVID-19 у пациентов, инфицированных данным вариантом вируса SARS-Cov-2 по сравнению со всеми остальными вариантами вируса, вызывающих опасение. На момент проведения исследований доля варианта Дельта (и его дочерних линий)

среди всех выявляемых вариантов на территории РФ составляла более 96% (май 2021г в Москве).

Для оценки базовой протективности препарата в отношении исходного штамма SARS-CoV-2 В.1.1.1 провели оценку его активности на модели инфекции у ACE2-трансгенных мышей. Вирус был изолирован в ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России и хранится в Государственной коллекции вирусов. Инфекционный титр вируса составил  $10^7$  TCID50/мл. Животных заражали интраназально в дозе  $10^5$  TCID50 на животное, далее вводили препарат моноклональных антител или плацебо, согласно таблице 17. Выживаемость животных оценивали в течение 25 суток после заражения.

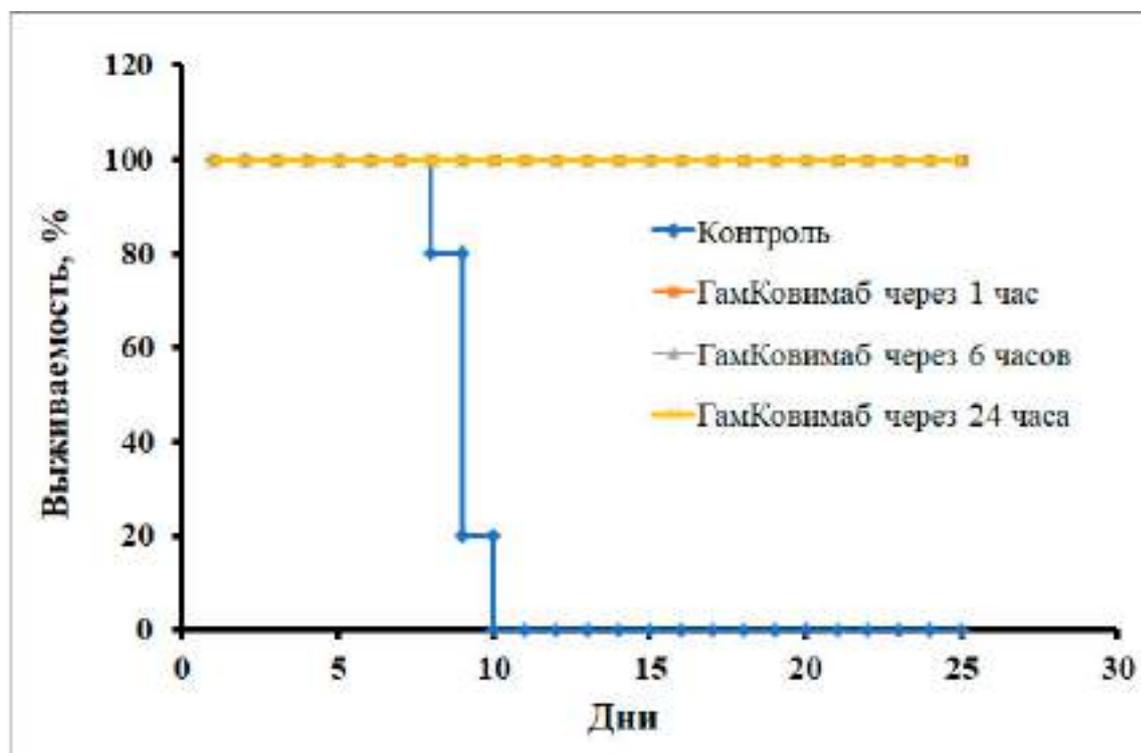
Таблица 17. Дизайн изучения протективной активности препарата ГамКовиМаб в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта В.1.1.1 на модели ACE2-трансгенных мышей.

Препарат	Доза препарата	Путь введения	Время введения	Инфицирование интраназально в дозе TCID50	Количество животных	Оценка эффективности
ГамКовиМаб	10 мг/кг	в/б	Через 1 час после заражения	$10^5$	5 шт.	Анализ выживаемости Анализ изменения веса
ГамКовиМаб	10 мг/кг	в/б	Через 6 часов после заражения	$10^5$	5 шт.	
ГамКовиМаб	10 мг/кг	в/б	Через 24 часа после заражения	$10^5$	5 шт.	
Плацебо	-	в/б	Через 1 час после заражения	$10^5$	5 шт.	

На рисунке 33А представлены данные по выживаемости животных исследуемых групп. На рисунке 33Б представлена динамика изменения веса. В контрольной группе животных наблюдалась гибель всех животных к 10 дню после инфицирования. В группе животных, получивших препарат ГамКовиМаб

в дозе 10 мг/кг через 1, 6 и 24 часа после заражения, гибели животных не наблюдалось.

А



Б

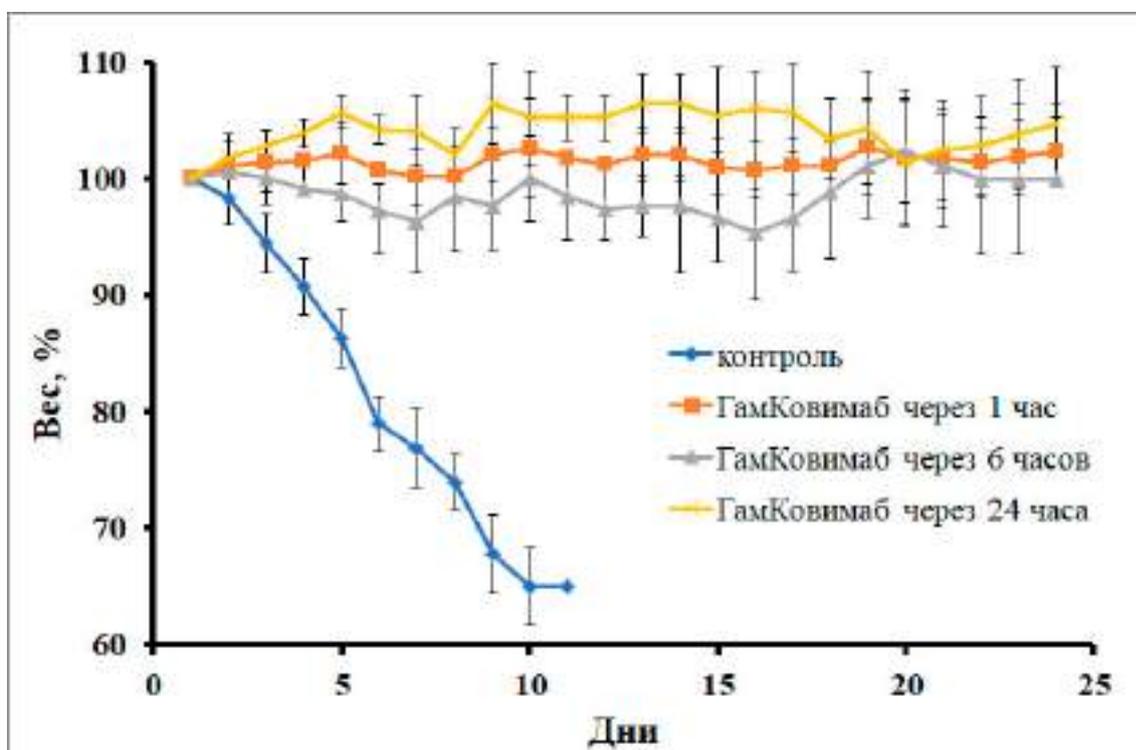


Рисунок 33. А - анализ выживаемости животных в группах, получавших ГамКовиМаб или плацебо, после заражения вирусом SARS-CoV-2 варианта

В.1.1.1. Б - анализ изменения веса животных в группах, получавших ГамКовиМаб или плацебо, после заражения вирусом SARS-CoV-2 варианта В.1.1.1.

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

Инфекционный титр вируса В.1.617.2 (Delta) составил  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/мл. Животных заражали вирусами SARS-CoV-2 интраназально (и/н) в дозе  $10^5$  TCID<sub>50</sub> на животное, что соответствует ~333 ЛД<sub>50</sub>. Препарат моноклональных антител или плацебо вводили внутрибрюшинно (в/б), согласно таблице 18. Выживаемость животных оценивали в течение 25 суток после заражения.

Таблица 18. Дизайн изучения протективной активности препарата ГамКовиМаб в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта В.1.617.2 (Delta) на модели ACE2-трансгенных мышей.

Препарат	Доза препарата	Путь введения	Время введения	Инфицирование интраназально в дозе TCID <sub>50</sub>	Количество животных	Оценка эффективности
ГамКовиМаб	10 мг/кг	в/б	Через 1 час после заражения	$10^5$	10 шт.	Анализ выживаемости
ГамКовиМаб	10 мг/кг	в/б	Через 6 часов после заражения	$10^5$	10 шт.	Анализ изменения веса
ГамКовиМаб	10 мг/кг	в/б	Через 24 часа после заражения	$10^5$	10 шт.	

Плацебо	-	в/б	Через 1 час после заражения	$10^5$	10 шт.	
---------	---	-----	-----------------------------	--------	--------	--

На рисунке 34 представлены данные по выживаемости животных. На рисунке 35 представлена динамика изменения веса. В контрольной группе животных, получавших плацебо, отмечалась гибель всех животных к 9 дню после заражения вирусом. В группах животных, получавших препарат ГамКовиМаб в дозе 10 мг/кг спустя 1, 6 или 24 часа после заражения, гибели животных не отмечалось.

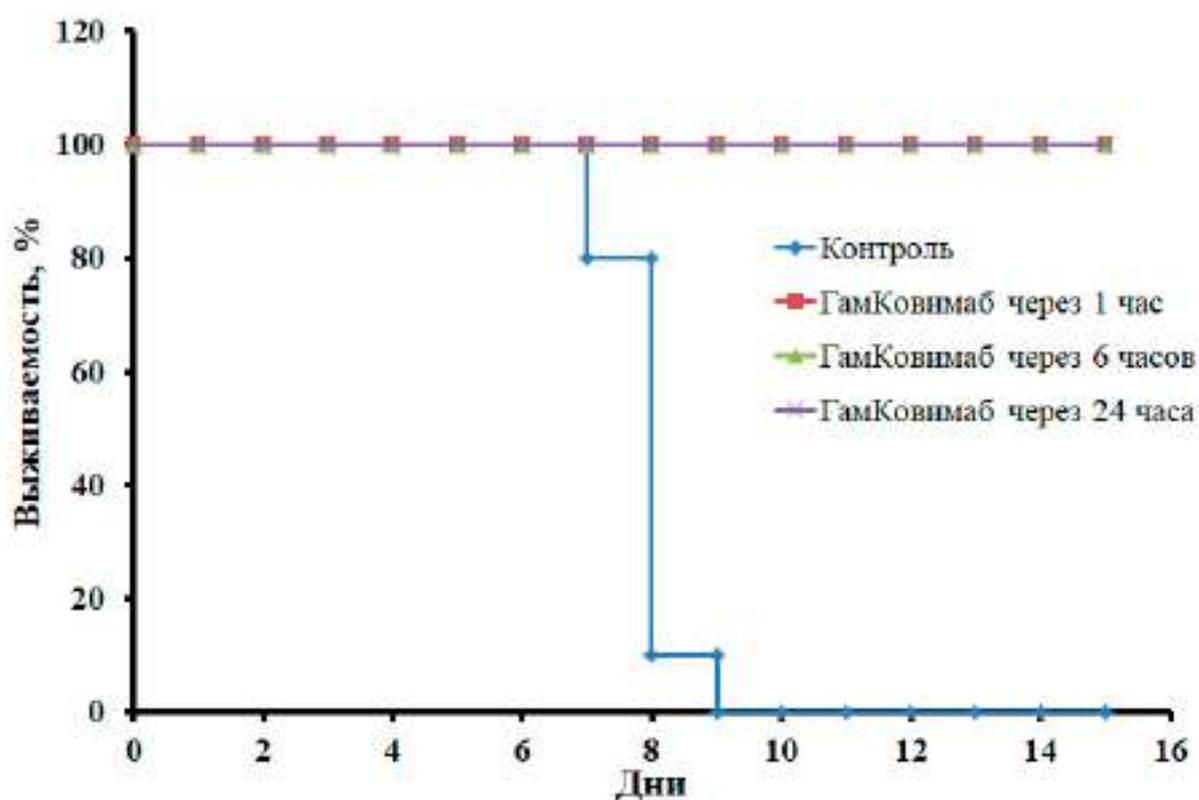


Рисунок 34. Анализ выживаемости животных в группах, получавших ГамКовиМаб или плацебо, после заражения вирусом SARS-CoV-2 варианта Delta.

На заключительном этапе исследования протективность препарата была оценена в отношении вируса SARS-Cov-2 варианта Omicron (B.1.1.529). Указанный вариант, содержит большое количество мутаций в области рецептор-связывающего домена, позволяющего вирусу эффективно ускользать

от сформированного ранее защитного гуморального иммунитета в результате перенесенной инфекции или вакцинации [Favorskaya I. A. et al. 2022].

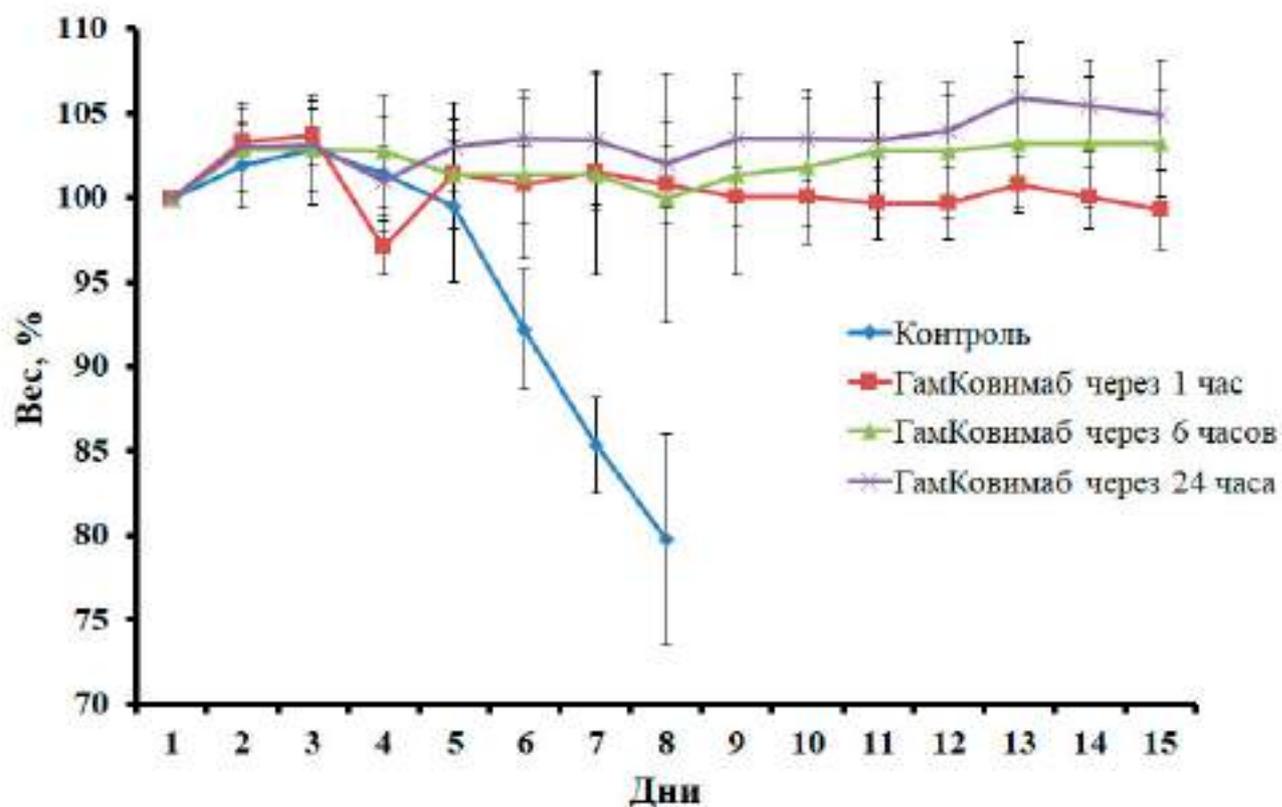


Рисунок 35. Анализ изменения веса животных в группах, получавших ГамКовиМаб или плацебо, после заражения вирусом SARS-CoV-2 варианта Delta.

При изучении биологических и инфекционных свойств вируса SARS-Cov-2 варианта Omicron (B.1.1.529) было зарегистрировано снижение вирулентности вируса в отношении как модели с использованием сирийских хомячков, так и модели с использованием hACE2 трансгенных мышей линии B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2Pr1mn/J. В связи с этим оценку эффективность препарата Гамковимаб в отношении предотвращения инфекции, вызванной вариантом вируса Omicron, проводили по регистрации изменения веса инфицированных животных, а также содержанию вируса в легких инфицированных животных на 4 сутки после заражения. Результаты эксперимента представлены на рисунке 36.

Как показано на рисунке 36 в группе животных, получивших плацебо выживаемость составила 50%, в группе животных, получивших препарат в количестве 10мг/кг выживаемость составила 100%.

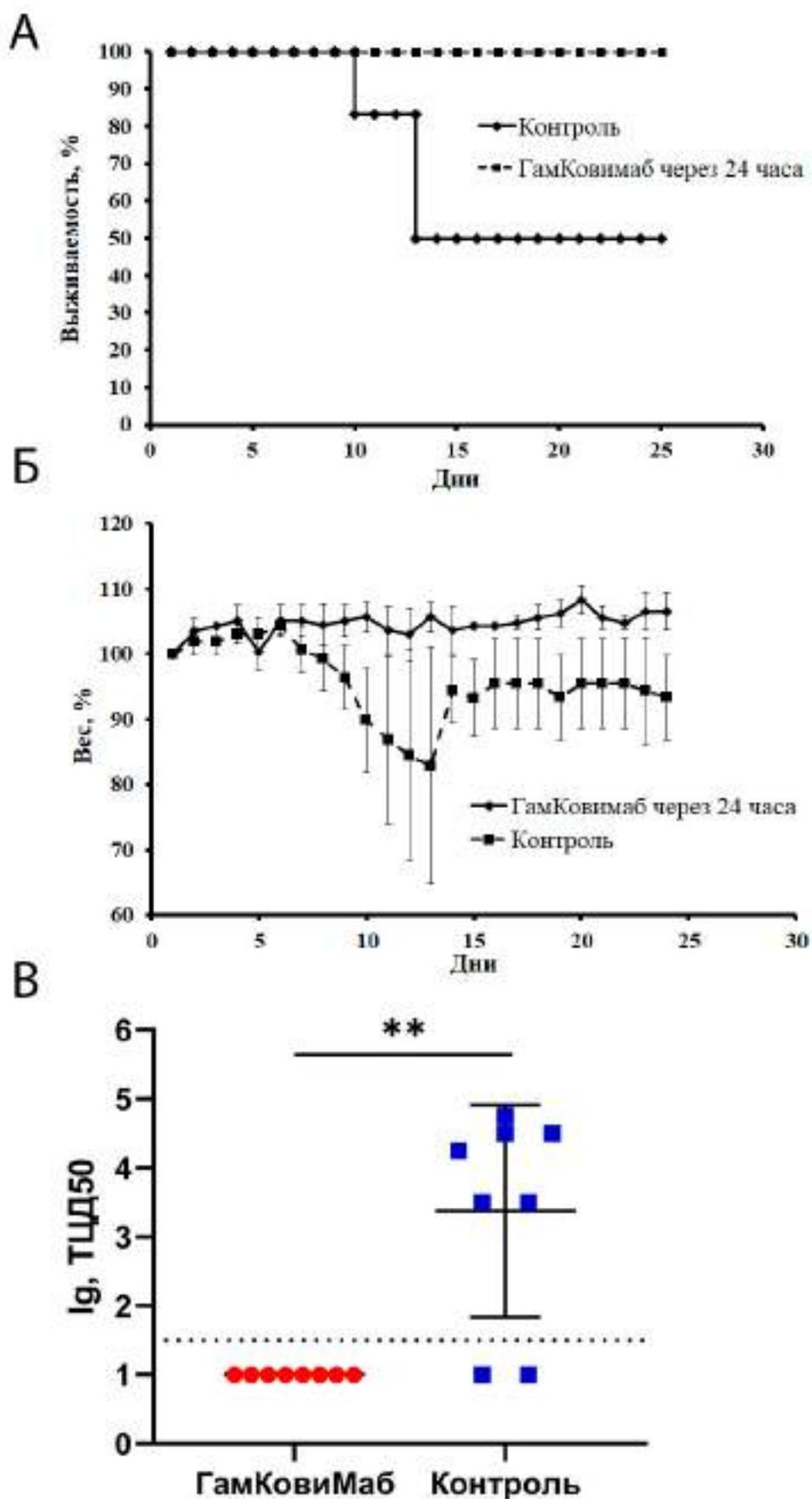


Рисунок 36. Анализ протективности препарата ГамКовиМаб на модели инфекции мышей вирусом SARS-Cov-2 варианта Omicron (B.1.1.529). А -

Анализ выживаемости животных в группах, получавших ГамКовиМаб или плацебо; Б - Анализ изменения веса животных в группах, получавших ГамКовиМаб или плацебо; В - содержанию вируса в легких инфицированных животных на 4 сутки после заражения.

При этом, изменения веса животных, получивших препарат, не наблюдалось. Кроме того, в результате анализа было показано, что на 4 сутки после инфицирования у животных опытной группы не обнаруживался вирус в легких, в отличие от образцов, выделенных из легких мышей, получивших плацебо (Контроль).

Таким образом, результаты исследования протективной активности препарата ГамКовиМаб *in vivo* на трансгенных мышах, показывают, что при однократном системном введении препарата в дозе 10 мг/кг препарат обладает высокой протективной активностью (100%) в отношении летальной инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2 как в отношении исходного варианта вируса B.1.1.1, так и в отношении вариантов B.1.617.2 (Delta) и Omicron (B.1.1.529). При этом, защитная эффективность достигается даже при введении препарата через 24 часа после инфицирования.

В исследовании вирус-нейтрализующей активности моноклональных антител GamP2C5 (компонент I) и GamXRH19 (компонент II) на культуре клеток Vero E6 была выявлена выраженная активность антител в отношении вируса SARS-CoV-2, включая все варианты вируса, вызывающие опасения: Alpha, Beta, Gamma, Delta и Omicron. Моноклональное антитело GamP2C5 нейтрализовало вирус SARS-CoV-2 штамма B.1.1.1 и вариантов Alpha, Beta, Gamma и Omicron в минимальных концентрациях не более 9,8-40 нг/мл. Моноклональное антитело GamXRH19 нейтрализовало вирус SARS-CoV-2 штамма B.1.1.1 и варианта Delta в минимальных концентрациях не более 16-32 нг/мл. На летальной модели инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, у ACE2-трансгенных мышей была продемонстрирована высокая протективная активность препарата ГамКовиМаб. Однократное системное введение

препарата в дозе 10 мг/кг защищало 100% животных от гибели. Проведенные доклинические исследования активности препарата ГамКовиМаб позволили сделать вывод о целесообразности проведения дальнейших клинических исследований препарата ГамКовиМаб как перспективного средства для терапии и экстренной профилактики инфекционного заболевания COVID-19.

### **3.2.2.5. Открытое исследование безопасности и фармакокинетики лекарственного препарата для ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы**

На следующем этапе исследования Этическим Комитетом министерства здравоохранения РФ было выдано разрешение на проведение клинических исследований препарата ГамКовиМаб по протоколу № 01- ГамКовиМаб -2022. В период с апреля по май 2022 года добровольцы получали препарат с целью оценки переносимости, безопасности и фармакокинетики лекарственного препарата для ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, на основе гуманизированных моноклональных антител при однократном введении у здоровых добровольцев.

Задачами исследования являлись:

- Изучение переносимости, безопасности, иммуногенности и фармакокинетики препарата у здоровых добровольцев при введении 1/10 терапевтической дозы (однократно, 1 мг/кг)
- Изучение переносимости, безопасности, иммуногенности и фармакокинетики препарата у здоровых добровольцев при введении 1/2 терапевтической дозы (однократно, 5 мг/кг)
- Изучение переносимости, безопасности, иммуногенности и фармакокинетики препарата у здоровых добровольцев при введении полной терапевтической дозы (однократно, 10 мг/кг)

В ходе всего периода наблюдения было изучено влияние препарата на жизненно-важные показатели, данные инструментальных и лабораторных

показателей, развитие, выраженность и связь с введением препарата нежелательных явлений (НЯ) в течение исследования.

### **Общий дизайн и план-описание исследования**

В рамках исследования изучалась безопасность препарата при однократном введении. Терапевтическая доза рассчитана исходя из противовирусной активности моноклональных антител, входящих в состав препарата. Для обеспечения безопасности добровольцев введение препарата начато с 1/10 терапевтической дозы. Эскалация дозы проводилась поэтапно: на первом этапе изучена безопасность препарата в дозе 1/10 от терапевтической дозы у 5 добровольцев, на втором – 1/2, у 5 добровольцев, на третьем – полная доза, у 15 добровольцев. На третьем этапе было включено 15 добровольцев по 5 человек в когорте.

Выбор контингента добровольцев обусловлен требованиями Федерального закона от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств», Руководств по проведению клинических исследований лекарственных средств (ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ, том 1, 2), а также рекомендациями ВОЗ (1994 г., 2004 г., 2016 г.)

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

**Таблица 19.** Распределение добровольцев в группы.

	1/10 дозы	1/2 дозы	1 доза	Итого
дублиеры *	1	1	3	5
добровольцы	5	5	15	25

\* - потребовалось включение 1 дублиера.

Исследование для каждого участника состояло из 3 периодов:

- скрининг (не более 14 дней до введения препарата);
- период введения исследуемого препарата и наблюдения в условиях стационара (госпитализация на 7 дней);

- период последующего наблюдения (с 8 по 90 день с момента введения).

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

Все включенные добровольцы (соответствующие критериям включения и не имеющие критериев невключения) были распределены в дозовые группы по мере подписания информированных согласий, специального распределения в группы не подразумевалось.

Для обеспечения безопасности пациентов планировались следующие мероприятия:

1. Введение препарата проводилось в стационаре оснащенном средствами неотложной помощи: палата интенсивной терапии со всеми необходимыми медикаментами: кислород, кортикостероиды, аэрозольные бронходилататоры, адреналин и оборудование неотложной помощи (дефибриллятор, кислородное оборудование, укладка для выполнения трахеостомы);

2. Введение препарата осуществлялось под наблюдением врача реаниматолога;

3. Добровольцу устанавливался периферический венозный катетер с наличием дополнительного инъекционного порта, введение препарата производилось через дополнительный порт; основной порт предназначен для введения препаратов неотложной терапии, в том числе растворов для инфузий, в случае развития нежелательных явлений;

4. Введение препарата производилось с использованием шприцевого дозатора/ инфузомата или аналогичного устройства для обеспечения контролируемой скорости введения (инфузионной помпы, инфузионного насоса). Скорость введения в течение первых 30 минут составляла 0,3 мл/кг/час. При отсутствии нежелательных явлений скорость введения можно

было постепенно увеличить до максимально возможной – 1 мл/кг/час. Увеличение скорости введения препарата, особенно при первой инфузии могло увеличить риск развития инфузионных реакций. Недопускалось быстрое внутривенное капельное, струйное или болюсное введение;

5. Предусматривался тщательный мониторинг жизненно важных показателей во время введения, изменение которых свидетельствовало о развитии инфузионных реакций, особенно во время и в первый час после инфузии; при первом признаке инфузионной реакции инфузию следовало остановить и продолжить физиологическим раствором, после стабилизации состояние введение могло быть продолжено с меньшей скоростью введения;

6. По решению врача исследователя добровольцы могли быть госпитализированы не в один день;

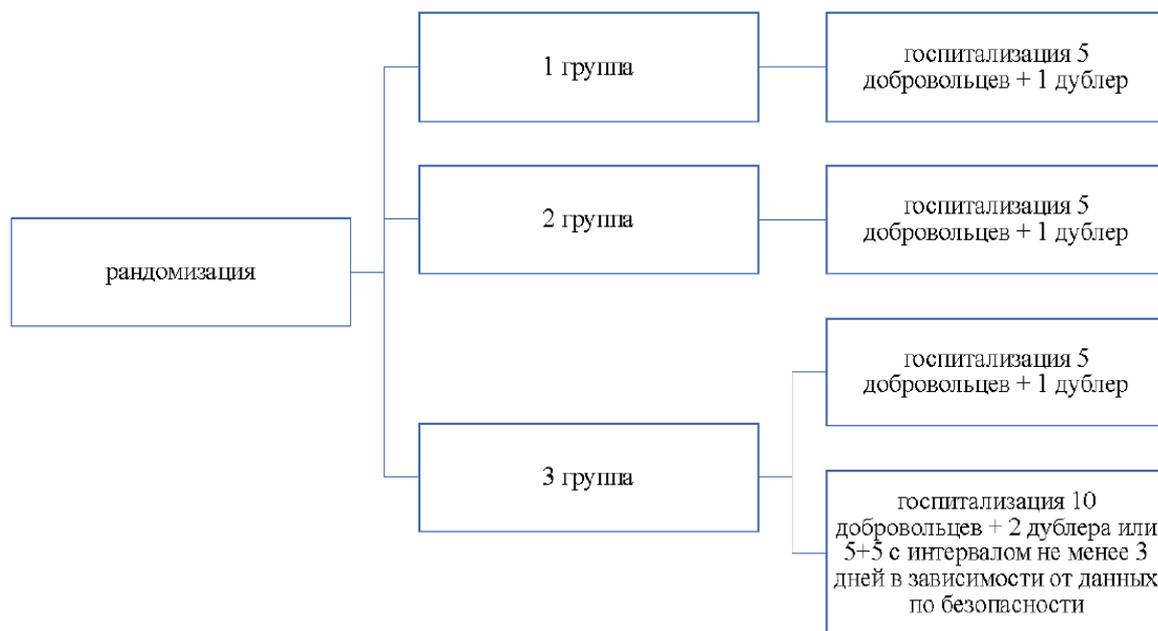
7. В случае развития инфузионных реакций для оказания экстренной помощи могли быть использованы средства неотложной помощи: кислород, кортикостероиды, аэрозольные бронходилататоры, адреналин и оборудование неотложной помощи (дефибриллятор, кислородное оборудование, укладка для выполнения трахеостомы) и другие при необходимости;

8. В случае развития инфузионных реакций проводился контроль содержания электролитов крови и, по мере необходимости, проводилась заместительная инфузионная терапия.

Первая группа, 5 добровольцев, получила препарат в 1/10 дозы – 1,0 мг/кг, после введения до 7 суток осуществлялся мониторинг безопасности в условиях стационара.

Вторая группа 5 добровольцев получила препарат в 1/2 дозы – 5 мг/кг и после введения до 7 суток осуществлялся мониторинг безопасности в условиях стационара. Третья группа 15 добровольцев получила препарат в полной дозе – 10 мг/кг и после введения до 7 суток осуществлялся мониторинг безопасности в условиях стационара. Для обеспечения безопасности добровольцев сначала было включено в исследование 5 добровольцев. По результатам оценки безопасности главный исследователь принимал решение о продолжении

исследования и в зависимости от показателей безопасности на 7 день у первой подгруппы из 5 добровольцев: если безопасность оценивалась исследователем как «хорошая», госпитализировали еще 10 добровольцев одновременно.



**Рисунок 37.** Схема исследования

### ***Исследование фармакокинетики и иммуногенности препарата ГамКовиМаб***

Количественное определение концентрации исследуемого препарата в биологических образцах выполнено с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), обеспечивающего получение достоверных данных в выбранных условиях и отвечающий общим требованиям селективности, точности и воспроизводимости.

Оценка фармакокинетики каждого антитела проведена в отдельности. Для этого на плашку в качестве мишени сорбирован рекомбинантный рецептор-связывающий домен (RBD) S белка вируса SARS-CoV-2. При этом для оценки фармакокинетики антитела GamP2C5 использован рецептор-связывающий домен (RBD) S белка вируса SARS-CoV-2 варианта Гамма, с которым не взаимодействует антитело GamXRH19, а для оценки фармакокинетики антитела GamXRH19 использован рецептор-связывающий домен (RBD) S белка

вируса SARS-CoV-2 варианта Дельта, с которым не взаимодействует антитело GamP2C5. После сорбции антигена, в планшеты добавляли блокирующий буфер, а затем вносить исследуемые образцы сыворотки и стандарты антител GamP2C5 и GamXRH19 с известной концентрацией. Далее после инкубирования и отмывки в планшеты вносили конъюгат к человеческому IgG1, меченный пероксидазой. Измерение оптической плотности производили при ОД450нм. По оптической плотности стандартов с известной концентрацией строили калибровочную кривую и по формуле вычисляли концентрацию антител GamP2C5 и GamXRH19 в исследуемых образцах.

Фармакокинетика препаратов на основе моноклональных антител в значительной степени обусловлена природой молекул иммуноглобулинов и способом их введения. Лекарственный препарат для экстренной профилактики болезни вызванной вирусом SARS-Cov-2 на основе моноклональных рекомбинантных антител предназначен для внутривенного инфузионного введения. При внутривенном введении препаратов моноклональных антител их биодоступность составляет 100%, при этом очевидно, что максимум достигается непосредственно в момент полного введения препарата. Распределение молекул моноклональных антител в организме детерминировано их биологической активностью и свойствами иммуноглобулинов. Проникновение в ткани организма больших полярных молекул антител класса G обуславливается их пассивной диффузией через стенки кровеносных сосудов и зависит от васкуляризации ткани, а также механизмами опосредованными Fc-рецептором. Уровень проникновения и депонирования антител в ткани, помимо васкуляризации, определяется присутствием в этой ткани целевого антигена. Именно наличие в ткани мишени для связывания антител вызывает отклонение от линейной фармакокинетики препаратов. Такая ситуация характерна для большинства противоопухолевых антител, когда имеет место двухпараметрическая модель распределения. Поскольку антитела, входящие в состав лекарственного препарата на основе моноклональных рекомбинантных антител, связываются с антигеном вируса SARS-Cov-2, то их фармакокинетика

у здоровых животных и человека не зависит от антигенопосредованного депонирования в тканях.

Забор образцов крови для исследования проводился в следующие временные точки после введения препарата: 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, 60 дней, 90 дней. Данные временные точки забора были выбраны исходя из собственных экспериментальных данных с соблюдением правила, что период отбора проб не менее 4  $T_{1/2}$  - то есть отбор пробы на 7, 10, 14 и 21 день. Точки забора крови на 28, 45, 60 и 90-й дни выбраны с запасом.

Исследование клинической фармакокинетики в сыворотке крови здоровых добровольцев в рамках I-й фазы клинических испытаний предполагал расчет следующих параметров для каждого добровольца:

$AUC_{0-t}$  – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» (от нуля до последнего отбора крови);

$AUC_{0-\infty}$  – площадь под фармакокинетической кривой «концентрация-время» (от нуля до бесконечности);

$C_{max}$  – величина максимальной концентрации;

$T_{1/2}$  – период полувыведения;

$kel$  – константа элиминации;

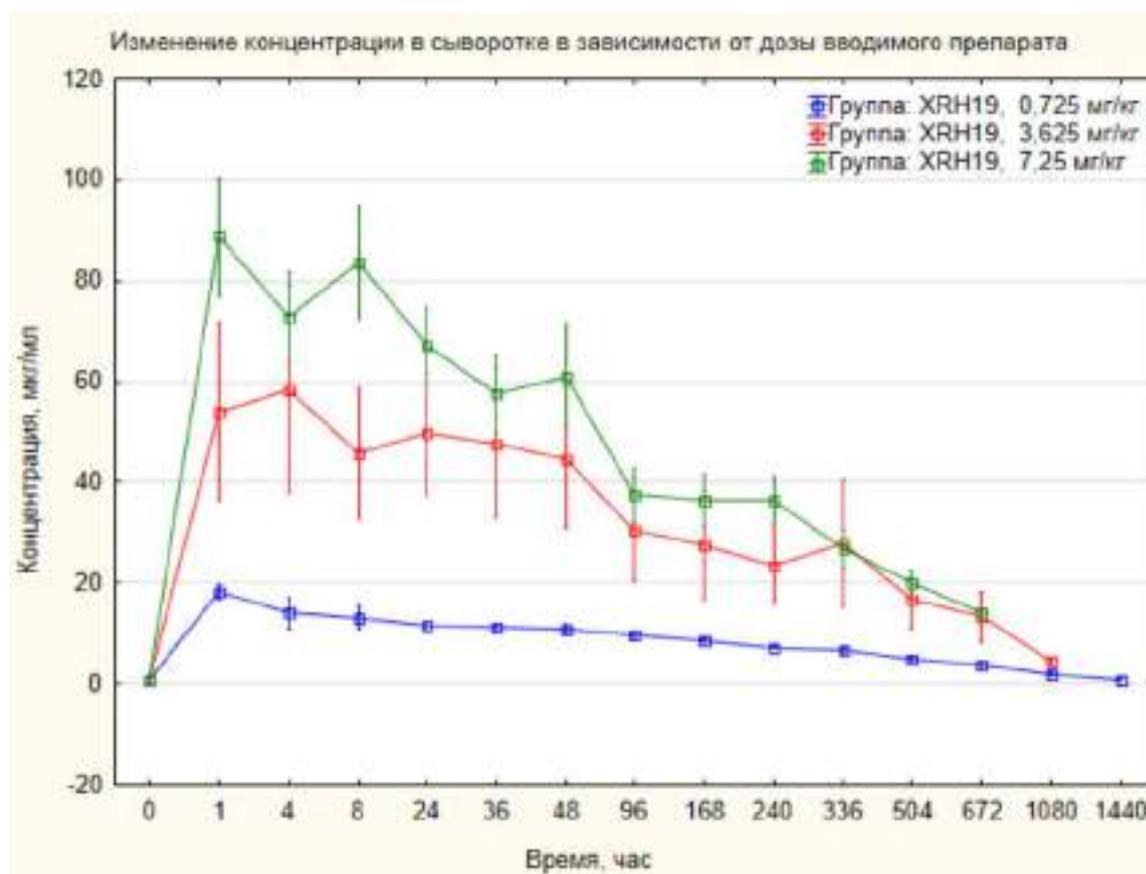
$V_d$  – объем распределения.

Рассчитаны индивидуальные и усредненные фармакокинетические профили.

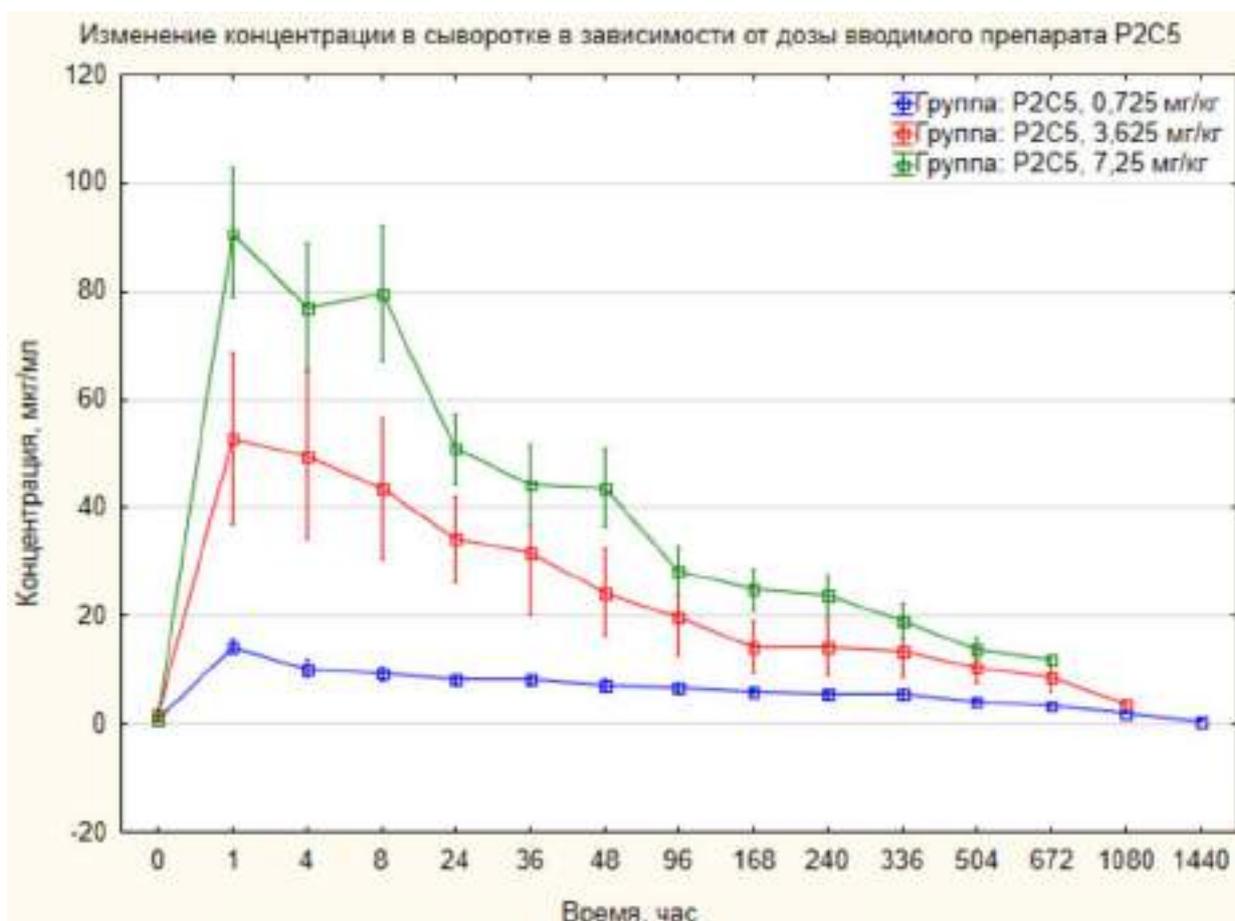
**Таблица № 20. Результаты расчета фармакокинетических параметров**

Параметр	Ед. измерения	XRH19			P2C5		
		0,725 мг/кг	3,625 мг/кг	7,25 мг/кг	0,725 мг/кг	3,625 мг/кг	7,25 мг/кг
$\lambda_z$	1/h	0,0017	0,0024	0,0019	0,0017	0,0024	0,0016
$t_{1/2}$	h	404,57	283,23	356,61	404,57	283,23	438,43
$T_{max}$	h	1	4	1	1	4	1
$C_{max}$	µg/ml	18,32	58,54	88,64	18,32	58,54	90,83
$C_0$	µg/ml	0,76	0,90	0,66	0,76	0,90	0,85
$C_{last\_obs}/C_{max}$		0,05	0,07	0,16	0,05	0,07	0,13

AUC 0-t	µg/ml*h	6427,42	20392,62	20797,23	6427,42	20392,62	15107,31
AUC 0-inf_obs	µg/ml*h	6964,39	22166,00	28003,36	6964,39	22166,00	22583,67
AUC 0-t/0-inf_obs		0,92	0,92	0,74	0,92	0,92	0,67
AUMC 0-inf_obs	µg/ml*h <sup>2</sup>	3965433,4	9920289,34	13783612,4	3965433,4	9920289,34	13487634,73
MRT 0-inf_obs	H	569,39	447,55	492,21	569,39	447,55	597,23
Vz_obs	(mg/kg)/(µg/ml)	0,0608	0,0668	0,1332	0,0608	0,0668	0,2031
Cl_obs	(mg/kg)/(µg/ml)/h	0,0001	0,0002	0,0003	0,0001	0,0002	0,0003
Vss_obs	(mg/kg)/(µg/ml)	0,0593	0,0732	0,1274	0,0593	0,0732	0,1917



**Рисунок 38.** Изменение концентрации в сыворотке в зависимости от дозы вводимого препарата XRH19 (Mean±Std Er)



**Рисунок 39.** Изменение концентрации в сыворотке в зависимости от дозы вводимого препарата P2C5 (Mean±Std Er)

Фармакокинетические параметры были рассчитаны на основании математической модели, которая предполагает внутривенное введение препарата и не учитывает компартментализацию, что обосновано отсутствием в нормальных тканях антигена для антител, входящих в состав препарата.

Общий объем распределения препарата ( $V_{ss\_obs}$ ) составил около 0,31 л/кг (0,3117 (мг/кг)/(мкг/мл)) для GamP2C5 и около 0,17 л/кг (0,1694 (мг/кг)/(мкг/мл)) для GamXRH19, что свидетельствует о распределении обоих компонентов препарата в крови и межклеточной жидкости. Константа реакции элиминации ( $\lambda_z$ ) составила 0,0060/час для GamP2C5 и 0,0059/час для GamXRH19; метаболический клиренс ( $Cl_{obs}$ ) - 2,1 мл/час (0,0021 (мг/кг)/(мкг/мл)/час) для GamP2C5 и 1,3 мл/час (0,0013 (мг/кг)/(мкг/мл)/час) для GamXRH19; время полувыведения ( $t_{1/2}$ ) – 114,9 часов в случае GamP2C5 и

117,9 часов в случае GamXRH19; максимальная концентрация в плазме крови (C<sub>max</sub>) – 70,7 мкг/мл в случае GamP2C5 и 84,5 мкг/мл в случае GamXRH19; среднее время удержания препарата (MRT 0-inf\_obs) – 145,5 часов в случае GamP2C5 и 130,5 часов в случае GamXRH19; при этом площадь под экспериментальной кривой концентрация-время (AUC<sub>0-t</sub>) составила 4382,9 мкг/мл\*час для GamP2C5 и 7367,4 мкг/мл\*час для GamXRH19.

#### Оцениваемые показатели иммуногенности

Для оценки иммуногенности исследуемого препарата, в биологических образцах количественно определены антитела к лекарственному препарату (ADA) с использованием метода твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), обеспечивающего получение достоверных данных в выбранных условиях и отвечающий общим требованиям селективности, точности и воспроизводимости.

С этой целью использован коммерческий набор Human Anti-Human Antibody ELISA Kit (Epitope Diagnostics Inc) позволяющий проводить количественную оценку антител IgG и IgM специфичных к Fc-фрагменту IgG человека в сыворотке крови. Процедуру проведения анализа выполняли согласно протоколу фирмы производителя.

Антитела к лекарственному препарату определены до введения ИП, через 28 и 90 дней после введения препарата. Количество антител оценивалось относительно базового уровня (до введения препарата).

#### *Изучение образования антител специфических к препарату*

##### **Сбор материала для анализа**

Выявление и измерение концентрации антител к антителам GamP2C5 и GamXRH19 у здоровых добровольцев при однократном введении возрастающих доз (0,325; 0,65; 3,25 мг/кг компонента I и 0,4; 0,8; 4 мг/кг компонента II) препарата ГамКовиМаб проводили в сыворотке здоровых добровольцев. Забор крови для получения сыворотки проводили до введения препарата и через 28, 90 дней после введения препарата. Кровь собирали в пробирки с активатором свертывания. Через 20-30 мин хранения при

комнатной температуре, образцы центрифугировали в течение 15 мин при ускорении 1500 G. Сыворотку крови стягивали микропипеткой, не касаясь сгустка. Определение концентрации антител к препарату проводили в лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ.

Исследование концентрации антител к антителам GamP2C5 и GamXRH19 в сыворотке крови. Для выявления и определения концентрации антител к антителам GamP2C5 и GamXRH19 в сыворотке крови здоровых добровольцев была использована коммерческая тест-система НАНА, Human Anti-Human Antibody ELISA Kit (Epitope Diagnostics INC), согласно протоколу фирмы-производителя.

Данная тест-система позволяет определять концентрацию анти-человеческих антител в сыворотке крови. Поскольку антитела GamP2C5 и GamXRH19 являются гуманизированными моноклональными антителами, то идиотипические антитела к GamP2C5 и GamXRH19 будут являться анти-человеческими.

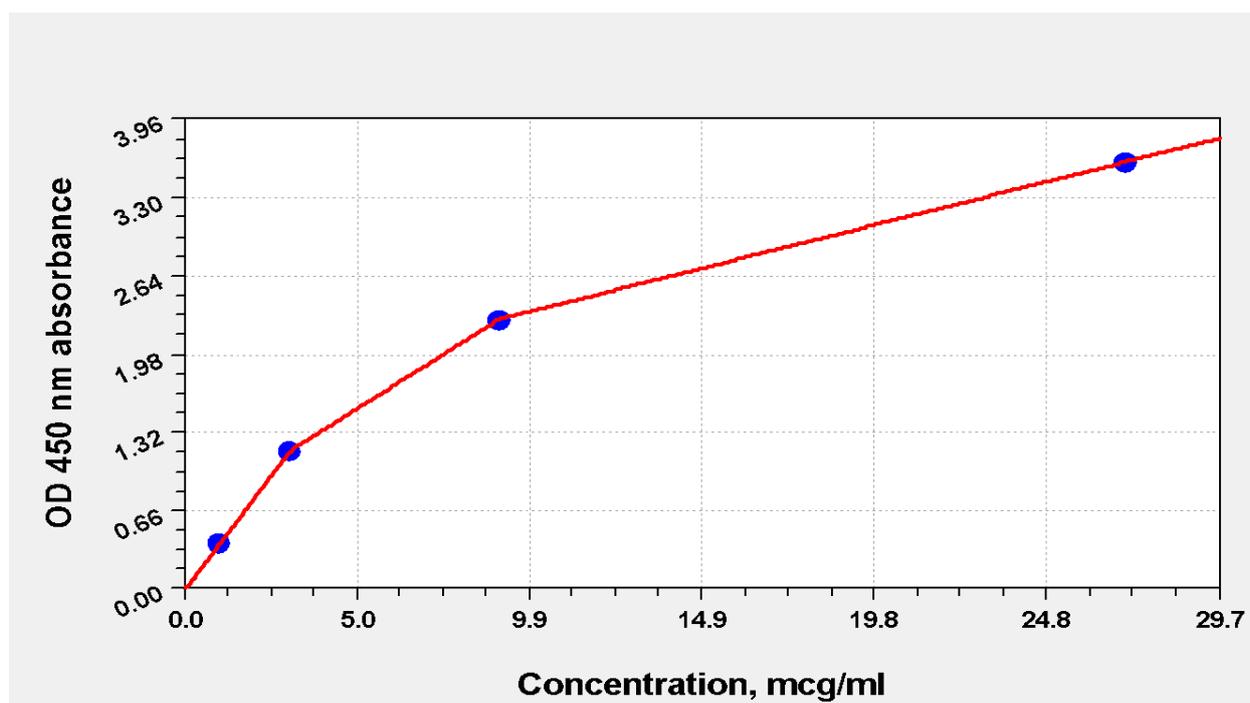
Для определения концентраций антител к антителам GamP2C5 и GamXRH19 в исследуемых образцах сывороток крови, строили калибровочные кривые зависимости оптической плотности раствора от концентрации стандартного образца и по оптической плотности тестируемого образца (сыворотки) находили концентрацию антител к антителам GamP2C5 и GamXRH19 в сыворотках крови.

В таблице 21 представлены экспериментальные данные, по которым была построена экспоненциальная калибровочная кривая для количественного определения антител к иммуноглобулинам человека (рисунок 40).

**Таблица № 21.** Экспериментальные данные для построения калибровочной кривой для количественного определения антител к антителам GamP2C5 и GamXRH19 в сыворотке крови добровольцев.

Раствор стандартного образца (мкг/мл)	Экспериментальные значения OD (450 нм)
--	---

0	0,000
1	0,378
3	1,159
9	2,269
27	3,597



**Рисунок 40.** Калибровочная кривая для количественного определения концентраций антител к антителам GamP2C5 и GamXRH19 в исследуемых образцах сывороток крови

***Результаты исследования концентрации антител к антителам GamP2C5 и GamXRH19 в исследуемых образцах сывороток крови***

Определение концентраций антител к антителам P2C5 и XRH19 в исследуемых образцах сывороток крови проводили в 3 повторах. Полученные результаты использовали для построения кривой изменения концентрации антител во времени для каждого из добровольцев.

Полученные значения подвергали статистической обработке. Среднее арифметическое значение и стандартное эмпирическое отклонение по выборке

рассчитывали в автоматическом режиме с помощью программы Microsoft Excel.

В результате проведения анализа концентраций антител к антителам GamP2C5 и GamXRH19 в сыворотках крови добровольцев было показано, что статистически достоверное увеличение содержания указанных антител не обнаружено. Таким образом, препарат ГамКовиМаб на основе гуманизированных моноклональных антител не является иммуногенным.

### ***Резюме по оценке нежелательных явлений***

В данном исследовании был проведен анализ безопасности, полученных в клиническом исследовании по протоколу № 01- ГамКовиМаб -2022 «Открытое исследование безопасности и фармакокинетики лекарственного препарата для ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы».

Все субъекты исследования, соответствующие критериям включения/исключения и успешно завершившие все скрининговые процедуры, распределены в три группы исследования. Распределение субъектов, демографические и другие исходные характеристики представлены с использованием методов описательной статистики для всех субъектов, включенных в исследование (FAS-популяция). В исследование были включены добровольцы в возрасте от 18 до 45 лет. Скринировано 101, включено в исследование 26 добровольцев, из них 1 дублер.

Всего в исследовании (FAS-популяция) было зарегистрировано 90 нежелательных явлений у 23 (92%) добровольцев. Все зарегистрированные НЯ были легкой степени тяжести. Из них причинно-следственная связь «вероятно связано» отмечалась в 24 (26,7%) случаях, «возможно связано» – в 30 (33,3%), «неизвестно» – в 2 (2,2%), «сомнительная» – в 20 (22,2%), «условная» – в 14 (15,6%). Исход НЯ «завершенное выздоровление/разрешение» – в 53 (58,9%), «исход неизвестен» – в 37 (41,1%) случаев.

В Группе 1 (1/10 дозы – 1,0 мг/кг) было зарегистрировано 14 нежелательных явлений у 5 (100%) добровольцев; в Группе 2 (1/2 дозы – 5 мг/кг) – 23 НЯ у 5 (100%) добровольцев; в Группе 3 (10 мг/кг) – 53 НЯ у 13 (86,7%) добровольцев. Во всех группах зарегистрированные НЯ были легкой степени тяжести.

В Группе 1 (1/10 дозы – 1,0 мг/кг) причинно-следственная связь «вероятно связано» отмечалась в 2 (14,3%) случаях, «возможно связано» – в 5 (35,7%), «неизвестно» – в 1 (7,1%), «сомнительная» – в 6 (42,9%). Исход НЯ в группе 1 (1/10 дозы – 1,0 мг/кг) зарегистрирован как «завершенное выздоровление/разрешение» – в 10 (71,4%), «исход неизвестен» – в 4 (28,6%) случаев.

В Группе 2 (1/2 дозы – 5,0 мг/кг) причинно-следственная связь «вероятно связано» отмечалась в 1 (4,3%) случае, «возможно связано» – в 15 (65,2%), «неизвестно» – в 1 (4,3%), «сомнительная» – в 6 (26,1%). Исход НЯ в группе 2 (1/2 дозы – 5,0 мг/кг) зарегистрирован как «завершенное выздоровление/разрешение» – в 16 (69,6%), «исход неизвестен» – в 7 (30,4%) случаев.

В Группе 3 (10 мг/кг) причинно-следственная связь «вероятно связано» отмечалась в 21 (39,6%) случае, «возможно связано» – в 10 (18,9%), «сомнительная» – в 8 (15,1%), «условная» – в 14 (26,4%). Исход НЯ в группе 3 (10 мг/кг) зарегистрирован как «завершенное выздоровление / разрешение» – в 27 (50,9%), «исход неизвестен» – в 26 (49,1%) случаев.

По результатам оценки лабораторных и жизненноважных показателей все зарегистрированные отклонения были классифицированы как нежелательные явления. В ходе исследования летальных случаев и прочих серьезных нежелательных явлений, а также других значимых нежелательных явлений зарегистрировано не было. **Переносимость препарата исследователем была признана удовлетворительной.**

**Таким образом, в результате исследования возможности использования технологической платформы однодоменных антител для**

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

### **3.2.3. Разработка препарата на основе модифицированных однодоменных антител для терапии интоксикации, вызванной ботулотоксином.**

На следующем этапе исследования было принято решение об изучении возможности использования технологической платформы однодоменных антител для получения молекул, обладающих нейтрализующей активностью в отношении бактериальных мишеней. Исследования были проведены на двух моделях: ботулотоксин А *C.botulinum* и токсин В *C.difficile*.

#### **3.2.3.1. Выделение антигенного материала проведение иммунизации альпак**

Для иммунизации альпак использовали анатоксин, состоящий из ботулинического токсина и гемагглютининов в небольшом количестве. Для приготовления анатоксина использовали 0,1% раствор формальдегида. Отличие от токсина заключается в присутствии фракции гемагглютининов в небольшом количестве. Без гемагглютининов токсин при добавлении формальдегида теряет иммунологическую активность (денатурирует). Обработку проводили в течение 7 дней при температуре 40°C, после чего определяли остаточную токсичность на мышах при внутрибрюшинном введении. При её отсутствии препарат был готов для использования. Перед введением антиген очищали через 0,22 мкм фильтр. Конечная концентрация составляла 60 мкг/мл.

Иммунизацию альпака проводили пять раз с интервалом 14 дней между первой и второй иммунизацией и 10 дней между последующими инъекциями. При первой иммунизации вводили 60 мкг антигена с полным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1 по объему. При последующих иммунизациях

вводили 90 мкг антигена с неполным адъювантом Фрейнда в соотношении 1:1. Образцы крови (5-7 мл) на 24 и 49 день после иммунизации отбирали для проведения оценки формирования гуморального иммунного ответа методом ИФА. Это этого сорбировали 100 нг антигена (ботулинического анатоксина) на лунку, в качестве отрицательного контроля использовали бычий сывороточный альбумин (BSA). На рисунке 41 показана схема проведения иммунизации, а также результаты оценки титра токсин-специфических антител в сыворотках крови альпак.

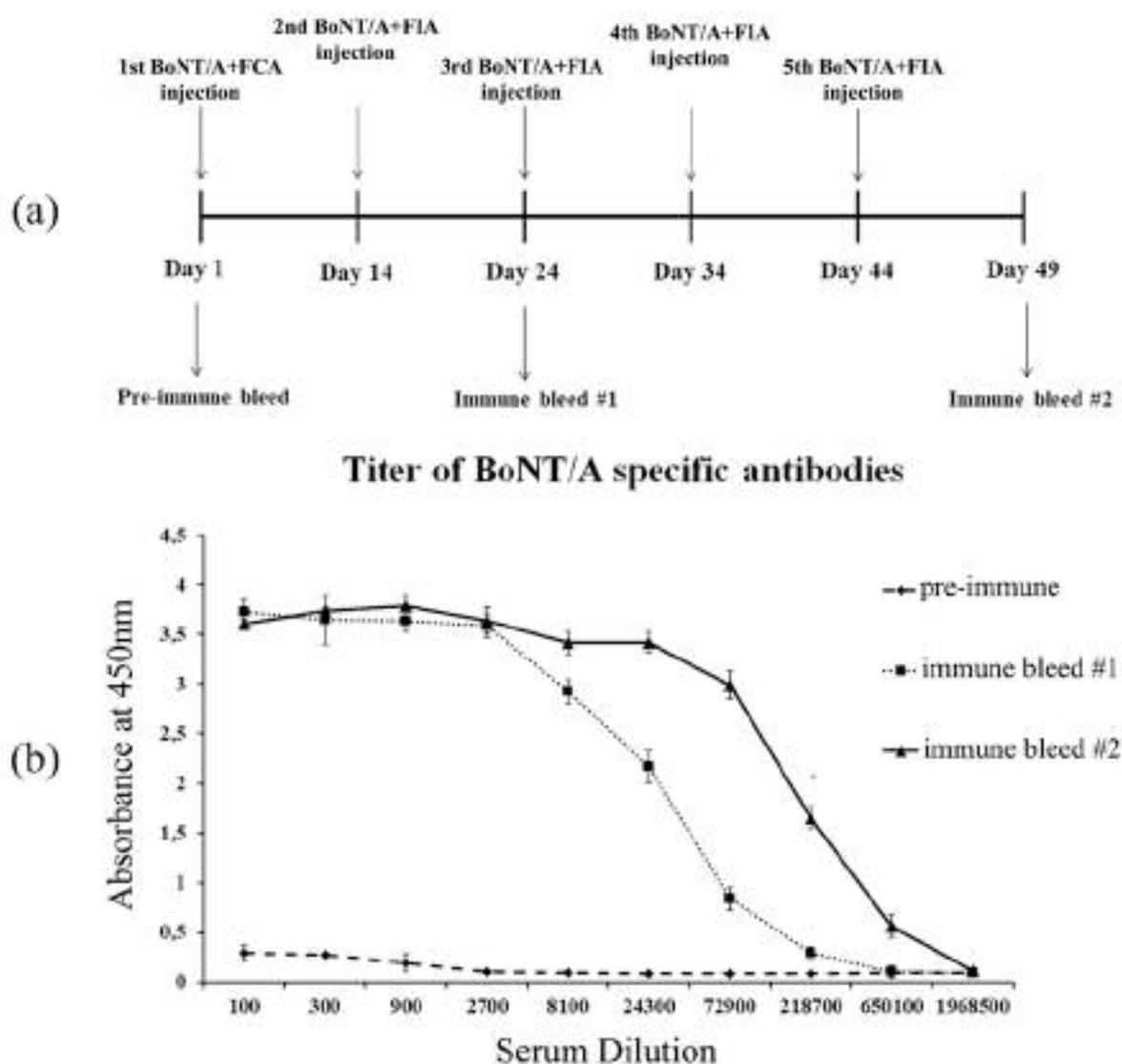
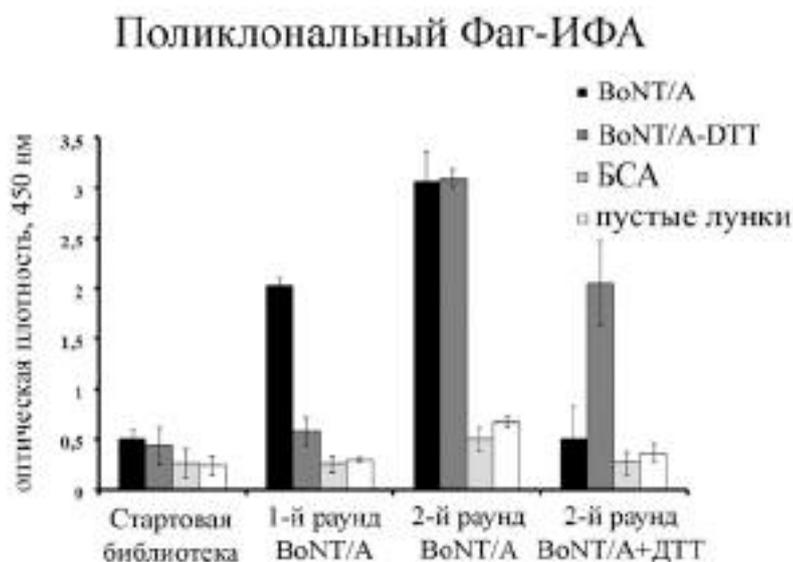


Рисунок 41. А – схема иммунизации альпака; Б – ИФА титра токсин-специфических антител в сыворотках крови альпак.

### 3.2.3.2 Получение библиотеки однодоменных антител специфичных ботулотоксину и предварительная оценка нейтрализующей активности

Для получения панели однодоменных антител к ботулотоксину VoNT/A была сконструирована библиотека нуклеотидных последовательностей VHH фрагментов неканонических антител альпака после иммунизации в составе фагмидного вектора pHEN1. После трансформации компетентных клеток E.coli была получена фагмидная библиотека размером  $5 \cdot 10^6$  клонов. Для отбора специфических антител были проведены 2 раунда селекции методом фагового дисплея. Для первого раунда селекции в качестве мишени использовали токсин VoNT/A. Для второго раунда использовали два независимых подхода: для первого использовали в качестве мишени токсин VoNT/A; для второго подхода использовали токсин VoNT/A, обработанный ДТТ. Восстановление токсина при добавлении ДТТ использовали для разделения тяжелой (НС) и легкой (LC) цепей токсина VoNT/A и их более равномерной адсорбции на поверхности иммунопланшета и для эквивалентного распределения эпитопов на обеих цепях при селекции. Анализ эффективности селекции проводили методом ИФА с использованием поликлональных фаговых библиотек после 1-го и 2-го раундов селекции (Рисунок 42а).

А



Б

Нейтрализующая активность библиотеки  
токсин специфических фагов

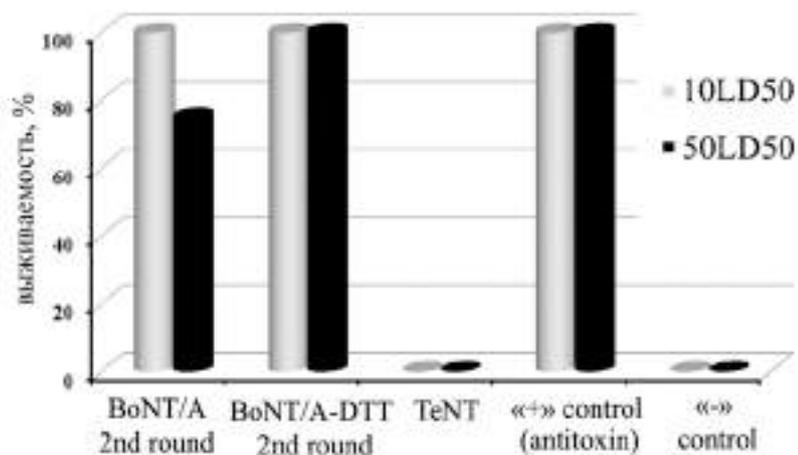


Рисунок 42. Анализ эффективности селекции и нейтрализации поликлональной токсин-специфической библиотеки фагов.

Кроме того, для быстрой оценки токсин нейтрализующих свойств антител, входящих в состав исследуемых фаговых библиотек, прошедших селекцию, был использован метод нейтрализации ботулинического токсина при добавлении смеси фаговых библиотек *in vivo* (Рисунок 42б). Ранее, в литературе такой подход описан не был.

Для этого мышам линии BALB/c вводили внутривентриально токсин А в количестве 10 ЛД50 или 50 ЛД50 после предварительной инкубации в течение 1 часа с фаговыми библиотеками. В качестве контроля специфичности использовалась библиотека фагов, после селекции к токсину *C.tetani* (TeNT) (контроль специфичности). В результате анализа было показано, что библиотеки фагов после 2-х раундов селекции на ботулинической токсине обладают токсин нейтрализующими свойствами и защищают животных от введения 10 и 50 летальных доз BoNT/A.

### 3.2.3.3. Отбор индивидуальных клонов VNN и оценка их нейтрализующей активности

Методом ИФА из библиотек, прошедших селекцию, были отобраны 39 индивидуальных Фаг-VNN клонов (рисунок 43а). По результатам секвенирования для дальнейшей работы были отобраны 15 клонов с уникальными последовательностями CDR. Для оценки токсин нейтрализующих свойств отобранных клонов был использован метод нейтрализации ботулинического токсина при добавлении индивидуальных фаговых клонов (рисунок 43б). Для этого мышам линии BALB/c вводили внутриперитонеально токсин А в количестве 10 ЛД<sub>50</sub>, смешанного с индивидуальными фаговыми клонами в количестве 10<sup>11</sup> КОЕ. Для дальнейших исследований были отобраны 4 клона (B10, C10, B11, G3), которые показали 100% протективную эффективность в эксперименте на животных. На втором этапе животных разделили на 4 группы, которым вводили токсин А в количестве 50 ЛД<sub>50</sub>, смешанного с одним из четырех фаговых клонов.

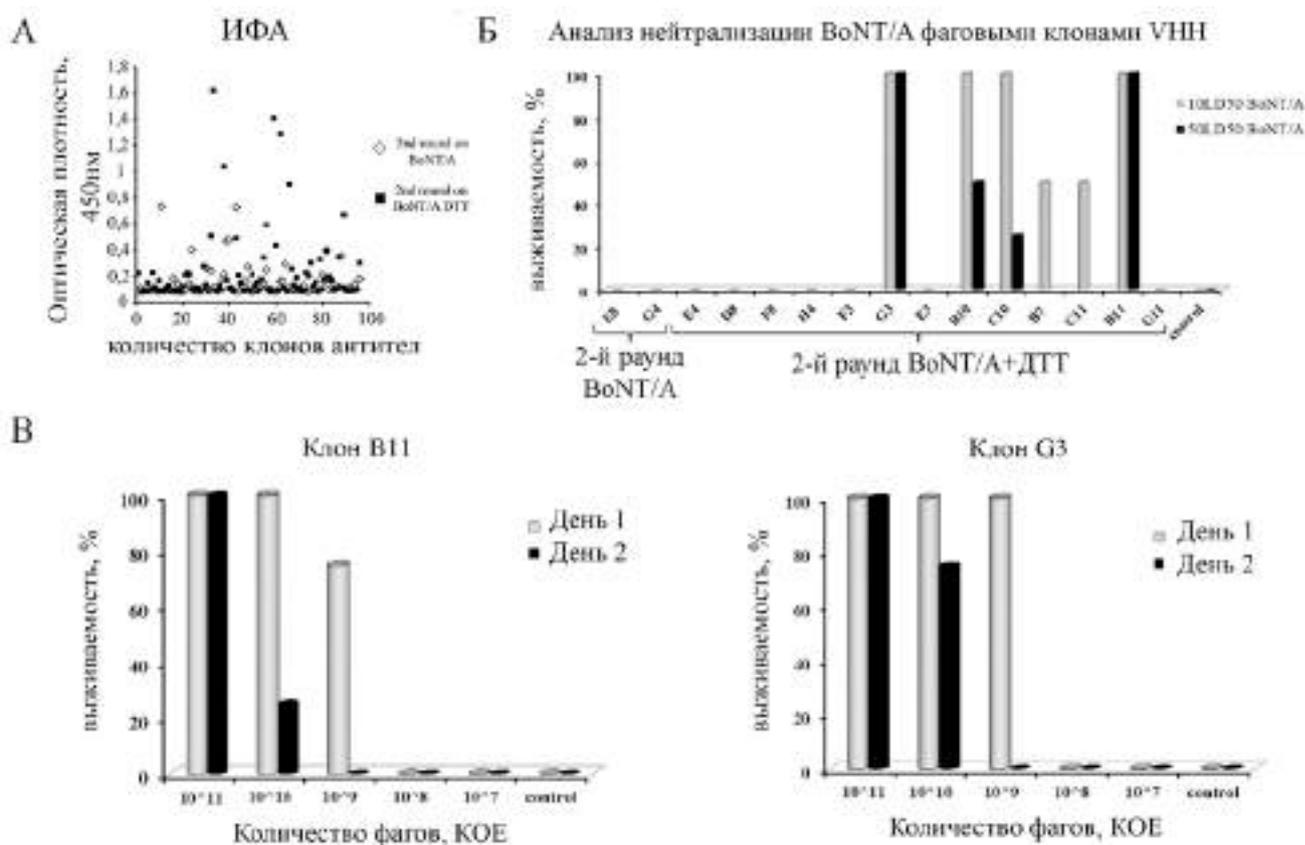


Рисунок 43. Анализ специфической активности индивидуальных клонов антител, специфичных ботулотоксину А.

Группы животных, получавших токсин в смеси с клонами В11 и G3, показали 100% выживаемость (рисунок 43в). Таким образом, в результате исследований было установлено, что фаги, несущие на своей поверхности VHH клоны В11 и G3 обладали наибольшей нейтрализующей активностью и были отобраны для дальнейших исследований.

Стоит отметить, что применение для селекции подхода, связанного с предварительной диссоциацией токсина А ДТТ, позволило увеличить разнообразие токсин специфических антител и отобрать клоны, обладающие наибольшей протективной эффективностью.

#### **3.2.3.4. Модификация клонов однодоменных антител для усиления их протективной активности**

Для повышения протективности выделенных клонов за счет увеличения времени циркуляции антител в крови и/или использования дополнительных эффекторных функций были синтезированы две модифицированные конструкции. Одна конструкция представляла собой димерную форму каждого клона (димер клона В11 и димер клона G3) за счет использования глицин-серинового линкера (Gly4Ser)<sup>3</sup> и экспрессируемую в плазмиде рЕТ30. Вторая конструкция представляла собой мономер каждого клона, связанный с Fc-фрагментом IgG человека (В11-Fc и G3-Fc) (рисунок 45а). Модификации, связанные с использованием Fc фрагмента использовались для увеличения времени циркуляции антител в крови, а также добавления Fc опосредованных эффекторных функций (АЗЦТ, КЗЦТ). Димерные молекулы антител были экспрессированы и очищены из периплазмы E.coli. Молекулярная масса выделенных клонов составила ~30 кДа. VHH, слитые с Fc-фрагментами, были получены в клетках яичника сирийского хомячка (CHO-S). Молекулярная масса антител составила ~ 40 кДа в восстанавливающих условиях (рисунок 45б). Для

определения специфичности полученных антител в отношении цепей ВоNT/A был выполнен иммуноблоттинг с использованием токсина в восстанавливающих условиях (рисунок 45в). В результате анализа было установлено, что клоны В11-Fc и G3-Fc специфически связываются эпитопами, находящимися на тяжелой цепи НС (100 кДа) токсина ВоNT/A, который соответствует рецепторному домену.

Поиск возможных эпитопов ВоNT/A для связывания с антителом В11-Fc был выполнен путем гомологического моделирования антитела, молекулярного докинга моделей к поверхности антигена и последующей проверки результата методом молекулярной динамики. Из комплексов «антиген-антитело», смоделированных программой SnugDock и отсортированных по значению скоринг-функции, была выбрана модель, в которой область контакта антитела со структурой ВоNT/A находится вблизи сайта связывания ганглиозида GD1a в исходной структуре антигена (рисунок 44).

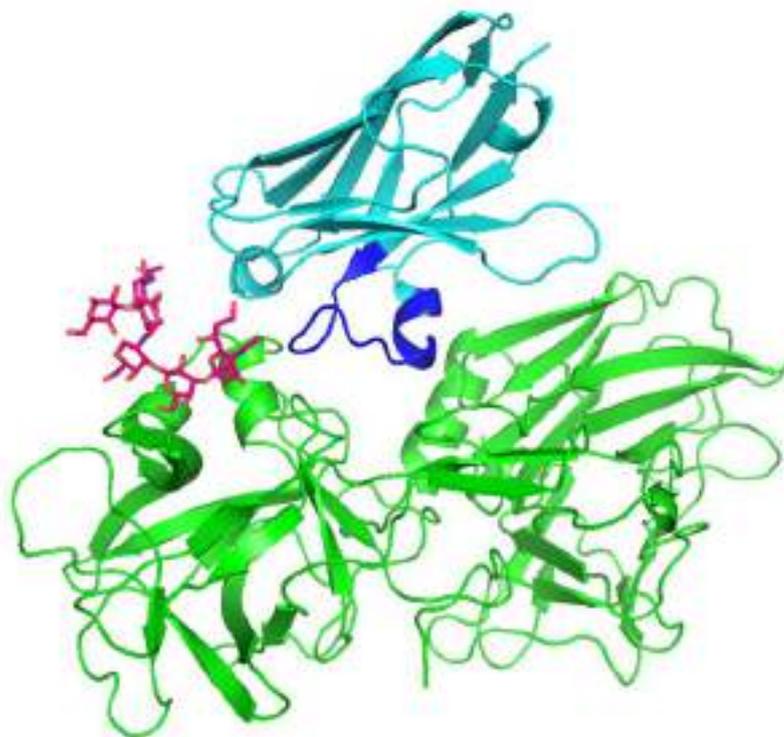


Рисунок 44. Структура комплекса ВоNT/A с антителом В11. зеленый цвет — ВоNT/A, голубой — В11 (VH), синим цветом выделена петля CDR3.

Последовательные симуляции молекулярной динамики данного комплекса с использованием программного пакета AMBER показали стабильное поведение данного комплекса, что может свидетельствовать о высокой вероятности корректной идентификации специфического эпитопа. Как известно, ботулинический нейротоксин с высокой афинностью связывается с двумя рецепторами на поверхности нейронов в качестве первого шага инвазии. При этом гликановые мотивы ганглиозидов служат корецепторами для этих белковых комплексов [Намарк С., 2016]. Поэтому в качестве возможного механизма нейтрализующей активности B11-Fc можно предположить способность отобранных антител подавлять инвазию BoNT/A в клетки посредством блокирования сайта связывания ганглиозида и нарушении его корецепторных функций.

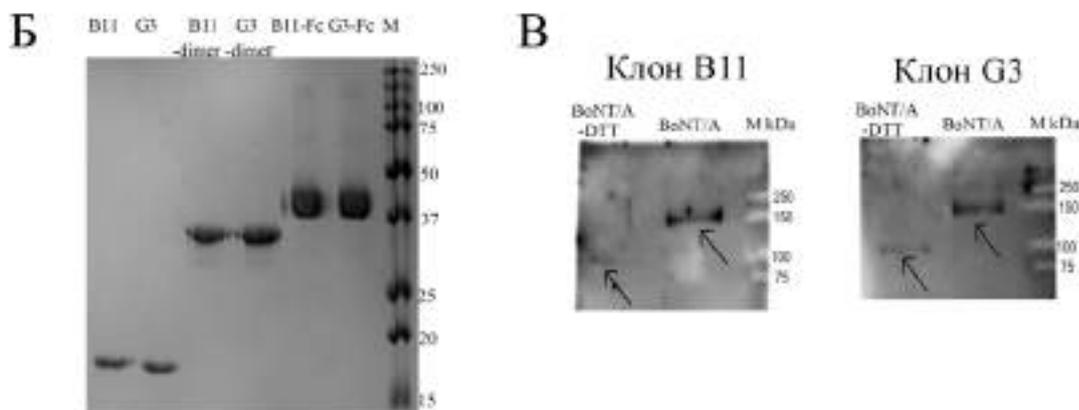
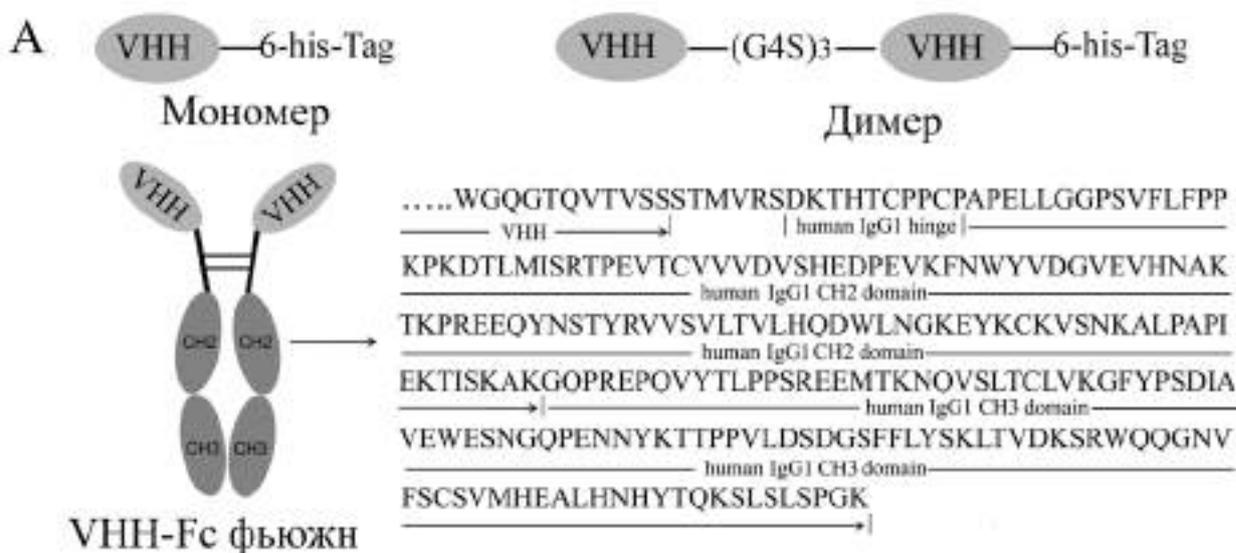


Рисунок 45. А – диаграмма мономеров VHH, димеров VHH с (GlySer)<sub>3</sub> линкером и VHH, связанных с Fc-фрагментом иммуноглобулина G человека; Б

– электрофорез в ПААГ с окраской Кумасси очищенных фрагментов мономеров, димеров и VNH-Fc вариантов антител; В – иммуноблоттинг токсина BotT/A с или без добавления DTT, инкубацией с антителами B11-Fc, G3-Fc и детекцией anti-human IgG-HRP конъюгатом.

Дополнительно была проанализирована афинность связывания клонов B11 и G3 с ботулиническим токсином методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Кинетические скорости связывания антител и токсина определяли из анализа сенсограмм и использовали для расчета равновесной константы диссоциации (KD) (таблица 23), которая составила 26.5 и 30.1нМ соответственно.

Таблица 23. Кинетические параметры взаимодействия антител с ботулотоксином методом поверхностного плазмонного резонанса.

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Rma x (RU)	KA (1/M)	KD (M)	Chi <sup>2</sup>
B11	8.67 x10 <sup>3</sup>	2.3x 10 <sup>-4</sup>	17	3.37 x10 <sup>7</sup>	<b>2.65</b> x10 <sup>-8</sup>	3.9
G3	1.51 x10 <sup>4</sup>	4.54 x10 <sup>-4</sup>	10.4	3.32 x10 <sup>7</sup>	<b>3.01</b> x10 <sup>-8</sup>	1.0

Для оценки протективной активности *in vivo* различные количества антител в мономерной, димерной или Fc-фьюжн модификациях смешивали с ботулотоксином в дозе 5 ЛД<sub>50</sub> и вводили внутривенно мышам линии BALB/c (Рисунок 46А). В результате исследования было установлено, что антитела в мономерной форме обладают частичной протективностью даже в максимальной дозе 100мкг/мышь и отсутствием защитного эффекта при введении антител в дозе 10 мкг/мышь. Димеризация антител позволила усилить защитные свойства молекул. В частности, клон B11-димер в дозе 100мкг/мышь показал 100% протективность и частичную защиту в дозе 10 мкг/мышь.

Модификация антител с Fc-фрагментом IgG человека позволила добиться наилучших результатов. Так, введение животным антитела G3-Fc обеспечивало защиту животных вплоть до дозы 0,1мкг/мышь, в то время как антитело B11-Fc

показало защиту от интоксикации ботулотоксином в дозе 1нг/мышь. Анализ фармакокинетики антител показал, что через 1 час после введения мономеров и димеров антител B11, G3 сыворотке крови животных обнаруживается только 10% от начального количества антител сразу после введения (0 часов), в то время как модификация антител с Fc-фрагментом позволила существенно увеличить их время циркуляции в крови. Через 2 недели после введения в сыворотке крови обнаруживались антитела в количестве 1% от начального уровня (рисунок 46Б). Более того, в последующем эксперименте *in vivo* было показано, что животные, ранее получившие препараты антител B11-Fc и G3-Fc в дозе 100-50мкг/мышь через две недели после введения были полностью защищены от повторной летальной интоксикации ботулотоксином к количеству 100ЛД<sub>50</sub> (Рисунок 46В). Дополнительно, было установлено, что антитела, содержащие модификацию с Fc-фрагментом, обеспечивают защиту животных и при терапевтическом режиме использования. Так, введение антител через 1 час после интоксикации также обеспечивало полную защиту животных (рисунок 46Г).

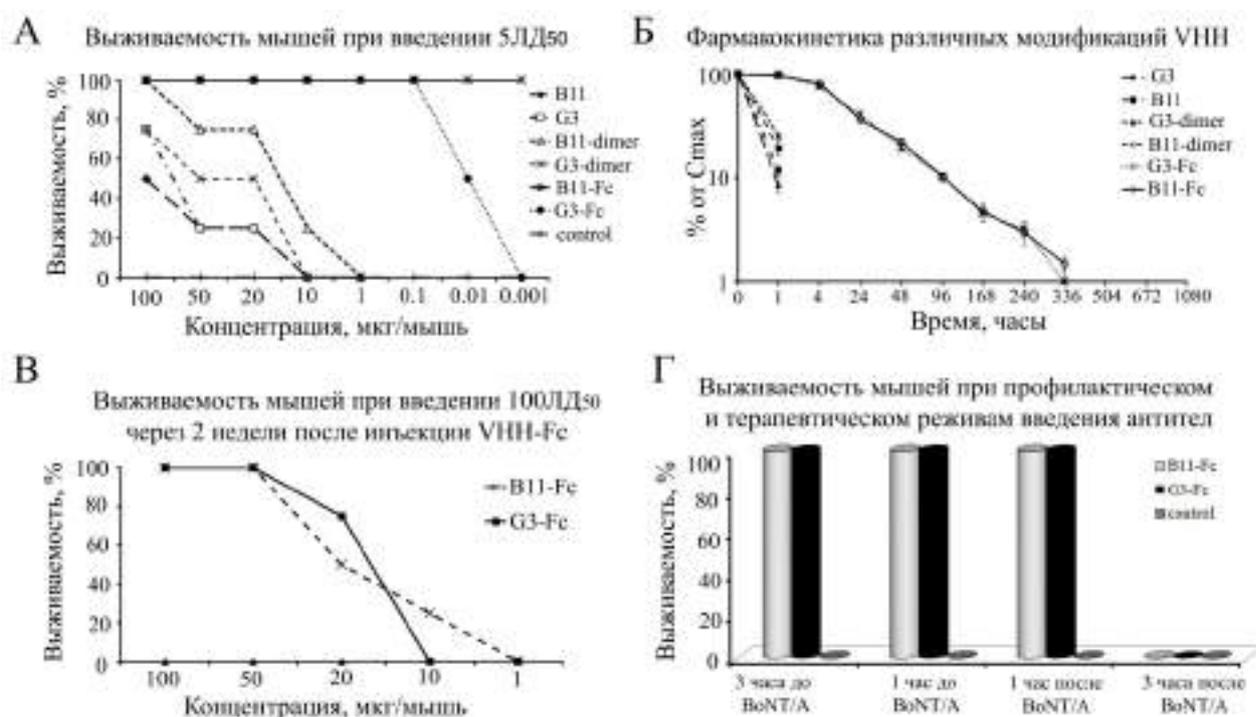


Рисунок 46. А - выживаемость мышей при заражении летальной дозой ботулотоксина (5 LD<sub>50</sub>), предварительно смешанного с мономерами VHNs,

димерами V<sub>HN</sub> или модификациями V<sub>HN</sub>, содержащими Fc-фрагмент; Б – клиренс различных модификаций антител из кровяного русла при однократной внутривенной (в.в.) инъекции 100 мкг. Концентрации молекул в сыворотке в указанные моменты времени измеряли с помощью ELISA; В - выживаемость мышей после введения ботулотоксина в дозе 100 LD<sub>50</sub> через две недели после инъекции антител; Г - выживаемость мышей после введения антител с разным режимом дозирования.

Таким образом, в результате исследования была получена панель однодоменных антител, специфичных ботулотоксину. Из 15 отобранных клонов были выбраны два клон (B11 и G3) с лучшими предварительными результатами по нейтрализации. На основе клонов были сконструированы их различные модификации путем димеризации через линкер (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> или слияния с Fc-фрагментом IgG человека. В исследовании *in vivo* на модели летальной интоксикации ботулотоксином было показано, что модификация нейтрализующих V<sub>HN</sub>, содержащая Fc-фрагмент значительно увеличивала время циркуляции антител в крови, а также позволяла увеличить защитную активность клонов V<sub>HN</sub> более чем в 1000 раз по сравнению с мономерными формами.

На основе клон B11-Fc был получен препарат для терапии интоксикации ботулотоксином. В 2021 году завершены доклинические исследования его эффективности и безопасности.

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

*Clostridioides difficile* – является причиной заболеваний кишечника, которые объединяют общим термином «*Clostridioides difficile* инфекция» (CDI), к которым относят, в том числе клостридиальный колит или псевдомембранозный энтероколит – тяжелое воспалительное заболевание

толстого кишечника. Помимо неблагоприятного эпидемиологического прогноза данной группы заболеваний следует отметить также существующие трудности в области терапии. Антибиотикотерапия остается одним из основных инструментов в терапии данной патологии. Однако данный подход стремительно теряет свою эффективность вследствие появления новых резистентных к антибиотикам штаммов *C. difficile*, а также увеличению частоты выявления данных штаммов у пациентов с АОД и ПМК.

В таких условиях крайне актуальным является поиск принципиально иных подходов в борьбе с заболеваниями, вызванными *C. difficile*. Согласно современным представлениям среди наиболее перспективных методов борьбы с инфекцией *C. difficile* является разработка новых препаратов для иммунотерапии. В связи с этим, получение моноклональных однодоменных антител против токсина В, как основного фактора патогенности *Clostridioides difficile* с последующей оценкой их нейтрализующего действия *in vitro* и протективного действия *in vivo*, отличается актуальностью и новизной, а также высокой значимостью для современной медицинской науки.

В связи с этим, в рамках поставленных задач в качестве второй бактериальной мишени для изучения возможности использования технологической платформы однодоменных антител для получения молекул, обладающих нейтрализующей активностью был выбран токсин В *C. difficile*.

#### **3.2.4.1. Проведение иммунизации животных семейства Camelidae нетоксичным производным токсина В *C. difficile***

Для иммунизации альпак использовали нетоксичный CROPs домен токсина В *C. difficile*. De novo синтезированная нуклеотидная последовательность кодирующая CROPs домен токсина В *C. difficile* была клонирована в бациллярный экспрессирующий вектор pHis1522 (Mobitec, Germany) (рисунок 47).

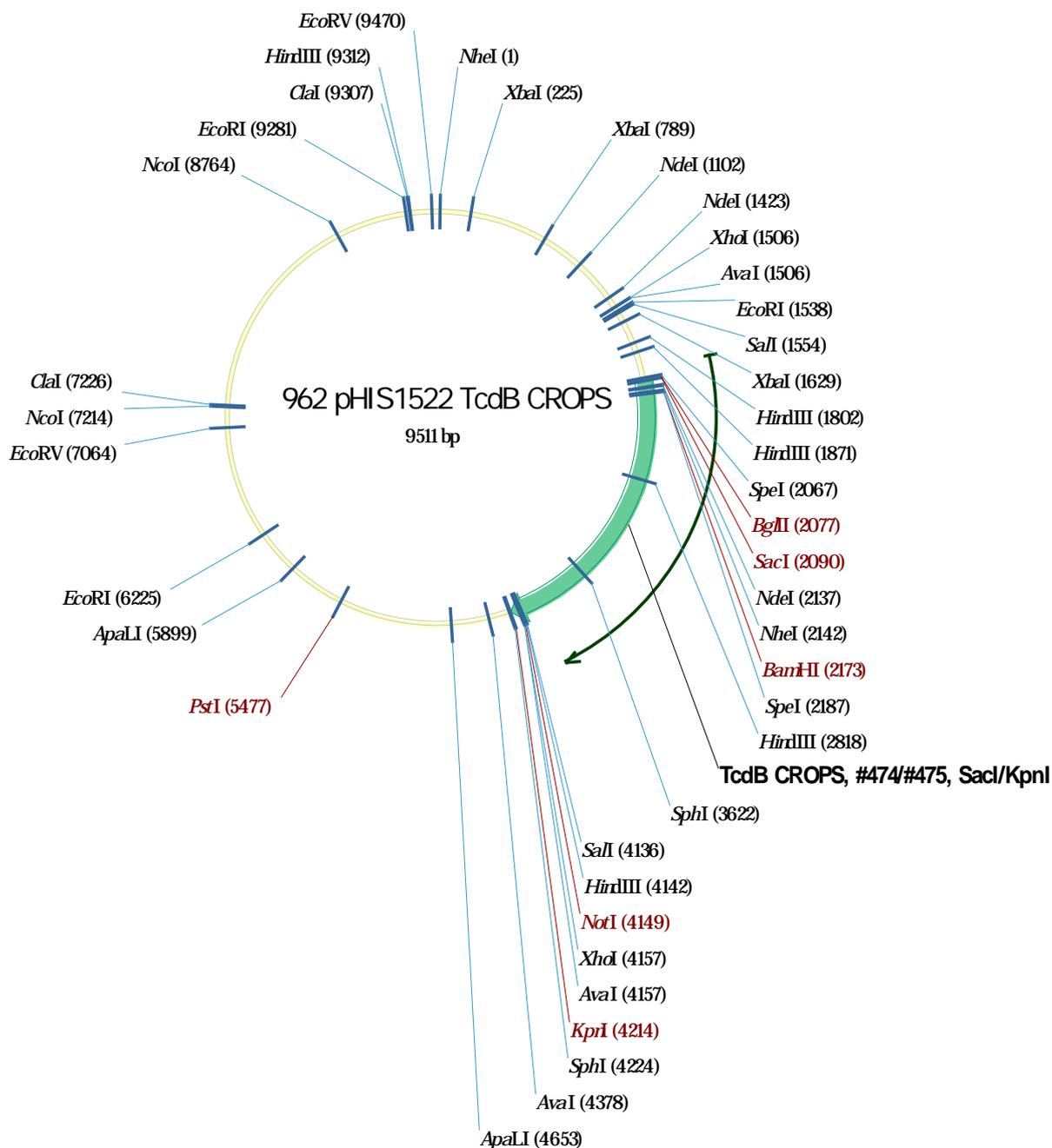


Рисунок 47 — Схема плазмиды, содержащей кодирующую нуклеотидную последовательность фрагмента CROPS TcdB и предназначенной для трансформации грамположительных микроорганизмов.

Полученной генетической конструкцией были трансформированы бактериальные клетки *B. megaterium* WH320. Далее проводилось накопление бактериальной массы, выделение рекомбинантного белка и его очистка методом аффинной хроматографии. Полученный препарат использовали для проведения иммунизации альпака (*Vicugna pacos*), любезно предоставленного

фермой "Российские Альпаки" (Юридический адрес: Московская обл., Дмитровский р-н, с/п Габовское, д. Левково, д. 1).

Иммунизацию альпаки проводили три раза с интервалом 14 дней между первой и второй иммунизацией и 10 дней между 2,3,4 и 5 инъекцией. Оценку специфического иммунного ответа оценивали методом ИФА титра антител в сыворотке крови альпака, связывающихся с CROPs доменом токсина *B. C. difficile*. По результатам проведенного анализа титр антител после третьей иммунизации составил 1:218,700. (рисунок 48).

Мононуклеарные клетки из периферической крови иммунизированного животного были использованы для получения библиотеки VNN и последующего проведения селекции методом фагового дисплея.



Рисунок 48 — Результаты ИФА, характеризующие наличие целевых антиген-специфических антител в сыворотке животного до и после иммунизации CROPs доменом токсина *B. C. difficile*

### 3.2.4.2. Проведение селекции и отбор клонов VHH, специфически связывающихся с CROPs доменом токсина В *C. difficile*

Для получения панели однодоменных антител к CROPs домене токсина В *C. difficile* была сконструирована библиотека нуклеотидных последовательностей VHH фрагментов неканонических антител альпака после иммунизации рекомбинантным белком CROPS в составе фагмидного вектора рНЕН1. После трансформации компетентных клеток *E.coli* была получена фагмидная библиотека размером  $7 \cdot 10^6$  клонов. Для отбора специфических антител были проведены 3 раунда селекции методом фагового дисплея. Эффективность проводимой селекции оценивали методом поликлонального Фаг-ИФА (рисунок 49А), с последующей оценкой специфической активности индивидуальных фаговых клонов (рисунок 49Б).

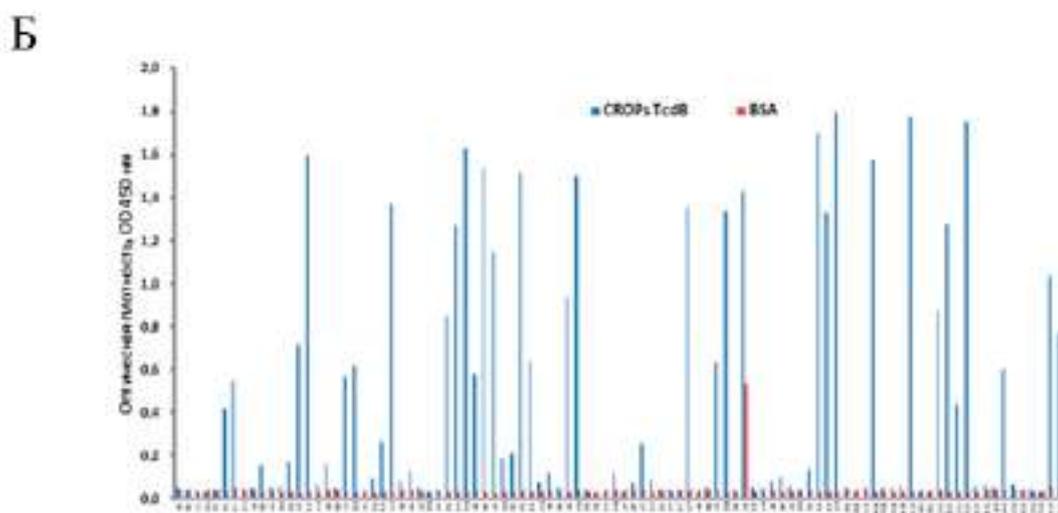
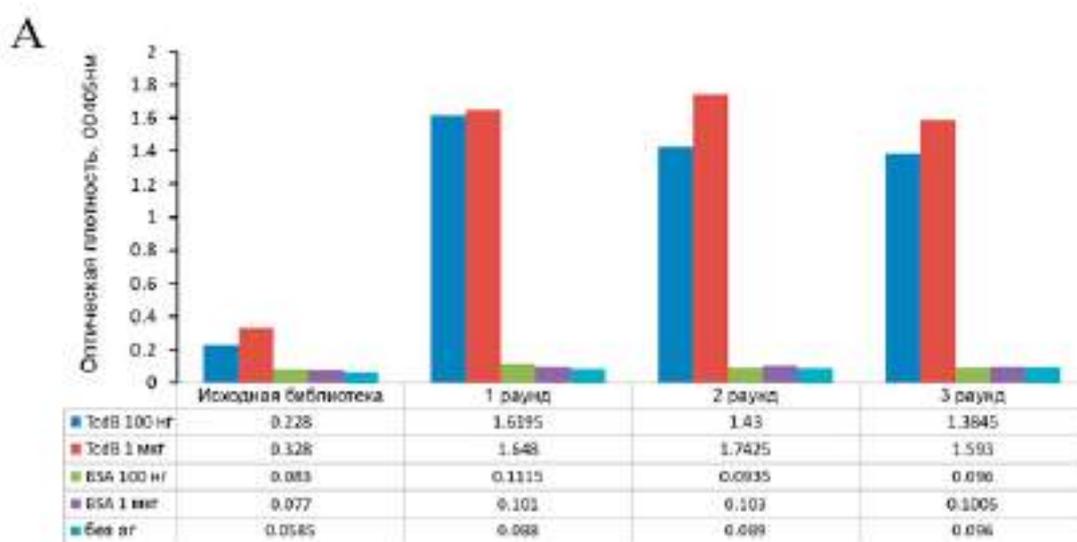


Рисунок 49. А – анализ специфической активности библиотек фагов до и после проведенных раундов селекции; Б – репрезентативный результат анализ специфической активности индивидуальных фаговых клонов, несущих на поверхности молекулы VHH после 1 раунда селекции.

В результате проведения селекции были получены библиотеки фагов, обогащенных специфическими к CROPS TcdB клонами. Фагмидная библиотека после второго раунда селекции была подвергнута секвенированию с целью определения нуклеотидной последовательности специфических однодоменных антител. Анализ сиквенсов нуклеотидных последовательностей VHH, а также удельная активность индивидуальных клонов VHH методом ИФА позволили отобрать 9 клонов однодоменных антител, имеющих уникальную структуру CDR 1,2 и 3 регионов, ответственных за связывание с антигеном (рисунок 50А), а также обладающих высоким сродством к CROPs домену токсина *B. C. Difficile* (рисунок 50Б).

А

№ п./п.	Клоны антител	Cdr1	Cdr2	Cdr3
1	A3 (2)	ERTISPY	IRSIGGT	AA SLLGTDYTQPKRYA
2	C7 (2)	GSIFSN	ITSDGN	NAGRKITMSTATGLA
3	H9 (1)	GVTY	ISSSGN	AARLSHWWSRPSEHY
4	F11 (1)	GSIFGN	ITGGN	VVLDNRNDNPI
5	F10 (2)	GSIFGNP	ITSDDN	NPPYRNNRPY
6	F1 (1)	GSIFGNN	ITSGDN	DYPDQGGYPI
7	D10 (1)	GLRFSNYA	ISWGGGS	AARLVPSGRDRTSYK
8	C11(1)	GSIFSSNT	ITSGGS	NGVQVVTSRSGTTVVVPG
9	D6 (1)	DSIFGNH	ITNGGN	NVADRNGNAI

Б

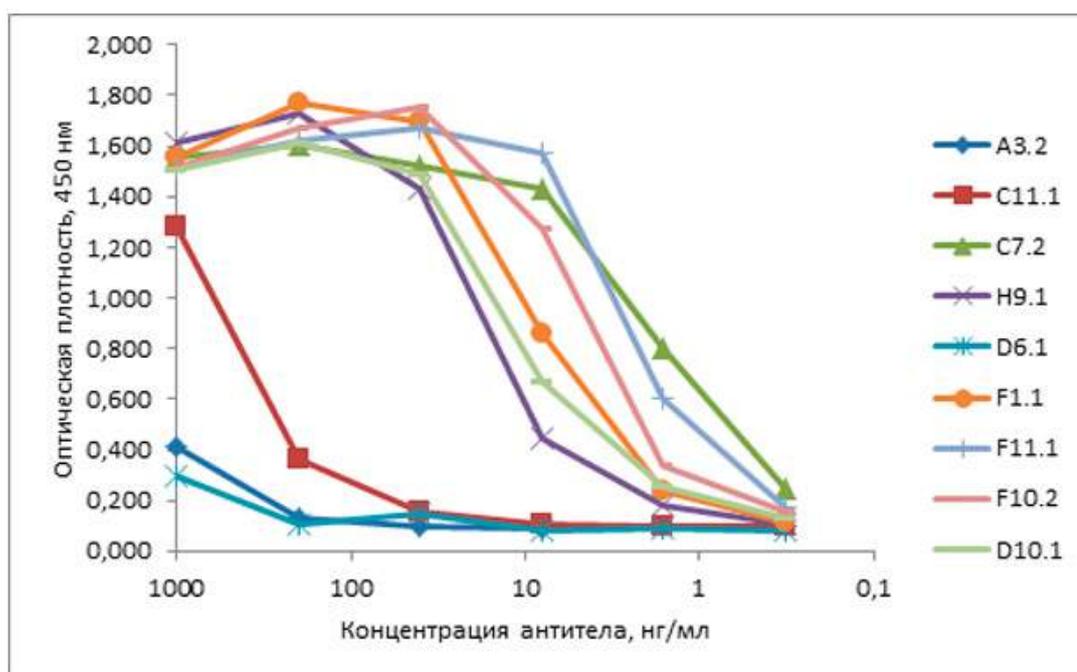


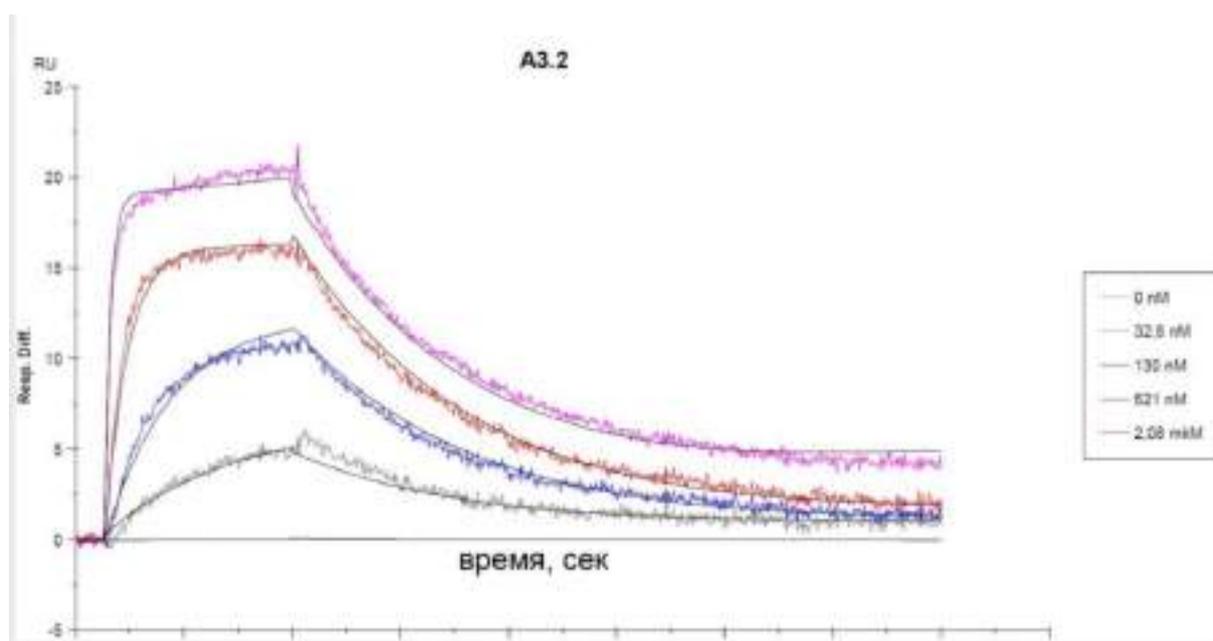
Рисунок 50. А – аминокислотные последовательности CDR регионов однодоменных антител; Б- оценка специфической активности отобранных клонов в отношении CROPS домена токсина TcdB методом ИФА.

Способность отобранных клонов антител связываться с полноразмерным рекомбинантным токсином TcdB *S.difficile* оценивали иммуноблотингом с последующей оценкой в ПААГ. Дополнительно, отобранные клоны антител были охарактеризованы по их аффинности к токсину *S.difficile* методом плазмонного резонанса. Для этого применялся прибор Biacore 3000 (GE Healthcare, Швеция), на поверхность чипа CM5 иммобилизовали токсин TcdB

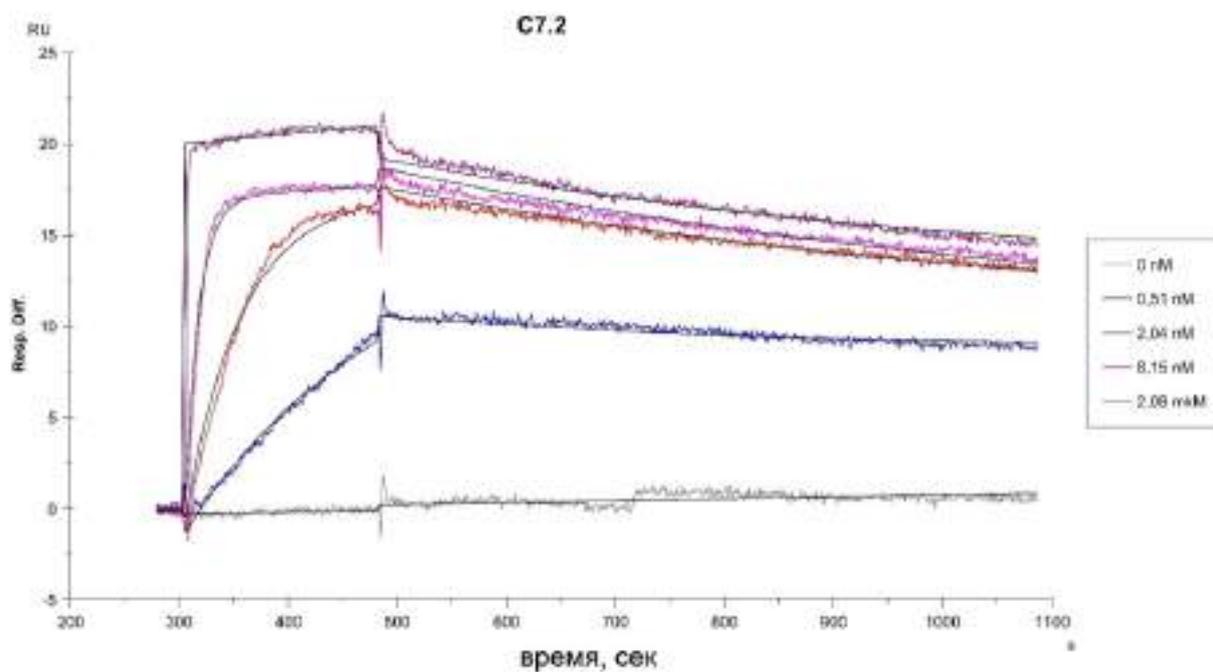
*C. difficile*, а белковые препараты отобранных клонов однодоменных антител использовали в качестве антител.

На рисунках 51А-И отображены сенсограммы реакций образования комплексов антигена TcdV *C. difficile* с соответствующими клонами однодоменных антител.

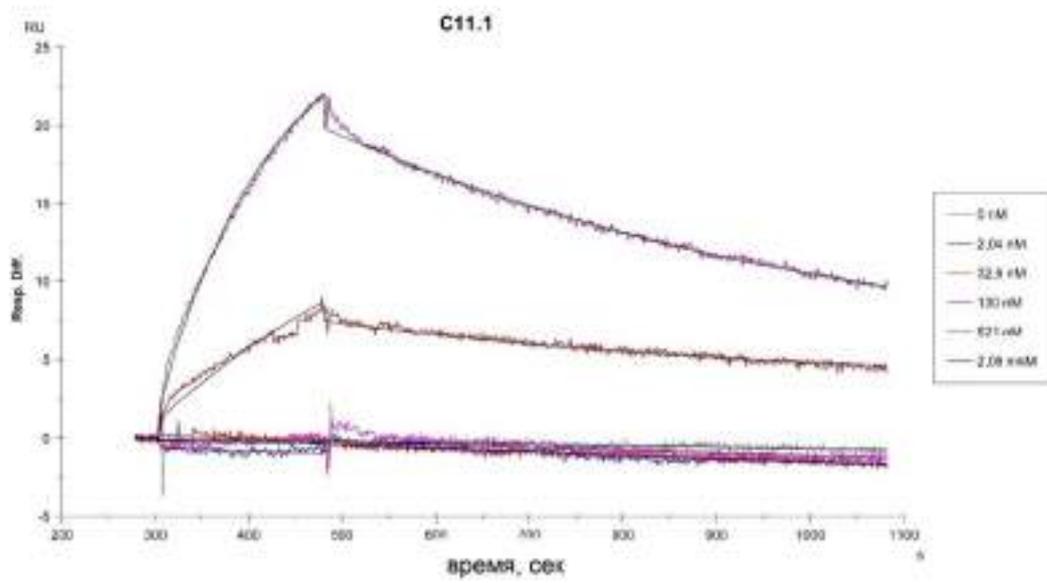
А



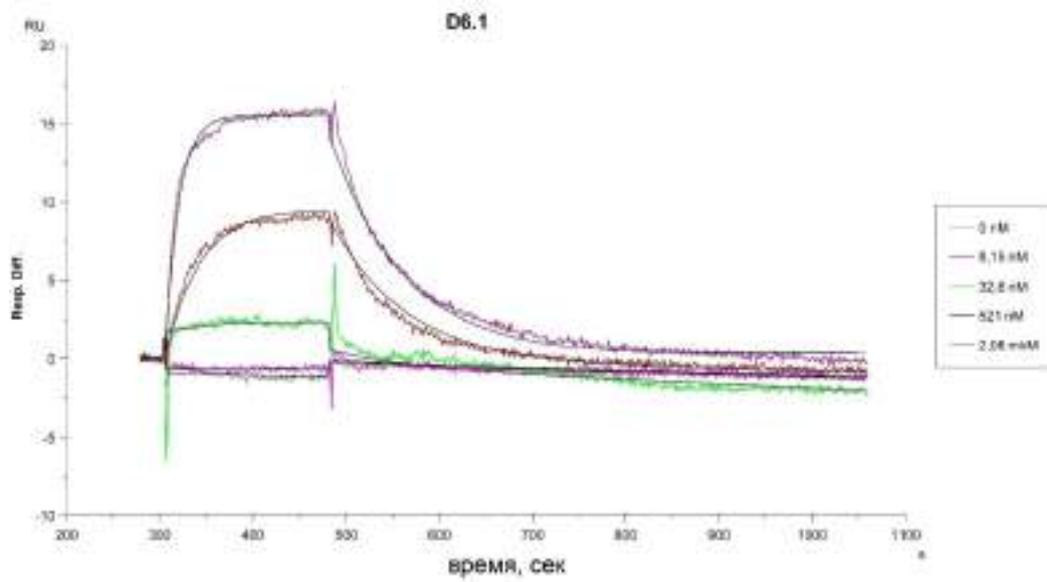
Б



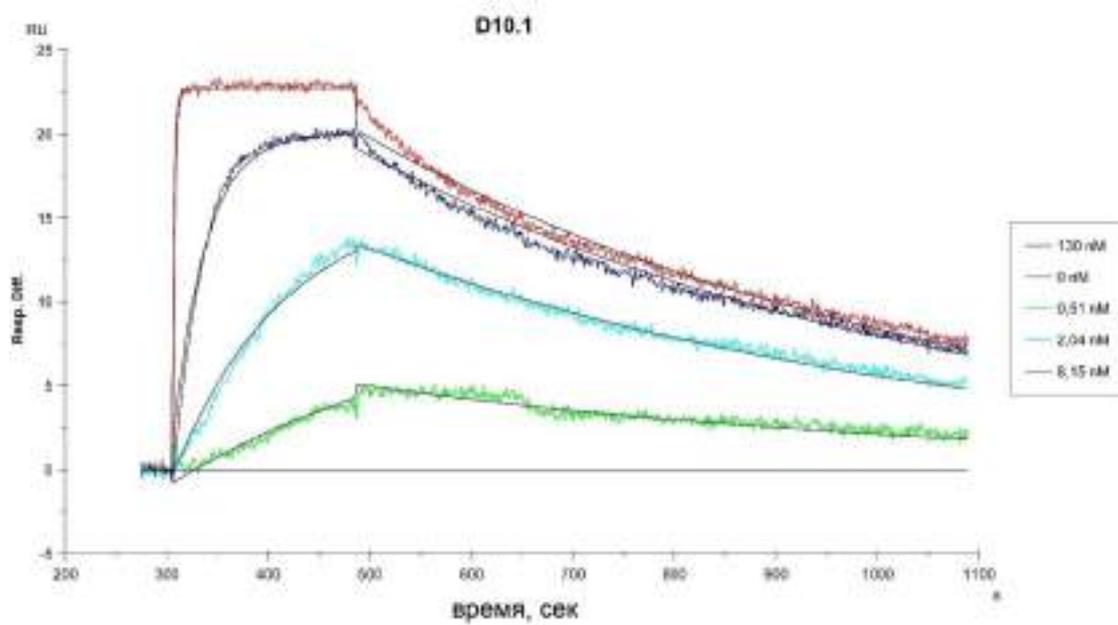
В



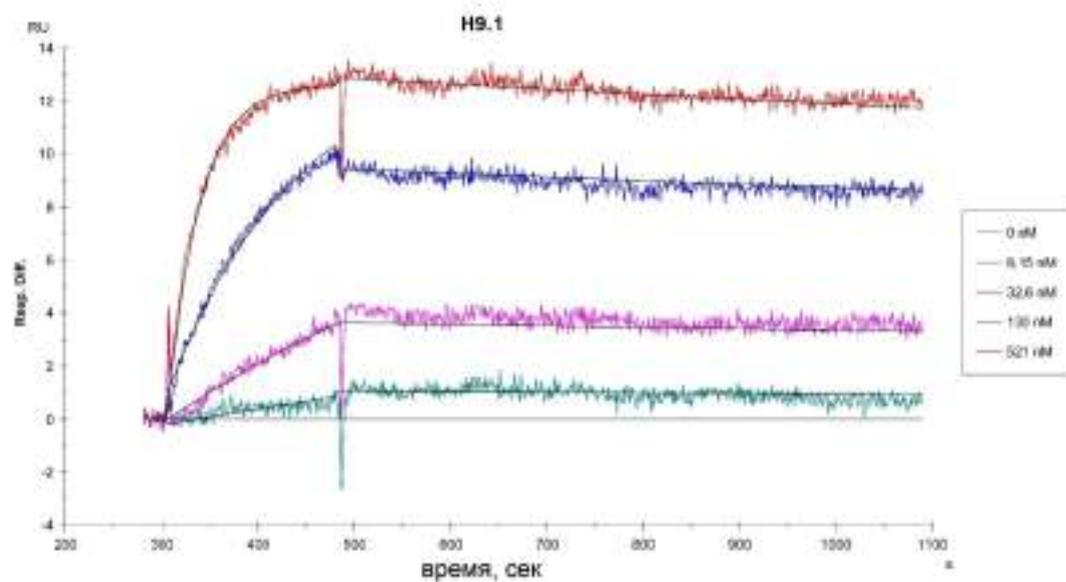
Г



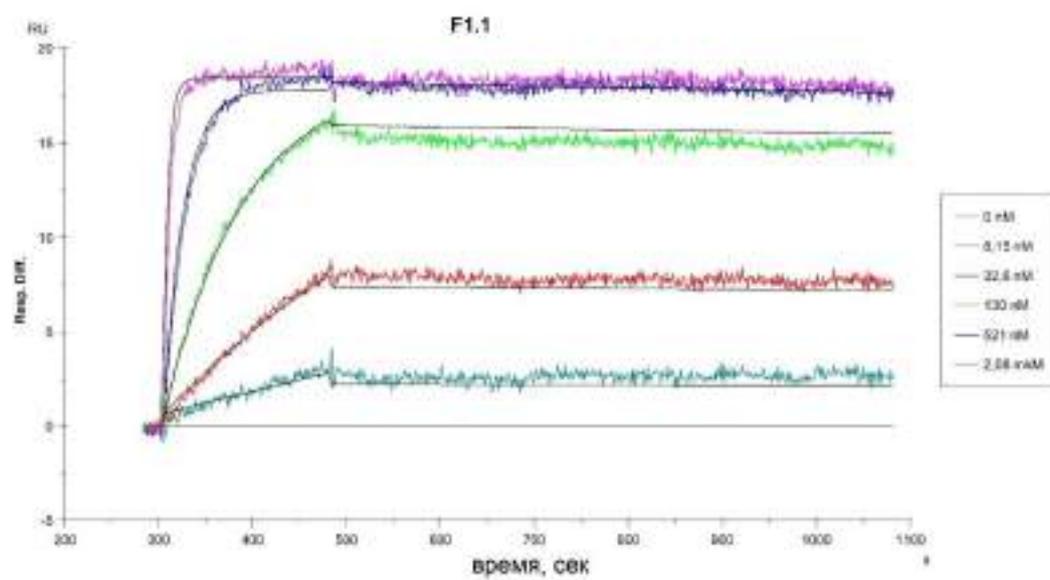
Д



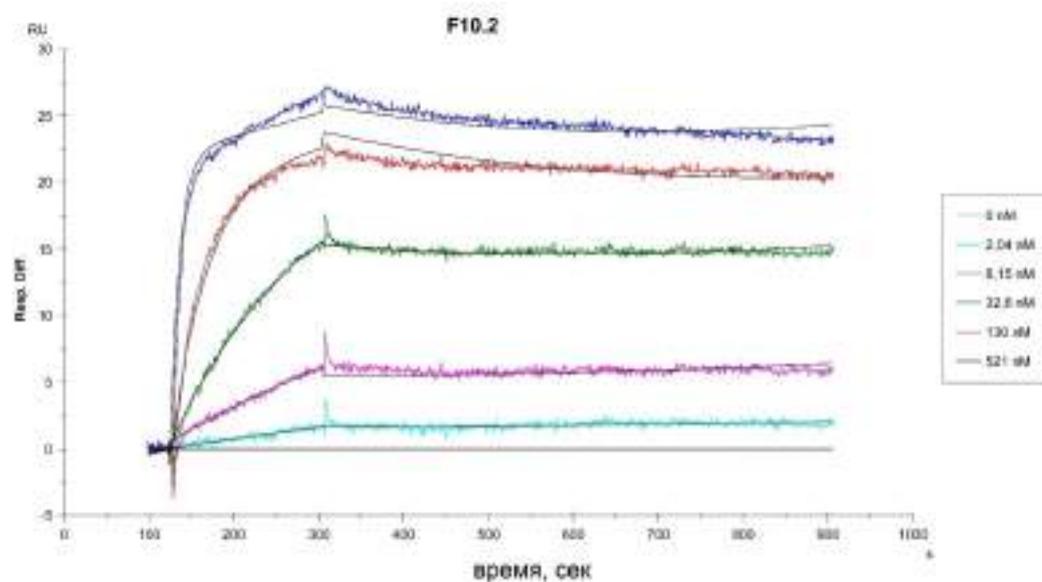
Е



Ж



З



И

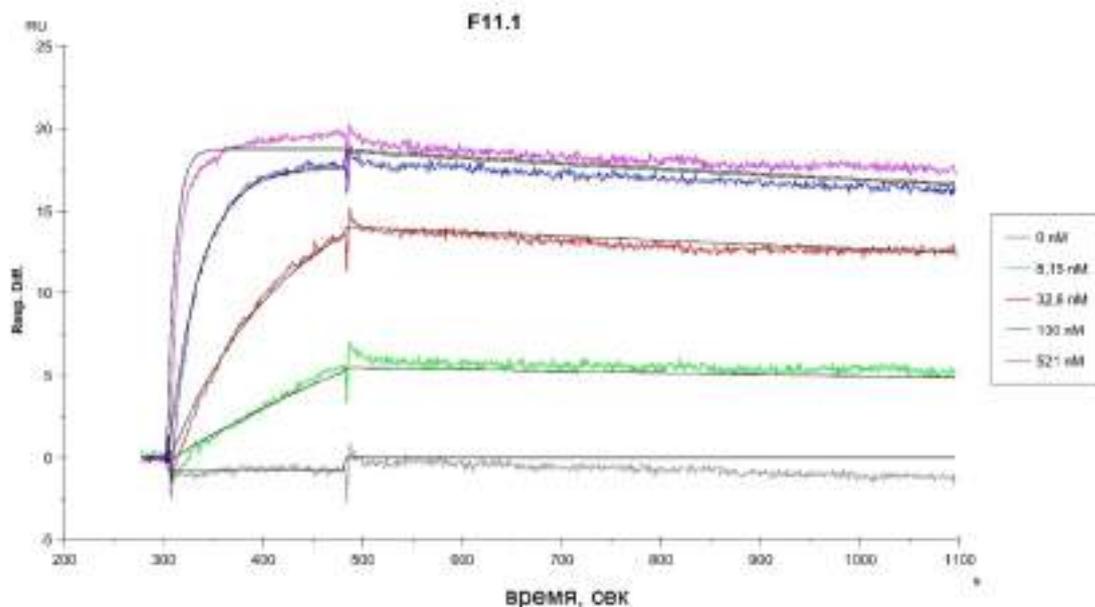


Рисунок 51 — А-И сенсограммы реакций образования комплекса однодоменных антитела и TcdB *C. Difficile*, полученные методом плазмонного резонанса По оси Y отображен уровень сигнала детектируемый прибором в относительных единицах. По оси X отложено время. Концентрация антигена была фиксирована Концентрации антитела указаны на рисунке с индикацией цвета кривой.

Полученные характеристики выбранных девяти клонов однодоменных антител представлены в таблице 24.

**Таблица 24 – Константы скорости ассоциации ( $K_a$ ) и диссоциации ( $K_d$ ), максимальная связывающая способность анализатора ( $R_{max}$ ), константа равновесной ассоциации ( $K_A$ ), константа равновесной диссоциации ( $K_D$ ) и распределение ( $\chi^2$ ) связывания однодоменных антител с TcdB *C. difficile* измеренные методом плазмонного резонанса**

Клон	$K_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$R_{max}$ (RU)	$K_A$ (1/M)	$K_D$ (M)	$\chi^2$
A3.2	$8.4 \cdot 10^4$	$5.91 \cdot 10^{-3}$	18.8	$1.42 \cdot 10^7$	$7.03 \cdot 10^{-8}$	0.145
C7.2	$9.46 \cdot 10^6$	$9.44 \cdot 10^{-4}$	18.2	$1 \cdot 10^{10}$	$9.96 \cdot 10^{-10}$	0.111
C11.1	$3.34 \cdot 10^3$	$1.52 \cdot 10^{-3}$	30.5	$2.2 \cdot 10^6$	$4.54 \cdot 10^{-7}$	0.071

D6.1	$2.76 \cdot 10^4$	0.0125	17.2	$2.21 \cdot 10^6$	$4.52 \cdot 10^{-7}$	0.0879
D10.1	$3.71 \cdot 10^6$	$1.71 \cdot 10^{-3}$	20.3	$2.17 \cdot 10^9$	$4.6 \cdot 10^{-10}$	0.169
F1.1	$9.04 \cdot 10^4$	$4.73 \cdot 10^{-5}$	18.2	$1.91 \cdot 10^9$	$5.22 \cdot 10^{-9}$	0.203
F10.2	$1.73 \cdot 10^5$	$1.3 \cdot 10^{-3}$	22.9	$1.33 \cdot 10^8$	$7.52 \cdot 10^{-10}$	0.201
F11.1	$2.43 \cdot 10^5$	$1.89 \cdot 10^{-4}$	18.8	$1.28 \cdot 10^9$	$7.78 \cdot 10^{-10}$	0.291
H9.1	$5.79 \cdot 10^4$	$1.54 \cdot 10^{-4}$	13	$3.75 \cdot 10^8$	$2.66 \cdot 10^{-8}$	0.0625

Согласно полученным результатам, ряд клонов однодоменных антител имеют константу диссоциации (C7.2, D10.1, F1.1, F11.1, F10.2, H9.1) находящуюся в нМ диапазоне. Полученный результат свидетельствует о том, что однодоменные антитела обладают высокой аффинностью в отношении целевого антигена.

### 3.2.4.3 Изучение нейтрализующей активности наиболее аффинных однодоменных антител в отношении токсина *V. C. difficile*

Важнейшей характеристикой антител, определяющей их терапевтический потенциал, помимо их общей способности распознавать антиген в ИФА, является способность нейтрализовать действие токсина. Нейтрализующую активность отобранных клонов однодоменных антител определяли *in vitro*, используя культуру клеток линии VERO E6.

Клетки были посеяны в лунки 96-ти луночного планшета в концентрации  $10^4$  клеток/лунку. На следующий день к клеткам добавляли токсин TcdB (в концентрации 250нг/мл) предварительно смешанный с белковыми препаратами однодоменных антител в стандартной концентрации 100нг/мл. В качестве положительно контроля использовали токсин TcdB без добавления однодоменных антител. В качестве отрицательного контроля использовали интактные клетки. Учет токсигенной активности проводили методом микроскопии через 24 часа после добавления токсина к клеткам. Микрофотографии клеток после обработки представлены на рисунке 52.

Из представленных данных видно, что действие токсина TcdV *C. difficile* приводит к выраженному токсическому эффекту. В поле зрения отсутствуют жизнеспособные клетки, имеют округлую форму, слабо прикреплены к поверхности планшета, отсутствуют делящиеся клетки. В результате исследования было установлено, что клоны D6.1, A3.2, C7.2 показали наибольшую нейтрализующую активность в отношении TcdV *C.difficile*, выраженную в снижении числа нежизнеспособных клеток. Указанные клоны однодоменных антител были отобраны для проведения дальнейших модификаций с целью усиления их нейтрализующих свойств.

Модификация трех отобранных клонов включала получение гомодимеров и гетеродимеров антител (рисунок 53). Каждый димер был разделен 15-аминокислотным линкером (Gly4Ser)<sub>3</sub> и содержал His6 участок для проведения очистки белковых молекул методом металлоаффинной хроматографии.

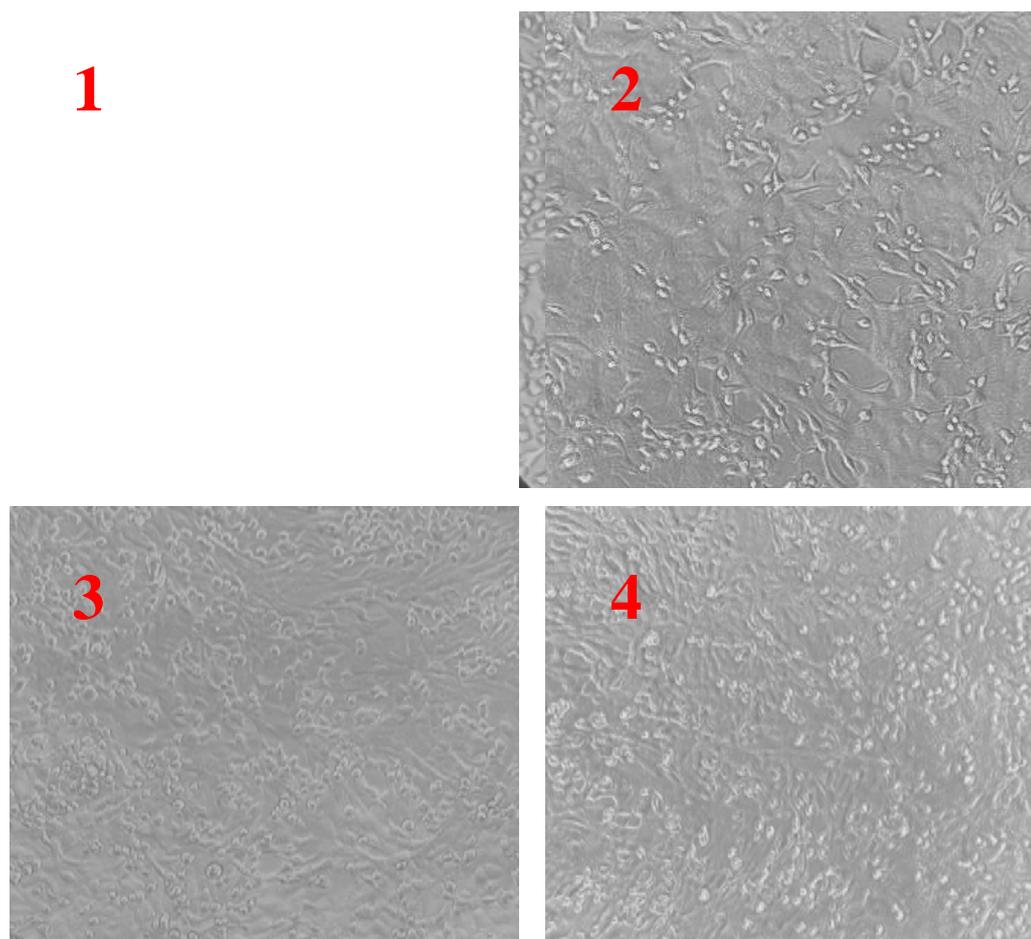


Рисунок 52. Анализ нейтрализующей активности однодоменных антител в отношении токсина *C.difficile*. 1 - положительный контроль (токсин без

предварительного смешивания с однодоменными антителами); 2-4 – При добавлении смеси TcdB+VНН D6.1, C7.2 и A3.2, соответственно. Наблюдается от 20% (2) до 60% (4) округление клеток, что свидетельствует о наличии нейтрализующей активности у отобранных клонов однодоменных антител.

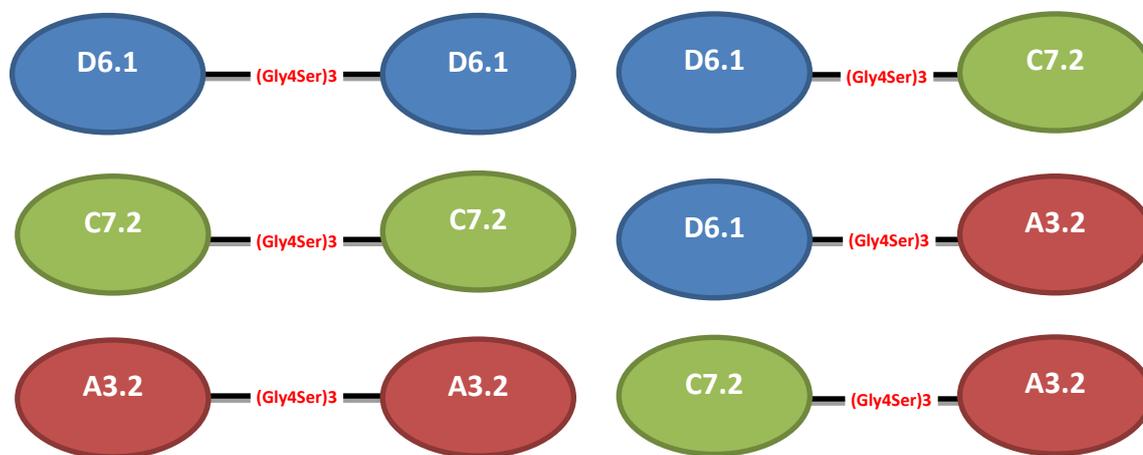


Рисунок 53. Схематическое изображение полученных модифицированных молекул однодоменных антител

Очищенные препараты гомодимеров и гетеродимеров антител были использованы для проведения оценки токсин нейтрализующей способности на культуре клеток Vero.

Антитела разводили в среде DMEM с 10% инактивированной FBS до концентрации 10  $\mu\text{g/ml}$ , смешивали с токсином В с концентрацией 1  $\text{ng/ml}$  и инкубировали 1 час в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37<sup>0</sup>С. Затем вносили по 50 мкл в лунки 96-луночного планшета, концентрация клеток Vero составляла  $3 \times 10^4$  в лунке. Визуальный учет результатов производили через 48 часов по жизнеспособности клеток. Результат тестирования представлен на рисунке 54.

Таким образом, была получена иммунная библиотека путем иммунизации животных семейства Camelidae нетоксичным производным токсина В *S. difficile*. Произведен отбор однодоменных антител, специфично распознающих антиген, методом фагового дисплея и исследована нейтрализующая активность отобранных клонов антител на культуре клеток *in vitro*. Для клонов, показавших наибольшую нейтрализующую активность, проведена модификация, позволившая значительно улучшить терапевтический потенциал

отобранных молекул. Максимальная активность наблюдалась у гомодимеров C7.2 и A3.2, гетеродимера A3.2-C7.2. Полученные результаты могут быть использованы для создания средства терапии инфекции, вызванной *C. difficile*.

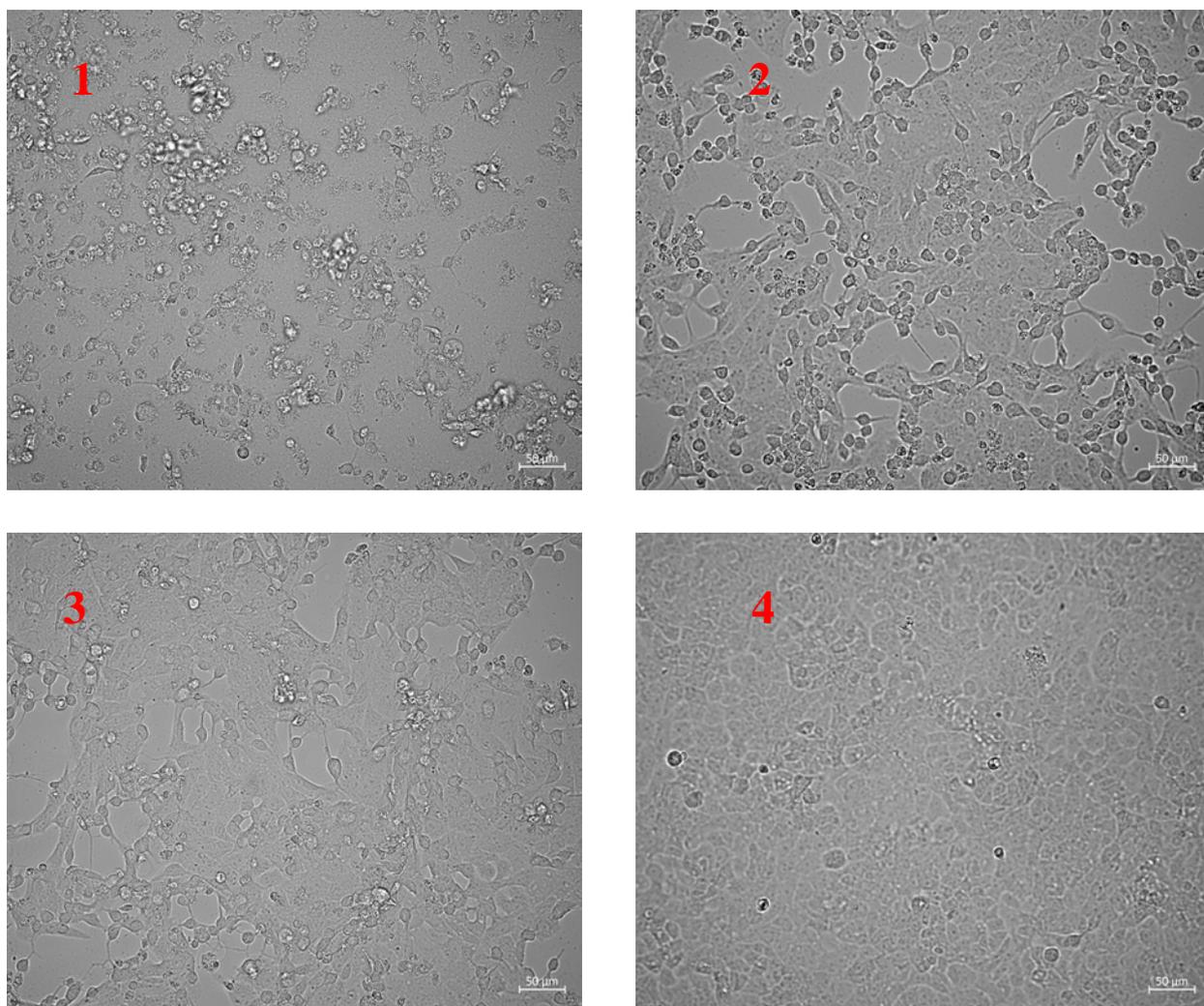


Рисунок 54. Анализ нейтрализующей активности модифицированных однодоменных антител в отношении токсина *C. difficile*. 1 - положительный контроль (токсин без предварительного смешивания с однодоменными антителами); 2 - Смесь TcdB с гомодимером A3.2-A3.2; 3 - Смесь TcdB с гомодимером C7.2-C7.2; 4 - контрольные клетки Vero E6.

### **3.3 Получение молекул на основе неканонических однодоменных антител и их модификаций для обнаружения и идентификации патогенных микроорганизмов**

Как было описано в литературном обзоре, в настоящее время проводятся исследования возможности применения однодоменных антител как для терапии

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

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

Для оценки возможности использования однодоменных антител для детекции патогенных микроорганизмов и/или их антигенов были получены антитела, специфически связывающиеся с поверхностным антигеном *M.hominis*. Для получения VHH-фрагментов неканонических антител верблюда, которые специфически взаимодействуют с поверхностными белками *Mycoplasma hominis*, был использован подход, основанный на технологии селекции фрагментов антител методом фагового дисплея.

Работа по получению иммунной библиотеки и селекции выполнялись совместно с С.В.Тиллибом на базе лаборатории НИИ Биологии Гена РАН, а затем технология была воспроизведена в лаборатории Иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» МЗ РФ. Основные теоретические положения и практические результаты исследования в этой части были описаны в диссертационной работе Бурмистровой Д.А., которая была выполнена под руководством Щеблякова Д.В.

В качестве антигенного материала для иммунизации была использована фракция липид-ассоциированных мембранных белков (ЛАМБ) *M. hominis*, полученных путем разделения гидрофильных и гидрофобных фаз в детергенте

Тритон Х-114. Выделение проводили из бактериальной культуры лабораторного штамма *M. hominis* Н-34 с титром не менее  $10^7$  КОЕ/мл. Культура, используемая для выделения ЛАМБ, была предварительно охарактеризована на предмет видовой принадлежности бактерий методом ПЦР с использованием как видоспецифических так и родоспецифических праймеров (производитель «Синтол») (рисунок 55).

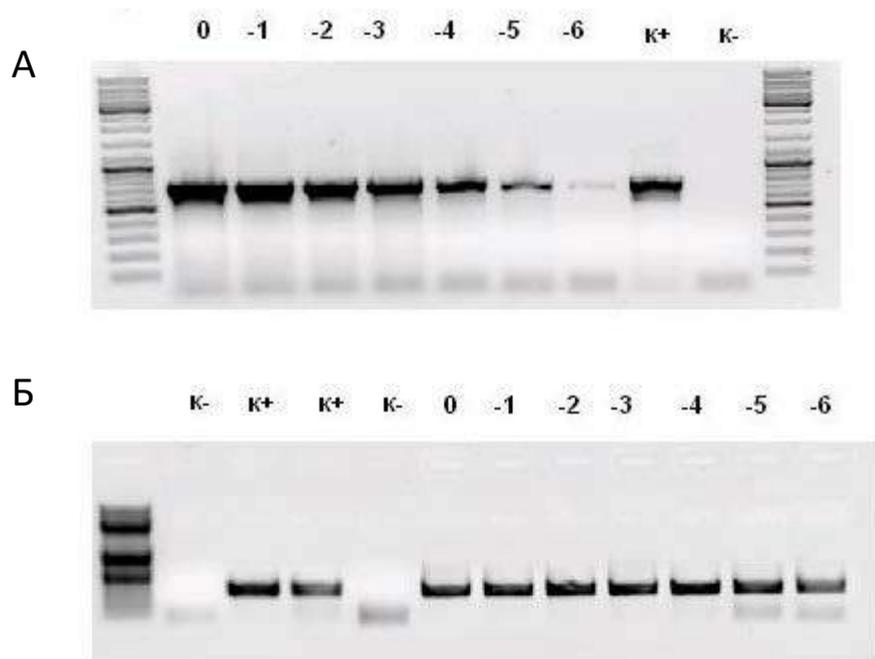


Рисунок 55. Электрофореграмма результатов ПЦР, демонстрирующая видовую принадлежность бактериальной культуры, из которой проводилось выделение антигенов для иммунизации. 0-6 – пробы ДНК, выделенные из серийных 10-кратных разведении бактериальной культуры (от 10 КОЕ до  $10^6$  КОЕ на ПЦР-реакцию), маркер молекулярного веса ДНК, K+ - положительный контроль выделения и ПЦР, K- отрицательный контроль выделения и ПЦР. А - амплификацию проводили с использованием праймеров MGSO/GPO, Б – амплификацию проводили с использованием коммерческого набора.

Метод выделения фракции ЛАМБ описан в разделе 2.2.1.1 Методы. Анализ белковой фракции ЛАМБ, выделенных из *M. hominis*, проводилась путем электрофореза в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле, с

последующим окрашиванием белков красителем EZblue (электрофореграмма ЛАМБ представлена на рисунке 56). Концентрация белков была определена методом Брэдфорда. Полученный препарат ЛАМБ был использован для иммунизации двугорбвого верблюда согласно описанной ране схеме иммунизации.

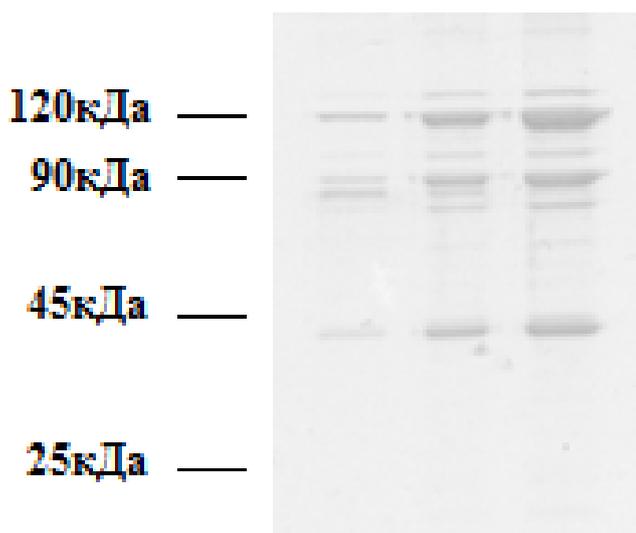


Рисунок 56. Фракция липид ассоциированных мембранных белков *M. hominis* Н-34. Три дорожки соответствуют различным концентрациям вносимого в гель образца- 2,5 мкг, 5 мкг и 10 мкг белка соответственно.

Для первой иммунизации использовали полный адьюван Фройнда, для 2-5 иммунизации использовали неполный адьюван Фройнда, спешанный с препаратом ЛАМБ в соотношении 1:1. Иммунизация верблюда проводилась подкожно согласно схеме, включающей 5 последовательных подкожных инъекций антигенного материала.

Все последующие этапы фагового дисплея на основе бактериофага M13, такие как: получение библиотек VHH-кодирующих последовательностей в фагмидном векторе, получение бактериофагов с экспонированными на головке вирусных частиц VHH, последовательные циклы селекции и скрининг

полученных клонов, проводились согласно описанному в соответствующем разделе протоколу (раздел 2.2.2, 2.2.3, 2.2.4.).

После последней иммунизации спустя 5 дней из периферической крови путем центрифугирования в градиенте Histopaque 1077 были выделены мононуклеарные клетки, в том числе В-лимфоциты. Выделенные клетки использовались для экстракции тотальной РНК методом тризольной экстракции. Количество и качество выделенной РНК оценивали с помощью прибора Nanodrop2000 (соотношение A260/A280 ~ 1.8-2.0 и A260/A230 2.0-2.2). Качество выделенной РНК оценивалось по наличию на электрофореграмме фрагментов, соответствующих 16S и 28S рибосомальной РНК (рисунок 57).

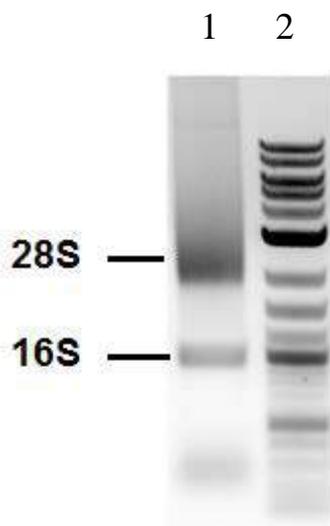


Рисунок 57. Электрофореграмма тотальной РНК (1), выделенной из мононуклеарных клеток иммунизированного животного. Наличие явных специфических полос 16S и 28S рибосомальной РНК свидетельствует о целостности выделенной тотальной РНК. 2 – маркер молекулярного веса фрагментов НК.

Выделенную РНК использовали в качестве матрицы в реакции обратной транскрипции с oligo-dT праймером для получения кДНК. Обратную транскрипцию проводили с использованием обратной транскриптазы SuperscriptIII, характеризующейся термостабильностью и отсутствием РНК-Н активностью, что позволяет использовать ее для получения кДНК библиотек.

На следующем этапе на матрице кДНК с помощью специфических праймеров методом ПЦР амплифицировали последовательности тяжелых цепей иммуноглобулинов класса G. Используемые праймеры позволяют в процессе ПЦР амплифицировать как тяжелые цепи канонических антител, так и неканонических, отличающихся друг от друга размером ПЦР-продукта (900 и 600 п.о. соответственно). Анализ ПЦР продуктов и их разделение было выполнено методом электрофореза в 1,5% агарозном геле. (рисунок 58А). ПЦР-продукт, соответствующий неканоническим антителам (около 600 п.о.), был элюирован из геля и использован в качестве матрицы для второго раунда ПЦР (ПЦР II). В последовательность праймеров для второго раунда ПЦР были внесены сайты рестрикции эндонуклеаз NcoI и NotI, необходимые для дальнейшего клонирования ПЦР фрагментов, содержащих нуклеотидную последовательность неканонических антител, в фагмидный вектор (рисунок 58Б).

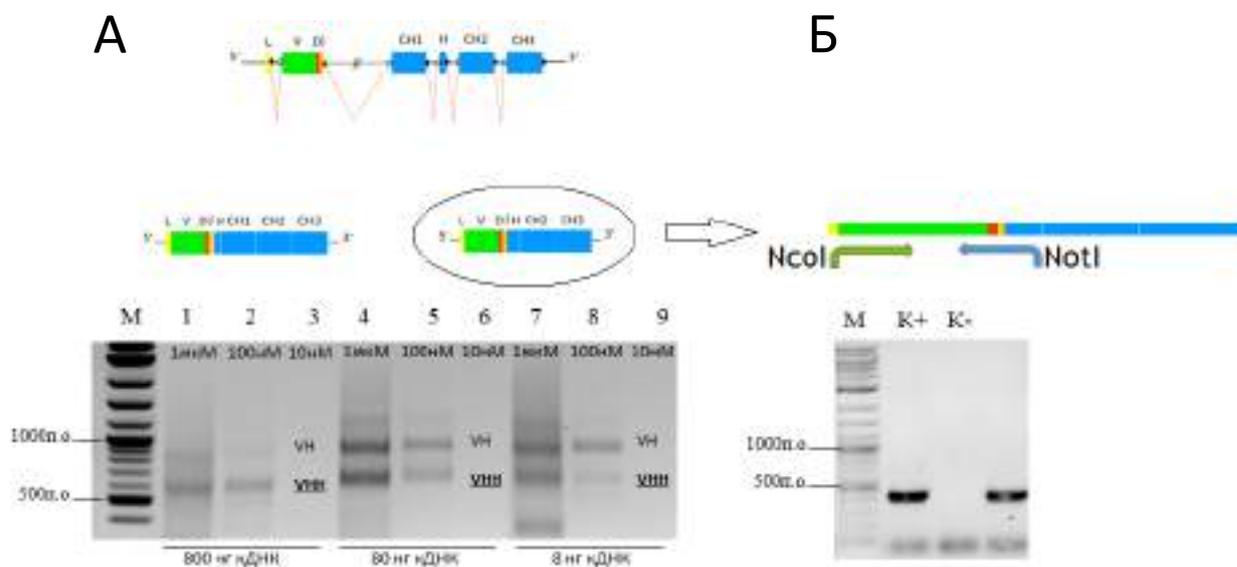


Рисунок 58. Амплификация последовательностей V<sub>H</sub>N. На рисунке А изображены варианты сплайсинга тяжелых цепей иммуноглобулинов класса G у верблюдовых, демонстрирующие возможность образования мРНК, кодирующую неканонические иммуноглобулины, не содержащие легких цепей. Показана электрофореграмма ПЦР продуктов, полученных с использованием двух вариантов мРНК в качестве матрицы: фрагмент V<sub>H</sub> (~900 п.о.)

соответствует ампликонам тяжелых цепей канонических антител и более короткие фрагменты V<sub>H</sub>H (~600 п.о.) соответствуют укороченным цепям неканонических антител. Б - электрофореграмма продуктов амплификации (~420 п.о.) после второго раунда ПЦР. М – маркер молекулярного веса ДНК, К- - отрицательный контроль ПЦР, К+ - положительный контроль ПЦР.

Полученный ПЦР-продукт был клонирован в фагмидный вектор pHEN и трансформирован методом электропорации в компетентные клетки E.coli штамма TG1. Указанный штамм может быть использован для продукции нитчатых бактериофагов, так как является F<sup>+</sup> (то есть на поверхности бактериальной клетки образуются F-пили). При этом, благодаря наличию Amber стоп-кодона, в последовательности, кодирующей V<sub>H</sub>H-rIII фьюжн, этот штамм E.coli можно использовать для продукции однодоменных антител, слитых с белком rIII бактериофага M13 и сборки рекомбинантных фаговых частиц.

Для оценки качества библиотеки 50 отобранных клонов были проанализированы методом ПЦР на наличие целевой вставки, соответствующей V<sub>H</sub>H. В результате анализа было показано, что 46 из 50 клонов содержали целевую вставку (рисунок 59). Таким образом, целевые клоны составили 92% от полученной библиотеки. В результате выполнения данного этапа исследования была получена библиотека, содержащая  $5 \cdot 10^6$  индивидуальных клонов. Полученная библиотека клонов была использована для получения библиотеки фаговых частиц, несущих на своей поверхности белок rIII слитый с однодоменными антителами. В качестве фага-помощника в данном исследовании использовали бактериофаг M13KO7.

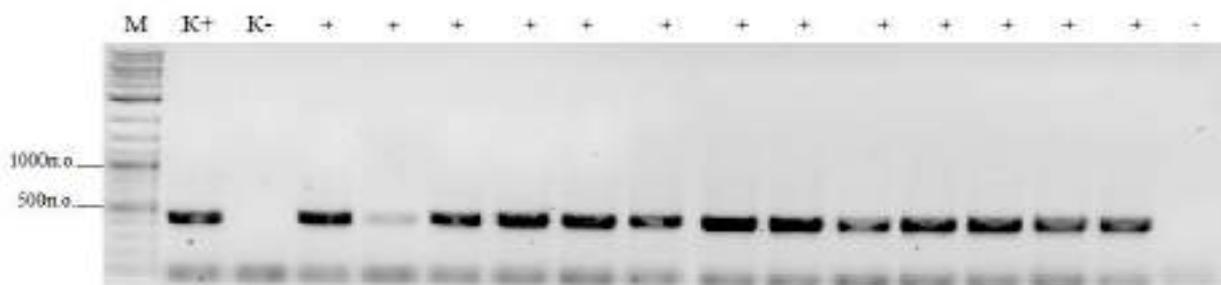


Рисунок 59. Контроль присутствия целевой вставки последовательностей VNN для оценки качества библиотеки. Электрофореграмма ампликонов последовательностей, клонированных в фагмидный вектор. М – маркер молекулярного веса ДНК, К- - отрицательный контроль ПЦР, К+ - положительный контроль ПЦР, + - положительные результаты ПЦР, - - отрицательные.

Селекцию специфических рекомбинантных бактериофагов методом фагового дисплея проводили с использованием фракции ЛАМБ в качестве мишени. ЛАМБ сорбировали на полистироловых иммунологических планшетах (1 мкг на лунку 96-луночного планшета). Последовательно было проведено 3 раунда селекции, для блокирования неспецифически связывающихся фаговых частиц использовали чередование блокирующих агентов – БСА и обезжиренного молока. Для исключения ложно положительных результатов скрининг клонов проводился 3 способами:

- 1) ИФА-скрининг клонов с использованием индивидуальных рекомбинантных бактериофагов;
- 2) ИФА-скрининг клонов с использованием белковых препаратов VNN, продуцируемых индивидуальными клонами;
- 3) Секвенирование нуклеотидных последовательностей, кодирующих VNN специфически связывающихся с ЛАМБ.

В результате проведения селекции и последующего отбора был выбран 1 клон (VNN06), показавший положительные результаты во всех вариантах ИФА и который, по данным секвенирования оказался встречающимся в библиотеке,

прошедшей селекцию. Аминокислотная последовательность VHH06 представлена на рисунке 60. На нуклеотидной последовательности указаны участки, соответствующие CDR–регионам, а также выделены аминокислотные остатки характерные для VHH.



Рисунок 60. Нуклеотидная и аминокислотная последовательность VHH06. Рамкой выделены последовательности гипервариабельных петель (CDR 1, 2 и 3 последовательно).

Для проведения оценки функциональной активности VHH06 был получен очищенный белковый препарат. Для этого, фагида рНЕН, содержащая специфическую последовательность VHH, была трансформирована методом теплового шока в клетки *E.coli* штамма VL-21. Полученные клоны-трансформанты были использованы для приготовления ночной культуры бактерий, которую использовали для наращивания бактериальной массы и индукции экспрессии белкового продукта VHH. Фракции растворимых белков бактериальных культур, отобранных на разных этапах культивирования, использовались для анализа экспрессии методом электрофореза и вестерн-блот гибридизации (рисунок 61).

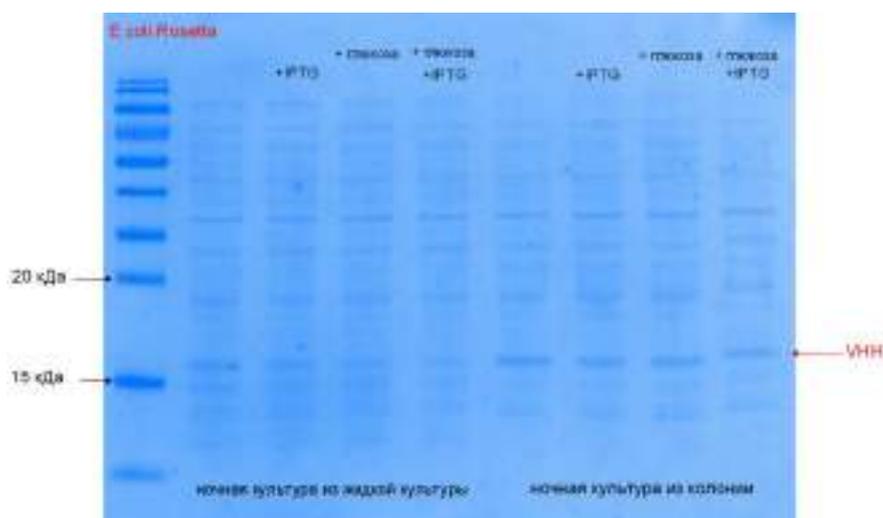


Рисунок 61. Анализ экспрессии однодоменного антитела VНН06 в клетках *E.coli* BL-21. Электрофореграмма фракции растворимых белков. Первые 4 образца соответствуют пробам, полученным с использованием ночной культуры, приготовленной из жидкого образца бактерий, хранящегося в замороженном виде; последующие 4 образца соответствуют пробам, полученным с использованием ночной культуры, приготовленной из «свежей» колонии *E.coli* штамма Rosetta; + глюкоза – пробы, полученные из бактериальной массы, которая культивировалась на среде с добавлением 2% глюкозы до оптической плотности  $OD_{600}=0,6$ ; +IPTG - пробы, полученные из бактериальной массы, к которой при достижении  $OD_{600}=0,6$ , добавляли IPTG (конечная концентрация в среде – 0,3 мкМ).

Таким образом, было установлено, что экспрессия VНН наблюдается при конститутивной активности *Lac* промотора в клетках *E.coli* BL-21. При этом добавление глюкозы на начальных этапах наращивания бактериальной массы никак не влияет на эффективность экспрессии растворимой формы VНН. Кроме того, было установлено, что наибольшая экспрессия однодоменного антитела наблюдалась при использовании ночной культуры, полученной из колонии.

Для дальнейших исследований, белковый препарат VНН был очищен из растворимой фракции белкового лизата клеток *E.coli* BL-21, методом аффинной

хроматографии с использованием сорбента на основе Ni-агарозы (рисунок 62). Для проведения металл-афинной хроматографии в нуклеотидную последовательность, кодирующую ген однодоменного антитела VHH06 была добавлена последовательность кодирующая 6 гистидинов (His<sub>6</sub> тэг).

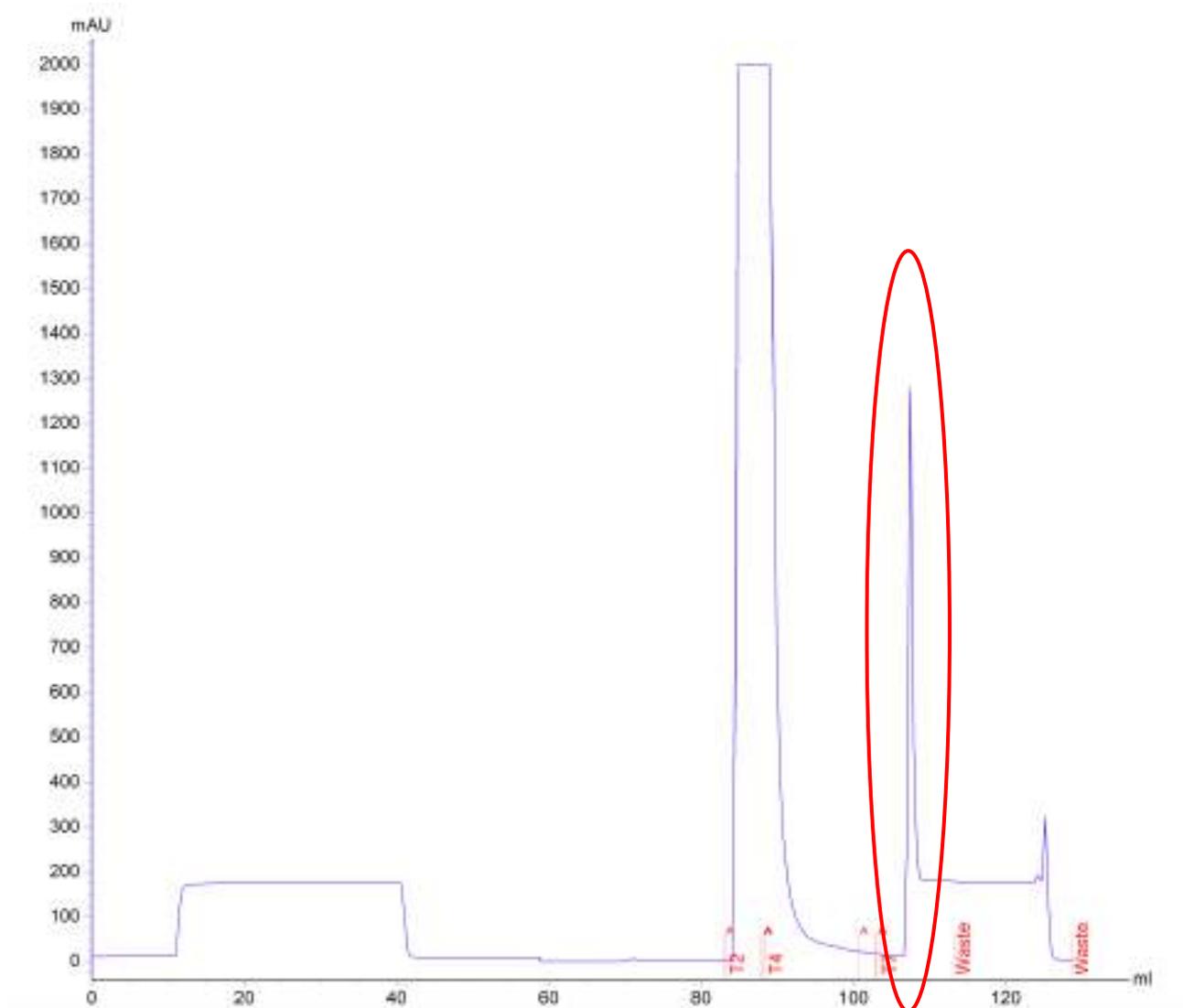


Рисунок 62. Очистка белкового препарата VHH06 методом Ni-афинной хроматографии. Хроматограмма очистки VHH. T2-T4 – ввод в систему лизата растворимых белков *E.coli* BL-21, T7 – ввод в систему элюирующего раствора. Пик между 105 и 110 мл соответствует очищенной фракции белка.

Электрофореграмма фракций, отобранный на разных этапах проведения очистки, представлена на рисунке 63.

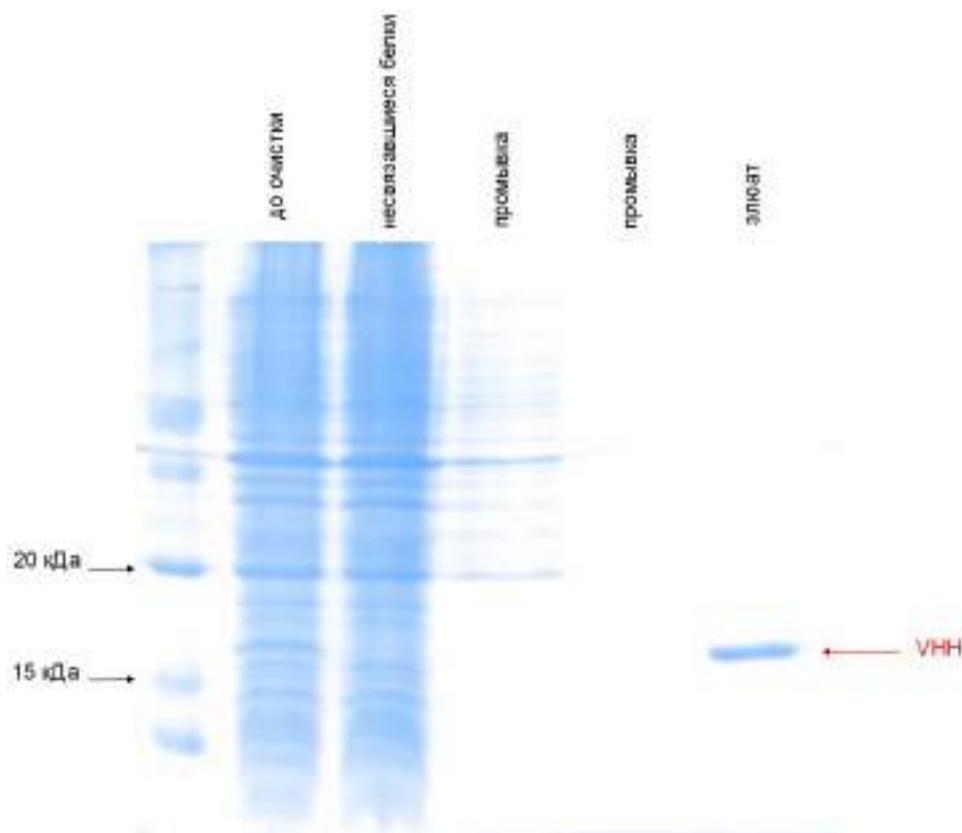


Рисунок 63. Очистка белкового препарата VHN06 методом Ni-аффинной хроматографии. Электрофореграмма различных фракций: лизат растворимых белков до очистки («до очистки»), проскок, промывка и элюат.

В результате выполнения данного этапа работы был получен очищенный белковый препарат VHN06, который методом диализа с использованием фильтра на 10 кДа был переведен в фосфатный буферный раствор. Для длительного хранения белкового препарата в раствор добавляли 40% глицери и хранили при  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Для удобства номенклатуры VHN06 было присвоено название aMh06 (от anti-M. hominisVHN06).

### 3.3.1.2 Идентификация мишени для антител aMh06

На следующем этапе исследования была проведена работа по идентификации мишени, специфической для отобранных антител. Для этого aMh06 были иммобилизованы на поверхности магнитных частиц.

Иммобилизацию осуществляли путем образования ковалентных амидных связей между активированным глутаровым альдегидом на поверхности магнитных частиц и N-концом белка aMh06. Магнитные частицы с иммобилизованными на поверхности антителами aMh06 использовали для иммунопреципитации антигена из раствора ЛАМБ. Наличие целевого антигена в преципитате определяли методом вестерн-блот гибридизации с антителами aMh06 (в качестве вторичных использовали антитела, связывающиеся с HA-tag). Схема идентификации антигена представлена на рисунке 64.

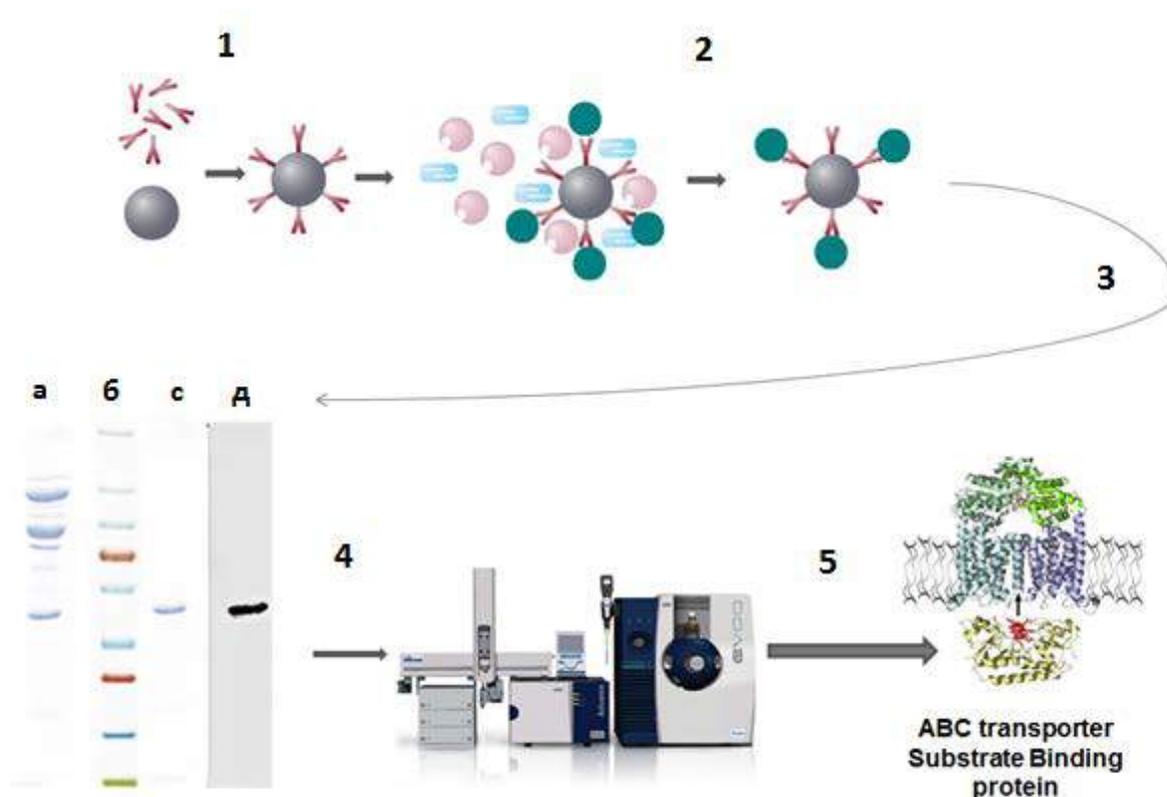


Рисунок 64. Схема идентификации антигена. Подробное описание представлено в тексте. 1-ковалентная иммобилизация aMh06 на поверхности магнитных частиц, 2- иммунопреципитация специфического антигена из раствора ЛАМБ, 3- фракционирование в полиакриламидном геле выделенного антигена, а – ЛАМБ, б – маркер молекулярного веса белков, с – преципитат, д – вестерн-блот гибридизация для подтверждения специфичности полученного белка, 4 – пробоподготовка для MALDI-MS, 5 – идентификация антигена.

Дальнейшая пробоподготовка и масс-спектрометрическая идентификация проводились Серебряковой М.В. в НИИ Физико-Химической биологии имени А.Н. Белозерского. Результаты MALDI-времяпролетной масс-спектрометрии показали, что полученный образец обогащен белком *M. hominis* «P37-like (*Mycoplasma hyorhina*) ABC transporter substrate-binding lipoprotein» (МНО\_3620). Таким образом, был идентифицирован специфическая мишень для аMh06 в составе ЛАМБ, который представляет собой субстрат-связывающий белок ABC-транспортера.

Биоинформационный поиск схожих последовательностей белков в базе данных NCBI с использованием алгоритма BLAST-P показал, что данный белок является гомологом ряда субстрат-связывающих белков микоплазм, входящих в состав ABC-транспортеров (рисунок 65).

Sequences producing significant alignments:

Select All None Selected 0

Alignments

Accession	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
U85026	ABC transporter substrate-binding lipoprotein ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	764	764	100%	0.0	100%	U85026.1
U85026	ABC transporter substrate-binding lipoprotein ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	760	760	100%	0.0	96%	U85026.1
U85026	ABC transporter substrate-binding lipoprotein ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	759	759	100%	0.0	98%	U85026.1
U85026	ABC transporter substrate-binding lipoprotein ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	757	757	100%	0.0	98%	U85026.1
U85026	ABC transporter substrate-binding lipoprotein ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	754	754	100%	0.0	98%	U85026.1
U85026	ABC transporter substrate-binding lipoprotein ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	359	359	96%	1e-117	48%	U85026.1
U85026	ABC transporter substrate-binding lipoprotein ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	348	348	94%	3e-113	48%	U85026.1
U85026	ABC transporter substrate-binding lipoprotein ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	320	320	91%	2e-102	48%	U85026.1
U85026	ABC transporter substrate-binding lipoprotein ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	320	320	91%	3e-102	48%	U85026.1
U85026	ABC transporter substrate-binding lipoprotein ( <i>Mycoplasma hominis</i> )	315	315	97%	2e-100	45%	U85026.1

Рисунок 65. Результаты поиска белков-гомологов МНО\_3620.

На момент проведения исследований в международных базах данных не имелось опубликованных экспериментальных данных, свидетельствующих о какой-либо определенной функции данного белка. Однако согласно базе данных **KEGG PATHWAY** (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) МНО\_3620 предположительно входит в состав субстрат-связывающего комплекса участвующего в транспорте фосфонатов.

### 3.3.1.3 Изучение диагностического потенциала препаратов на основе aMh06 для детекции *M. hominis*

Подтверждение функциональной активности очищенного белкового препарата *aMh06* и проверку специфичности его взаимодействия с антигенами *M. hominis* проводили методом твердофазного непрямого ИФА с сорбированными на поверхность иммунологического планшета ЛАМБ различными видами микоплазм. Результаты представлены на рисунке 66.

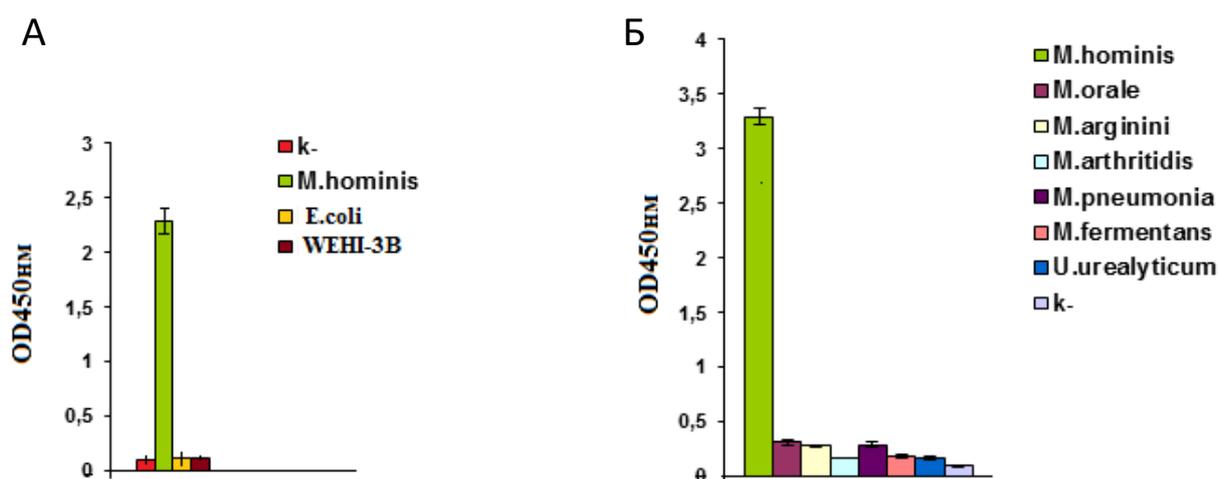


Рисунок 66. Оценка специфической активности антител aMh06. А – результаты ИФА с антигенами бактерий *M. hominis*, *E. coli* и антигенами эукариотической клеточной линии WENI-3B (использовали в качестве контроля). Б – результаты ИФА с ЛАМБ различных видов микоплазм. К- - отрицательный контроль (БСА).

В результате проведенных исследований было установлено, что aMh06 специфически взаимодействуют с антигенами *M. hominis* и при этом не взаимодействуют с эукариотическими антигенами, антигенами других бактерий и антигенами других видов микоплазм, в том числе близкородственного вида *M. arginini* (на основании выравнивания последовательности 16S РНК). Таким образом, нами была показана специфичность взаимодействия aMh06 с антигенами *M. hominis*.

Дополнительно, специфическая активность антител была оценена методом иммуноблоттинга с использованием ЛАМБ *hominis*. Результаты представлены на рисунке 67.

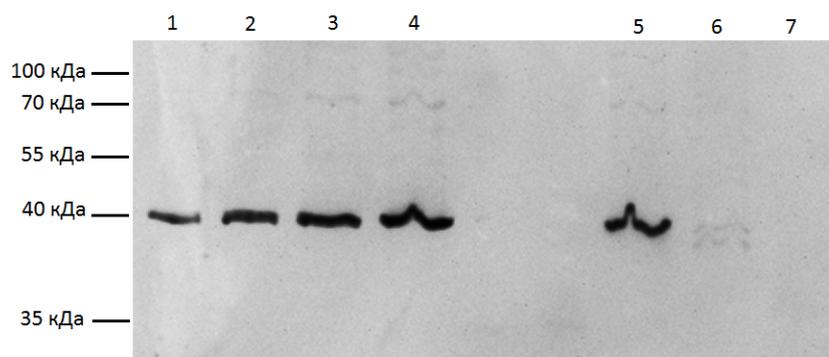


Рисунок 67. Вестерн-блот гибридизация различных белковых фракций *M. Hominis* Н-34 с аMh06, в качестве вторичных антител использовались антитела на HA-tag, конъюгированные с пероксидазой хрена. 1-4 - ЛАМБ (500 нг, 1 мкг, 2 мкг и 5 мкг на лунку), 5 – тотальный лизат клеток *M. hominis* (10 мкг на лунку), 6 – фракция водорастворимых белков (10 мкг на лунку), 7 - образец кондиционированной культуральной среды (10 мкг на лунку).

Из представленных данных видно, что аMh06 взаимодействует со специфическим антигеном ( $M_w \sim 40$ кДа). При этом, детектируемый антиген обнаруживается во фракции ЛАМБ, а также в тотальном лизате клеток микоплазмы, что подтверждает его локализацию в составе мембранных белковых комплексов *M. hominis*.

Для тестирования возможности применения препаратов на основе аMh06 для идентификации разных штаммов микоплазм принадлежащих к виду *M. hominis*, была проведена оценка специфичности связывания аMh06 с использованием клинических изолятов *M. hominis* (клинические изоляты были предоставлены Раковской И.В.). В том числе, в эксперименте был использован лизат «мини-форм» *M. hominis*, выращенных на агаризованной среде в виде «мини-колоний» [Levina и др., 2012]. Результаты вестерн-блот гибридизации представлены на рисунке 68. В результате анализа было установлено, что препараты на основе аMh06 могут быть использованы для идентификации

микоплазмы в клинических изолятах *M. hominis*, в том числе у мини-форм *M. hominis*.

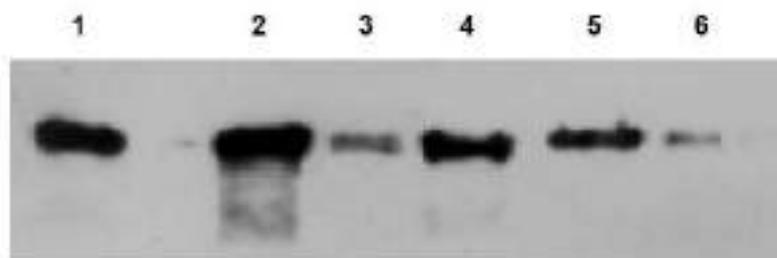


Рисунок 68. Взаимодействие aMh06 с ЛАМБ выделенных из различных клинических изолятов. Иммуноблоттинг лизатов клеток клинических изолятов (нагрузка по белку 10мкг на пробу). 1 – «мини-формы» *M. hominis*, 2-6 – различные клинические изоляты. В качестве вторичных антител использовали анти НА-tag, конъюгированные с пероксидазой хрена.

Дополнительно, была разработана тест-система для идентификации антигеном *M. hominis* методом иммуноферментного анализа. В работе была исследована возможность применения антител aMh06 в варианте сэндвич-ИФА. Для этого на поверхности лунок иммунологических планшетов иммобилизовали препарат aMh06, а для детекции связавшегося антигена (клеток *M. hominis*, присутствующих в биологическом материале) использовали препарат aMh06-Biotin, полученный с помощью биотинилирования белковых молекул aMh06. В качестве биологических образцов были использованы вагинальные смывы, полученные от мышей, предварительно (за 2 часа до забора образцов) инокулированных суспензией *M. hominis* Н-34 (количество КОЕ во вводимом мышам инокуляте составляло  $5 \cdot 10^5$ ). Данные ИФА представлены на рисунке 69.

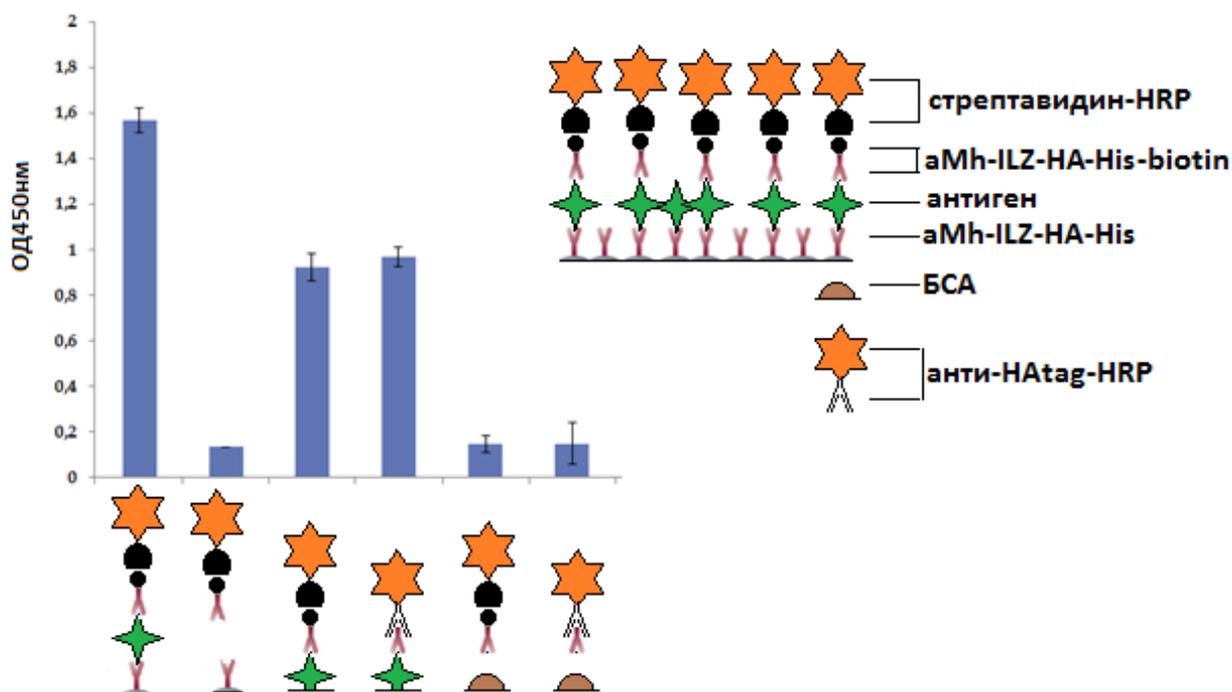


Рисунок 69. Прототип «сэндвич ИФА» тест-системы для определения наличия *M. hominis* в образцах вагинальных смывов. Инфографика представлена на рисунке.

Полученные результаты подтверждают применимость пары препаратов aMh06 и aMh06-Biotin для создания прототипа тест системы для детекции *M. hominis* в биологических образцах.

Одним из распространенных методов лабораторной микробиологической диагностики микоплазменной инфекции и видовой идентификации патогена является окраска отпечатков колоний микроорганизмов на стеклах с использованием поликлональной гипериммунной сыворотки (метод прямой иммунофлуоресценции - ПИФ). Использование моноклональных антител, которые можно нарабатывать в препаративных количествах, вместо иммунных поликлональных сывороток является актуальной задачей. Для проверки возможности использования aMh06 для этих целей было проведено окрашивание отпечатков колоний микоплазм на стеклах. Фотографии окрашенных отпечатков представлены на рисунке 70.

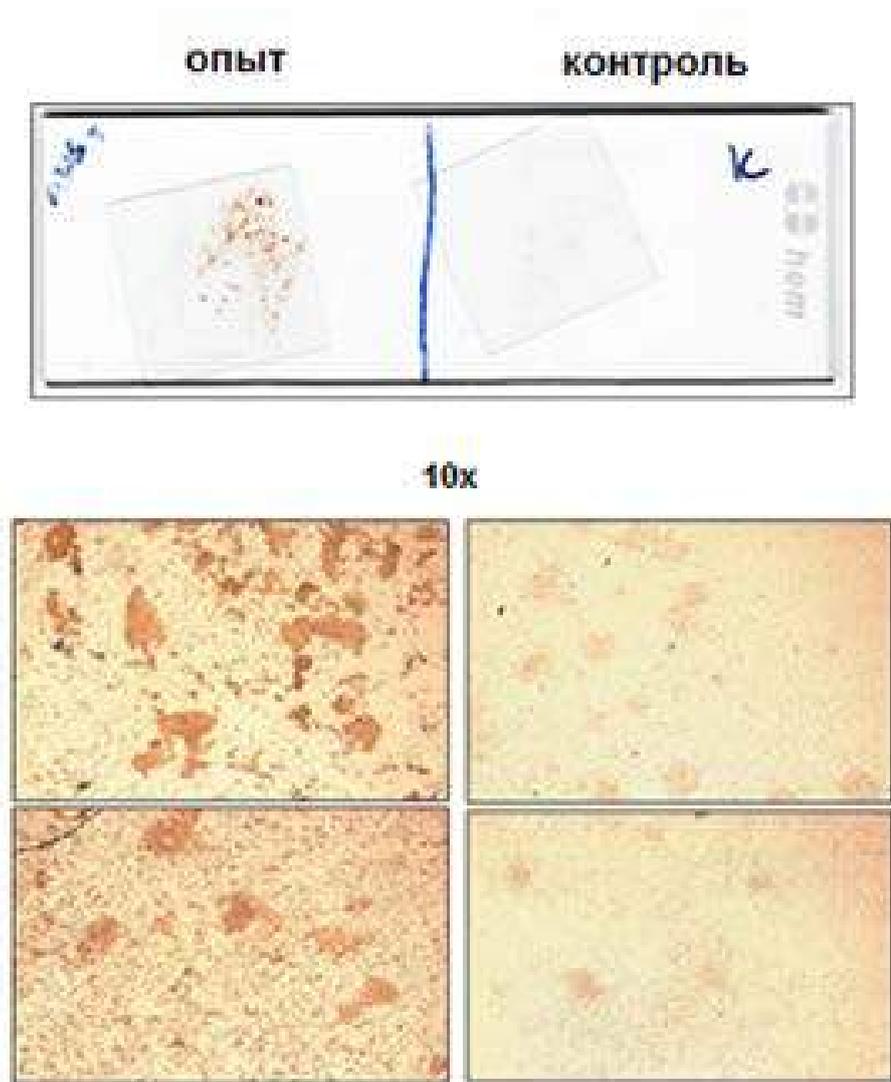


Рисунок 70. Окрашивание отпечатков колоний микоплазм на стеклах с использованием aMh06-His. В качестве вторичных антител использовали анти-НА-tag антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. В качестве субстрата – диаминобензидин (ДАБ). Опыт – целевое окрашивание отпечатка колоний, контроль – образец, без добавления aMh06-His. В верхней части рисунка представлен общий вид окрашенных отпечатков на стекле, ниже – увеличении 10х.

Проблема контаминации эукариотических клеточных культур, используемых для лабораторных исследований, а также на биотехнологических производствах, микоплазмами – одна из самых распространенных среди исследовательских лабораторий, работающих с культурами клеток млекопитающих. Поэтому актуальной задачей является быстрая оценка

наличия микоплазм в культуре эукариотических клеток. В данном исследовании антитела aMh06 были протестированы на способность идентифицировать *M. hominis* в зараженной культуре клеток A549, фиксированной 4% параформальдегидом методом иммуноцитохимического окрашивания. Результаты исследования представлены на рисунке 71А.

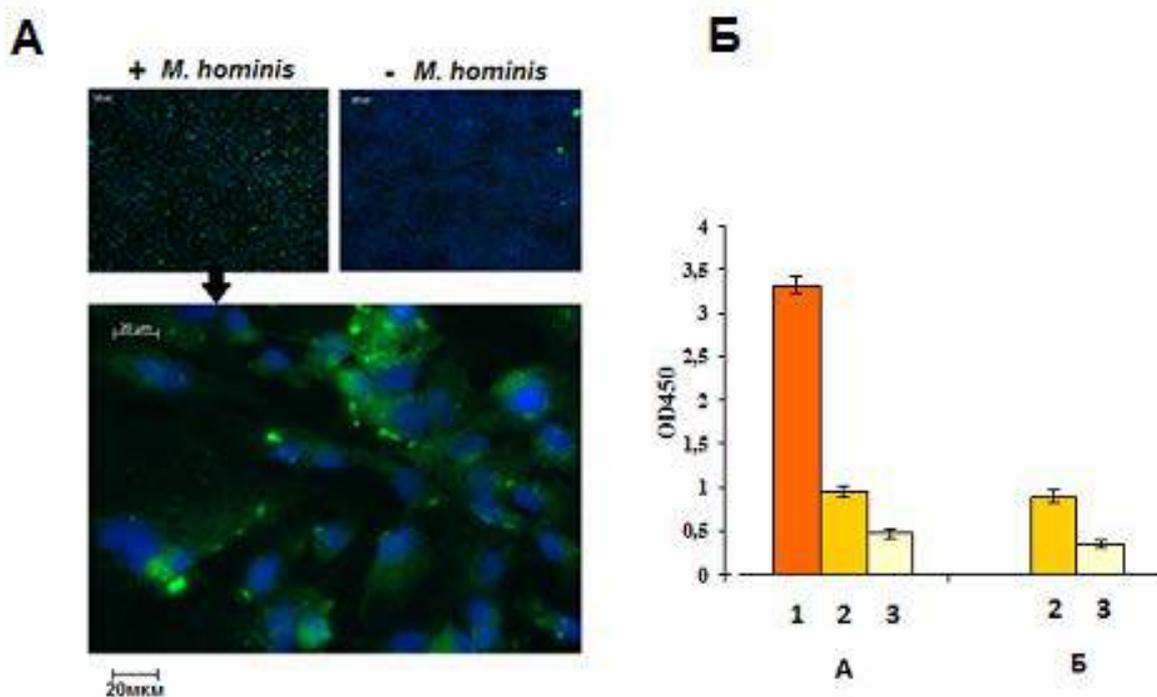


Рисунок 71. Детекция *M. hominis* в культуре эукариотических клеток. А – иммуноцитохимическое исследование зараженных клеток линии A549. Для окрашивания ДНК использовали краситель DAPI. Для окрашивания *M. hominis* использовали aMh06, меченные флуоресцентным белком FITC. Б – ИФА на зараженных клетках линии MCF7. А1 – зараженные клетки, А2 – интактные клетки, А3 – фон культуры клеток в реакции с субстратом, Б2 и Б3 – изотипические контроли.

Помимо прямой визуализации результатов с использованием микроскопа, была проведена аналогичный ИФА тест на зараженных микоплазмой *M. hominis* клетках с детекцией по изменению оптической плотности раствора. Результаты представлены на рисунке 71Б.

Внедрение новых методов для детекции инфекционных агентов или отдельных антигенов является актуальной задачей. К таким методам относится проточная цитофлуориметрия. В большинстве случаев проточная цитофлуориметрия применяется для клеточной дифференцировки, анализа уровня экспрессии рецепторных и внутриклеточных белков, а также концентрации цитокинов в сыворотке крови. В данном исследовании был проведен анализ возможности использования антител aMh06 для детекции клеток *M. hominis* методом проточной цитофлуориметрии. Для проверки возможности использования aMh06 для этих целей мы провели детекцию клеток *M. hominis* в суспензии методом проточной флуориметрии с использованием двухканальной детекции: флуоресценции с длиной волны 488нм для определения среди популяции частиц определенного размера клеток микроорганизмов (флуоресценция, испускаемая интеркалирующим в ДНК красителем SYBR-Green) и детекция флуоресценции с длиной волны испускания 525 нм для определения клеток *M. hominis* (aMh06-biotin и вторичный конъюгат streptavidin-PE). Диаграммы данных проточной флуориметрии представлены на рисунке 72.

Из представленных данных видно, что при окрашивании суспензии клеток *M. hominis* ДНК красителем SYBR-Green (рисунок 72 а-в FL1) и aMh06-biotin + streptavidin-PE (рисунок 72а FL2) наблюдается смещение пика флуоресценции по соответствующим каналам (в сравнении с интактными клетками). При этом инкубация *M. hominis* с aMh06-biotin без streptavidin-PE не приводит к подобному смещению пика флуоресценции, что свидетельствует о специфическом окрашивании *M. hominis*.

Таким образом, было показано, что препараты на основе aMh06 могут успешно применяться для создания диагностических тест-систем работающих на различных методологиях, таких как: ИФА, иммуноблоттинг, иммуноцитохимическое исследование, окрашивание отпечатков колоний, проточная цитофлуориметрия.

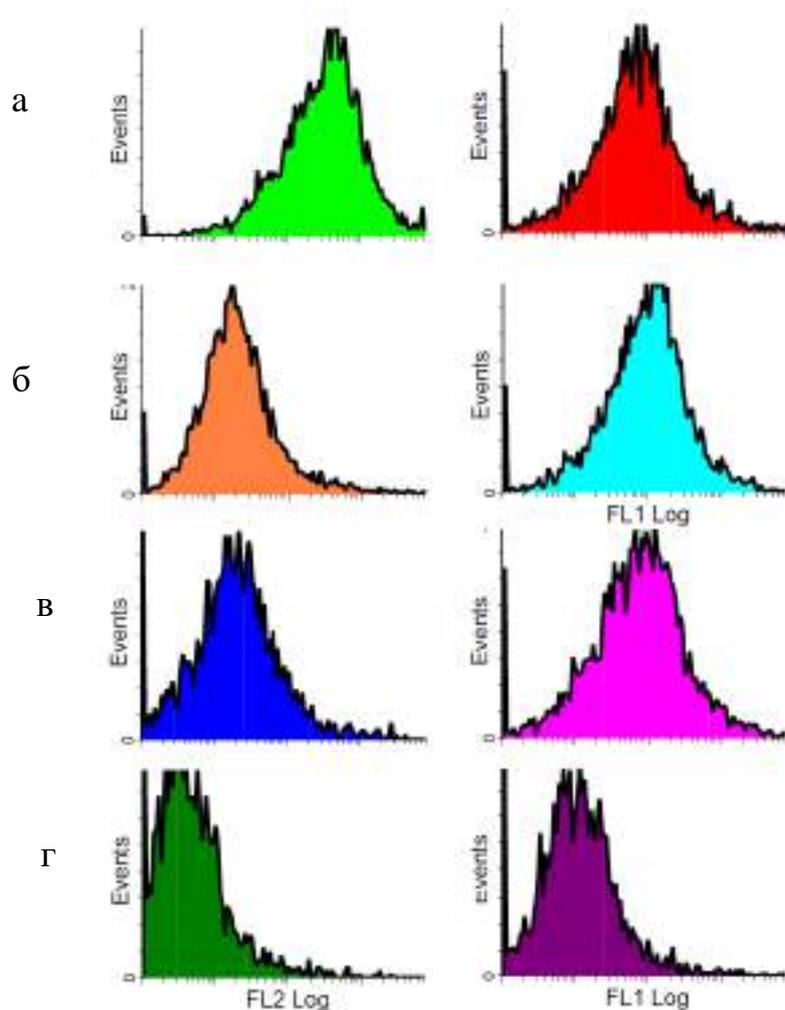


Рисунок 72. Детекция клеток *M. hominis* в суспензии методом проточной флуорометрии. а – окрашивание *M. hominis* SYBR-Green, аMh06-biotin + streptavidin-PE; б- SYBR-Green и streptavidin-PE; в - SYBR-Green, аMh06-biotin; г- неокрашенные клетки *M. hominis*. FL-1 и FL-2 - каналы детекции флуоресценции, для PE и SYBER-Green соответственно.

### 3.3.1.4. Генетическая пассивная иммунизация для защиты от урогенитальной инфекции, вызванной *M. hominis*

*Оценка нейтрализующей активности антитела аMh06 в условиях invitro на модели роста колоний M.hominis.*

В рамках разработки средства диагностики на основе однодоменных антител, как было описано выше, были получены антитела aMh06, связывающиеся с субстрат-связывающим белком ABC-транспортера.

Функция данного белка у *M. hominis* не описана в опубликованных литературных источниках. Тем не менее, многие авторы считают, что белки, относящиеся к данному молекулярному комплексу микоплазм, могут являться мишенями при создании противомикробных лекарственных препаратов [Cacciotto и др., 2013;]. В связи с этим, в рамках проводимого исследования было принято решение изучить потенциальную возможность использования отобранных антител aMh06 в качестве средства терапии на модели урогенитальной инфекции. Для оценки терапевтического потенциала отобранных антител на первом этапе было проведено исследование прямого противомикробного действия aMh06 в условиях *in vitro* в отношении *M. hominis*. Для этого были получены модифицированные однодоменные антитела aMh06-Fc, содержащие Fc фрагмент иммуноглобулина G. Антитела добавляли в среду для культивирования микоплазм, а затем проводили оценку способности антител подавлять рост колоний *M. hominis*. Оценку проводили методом подсчета количества бактерий после высева разведений в жидкую питательную среду (рисунок 73).

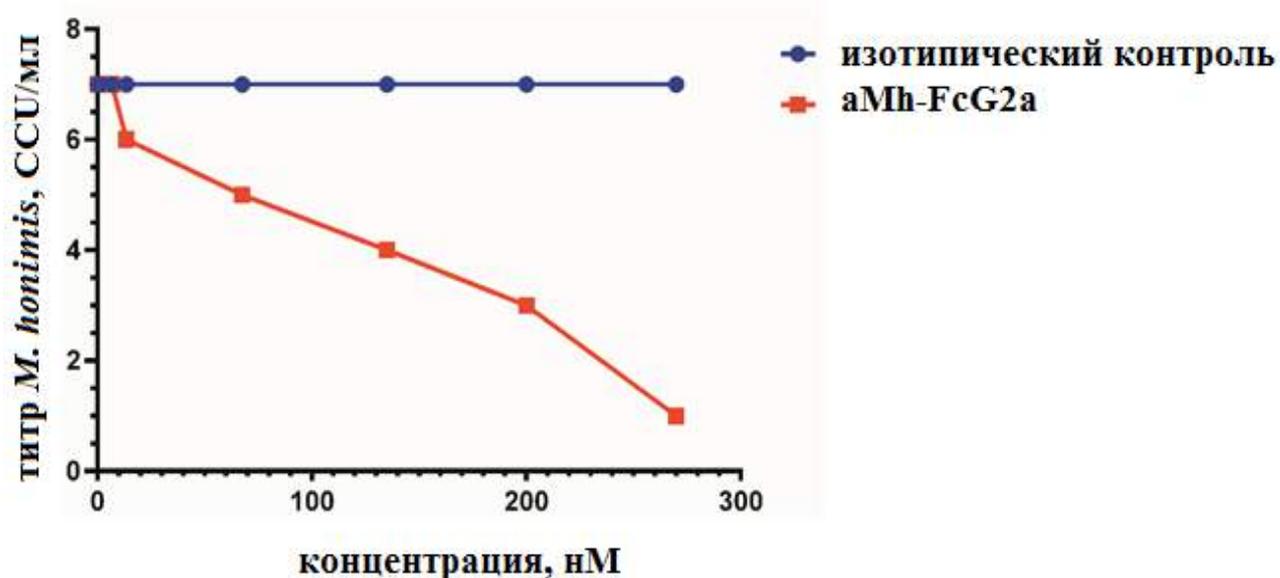


Рисунок 73. Подавление роста *M. hominis* in vitro. В качестве изотипического контроля было использовано неспецифическое однодоменное антитело.

В результате проведенного исследования было установлено, что антитело клон aMh06-Fc обладает прямым дозо-зависимым ингибирующим действием в отношении микоплазмы *M. hominis*. На следующем этапе были проведены исследования на модели урогенитальной инфекции вызванной *M. hominis* у мышей.

### ***Получение вектора для генетической пассивной иммунизации.***

Моноклональные антитела для терапевтического применения могут быть использованы в различных лекарственных формах и способах введения. Чаще всего терапевтические антитела доставляют в организм в виде внутривенной инъекции белкового препарата высокоочищенных антител. Получение такого лекарственного средства является трудоемким процессом и требует использование биотехнологического производства и очистки моноклональных антител с использованием эукариотических клеток-продуцентов. На сегодняшний день активно стали развиваться альтернативные технологии доставки терапевтических антител. К таким методам можно отнести доставку генов, кодирующих нейтрализующие антитела в составе вирусных рекомбинантных векторов или молекул мРНК. Такой подход называется генетическая пассивная иммунизация. Использование метода пассивной иммунизации для терапии инфекционного заболевания, вызванного *M. hominis*, связано с рядом сложностей, которые необходимо учитывать на этапе дизайна терапевтического средства. Инфекции, вызванные *M. hominis*, в большинстве случаев локализованы в урогенитальном тракте. Поэтому, терапевтическое средство, обладающее бактерицидным или бактериостатическим воздействием на микроорганизм, должно применяться либо местно (например, в форме растворов для спринцевания, суппозиторий или вагинальных капсул), либо

обладать механизмом транспорта в место локализации инфекции при системном введении. Кроме того, терапевтический потенциал моноклональных антител помимо специфической активности может определяться их эффекторными свойствами, такими как активация системы комплемента и антителозависимой цитотоксичности, а также стимуляция активности макрофагов, реализуемые через Fc фрагмент. Кроме того, лечение бактериальных и вирусных инфекций требует пролонгированного терапевтического воздействия, а препараты однодоменных антител, не содержащие дополнительных модификаций, обладают очень коротким временем выведения (30 минут). Таким образом, для повышения терапевтического потенциала препарата на основе aMh06 был получен рекомбинантный аденовирусный вектор, несущий ген антитела aMh06, содержащий Fc-фрагмент иммуноглобулина G2a мыши. Введение таких рекомбинантных частиц обеспечивает длительную продукцию молекул антител, а также их транспорт в урогенитальный тракт за счет наличия Fc-фрагмента в составе молекулы, поскольку поверхность урогенитального тракта относится к слизистой II типа и характеризуется наличием рецептор опосредованного направленного транспорта иммуноглобулинов изотипа G из системной циркуляции. Дополнительно, мультимеризация за счет присоединения молекулы VHH к Fc-фрагменту улучшает термодинамические характеристики взаимодействия с антигеном за счет димеризации.

Для проведения генетической пассивной иммунизации был получен рекомбинантный аденовирус человека 5 серотипа, несущий ген однодоменного антитела aMh06 слитого с Fc фрагментом мыши – rAd5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a (конструкция получена по руководством Зубковой О.В.).

Аналогичным образом был получен контрольный рекомбинантный аденовирус rAd5-CMV-PLAP-aMh06-ILZ-NA, экспрессирующий белок aMh06-ILZ-NA не содержащий Fc-фрагмент. Данный препарат был использован для проведения сравнительных исследований эффективности транспорта молекул

антител к поверхности слизистой уrogenитального тракта за счет наличия или отсутствия Fc-фрагмента в составе молекулы антитела.

Константа связывания aMh06-FcG2a была определена методом поверхностного плазмонного резонанса. Для этого aMh06-FcG2a были иммобилизованы на поверхности декстранового матрикса микрочипа CM5, при этом раствор, содержащий ЛАМБ, использовался в качестве аналита. Кривые ассоциации и диссоциации антител с мишенью представлены на рисунке 74.

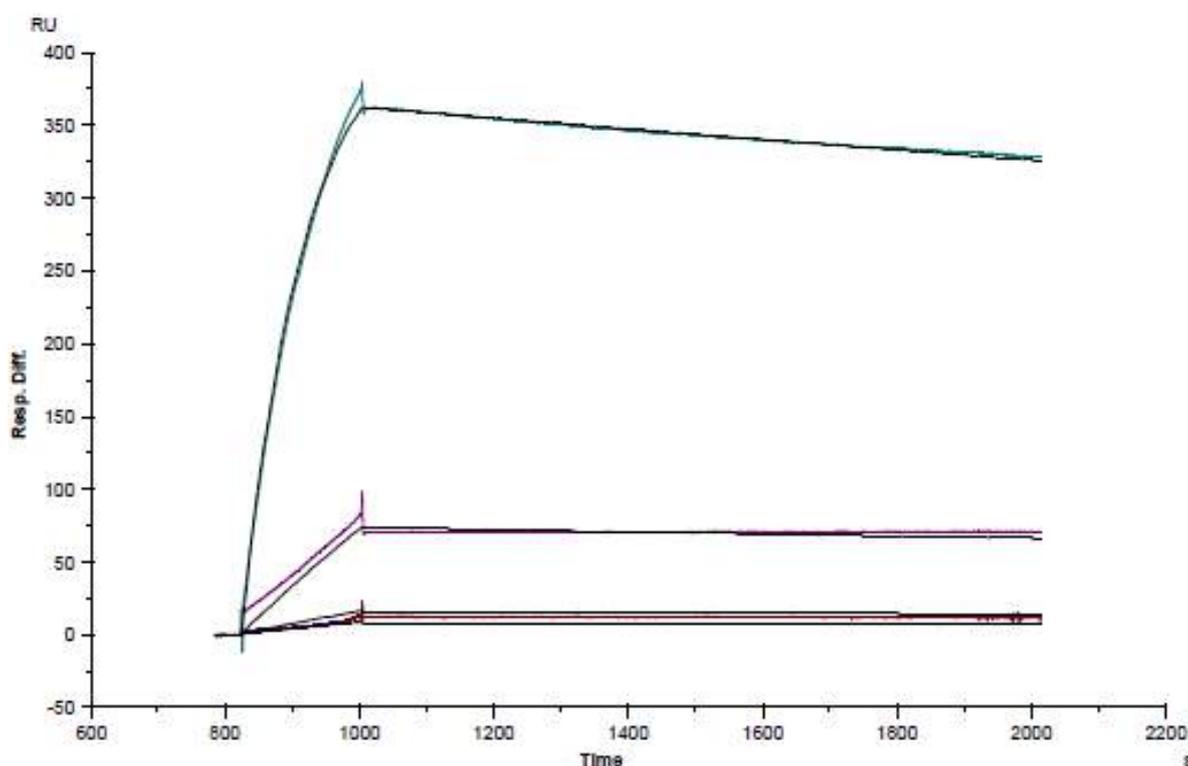


Рисунок 74. Определение константы связывания aMh06-FcG2a методом поверхностного плазмонного резонанса. Молярная концентрация ЛАМБ – 5,95 нМ, 1,95 нМ, 59,5 нМ, 595 нМ,  $R_{max} = 428$  RU,  $\chi^2=11$ .

В результате анализа было установлено, что константа связывания очищенных антител aMh06-FcG2a,  $K_D$  составила 5,9 нМ.

Для проверки работоспособности полученных аденовирусных препаратов в условиях *in vivo* мышам линии BALB/C вводили внутривенно  $10^7$  БОЕ rAd5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a. Через 48 часов, 7 дней и 14 дней у животных отбирали образцы сыворотки крови и вагинальные смывы, в которых

методом ИФА определяли титр специфических к *M. hominis* антител. На рисунке 75 представлены результаты количественной оценки содержания антител в крови и вагинальных смывах после введения рекомбинантного аденовируса.

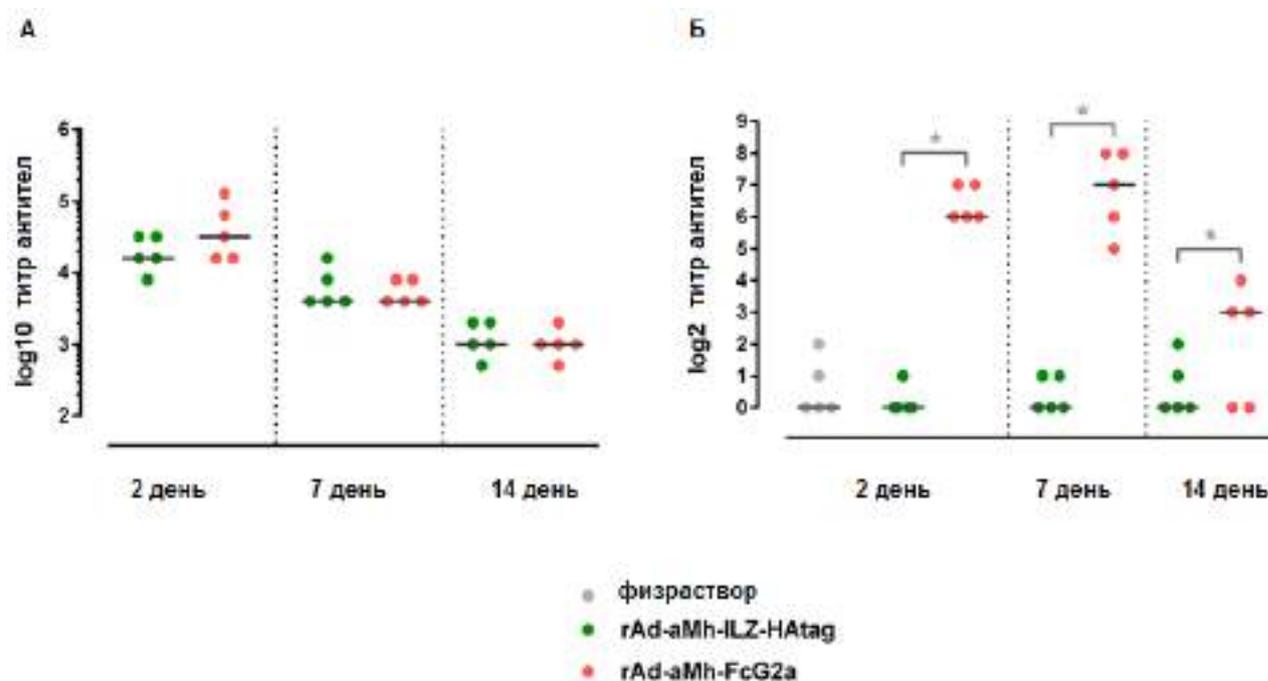


Рисунок 75. Оценка продукции антител аMh06-Fc после введения рекомбинантного аденовируса rAd5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a. Титр антител в сыворотке (А) и образцах вагинальных смывов (Б) измеренный методом ИФА. В качестве мишени использовали ЛАМБ, сорбированные в количестве 100нг/лунку. За титр принималось последнее разведение, в котором значение OD600 превышало в 2 раза оптическую плотность в контрольных лунках (БСА 100нг/лунку).

В результате исследования было установлено, что антитела аMh06-FcG2a при системном введении препарата аденовируса обнаруживаются как в сывороотке крови, так и в вагинальных смывах животных, что подтверждает наличие транспорта молекул антител к поверхности слизистой уrogenитального тракта.

### ***Оценка эффективности подхода генетической пассивной иммунизации для защиты от урогенитальной инфекции мышей, вызванной *M. hominis*.***

Для проверки способности рекомбинантного аденовируса, несущего ген антитела aMh06-FcG2a, подавлять развитие инфекции *M. hominis* в условиях *in vivo* была отработана модель урогенитальной инфекции у мышей. Для этого использовали клинический изолят *M. Hominis* - 1864.3, адаптированный, путем последовательных пассажей у мышей [Shkarupeta, Lazarev, Govorun, 2004]. Для моделирования урогенитальной инфекции нами была выбрана линия мышей DBA/2, так как по данным литературы мыши данной линии являются восприимчивыми к урогенитальным инфекциям вызванным хламидиями и герпес вирусом [Koroleva и др., 2015; Nagurskaya и др., 2008]. Перед заражением была проведена гормональная синхронизация цикла овуляции препаратом синэстрол (17-бета эстрадиол). Заражение проводили путем интравaginaльной инокуляции суспензии микоплазмы *M. Hominis* в количестве  $10^6$  КОЕ на мышь.

Для оценки протективной активности вектора для генетической пассивной иммунизации в условиях *in vivo* на первом этапе был проведен эксперимент с «профилактическим» режимом введения препаратов, в котором животным внутривенно вводили Ad5-CMV-PLAP-aMh06-ILZ-NA и Ad5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a в количестве  $10^7$  БОЕ на мышь за сутки до инокуляции *M. hominis* 1864.3. В качестве контрольных использовали 2 группы мышей, которым вводили Ad5-null (аденовирус, не несущий трансген) и буферный раствор соответственно. Затем, на 5 день, проводился отбор вагинальных смывов, которые разделялись на 2 части – одна использовалась для выделения ДНК и постановки ПЦР для определения количества геномов *M. hominis*, а другая часть помещалась в транспортную среду и использовалась для микробиологического подтверждения титра микоплазмы методом оценки роста разведений культуры по изменению рН среды. Данные определения титра микоплазмы микробиологическим тестом и методом ПЦР совпадали в пределах порядка, что соответствует результатам полученным другими исследователями

[Ivanova и др., 2014]. Данные ПЦР в реальном времени представлены на рисунке 76.

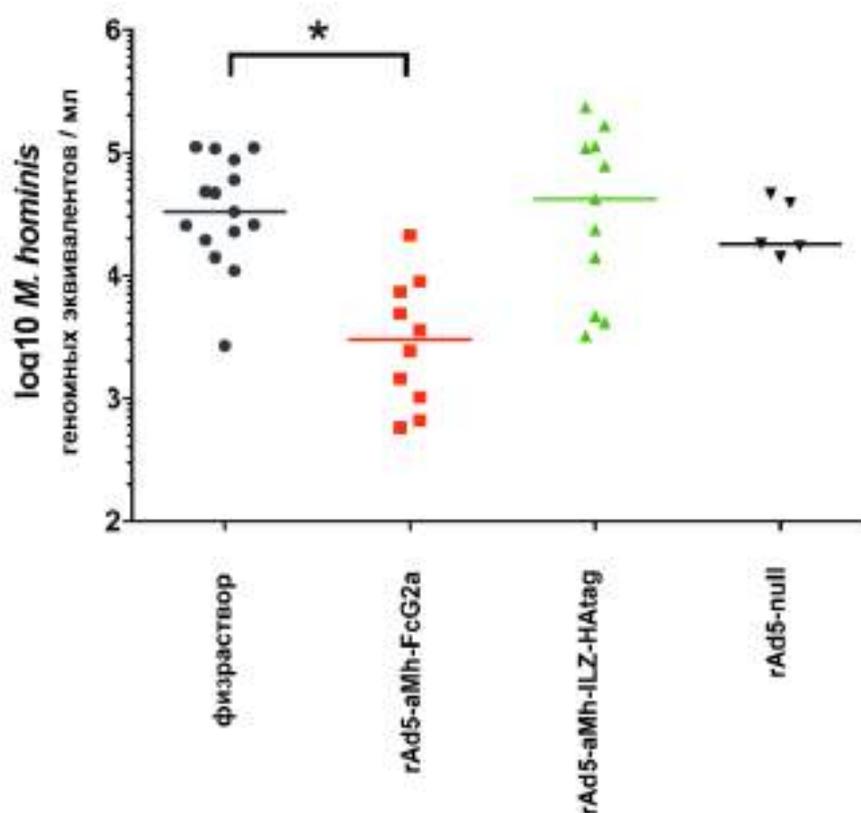


Рисунок 76. Количество геномных эквивалентов *M. hominis* в образцах урогенитальных смывов мышей, определенных методом ПЦР в реальном времени. Горизонтальными линиями отмечены значения медиан. \* t-критерий Стьюдента = 3,5 ( $p < 0.01$ ).

При статистической обработке полученных данных для оценки разницы между группой PBS ( $n=15$ ) и Ad5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a ( $n=10$ ) t-критерий Стьюдента составил 3,5, то есть находится в зоне значимости при  $p < 0.01$ . При этом различия по этому критерию между группой PBS ( $n=15$ ) и Ad5-CMV-PLAP-aMh06-ILZ-NA ( $n=11$ ) были вне зоны значимости. Для сравнения групп PBS ( $n=15$ ) и Ad5-null ( $n=5$ ) был использован как t-критерий Стьюдента, так и U-критерий Манна-Уитни, оба критерия показали незначимость различий между этими двумя контрольными группами.

Таким образом, в результате исследования было показано, что при введении препарата рекомбинантного аденовируса, несущего ген антитела aMh06-FcG2a за сутки до заражения, на 5 день после заражения наблюдается статистически значимое уменьшение количества миколазм более чем на порядок, при этом в других группах подобного эффекта не наблюдается.

Для оценки способности генетической пассивной иммунизации обеспечивать ингибирующее действие в режиме терапии был проведен следующий эксперимент согласно схеме, изображенной на рисунке 77.

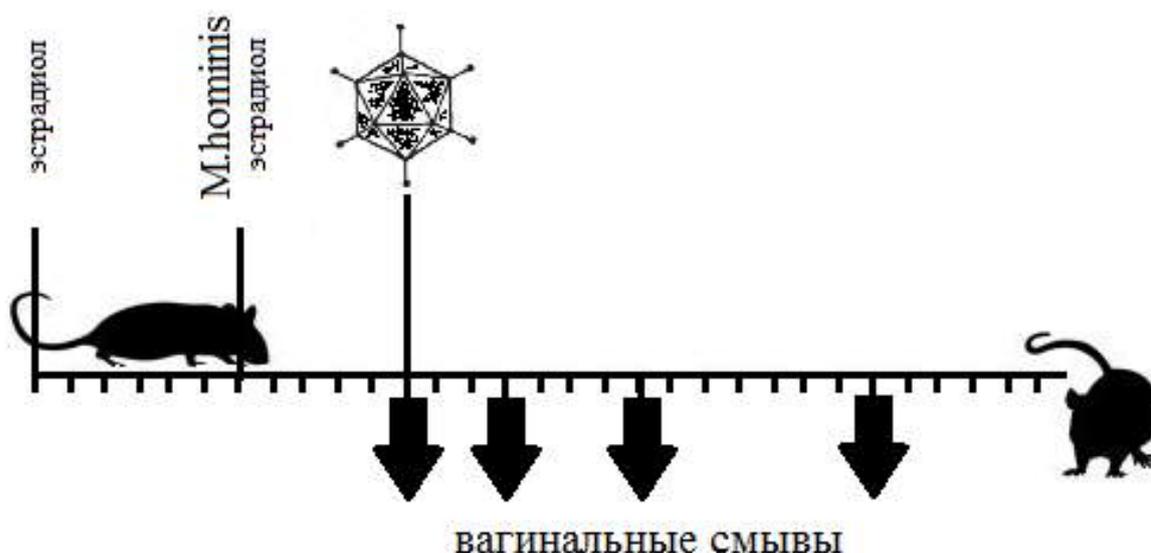


Рисунок 77. Схема эксперимента.

На 5 день после инокуляции *M. hominis* 1864.3 мышам вводили в глазной синус препараты Ad5-CMV-PLAP-aMh06-ILZ-NA и Ad5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a в количестве  $10^7$  БОЕ на мыш. В качестве контрольных использовали 2 группы мышей, которым вводили  $10^7$  БОЕ Ad5-null и буферный раствор соответственно. На 3, 7 и 14 дни отбирали образцы вагинальных смывов. В отобранных образцах проводили оценку количества микоплазм методом ПЦР в реальном времени, который подтверждали микробиологическим высевом с оценкой роста разведений культуры по изменению рН среды. Полученные результаты представлены на рисунке 78.

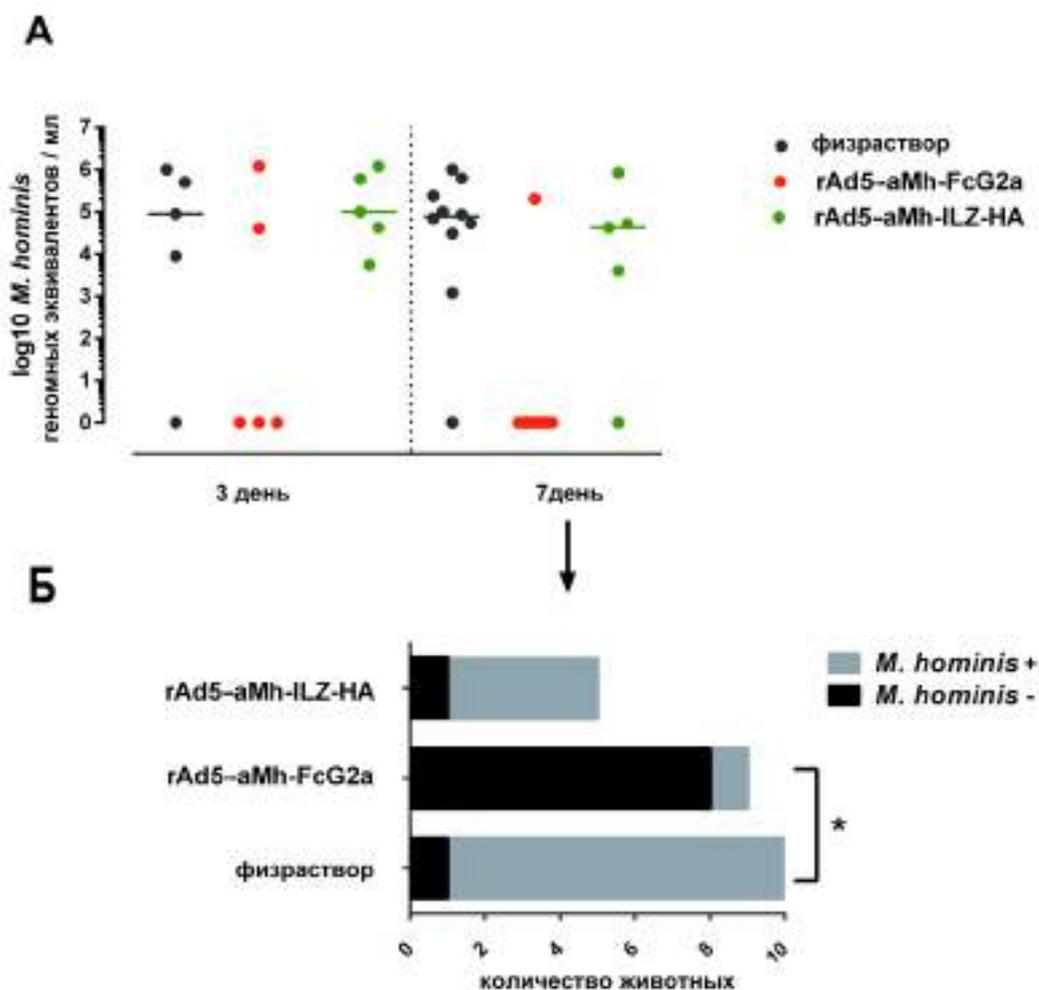


Рисунок 78. Результаты *in vivo* эксперимента при терапевтической схеме введения рекомбинантных аденовирусных препаратов. \* точный тест Фишера  $\phi^* = 3.959$  ( $\phi_{0.05} = 1.64$ ;  $\phi_{0.01} = 2.31$ ). А – оценка содержания *M.hominis* в уrogenитальных смывах животных методом ПЦР; Б – количество животных в каждой группе, у которых обнаружена *M.hominis* в уrogenитальных смывах.

Следует отметить, что на 14 день после введения рекомбинантных аденовирусов во всех группах наблюдалась персистенция микоплазмы в низком титре ( $< 10^2$  геномов/мл) у 30-50% животных. Эти данные говорят о том, что терапевтический эффект на 3 и 7 день достигается за счет снижения количества микоплазм, тогда как полной элиминации патогена может не происходить. Возможно, что полная элиминация патогена может быть достигнута путем

оптимизации терапевтической схемы введения препарата и сочетанием с другими лекарственными средствами.

Данные свидетельствуют о достоверном снижении количества животных, содержащих микоплазму при терапии Ad5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a, при этом в других группах подобного эффекта не наблюдается.

Таким образом, в результате исследования *in vivo* было установлено, что введение препарата рекомбинантного аденовируса Ad5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a как за сутки до заражения, так и через 5 дней после инфицирования приводит к достоверному снижению количества *M. Hominis* в урогенитальных смывах. Наиболее выраженное снижение количества микоплазм при введении Ad5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a в терапевтическом режиме наблюдается на 7 день после введения препаратов рекомбинантных аденовирусов более чем на порядок, при этом в других группах подобного эффекта не наблюдается. Таким образом, полученный нами препарат Ad5-CMV-PLAP-aMh06-FcG2a обладает выраженным противомикоплазменным действием как в режиме профилактического, так и терапевтического введения.

По результатам проведенной работы была защищена кандидатская диссертация Егоровой Д.А. «Однодоменные антитела для диагностики и защиты от урогенитальной инфекции, вызванной *Mycoplasma hominis*» по специальности – микробиология (научный руководитель Щебляков Д.В.).

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

В разделе 3.2.4 представлены результаты исследования оценки нейтрализующих свойств однодоменных антител, специфичных токсину В *C.difficile*. Ниже приведены результаты возможностей, полученных молекул антител для диагностического использования в формате биосенсоров, работающих на принципе плазмонного резонанса. Токсин В (TcdB) был выбран в качестве диагностической мишени при создании таких биосенсоров.

Для получения очищенного белка на начальном этапе нуклеотидная последовательность размером около 2.0 тпн и содержащая целевой ген амплифицировали в ПЦР с использованием праймеров # 768 (5'-GTGCATTCATCATAGTCGACSTTTT-3') и #769 (5'-GGTAATGATTGGATCSTTATGTCAAC-3'). Продукт реакции выделяли из реакционной смеси, обработанной эндонуклеазами BamHI и SalI и лигировали с вектором pET28c. Целевой ген амплифицировали с использованием праймеров #474 (5'-GCAGAGCTCATCATCATCATCACAG-3') и #475 (5'-CTCAGGTACSTTTCGGGCTTTGTTAG-3').

Продукт реакции выделяли из реакционной смеси, обрабатывали эндонуклеазами SacI и KpnI и лигировали с вектором pHis1522, предназначенным для трансформации генов в штаммы грамположительных микроорганизмов. Полученная генетическая конструкция трансформируется в штамм *B. megaterium*.

Для продукции целевого белка полученный штамм-продуцент выращивали в жидкой питательной среде LB до оптической плотности OD<sub>600</sub>=0.3, добавляли в качестве индуктора транскрипции 0.1% ксилозу и продолжали выращивание в течение ночи. После культивирования бактериальные клетки разрушали ультразвуком и подвергали металл-аффинной хроматографии на NiCl<sub>2</sub>-содержащем сорбенте HisTrap (GE Healthcare). С использованием разработанной технологии из одного литра жидкой культуры получали около 700 мкг белкового препарата.

Полученный белок для анализа качественных характеристик подвергали электрофорезу в полиакриламидном геле с добавлением додецилсульфата натрия в качестве детергента с последующей окраской нитратом серебра. Как следует из представленного рисунки, полученный белок мигрирует в геле полосой с молекулярной массой около 80 кД (Рисунок 79), что хорошо согласуется с расчетной массой (76.7 кД).

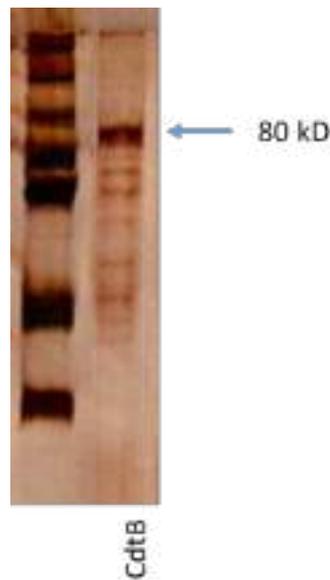


Рисунок 79. Электрофореграмма образца токсина В (TcdB) после очистки.

Полученный белок использовали для получения иммунной библиотеки и селекции однодоменных антител как описано в разделе 3.1.1. Для этого альпаки были иммунизированы нетоксичной субъединицей токсина В (TcdB) *S. Difficile*. Проведен цикл из 5 последовательных иммунизаций с интервалом 14 дней. После последней иммунизации через 5 дней у животных было отобрано 50 мл венозной крови, из которой были получены методом градиентного центрифугирования мононуклеарные клетки. Из мононуклеарных клеток была выделена тотальная РНК. На матрице этой РНК была синтезирована кДНК. Полученную кДНК использовали в качестве матрицы для амплификации методом ПЦР последовательностей, кодирующих однодоменные антитела. Полученные ампликоны гидролизовали эндонуклеазами рестрикции NotI и SfiI. Продукты реакции гидролиза клонировали в фагмидный вектор pHEN1, предварительно гидролизованный эндонуклеазами рестрикции NotI и SfiI. Продукты клонирования трансформировали методом электропорации в клетки *Escherichia coli* TG1, которые затем высевали на агаризованную питательную среду с селективным антибиотиком. Полученная библиотека клонов была использована в качестве бактериальной культуры для получения библиотеки рекомбинантных бактериофагов на основе нитчатого бактериофага M13. Для

этой процедуры использовался фаг-помощник M13KO7. Как было описано ранее, в результате проведения данного этапа была получена библиотека рекомбинантных бактериофагов, несущих на своей поверхности неканонические антитела, слитые с белком рIII бактериофага. При этом сам фагмидный вектор упакован в качестве геномного материала внутри капсида рекомбинантного бактериофага. Методом биопанинга из полученной библиотеки бактериофагов были изолированы вирионы, которые за счет специфических свойств однодоменных антител, слитых с белком рIII, связываются с антигеном TcdB. После изоляции бактериофагов, обладающих специфическими свойствами, их использовали для трансдукции клеток *Escherichia coli* TG1 и повторения цикла получения библиотеки рекомбинантных бактериофагов и биопанинга. Всего было проведено 3 раунда биопанинга. После последнего цикла биопанинга, трансдуцированные клетки *Escherichia coli* TG1 использовали для получения индивидуальных клонов и выделения индивидуальных фагмидных векторов в форме двуцепочечной кольцевой ДНК (т.е. в форме плазмидной ДНК). Последовательности, кодирующие однодоменные антитела в составе плазмидных ДНК, секвенировали и идентифицировали среди них панель уникальных последовательностей однодоменных антител.

В результате проведенной работы были отобраны 7 клонов однодоменных антител (B7, G8, F3, G5, C3, A3, H7) специфически связывающихся с токсином В *C.difficile*. Анализ нуклеотидных последовательностей CDR отобранных клонов представлен в таблице 25.

Таблица 25. Анализ нуклеотидных последовательностей, кодирующих CDR петли

	CDR1	CDR2	CDR3
Однодоменное антитело клон B7	GDTFSTYA	ISWNGRNT	AAGQYLTGWGTMRDYDY
Однодоменное антитело клон G8	GGAITTSKNY	IAYSGST	ARSARFEDPHSFD

Однодоменное антитело клон F3	GRTFSSYIMG	SISWSGGST	AAITSKLGLIEATHLYEYNY
Однодоменное антитело клон G5	GRTVSTYN	ITRSGSST	AAQISEYYSATPRSQFGYDY
Однодоменное антитело клон C3	GIDFSSHE	IHPNDMT	NAHRPFPTGADDY
Однодоменное антитело клон A3	GRTFSNYV	ISRSGGST	AADRSRSYIYTGSSNYDY
Однодоменное антитело клон H7	GGTFTGYA	IAWNPKT	RADRKRMGRRTTY

Для проверки специфической активности отобранных клонов антител, плазмидные ДНК, соответствующие каждому уникальному однодоменному антителу, трансформировали в клетки *Escherichia coli* BL21, оптимизированные для продукции рекомбинантных белков. Полученные трансформанты использовали для наращивания биомассы и выделения однодоменных антител методом аффинной хроматографии. Полученный материал анализировали методом электрофореза в полиакриламидном геле для характеристики однодоменных антител согласно техническим характеристикам, в частности по параметрам молекулярной массы однодоменных антител, их чистоты и уровню продукции однодоменных антител в клетках *Escherichia coli* BL21. Электрофореграммы представлены на рисунке 80.

В результате проверки уровня экспрессии антител, их чистоты, растворимости и анализа электрофоретической подвижности для дальнейшей работы были выбраны клоны В7, F3, G5, H7.

Предварительный анализ характеристик однодоменных антител проводился с использованием метода ИФА для детекции токсина В *C.difficile*. Методом иммуноферментного анализа (ИФА) проводили характеристику специфических свойств однодоменных антител в этом типе анализа. Для этого по 100 нг антигена сорбировали на поверхность иммунологического пластика и проводили иммуноферментный анализ. Данные представлены на рисунке 81.

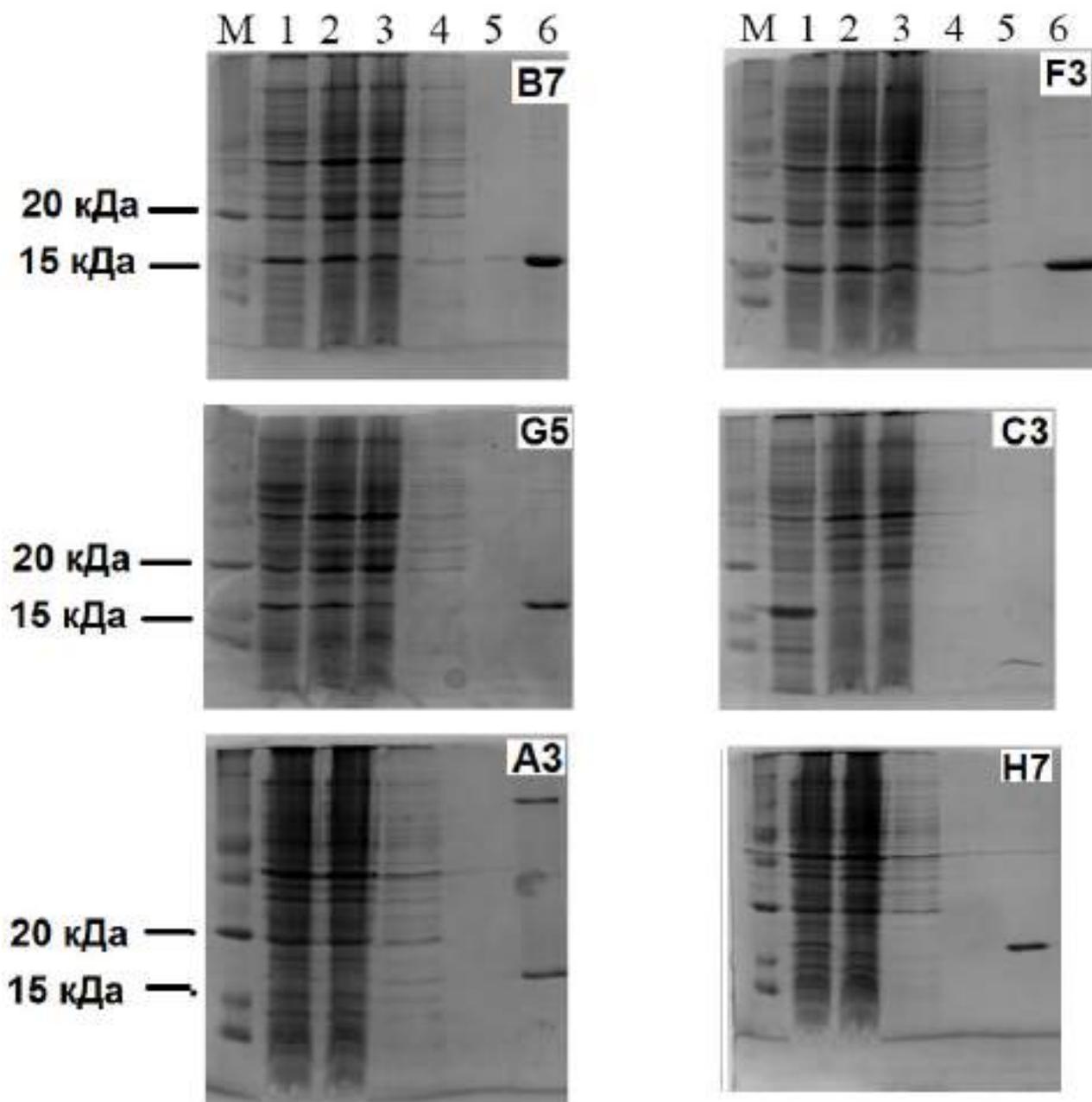


Рисунок 80. Электрофореграммы продукции и очистки однодоменных антител, специфичных токсину В (TcdB) *C.difficile*. М – маркер молекулярного веса; 1- осветленный лизат клеток *E.coli* продуцентов антител; 2 – лизат после инкубации с сорбентом на основе Ni-агарозы; 3,4,5 – образцы после 1,2,3 стадии промывки сорбента; 6 – элюат;

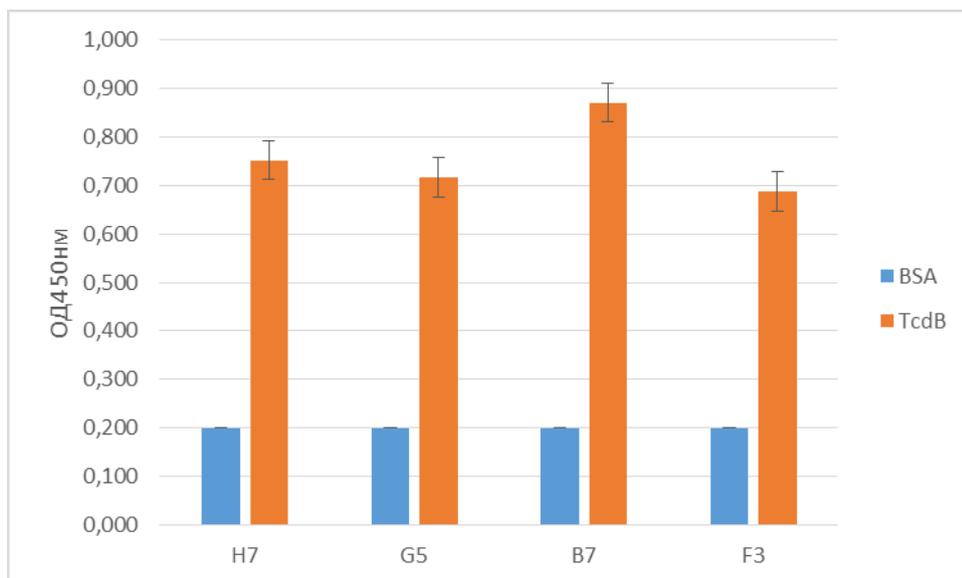


Рисунок 81. Данные иммуноферментного анализа с использованием токсина TcdB *C.difficile* и однодоменных антител В7, F3, G5, Н7. Метод – прямой ИФА. В качестве мишени сорбировали рекомбинантный CROPS в количестве 100нг в лунку. Визуализацию реакции проводили анти-Гис-таг антителами.

В результате иммуноферментного анализа было установлено, что однодоменные антитела В7, F3, G5, Н7 способны связывать токсина TcdB.

Дальнейший анализ характеристик однодоменных антител проводился с использованием метода иммуноблоттинга. Для этого по 100 нг токсина В *C.difficile* разделяли в полиакриламидном геле, переносили на нитроцеллюлозную мембрану, а затем проводили гибридизацию с однодоменными антителами и последующую визуализацию результата. Данные представлены на рисунке 82.

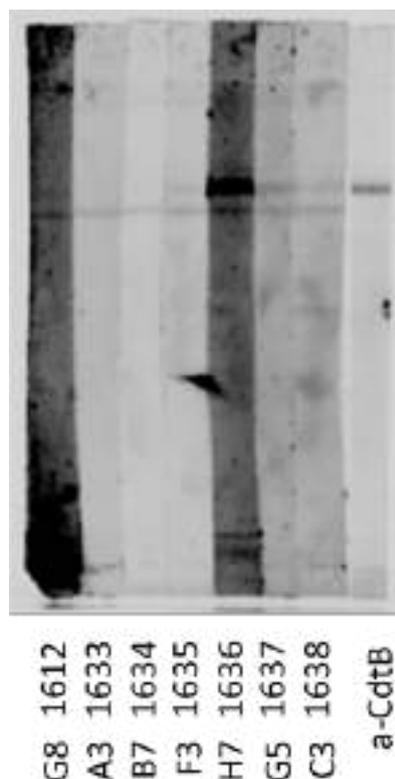


Рисунок 82. Данные иммуноблоттинга с использованием токсина TcdV и однодоменных антител B7, G8, F3, G5, C3, A3, H7, aCdtB – положительный контроль.

В результате анализа данных вестерн-блот гибридизации было установлено, что однодоменное антитело клон H7 способны связывать токсин TcdV и показывает сигнал большей интенсивности в сравнении с остальными клонами. В связи с полученными результатами клон H7 был выбран для дальнейших исследований в качестве основной молекулы для создания тест-системы на основе метода плазмонного резонанса (SPR). Для этого однодоменные антитела клон H7 был охарактеризован по кинетическим параметрам взаимодействия с TcdV (константа диссоциации KD). Для этого, TcdV был ковалентно иммобилизован на поверхности чипа CM5 (GE). Затем с использованием стандартного алгоритма для определения кинетики реакции методом поверхностного плазмонного резонанса на приборе Biacore3000 (GE) были определены константы реакции взаимодействия однодоменных антител с антигеном. Данные представлены на рисунке 83.

Константа реакции взаимодействия однодоменных антител Н7 с токсином TcdB, иммобилизованном на поверхности чипа, составила 7 нМ.

Охарактеризованный клон Н7 использовали для создания тест-системы для индикации токсина В *C.difficile* в различных образцах методом плазмонного резонанса.

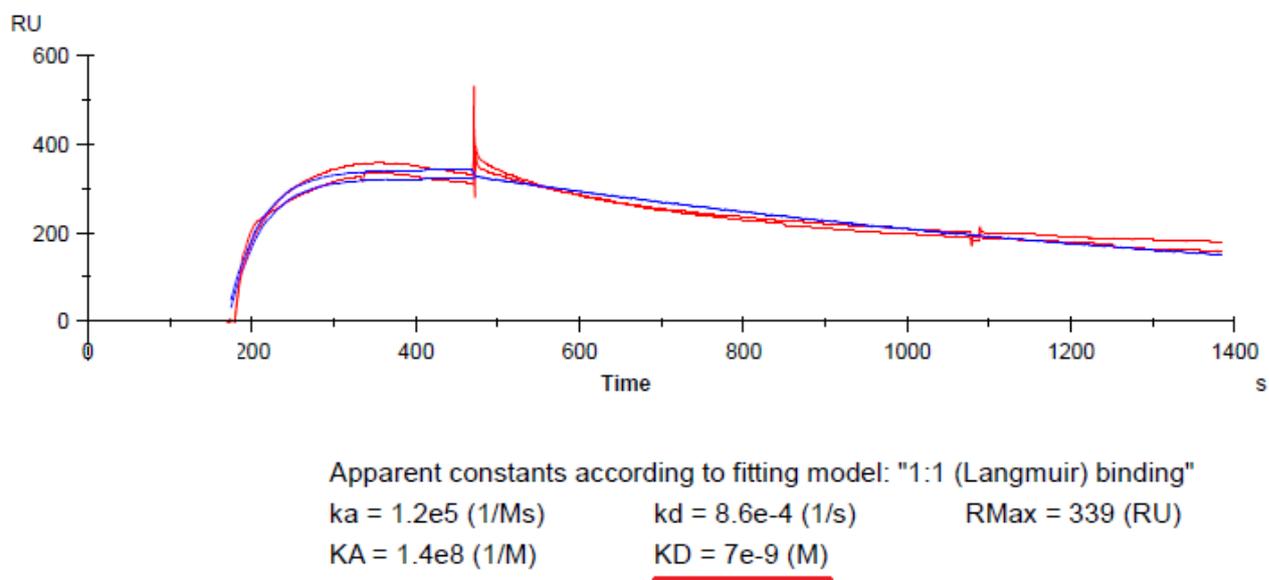


Рисунок 83. Определение константы реакции взаимодействия однодоменных антител Н7 с токсином TcdB, иммобилизованном на поверхности чипа. Ось Y - RU- резонансные единицы; Ось X – время проведения анализа; Кривая ассоциации отражает изменение ППР при взаимодействии антител с мишенью (время по оси X – 180-440 секунд); Кривая диссоциации отражает скорость разделения комплекса АТ-АГ (время по оси X - 440-1400 секунд).

Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) — возбуждение поверхностного плазмона на его резонансной частоте внешней электромагнитной волной в тонком слое проводящего материала, который помещен между двух сред с разными показателями преломления. Эффект ППР как физическое явление был открыт в 60-х гг. XX века и относится к области современной квантовой нанооптики.

Применение поверхностного плазмонного резонанса активно используется в биомедицинских исследованиях. Сенсоры на основе ППР становятся одним из основных подходов при исследовании разнообразных межмолекулярных взаимодействий. Они позволяют регистрировать взаимодействия между практически любыми молекулярными объектами в широком диапазоне концентраций. ППР-биосенсоры имеют очень высокую точность, воспроизводимость и чувствительность, что и обуславливает их активное применение в фундаментальных и прикладных исследованиях.

При использовании, полученных в исследовании однодоменных антител клон Н7, был сконструирован биосенсор, предназначенный для детекции токсина В TcdV *C.difficile*. Макет биосенсора и принцип его работы показан на рисунке 84.

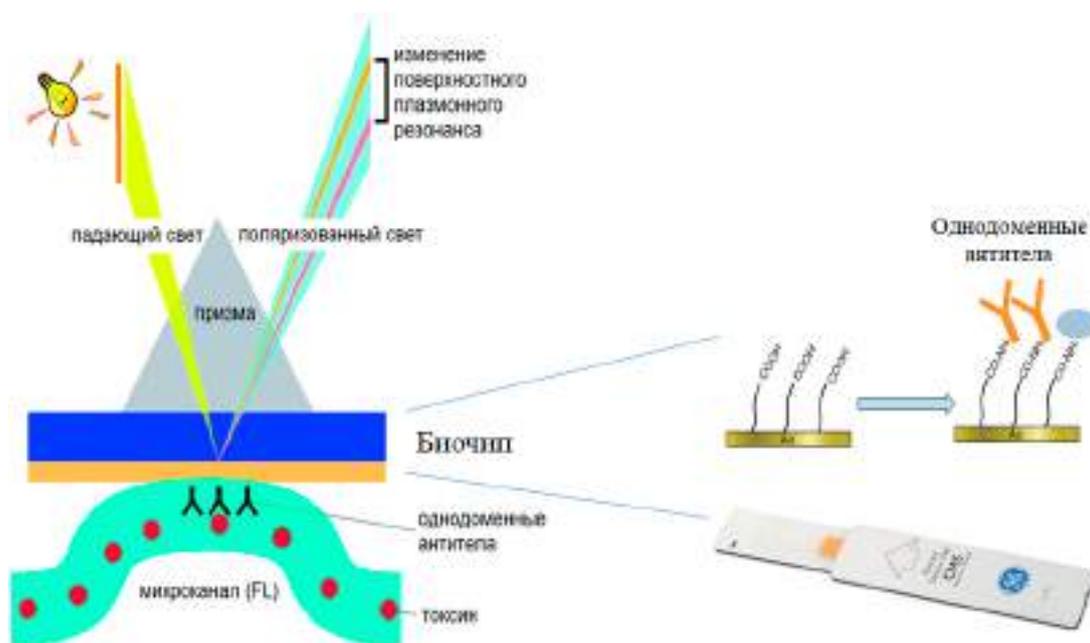


Рисунок 84. Принцип работы биосенсоров, основанных на плазмонном резонансе.

Однодоменные антитела клон Н7, специфичные токсину В *C.difficile*, были использованы для иммобилизации на поверхности чипа CM5. Иммобилизацию однодоменных антител на поверхности чипа проводили с использованием N-гидроксисукцинимид и 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)-карбодимид

гидрохлорида. Процедуру проводили по протоколу для иммобилизации антигенов согласно стандартному протоколу прибора Biacore 3000 в автоматическом режиме. Уровень иммобилизации определялся в автоматическом режиме и был представлен в виде значений резонансных единиц - RU.

Однодоменные антитела иммобилизовались на поверхности чипа в количестве от 500 до 25000 RU, причем уровень иммобилизации был полностью контролируем заданными параметрами автоматического протокола. В качестве положительного контрольного образца использовали рекомбинантную субъединицу токсина TcdB, обладающую способностью связываться со специфическими однодоменными антителами, но не обладающий токсической активностью из-за отсутствия активной части молекулы, отвечающей за эту функцию.

Одним из преимуществ однодоменных антител перед каноническими антителами является их высокая стабильность. Однодоменные антитела обладают высокой устойчивостью в условиях изменения pH; способны переносить длительное хранение без применения криоконсервантов; не требуют сложных буферных систем для хранения. Указанные свойства однодоменных антител являются значимым преимуществом при создании тест-систем на основе чипов с иммобилизованными на их поверхности распознающими молекулами, для которых подразумевается длительный срок хранения, а также обязательный этап регенерации биосенсора для повторного использования.

В связи с этим, в исследовании было проведено сравнение стабильности биосенсора с иммобилизованными однодоменными антителами и биосенсора с каноническими полноразмерными антителами, специфичными к TcdB, при проведении многократных циклов регенерации сенсора и последующего измерения взаимодействия с токсином. Результаты анализа показаны на рисунке 85.

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

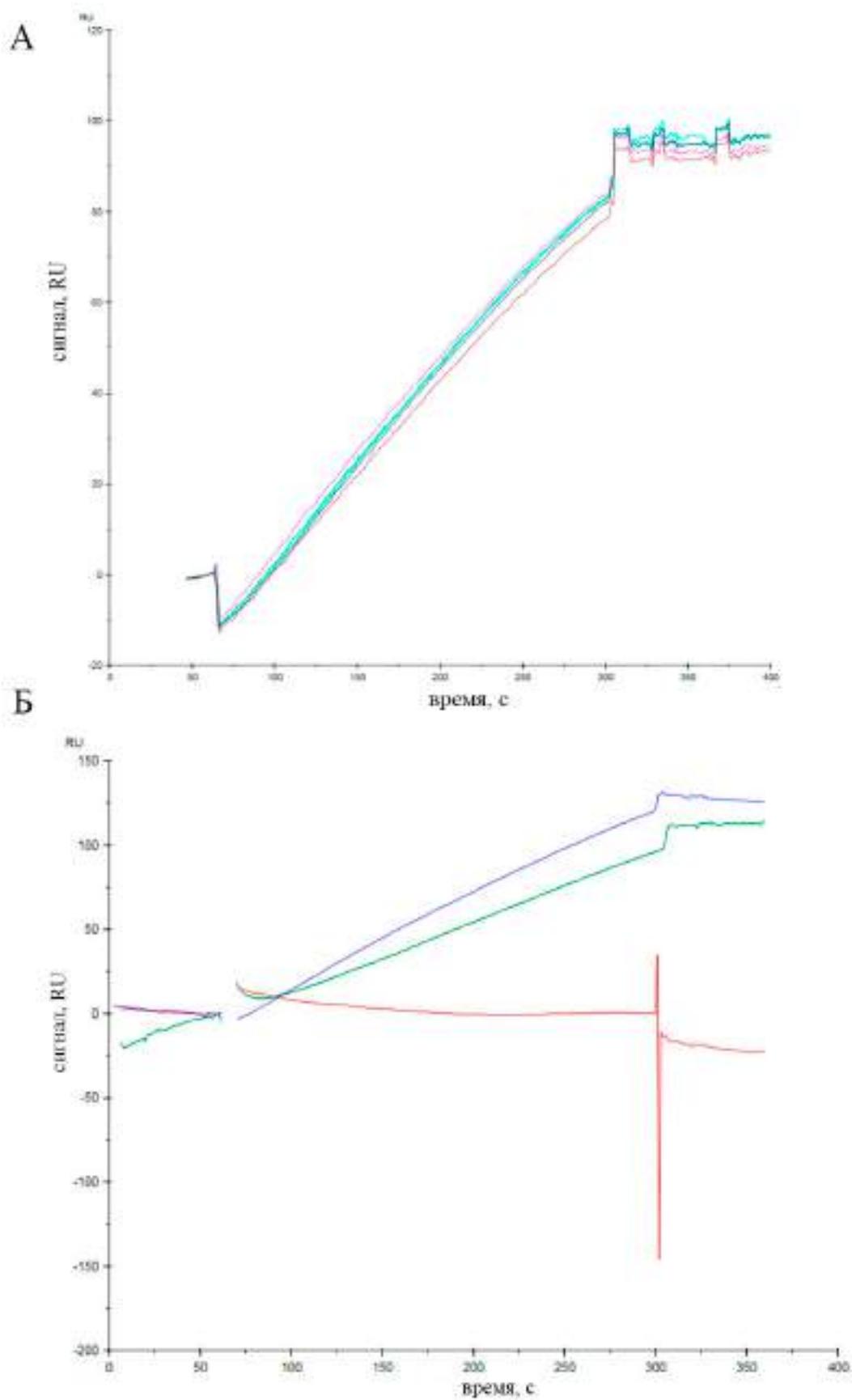


Рисунок 85. Определение токсина В *C.difficile* методом плазмонного резонанса. А – биосенсор с однодоменными антителами, клон Н7; Б –

биосенсор с поликлональными иммуноглобулинами мыши, выделенными из сыворотки крови.

### **Выводы**

В результате исследования на модельных антигенах *M.hominis*, *C.difficile* было показано, что специфические рекомбинантные однодоменные антитела после модификаций (добавление 6xHis, НА-тагов, биотинилирование) можно эффективно использовать в различных диагностических методах (ИФА, иммуноблоттинг, иммуноцитохимическое исследование, окрашивание отпечатков колоний, детекция методом проточной цитофлуорометрии). При этом чувствительность указанных методов определения патогенов или их антигенов с использованием однодоменных антител ниже чувствительности методов, в которых используются полноразмерные канонические антитела. Наличие Fc-фрагмента у канонических антител позволяет увеличить чувствительность определения антигена за счет использования более аффинных конъюгатов вторичных антител. При этом вторичные антитела к тэгам (His-, НА-таг) в структуре однодоменных антител такой чувствительностью не обладают. Однако, однодоменные антитела за счет своих физико-химических свойств значительно эффективнее могут использоваться в методах, не требующих меченя или измерения вторичных сигналов. Так, биосенсоры, основанные на методе плазмонного резонанса, могут использоваться для многократных измерений присутствия патогенов в биологических образцах без снижения сигнала после регенерации.

## ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На сегодняшний день, благодаря открытиям в области иммунологии, а также развитию методов клеточной биологии, генетической инженерии и технологии фагового дисплея привели к разработке и внедрению большого числа препаратов на основе рекомбинантных моноклональных антител, широко применяемых в области онкологических, аутоиммунных, сердечно-сосудистых и инфекционных заболеваний.

При этом, канонические антитела, состоящие из тяжелых и легких цепей, несмотря на их широкое распространение, имеют очевидные для практического использования недостатки, связанные с их структурной организацией, ограничивающих и/или существенно усложняющих процесс их отбора. Кроме того, канонические антитела, полученные при помощи гибридомной технологии, даже после гуманизации могут вызывать дозо-зависимую иммуотоксичность и другие нежелательные явления, а также имеют лимитированную эффективность проникновения в различные ткани [Descotes, 2009; Hansel и др., 2010; Shah, Betts, 2013; Tabrizi, Bornstein, Suria, 2010]. А структурная организация канонических антител, состоящих из тяжелых и легких цепей и имеющих мультидоменную структуру варибельного фрагмента, значительно усложняют процесс модификации таких антител, а также создания гетеродимерных молекул на их основе. В связи с этим, в настоящее время происходит стремительный рост интереса к альтернативным форматам антител и их фрагментов, лишенных описанных недостатков [Деев С.М. и др. 2008; Альтшулер Е.П. и др. 2010]. Одним из наиболее перспективных направлений является получение и использование антиген-распознающих фрагментов неканонических антител представителей семейства верблюдовых (VНН или nanobody®). VНН представляют собой фрагмент неканонических антител, состоящих только из тяжелых цепей иммуноглобулинов. Полипептидная цепь этих фрагментов кодируется одним геном, что делает их очень привлекательными молекулами с точки зрения биотехнологического потенциала и возможности различных генно-инженерных манипуляций.

Антигенсвязывающий домен формируется из 3 гипервариабельных петель – CDR1, 2 и 3. Причем характерной особенностью VHH является удлиненная CDR3 петля, которая конформационно образует гибкий «палец», способный входить в функционально-активные сайты антигенов, а также связывать необычные и скрытые эпитопы различных молекул. Это свойство VHH позволяет с большей вероятностью отбирать антитела с нейтрализующими и блокирующими свойствами.

Подтверждением актуальности использования однодоменных антител в практической медицине служат большое число исследований, направленных на разработку средств диагностики и терапии различных заболеваний, начавшихся в последнее десятилетие во всем мире, ряд из которых в настоящее время проходят клинические исследования. Однако, несмотря на активные исследования в области разработки и применения VHH в качестве средств терапии, изучение возможности использования однодоменных антител и/или молекул на их основе для борьбы с инфекционными заболеваниями, в настоящее время ограничены. Поэтому исследование, направленное на разработку средств борьбы с инфекционными заболеваниями на основе однодоменных антител является важным и актуальным научным направлением.

В связи с этим целью настоящего исследования являлось разработка технологической платформы однодоменных антител и изучение возможности ее использования для создания средств диагностики и терапии инфекционных заболеваний на основе однодоменных антител и молекул на их основе.

Как известно, моноклональные антитела (в том числе однодоменные) могут использоваться не только в качестве диагностических молекул, но и как средств нейтрализации различных мишеней, в том числе и бактериальной и вирусной природы. В первой части научной работы для изучения возможности применения платформы однодоменных антител в терапевтических целях качестве инфекционных моделей были использованы: белок GP вируса Эбола, рецептор-связывающий домен (RBD) коронавируса SARS-Cov-2, а также ботулотоксин А *C.botulinum* и токсин В *C.difficile*.

На первом этапе изучения возможности применения технологии однодоменных антител для разработки средств терапии мы провели исследования на двух вирусных моделях – вирус лихорадки Эбола и коронавирус SARS-Cov-2.

Вирус Эбола, член семейства *Filoviridae*, является возбудителем геморрагической лихорадки у человека и приматов [Siragam 2018]. Смертность от заболевания, вызванного вирусом Эбола (БВВЭ), может достигать 60–90% [Qiu X. et al 2012]. Недавние вспышки БВВЭ были зарегистрированы в Конго в 2018 г., Уганде в 2019 г., а также в Конго и Гвинее в 2021 г. [ECDC, 2019]. Моноклональные антитела (МАт) с вируснейтрализующей активностью и высокой специфичностью к гликопротеину вируса Эбола (EBOV GP) рассматриваются как высокоэффективные потенциальные противовирусные препараты. Так, в исследованиях было показано, что коктейли моноклональных антител, специфичные к EBOV GP, могут обеспечить полную защиту от БВВЭ у нечеловеческих приматов; некоторые из них (Zmapp, MAb114, REGN-EB3 и GamEMab) в настоящее время проходят клинические испытания [Moekotte A. L. 2016; Corti D. et al, 2016].

В нашем исследовании впервые показана возможность получения однодоменных антител, слитых с Fc-фрагментом IgG1 человека, обладающих нейтрализующей и защитной активностью в отношении вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного белком GP вируса Эбола. Кроме того, впервые была получена панель однодоменных антител, специфичных к EBOV GP, путем иммунизации альпаки рекомбинантным аденовирусом Ad5-GP, несущем ген белка GP вируса Эбола. Эта стратегия иммунизации ранее успешно использовалась для получения моноклональных антител с защитной активностью против вируса Эбола [Shcheblyakov D. et al 2019]. Таким образом, были получены четыре клон однодоменных антител (aEv2, aEv3, aEv6 и aEv7); их характеристика представлена в таблица 5. На основании полученных нами данных клон aEv6 показал как наибольшую аффинность к EBOV GP, так и

вируснейтрализующую активность в отношении rVSV-GP. Поэтому этот клон был выбран для дальнейшего изучения.

На последнем этапе работы была проведена оценка защитной активности aEv6-Fc на мышинной модели летальной инфекции вирусом везикулярного стоматита, псевдотипированным EBOV GP. Указанная модель была разработана в качестве удобного подхода для скрининговых исследований вируснейтрализующей активности антител без использования вируса Эбола дикого типа [St Claire M. C. 2017]. Доза препарата (50 мг/кг) была выбрана на основании опубликованных данных [<https://www.who.int/ebola/drc-2018/treatments-approved-for-compassionate-use-update/en/>]. В исследовании было установлено, что, aEv6-Fc полностью защищает мышей от инфекции как при предварительной инкубации, так и при смешивании с вирусом непосредственно перед инфицированием. Кроме того, при введении антител животным не позднее 2 ч после заражения вирусом уровень защиты составил около 30%. Таким образом, aEv6-Fc можно использовать в качестве защитного средства как для профилактики, так и для лечения сразу после предполагаемого контакта с возбудителем.

Детальный анализ накопления rVSV-GP в органах и тканях инфицированных мышей выявил наиболее высокий титр вируса в крови, печени, почках и селезенке, тогда как в головном мозге и кишечнике rVSV-GP не был обнаружен. Полученные результаты могут быть связаны с псевдотипированием вируса везикулярного стоматита с помощью белка GP вируса Эбола, что, по-видимому, изменяет тропность вируса к тканям организма. Изменения тропизма rVSV-GP, в свою очередь, могут объяснять накопление вируса в почках, селезенке и особенно в печени и крови, что, по-видимому, вызывает полиорганную недостаточность и гибель животных на второй день заражения. Важно отметить, что в органах и тканях мышей, инфицированных rVSV-GP, предварительно инкубированных с aEv6-Fc, вирус не обнаружен, что еще раз подтверждает вируснейтрализующую и защитную способность антитела. Таким образом, в нашем исследовании впервые была

показана возможность получения однодоменных антител и модифицированных производных из них, специфичных к поверхностному гликопротеину вируса Эбола и проявляющих высокую противовирусную активность на летальной модели мышей, инфицированных псевдотипированным вирусом везикулярного стоматита.

Кроме того, необходимо отметить, что в результате проведения исследований был разработан препарат ГамЭзумаб предназначенный для экстренной профилактики и этиотропной терапии болезни, вызванной вирусом Эбола на основе моноклональных антител. В настоящее время успешно завершены клинические исследования безопасности и фармакокинетики на здоровых добровольцах. Кроме того, выданы два патента на изобретение Патент РФ на изобретение RU 2 686630 C1 «Штаммы гибридных клеток животных *Mus. Musculus* - продуценты моноклональных антител к белку GP вируса Эбола (subtype Zaire) и моноклональные антитела к белку GP вируса Эбола (subtype Zaire)», Патент РФ на изобретение RU 2 644 202 C2 «Однодоменные антитела к белку GP вируса Эбола для иммунотерапии лихорадки Эбола».

В конце 2019 года весь мир столкнулся с пандемией, вызванной появлением нового коронавируса. Возбудителем нового заболевания оказался одноцепочечный РНК-содержащий вирус SARS-CoV-2, относящийся к семейству Coronaviridae, к линии Beta-CoV B.

Заболевание, которое вызывает SARS-CoV-2 получило собственное название COVID-19. Заболевание характеризуется острым течением и поражением респираторного тракта. Нередко у пациентов возникают осложнения в виде острого респираторного дистресс-синдрома, острой сердечной недостаточности, острой почечной недостаточности, септического шока, кардиомиопатии, и др. По состоянию на 6 октября 2024 года число зарегистрированных случаев COVID-19 превысило 770 млн и более 7 млн случаев COVID-19 закончились летальным исходом. Очевидно, что во всем мире в настоящее время есть острая необходимость в разработке безопасных и эффективных средств профилактики и лечения.

С начала пандемии несколько препаратов на основе моноклональных антител получали разрешение на экстренное использование для лечения COVID-19 и постконтактной профилактики. Так, в 2020 году FDA выдало разрешение на экстренное использование двух препаратов на основе моноклональных антител. 21 ноября 2020 года Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) выдало разрешение на экстренное использование (EUA) препарата REGEN-COV (Regeneron Pharmaceuticals), для лечения COVID-19 от легкой до умеренной степени у людей в возрасте от двенадцати лет и старше с массой тела не менее 40 кг (88 фунтов) с положительными результатами прямого тестирования на вирус SARS-CoV-2 и которые имеют высокий риск развития тяжелой формы COVID-19. Сюда входят лица в возрасте 65 лет и старше или лица, страдающие определенными хроническими заболеваниями. REGEN-COV состоит из двух моноклональных антител: казиривимаба (REGN10933) и имдевимаба (REGN10987), которые связываются с неперекрывающимися эпитопами S белка SARS-CoV-2. Результаты клинических исследований данного препарата показали, что он способен снижать вирусную нагрузку, с большим эффектом у пациентов, у которых иммунный ответ еще не был инициирован или у которых исходно была высокая вирусная нагрузка [Weinreich D. M. 2021].

Другой препарат на основе моноклонального антитела - бамланивимаб (LY-CoV555, разработчик: Eli Lilly) получил разрешение FDA на экстренное применение для лечения COVID-19 от легкой до умеренной степени тяжести у негоспитализированных взрослых и детей. Однако результаты клинических исследований неоднозначны. Среди госпитализированных пациентов с COVID-19 одновременное применение бамланивимаба с ремдесивиром не было эффективно (ACTIV-3/TICO LY-CoV555 Study Group) [Lundgren J. D. et al 2021]. Клинические исследования на амбулаторных пациентах показали, что только одна из трех доз исследуемого препарата (2800 мг LY-CoV555) достоверно ускоряла естественное снижение вирусной нагрузки. [Chen P. et al 2021].

Наилучший эффект наблюдался при комбинированной терапии двумя моноклональными антителами: бамланивимаб и этесевимаб [Gottlieb RL, 2021].

Основной механизм вируснейтрализующей активности антител связан с предотвращением проникновения вируса в клетки-хозяева. Проникновение вируса SARS-CoV-2 происходит в результате первичного взаимодействия гликопротеина S с клеточным рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2). Таким образом, S-гликопротеин, в частности его рецептор-связывающий домен (RBD), является привлекательной мишенью для разработки нейтрализующих антител. В нашем исследовании для получения однодоменных антител, обладающих вируснейтрализующей активностью мы иммунизировали двугорбого верблюда рекомбинантным белком RBD для последующего выделения и селекции наиболее активных клонов. Отдельно необходимо отметить, что в результате выполнения описанного этапа исследования, нами был создан стабильный продуцент рекомбинантного белка RBD, который не только использовался для получения иммунной библиотеки и селекции однодоменных антител, но также и для создания Набора реагентов для иммуноферментного выявления иммуноглобулинов класса G к рецептор-связывающему домену поверхностного гликопротеина S (spike) коронавируса SARS-Cov-2 «SARS-Cov-2-RBD-ИФА-Гамалеи», для которого было получено регистрационное удостоверение на медицинское изделие №РЗН 2020/10393 от 18 года 2020года. Разработанная тест-система активно применялась при проведении доклинических и клинических исследований препарата для профилактики коронавирусной инфекции «Гам-КОВИД-Вак» (также известная как Спутник V).

Для отбора панели RBD-специфических однодоменных антител нами была получена библиотека фаговых частиц, несущих на своей поверхности однодоменные антитела. Используя анализ микронейтрализации *in vitro*, мы идентифицировали три клона (P2C5, P5F8 и P2G1) обладающих наибольшей нейтрализующей активностью, которые полностью ингибировали

цитопатический эффект вируса SARS-CoV-2 при минимальных концентрациях от 12 нМ до 48 нМ.

На следующем этапе для повышения нейтрализующего потенциала выделенных однодоменных антител были созданы их модифицированные варианты - гомодимерные и гетеродимерные формы наиболее активных антител. Ранее было показано, что мультимерные конструкции на основе однодоменных антител могут иметь улучшенные характеристики по сравнению с их мономерными вариантами. [Saerens D 2008]. Например, димерная форма анти-TNF VHH была до 500 раз более активной, чем моновалентная форма, в модели ревматоидного артрита *in vivo* [Corpieters K 2006], димерные формы однодоменных антител к ботулиническому нейротоксину показали более высокую защитную активность *in vivo* [Godakova S. A., 2019]. В нашем исследовании мы выявили 200-кратное улучшение нейтрализующего потенциала гомодимерной формы однодоменного антитела P2C5. Двухвалентная молекула эффективно нейтрализовала вирус SARS-CoV-2 в концентрации 89 пМ. Также мы наблюдали выраженное увеличение нейтрализующей активности в случае гетеродимерной молекулы P2C5-P5F8, которая ингибировала вирус SARSCoV-2 в концентрации 178 пМ. В случае двухвалентной формы клона P5F8 наблюдалось лишь незначительное повышение активности. Мы предполагаем, что это может быть связано с моновалентным связыванием димера P5F8 с гликопротеином S, например, в результате недостаточной длины линкера, чтобы перекрыть расстояние между эпитопами в тримерном гликопротеине S.

Появление вариантов SARS-CoV-2, содержащих большое число мутаций в RBD привело к ускользанию вируса от нейтрализующих антител. Показано, что вируснейтрализующая активность сывороток, полученных от лиц, вакцинированных Pfizer/BNT162b2, Moderna/mRNA-1273 или Sputnik V, снижалась в случае штаммов B.1.351, B.1.1.28/P.1 и B. 1.617.2 вариантов по сравнению с вирусом дикого типа (Choi A., 2021; Gushchin V.A., 2021). Наиболее выраженное снижение вируснейтрализующей активности сывороток

наблюдалось при варианте B.1.1.529 (Омикрон) [Dolzhikova I.V., 2021; Rossler A., 2021]. Ускользящие мутации также представляют собой проблему и при разработке средств терапии на основе антител. Так, некоторые терапевтические антитела, проявляющие активность в отношении исходного штамма вируса SARS-Cov-2 стали неэффективными против некоторых вариантов вируса. Например, наблюдалось значительное снижение активности препарата бамланивимаб в отношении варианта Дельта, активность препаратов этесевимаб и касиривимаб в отношении Бета-варианта [Planas D., 2021]. Вариант Омикрон ускользает от активности большинства нейтрализующих антител. Несколько моноклональных антител полностью утратили ингибирующую активность в отношении Омикрона, включая бамланивимаб, этесевимаб, касиривимаб, имдевимаб и регданвимаб [Planas D, Saunders N., 2021; VanBlargan L.A., 2021].

В нашей работе мы провели исследование активности выделенных однодоменных антител и их мультимерных форм с помощью анализа микронейтрализации различных вариантов вируса SARS-CoV-2. В результате проведенного анализа было обнаружено, что гетеродимер P2C5-P5F8 эффективно нейтрализовал все протестированные варианты вируса в низкой концентрации, включая варианты Дельта и Омикрон. В частности, было обнаружено, что эта молекула P2C5-P5F8 полностью ингибирует цитопатический эффект при смешивании с вирусами вариантов Альфа, Бета, Гамма, Дельта и Омикрон в концентрациях 89 пМ, 356 пМ, 356 пМ, 2,85 нМ и 709 пМ соответственно.

Таким образом, были отобраны клоны VHH, обладающие высоким сродством к рецептор-связывающему домену RBD гликопротеина S и обладающих нейтрализующей активностью в отношении различных штаммов вируса SARS-Cov-2 за счет блокирования связывания вируса с ACE2 рецептором на поверхности клеток хозяина. Кроме того, на основе отобранных клонов, были получены различные модификации молекул VHH, для ряда из которых продемонстрировано значительное усиление нейтрализующего

потенциала молекул. Для дальнейшей работы с целью разработки средства экстренной профилактики и этиотропной терапии COVID-19 была использована молекула P2C5-Fc, показавшая наибольшую нейтрализующую активность *in vitro* на различных штаммах, включая Омикрон вариант B.1.1.529.

Итогом данной научно-исследовательской работы явилось создание препарат «ГамКовиМаб» на основе нейтрализующих антител для экстренной профилактики и этиотропной терапии заболевания COVID-19. В настоящее время успешно проведен полный спектр доклинических исследований безопасности и эффективности препарата на различных моделях животных, успешно завершено «Открытое исследование безопасности и фармакокинетики лекарственного препарата для ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, при однократном применении у здоровых добровольцев в 3 группах с эскалацией дозы». В результате исследования препарат ГамКовиМаб признан безопасным. В настоящее время проводится «Открытое исследование безопасности и описания параметров эффективности лекарственного препарата для экстренной профилактики и ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, при однократном применении у пациентов с верифицированным диагнозом COVID-19» (NCT05729360). По результатам проведенного исследования планируется подача документов на регистрацию препарата ГамКовиМаб для медицинского применения.

В отношении бактериальных мишеней возможности терапевтического использования однодоменных антител были исследованы на ботулотоксине *A. C. botulinum* - анаэробная грамположительная бактерия. Выделяемый ею токсин относится к нейротоксинам. Ботулинический токсин (БТ) проникает в организм энтерально и вызывает вялые параличи периферических нервов. Известно 7 серотипов ботулинического токсина (A, B, C, D, E, F, G). Все они являются антигенно разнородными, используют разные, но взаимосвязанные механизмы действия и не могут быть взаимозаменяемыми. Вспышки ботулизма чаще всего вызваны токсином типа A, реже – типами B, C, E и F. Токсин D вызывает

заболевания только у животных и водоплавающих птиц [Sobel J., 2009]. По другим данным, типы С, D и E вызывают болезнь у млекопитающих, птиц и рыб [Chatham-Stephens K., 2017]. БТ – наиболее токсичное из всех известных на сегодняшний день веществ (как природного, так и синтетического происхождения). Его относительная токсичность для человека при попадании через дыхательные пути составляет ЛД<sub>50</sub> = 0,00002 мг мин/л, а при попадании в организм с пищей ЛД<sub>50</sub> = 0,0000057 мг/кг [Domingo R. M., 2008].

Наиболее распространенными формами природного ботулизма являются пищевой, раневой и младенческий [Sobel J., 2005]. Пищевой ботулизм возникает при употреблении продуктов, содержащих ботулотоксин либо споры *C.botulinum*. Летальность при ботулизме достигает 5–10% в развитых странах (по сравнению с 60–70% до 1950 г.). Раневой ботулизм возникает при контакте открытой раны со спорами *C. botulinum*, и летальность составляет примерно 10–15% пациентов даже при агрессивном лечении. Детский кишечный ботулизм возникает при проглатывании спор и их распространении по пищеварительному тракту, поскольку у младенцев отсутствует защитная флора взрослых, при этом уровень летальности оценивается менее чем в 1–2%. Ингаляционный ботулизм не встречается в природе и может возникать в контексте биотеррористической угрозы [Goonetilleke A., 2004]. Среди четырех основных патогенных ботулинических токсинов человека (BoNT/A, B, E и F) BoNT/A представляет собой наиболее серьезную проблему для лечения из-за его чрезвычайно высокой токсичности. На сегодняшний день, пациентам с подозрением на ботулизм проводят интенсивную терапию, в том числе включающую введение лошадиного иммуноглобулина. Данный препарат имеет доказанную эффективность, однако при его использовании существует риск развития осложнений (сывороточная болезнь, анафилактический шок). Также для профилактики и терапии ботулизма применяли инактивированный анатоксин BoNT/A-E пентасеротипа [Graham, R 1929]; однако его использование было прекращено из-за снижения эффективности [<https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm6042a3.htm>]. У других

больных лечение ботулизма в основном поддерживающее, а механическая вентиляция легких является единственным эффективным средством спасения жизни [Nantel, A.J., 1999].

Пути снижения побочного действия иммунобиологических лекарственных препаратов при сохранении их эффективности регулярно рассматриваются учеными и исследователями в разных сферах их применения. Не исключением является и лечение пациентов с токсикоинфекцией, вызванной ботулиническим токсином. Учитывая то, что применяемый в медицинской практике ботулинических антитоксин при своей хорошей эффективности имеет ряд побочных эффектов становится очевидной необходимость либо совершенствования таких препаратов, либо разработка других лекарственных средств, лишенных указанных недостатков. В связи с этим, получение моноклональных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении ботулотоксина и при этом, низкой иммуногенностью для человека является актуальной задачей. Специфические антитела являются перспективным инструментом для нейтрализации ботулинического токсина. Описаны и протестированы подходы к получению, селекции, комбинированию и модификации мАТ против ВоNT/A в различных исследованиях [Wu H.C., 2001; Nowakowski A., 2002].

В нашем исследовании был предложен способ выделения однодоменных антител, нейтрализующих ботулотоксин из иммунной библиотеки альпака и создания на их основе препарата для терапии интоксикации ботулотоксином. Для получения иммунной библиотеки в нашем исследовании в качестве иммуногена использовали анатоксин, состоящий из токсина ВоNT/A и небольшого количества гемагглютиниана (НА) в качестве антигена. При этом на этапе селекции использовали две стратегии селекции методом фагового дисплея специфических антител против ботулотоксина А: с использованием ВоNT/A в нативной конформации и ботулотоксина денатурированного добавлением дитиотреитола (ВоNT/A-DTT). Примечательно, что нейтрализующие клоны были отобраны при использовании денатурированного

антигена VoNT/A-DTT. При этом, следует отметить, что при последующем дополнительном скрининге эти нейтрализующие клоны позже были обнаружены и в библиотеке с нативным антигеном VoNT/A. Всего было исследовано около 300 клонов из библиотек VoNT/A-DTT и более 1000 клонов из библиотек VoNT/A. Подход разделения токсина на его тяжелую HC и легкую LC цепи путем денатурации, по видимому, приводит к обогащению содержания нейтрализующих клонов в библиотеке. На основании их нейтрализующей активности при предварительном смешивании с различными дозами токсина LD<sub>50</sub> были отобраны два клона. Интересно, что все клоны с нейтрализующей активностью не имели самых высоких сигналов в ИФА, что свидетельствует о том, что высокая чувствительность метода ИФА с использованием отобранных антител к мишени не всегда означает их высокую нейтрализующую и защитную активность в экспериментах *in vivo*.

Следующим шагом было получение и очистка VNH в форме белка для проверки их нейтрализующей активности *in vivo*. В эксперименте с использованием однодоменных антител в форме мономера была обнаружена слабая защитная эффективность. Даже при смешивании антител в количестве 100 мкг с токсином в дозе 5LD<sub>50</sub> выживаемость животных сохранялась на уровне 50–75%. Введение более низких доз антител не приводило к защите животных. Для усиления защитных свойств отобранных антител, мономерные молекулы B11 и G3 были модифицированы для увеличения их фармакокинетики и эффекторных свойств, реализуемых через Fc-фрагмент иммуноглобулина. Увеличение размера VNH за счет олигомеризации — соединения двух или более VNH через специфический линкер — приводило к повышению протективных свойств таких молекул, однако скорость выведения бивалентных конструкций из системной циркуляции при введении в организм остается высокой - около 30 минут и 2 часов для мономерной и димерной конструкций, соответственно. Другим подходом, реализованным в рамках проводимого исследования, было слияние мономерных молекул VNH с Fc-фрагментом иммуноглобулина G человека. В литературе описаны конструкции

антител, слитых с Fc-фрагментами для увеличения фармакокинетики на модели нейтрализации коронавируса ближневосточного респираторного синдрома (БВРС-КоВ) [Raj V., 2018], антител, специфических хемокиновому рецептору С-Х-С типа 4 (CXCR4) вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1) при подавлении проникновения и репликация вируса *in vitro* [Bobkov V., 2018], а также усиление эффекторных функций антител, нейтрализующих ротавирус [McEwan W. A 2013]. Следует отметить, что похожий подход для эффективного клиренса ботулотоксина из сыворотки описан ранее в работе Сепульведа и др. [Sepulveda J., 2010], однако был показан с использованием одноцепочечных антител (scFv) в качестве связывающих белок агентов, связанных с антителами к Fc-фрагменту. При введении различных вариантов таких конструкций одновременно, мыши были защищены от высоких доз LD50 ботулотоксина. При этом сам ботулотоксин BoNT/A быстро выводился из системной циркуляции. Полученные данные могут свидетельствовать о том, что слияние переменных доменов неканонических антител с Fc-фрагментом иммуноглобулина в случае ботулотоксина может повышать защитные свойства антител не только за счет увеличения фармакокинетики, но и за счет способности эффективно удалять токсин из системной циркуляции в сыворотке крови.

В нашем исследовании два выбранных клон были димеризованы с помощью линкера (Gly4Ser)<sub>3</sub> или слиты с Fc-фрагментом IgG человека, для стабилизации молекулы и увеличения времени циркуляции в организме. Использование указанных модификаций значительно увеличило протективную активность препаратов. Так, использование димерных молекул позволило достичь защитного эффекта при более низких дозах по сравнению с мономерами VHH. В частности, защитная эффективность на уровне 75–50% наблюдалась при введении димерных антител в дозах 50 и 20 мкг для клонов G3 и B11, соответственно. Наилучшие результаты были получены после слияния VHH с Fc-фрагментами, что согласуется с предыдущими исследованиями. Оба клон полностью защищали мышей при введении антител

в дозе 0,1 мкг. Защита, обеспечиваемая G3-Fc, была вдвое меньше при дозе 0,01 мкг, а дозе 0,001 мкг защиты не наблюдалось. При этом, клон B11-Fc продемонстрировал полную защиту вплоть до самой низкой испытанной дозы 0,001 мкг. Таким образом, оба клона с Fc-фрагментами показали по крайней мере 1000-кратное улучшение защитной активности по сравнению с обычными мономерами VHN и димерами.

Кроме того, анализ фармакокинетики различных модификаций антител показал, что клоны B11 и G3, содержащие Fc-фрагмент IgG, обнаруживались в сыворотке крови мышей через 14 суток после однократной инъекции, что подтверждается полной или частичной защитой животных от введения токсина через 14 суток после введения различных доз B11-Fc и G3-Fc. Анализ профилактической эффективности, а также возможного лечения интоксикации ботулотоксином путем введения B11-Fc и G3-Fc за один час и за три часа до и после заражения токсином в дозе 10 LD<sub>50</sub> показало, что оба клона полностью защищали мышей до введения токсином, а также через один час после введения. При этом, защиты мышей при введении антител через три часа после введения токсина не наблюдалось, что позволяет предположить, что эти клоны можно использовать для профилактики и экстренной терапии сразу после введения токсина. Это соответствует результатам, полученным ранее Sepulveda et al. [Sepulveda J., 2010], показывающие, что мыши, получавшие scFv, слитые с Fc-фрагментами были защищены только при введении антител через два часа после интоксикации, тогда как через четыре часа летальность после введения токсина лишь наступала позже.

Отдельным результатом исследования возможности применения однодоменных антител для терапии интоксикации ботулотоксином можно выделить разработку методологии оценки нейтрализующей активности отобранных антител *in vivo* в формате применения рекомбинантных фаговых частиц при их предварительном смешивании с токсином, что представляется новым удобным методом скрининга нейтрализующих VHN перед получением

их в белковой форме, что может значительно сократить время и затраты на их производство и испытания.

В результате реализации описанного исследования был разработан препарат для экстренной профилактики и терапии интоксикации ботулотоксином. В настоящее время завершены доклинические испытания безопасности и эффективности препарата, а также запланировано клинические исследования Фазы 1 на здоровых добровольцах в 2024 году. Антитела, полученные при проведении научно-исследовательской работы легли в основу двух Патентов на изобретения: Патент РФ RU 2766348 С1 «Однодоменное антитело и его модификации, специфически связывающиеся с ботулиническим нейротоксином типа А, и способ их применения для терапии или экстренной профилактики интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А» и Патент РФ 2768044 С1 «Экспрессионный вектор на основе аденоассоциированного вируса, обладающий защитными свойствами против интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А».

В качестве еще одной модели для оценки возможности применения однодоменных антител для терапевтического использования, был выбран токсин *C.difficile*. Как известно, *Clostridioides difficile* в настоящее время выделяют в качестве ключевого этиологического агента антибиотикоассоциированного псевдомембранозного колита (ПМК) [Bartlett et al. 1978; George et al. 1978]. ПМК — тяжелое воспалительное заболевание толстой кишки, характеризующееся образованием псевдомембран, состоящих из некротических эпителиальных клеток, фибрина, слизистых и лейкоцитов. Кроме этого, известно что *C. difficile* может вызывать у людей целый спектр клинических состояний, известных под общим названием инфекции, вызванные *C. difficile* (ИКД), которые могут быть как легкой и, возможно, рецидивирующей диареей до угрожающих жизни осложнений, таких как ПМК, токсический мегаколон и перфорация толстой кишки [Martin, Monaghan and Wilcox, 2016].

Несмотря на то, что некоторые факторы вирулентности ассоциированы с прикреплением и колонизацией *C. difficile*, симптомы ИКД коррелируют с продукцией двух экзотоксинов: токсина А (TcdA) и токсина В (TcdB) [Awad et al. 2014]. Индивидуальная роль и относительная важность TcdA и TcdB в патогенезе заболеваний, вызванных *C. difficile* остается предметом активных исследований. В частности, было показано, что TcdB нарушает целостность эпителия и вызывает повреждение тканей в эксплантатах толстой кишки человека и в модели химерных мышей, которым были трансплантированы ксенотрансплантаты кишечника человека [Savidge et al. 2003]. В модели ксенотрансплантата введение либо TcdA, либо TcdB выявило отличительные черты ИКД, такие как повышенная проницаемость слизистой оболочки и секреция жидкости, продукция цитокинов, рекрутирование нейтрофилов и повреждение тканей [Savidge et al. 2003]. Кроме того, недавние клинические испытания III фазы показывают, что безлотоксумаб, моноклональное антитело, нейтрализующее TcdB, может снижать частоту рецидивов ИКД у пациентов [Wilcox et al. 2017]. В целом эти исследования показывают, что TcdB играет важную роль в патогенезе *C. difficile* у людей.

В нашем исследовании в качестве мишени для получения однодоменных антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении TcdB использовали нетоксичный CROPS домен токсина В *C. difficile*. Исторически связывание TcdB с рецептором было связано именно с доменами CROPS, расположенными на С-концах TcdA и TcdB. Область CROPS содержит множественные короткие повторы (SR) из 19–24 аминокислот, перемежающиеся с четырьмя-семью длинными повторами (LR) из 31 остатка [von Eichel-Streiber and Sauerborn, 1990; von Eichel-Streiber et al., 1992]. Идея о том, что CROPS домен может обеспечивать связывание с рецептором, возникла в результате исследований, показывающих, что CROPS TcdA может связывать углеводы, присутствующие в гликоконъюгатах мембраны клеток млекопитающих [Krivan et al., 1986; von Eichel-Streiber and Sauerborn, 1990; Tucker and Wilkins, 1991; Pothoulakis et al. и др., 1996; Тенеберг и др., 1996;

Греко и др., 2006; Дингл и др., 2008; Эль-Хавиет и др., 2011]. Дополнительные доказательства, подтверждающие роль домена CROPS в связывании с рецептором, включают исследования того, что (i) выделенный домен CROPS из TcdA может связываться с клетками-хозяевами [Frisch et al. 2003; Olling et al. 2011], (ii) избыток CROPS TcdA конкурирует с голотоксином в анализах связывания и цитопатического действия на клетки [Sauerborn, Leukel and von Eichel-Streiber, 1997; Frisch et al., 2003; Olling et al., 2011], и (iii) домен TcdA является высокоиммуногенным, и антитела, специфичные CROPS могут блокировать связывание TcdA с клетками и подавлять цитотоксичность [Lyerly et al., 1986; Sauerborn, Leukel and von Eichel-Streiber, 1997; Кро и др., 2017]. В отличие от домена CROPS в TcdA, доказательства связывания углеводов с помощью CROPS домена TcdB ограничены одним исследованием, проведенным с помощью анализа связывания с помощью масс-спектрометрии [Dingle et al., 2008]. Однако роль CROPS TcdB в связывании с рецептором подтверждается исследованием, в котором показано, что моноклональное антитело безлотоксумаб, нейтрализующее TcdB, специфично связывающееся с CROPS доменом, блокирует связывание токсина с клеткой-хозяином (Orth et al. 2014). В соответствии с этим недавнее исследование идентифицировало хондроитинсульфатпротеогликан 4 (CSPG4) в качестве рецептора для TcdB [Yuan et al. 2015], а связывающее взаимодействие было идентифицировано на N-конце CROPS домена [Yuan et al. 2015; Тао и др., 2016].

В результате проведенного исследования нами были отобраны *методом фагового дисплея* однодоменные антитела, специфично связывающиеся с CROPS доменом TcdB *S. difficile*, которые показали не только высокое сродство к мишени но и изучена их нейтрализующая активность на культуре клеток *in vitro*. Для клонов, показавших наибольшую нейтрализующую активность, проведена модификация, позволившая значительно улучшить терапевтический потенциал отобранных молекул. Максимальная активность наблюдалась у гомодимеров C7.2 и A3.2, гетеродимера A3.2-C7.2. Полученные

результаты могут быть использованы для создания средства терапии инфекции, вызванной *C. difficile*.

В продолжении исследования возможности применения технологии однодоменных антител для разработки средств диагностики на модели инфекции *M. hominis*, нами была поставлена научная задача оценить, можно ли использовать полученные нами антитела аMh06 для терапии инфекции, вызванной *M. hominis in vivo*.

Идентифицированный нами антиген, с которым связываются аMh06, представляет собой субстрат-связывающий белок ABC-транспортера *M. hominis*. Белковые комплексы ABC-транспортеров обладают различной субстратной специфичностью, но, в целом, являются важными факторами вирулентности. Более того, они представлены на поверхности микоплазменных клеток в большом количестве и составляют от 58,8% до 91,7% всех белков у различных видов микоплазм [Blanchard и др., 1996]. Показано их участие в процессах, как транспорта веществ, так и адгезии к эукариотическим клеткам. Значительная часть исследователей сходится на том, что ABC-транспортеры могут выступать в роли потенциальных мишеней для создания средств терапии микоплазменных инфекций [Blanchard и др., 1996; Parvege, Rahman, Hossain, 2014]. Тем не менее, до сих пор не удавалось получить антитела или какие-либо другие агенты, ингибирующие или блокирующие функции ABC-транспортеров у микоплазм. Однако антитела, обладающие блокирующим действием на ABC-транспортер *Staphylococcus aureus*, оказывают бактерицидное действие и входят в состав препарата Aurograb® (Novartis). Поэтому, мы предположили, что аMh06 могут обладать аналогичным эффектом в отношении *M. hominis*.

Как и в случае модели ботулотоксина в исследовании с однодоменными антителами аMh06 нами было принято решение о модификации мономерной молекулы и, в частности, получения антитела, слитого с Fc-фрагментом иммуноглобулина. В случае микоплазменной инфекции такая модификация решает сразу несколько задач. Во-первых, как уже обсуждалось ранее, терапевтическое использование VHH ограничено их малым размером, что

приводит к быстрому выведению их из организма, а также отсутствием эффекторных функций, реализуемых через Fc-фрагмент канонических антител. Во-вторых, для эффективной терапии урогенитальных инфекций требуется локальное повышение концентрации терапевтического агента на слизистой генитального тракта, и, как правило, терапия должна проводиться в течение длительного времени, чтобы избежать рецидивов. Для решения указанных задач нами использовался комплексный подход. Мы сконструировали молекулу aMh06, слитую с Fc-фрагментом иммуноглобулина G2a мыши в составе рекомбинантного аденовируса человека 5 серотипа. Вектора на основе аденовируса 5 серотипа являются одними из наиболее охарактеризованных и показавших свою безопасность более чем в 300 клинических испытаниях. Стоит отметить, что использование рекомбинантных аденовирусов в работах с урогенитальными инфекциями до сих пор было ограничено генетической вакцинацией, то есть доставкой антигенов для выработки иммунитета [Zhang и др., 2012].

Разработанный нами препарат Ad-PLAP-aMh-FcG2a был использован для лечения экспериментальной вагинальной инфекции мышей. Однократное системное введение аденовирусного препарата обеспечивало секрецию aMh-FcG2a на слизистую оболочку генитального тракта и снижение титра *M. hominis* в вагинальных смывах больных мышей. Положительный эффект наблюдался как в профилактическом, так и в терапевтическом режиме введения рекомбинантного аденовируса. Причем относительно низкая вводимая нами доза аденовирусных частиц обеспечивала достаточную экспрессию aMh-FcG2a. Таким образом, в области терапии урогенитальных бактериальных инфекций, вызванных *M. hominis*, нами впервые был успешно использован препарат рекомбинантных аденовирусных частиц, вводимых системно, и обеспечивающих экспрессию и секрецию в просвет урогенитального тракта VHH-Fc, специфически взаимодействующих с субстрат-связывающим белком ABC-транспортера *M. hominis* и снижающих титр патогена в профилактическом и терапевтическом режиме введения.

Антитела, полученные при проведении научно-исследовательской работы, легли в основу Патента на изобретение № 2562158 «Рекомбинантная псевдоаденовирусная частица, продуцирующая модифицированные наноантитела, узнающие микоплазму *M. hominis*, фармацевтическая композиция на ее основе и способ ее использования для терапии микоплазмозов».

Во второй части исследования, в качестве инфекционных моделей для изучения возможности применения платформы однодоменных антител в диагностических целях были выбраны бактериальные антигены *M. hominis* и *C. difficile*.

На этапе получения и селекции специфических к *M. hominis* VHH принципиальное значение имел выбор антигенного материала для иммунизации животных. Микоплазмы лишены клеточной стенки, поэтому их контакт с окружающей средой и эукариотическими клетками, а также все активные системы транспорта веществ и поддержания осмотического баланса осуществляется комплексами липопротеинов, интегрированных в мембрану клетки микоплазмы. Возможно, что именно этой структурной особенностью объясняется тот факт, что массовая доля белков в наружной оболочке некоторых микоплазм достигает 1/3, а мембранные белки составляют около половины всех белков микоплазм [Liu и др., 2012] [Cacciotto и др., 2010]. Помимо этого, значительная часть липопротеинов микоплазм ацетируется и представляет собой патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, являющиеся лигандами для рецептора врожденного иммунитета TLR2 [Reutter и др., 2005]. Поскольку в последнее время все большее внимание уделяется новым поколениям адъювантов на основе лигандов рецепторов врожденного иммунитета, то это свойство ЛАМБ позволяет рассматривать их в качестве молекулярных адъювантов, усиливающих ответ при иммунизации [Basto, Leitão, 2014; Weigt и др., 2003]. Можно предположить, что ЛАМБ при введении в организм вызывают иммунный ответ, обусловленный как белковой природой вводимых антигенов, так и стимуляцией врожденного иммунитета ацетилированными липопептидами. В связи с вышеперечисленными

свойствами в качестве иммуногена для получения специфических VHH к *M. hominis* в настоящем исследовании использовали ЛАМБ микоплазмы.

В результате проведенной работы, включающей выделение и очистку антигена, получение иммунной библиотеки неканонических антител верблюдовых, селекции специфических неканонических антител методом фагового дисплея были выделены антитела (клон aMh06) специфически взаимодействующие с антигенной детерминантой, присутствующей только во фракции ЛАМБ, но не во фракции растворимых белков *M. hominis*. Методом масс-спектрометрии удалось идентифицировать специфический - субстрат-связывающий белок ABC-транспортера. В литературе не описано ни VHH, ни антител какого-либо иного формата, которые способны взаимодействовать с этим белком, более того не описано таких антител и для аналогов этого белка у других видов микоплазм родственной группы. Подобная уникальная специфическая активность антител aMh06 легла в основу последующей работы по изучению их потенциала для диагностического и терапевтического использования.

VHH фрагменты характеризуются соизмеримой с каноническими антителами аффинностью взаимодействия с мишенью, однако, они обладают низкой авидностью ввиду их однодоменной структуры. Кроме того, отсутствие Fc-фрагмента не позволяет использовать вторичные антитела в качестве конъюгата, что в ряде диагностических приложений может существенно снижать чувствительность метода обнаружения с использованием VHH в качестве первичных антител. Однако, благодаря простоте модификаций однодоменных антител, для увеличения их как диагностического, так и терапевтического потенциала можно применять различные подходы, направленные на увеличение авидности, фармакокинетики, чувствительности в качестве диагностикумов и тд.

В части создания молекулы на основе однодоменного антитела, специфического к ЛАМБ *M. hominis* для диагностического применения был использован принцип олигомеризации для увеличения количества сайтов

связывания с антигеном. Существует много разнообразных методов для осуществления данного подхода, которые можно условно разделить на 2 основные группы: олигомеризация на уровне гена, кодирующей полипептидную последовательность и олигомеризация на пост-трансляционном уровне. Второй подход основан на присоединении к антиген-распознающим последовательностям доменов, образующих олигомеры. После транскрипции полипептидные последовательности олигомеризуются за счет присоединенных доменов. Этот подход также можно использовать для мультимеризации последовательностей, связывающих различные антигены (то есть для сборки гетероолигомеров). На сегодняшний день описано большое количество олигомеризующихся доменов, таких как: участки константных доменов иммуноглобулинов, лейциновые zipper, амфипатические спирали и другие. Главным недостатком этого подхода является тенденция к агрегации подобных комплексов и динамический характер ассоциации и диссоциации. Использование различных подходов позволяет мультимеризовать от 2 до 10 молекул, но ни одно из существующих решений не является универсальным. В нашей работе мы использовали изолейциновый zipper для олигомеризации aMh06 (VНН06), так как в предшествующих работах нашего коллектива уже был получен положительный опыт олигомеризации специфических к вирусу гриппа VНН с использованием именно этого мотива [Tillib и др., 2013; Tutykhina и др., 2013]. Кроме того, в литературе имеются данные об огромном практическом опыте оптимизации продукции растворимых молекул антител (преимущественно scFv), но значительная часть таких разработок является частными примерами или же коммерческой тайной биотехнологических компаний. Тем не менее, одним из эффективных и общедоступных направлений в этой области является экспрессия рекомбинантных белков, слитых с белками носителями, которые значительно повышают растворимость комплексной молекулы рекомбинантного белка. Так, мальтоза-связывающий белок позволяет не только увеличить растворимость рекомбинантного продукта, но и может быть использован в качестве альтернативного «tag» для

аффинной очистки [Alzogaray и др., 2011; Zhang и др., 2014]. В нашем случае нам удалось успешно реализовать преимущества этого подхода. Использование мальтоза-связывающего белка также подразумевает возможность удаления его с использованием специальных протеаз, но и без этого MBP-aMh06-ILZ-NA сохраняет свои антигенсвязывающие свойства.

В данной работе мы продемонстрировали возможность использования препаратов на основе aMh06 для создания диагностикумов на основе классического иммуноферментного анализа, а также для окрашивания отпечатков колоний микоплазм на стеклах и иммуноцитохимии клеток, зараженных *M. hominis*. Важно отметить, что контаминация микоплазмами клеточных культур в научных лабораториях носит повсеместный характер и методы прямой детекции микоплазм пока ограничены использованием неспецифических ДНК-интеркалирующих красителей (например, DAPI), поэтому использование новых специфических иммуноцитохимических методов окрашивания является актуальной задачей на уровне лабораторной практики [Chernov и др., 2014]. Эти подходы являются общепризнанными и широко используются в диагностике инфекционных заболеваний, однако до сих пор, из-за отсутствия специфических антител, не применялись для идентификации микоплазм.

В последние годы наблюдается тенденция к созданию диагностикумов, использующих в своей основе высокотехнологичные методические и инструментальные подходы. Нами была продемонстрирована возможность использования препаратов на основе aMh06 для идентификации *M. hominis* методом проточной флуориметрии. Аналогичный подход уже широко используется в практической диагностике для определения цитокинового статуса и иммунофенотипирования клеток. Необходимое оборудование уже широко представлено в клинических лабораториях. Имеется несколько недавно опубликованных работ, в которых авторы продемонстрировали эффективное использование антител для детекции бактериальных патогенов методом проточной флуориметрии, например, для идентификации уропатогенной *E.coli*

O157:H7 [Chen и др., 2015]. Главной перспективой использования препаратов на основе aMh06 для этого подхода, является возможность создания мультиплексных диагностикумов, которые позволили бы быстро и точно проводить характеристику видового и количественного состава микрофлоры образцов вагинального происхождения.

Таким образом, в данной работе было показано, что препараты на основе aMh06 могут успешно применяться для создания диагностических тест-систем, основанных на различных методологиях детекции, таких как: ИФА, окрашивание отпечатков колоний, иммуноцитохимическое окрашивание, проточная цитофлуорометрия.

В качестве мишени для второй модели, используемой для изучения возможности использования технологической платформы на основе однодоменных антител для создания диагностикумов, нами был использован токсин В *C. difficile* (*TcdB*). На сегодняшний день *C. difficile* рассматривается как основная причина внутрибольничных диарей. При этом, данные о частоте их встречаемости в странах мира разнятся, но чаще всего они распространены в экономически развитых государствах [Лобзин Ю.В. 2002]. Также следует учитывать, что статистические данные о распространении инфекций, вызываемых *C. difficile*, официально считаются неточными в связи с тем, что значительное количество внутри- и внебольничных диарей, связанных с применением антибактериальных препаратов не регистрируется [Лобзин Ю.В. 2002]. Диагностика *C. difficile*-ассоциированных болезней основывается на комплексном анализе анамнестических, клинических, лабораторных и эндоскопических данных. При этом ведущую роль играют специфические лабораторные методы, основанные на обнаружении самого возбудителя и его токсинов [Лобзин Ю.В. 2002]. Одним из самых чувствительных методов является цитотоксический тест на культуре клеток. Его чувствительность и специфичность составляет 98 и 99% соответственно [Малов В.А. 2002]. При наличии токсина (А и/или В) происходит изменение морфологии клеток за счет нарушения формирования цитоскелета. При этом, в случае присутствия

нейтрализующих антител цитотоксический эффект не наблюдается. Недостатками данной методики являются: длительное время анализа (24-72 часа) и трудоемкость [Малов В.А. 2002]

Также выявление *C. difficile* можно осуществить культуральным методом. Для этого используется специальная селективная среда СССФ, содержащая цефокситин, циклосерин, фруктозу. При выполнении культурального метода можно проводить идентификацию на основе исследования морфологии колоний, характерного запаха, окраски по Граму и желто-зеленой флуоресценции под УФ лучами (360 нм). Для подтверждения видовой принадлежности выделенного штамма используют биохимические тесты (наборы) или метод латекс-агглютинации. Чувствительность культурального метода составляет 89-100%, специфичность – 84-99%, время исследования – 24-72 часа [Лобзин Ю.В. 2002].

Еще одним распространенным методом является иммуноферментный анализ (ИФА). Он позволяет получить результат в течение нескольких часов, а его чувствительность и специфичность приближается к 100% [Лобзин Ю.В. 2002]. Разработаны модификации методики для выявления токсина А или токсинов А и В одновременно.

На основе ИФА получена тест-система, позволяющая определять глутаматдегидрогеназу (ГДГ) в течение 15-20 минут. Такой метод обычно используют в качестве скринингового, в связи с тем, что другие возбудители также способны продуцировать ГДГ. В дальнейшем ГДГ-положительные пробы следует проверять более специфическими тестами [Лобзин Ю.В. 2002].

Новым и перспективным методом для определения *C. difficile* является полимеразная цепная реакция (ПЦР) [Лобзин Ю.В. 2002]. Для этого используется метод амплификации специфических участков генома возбудителя, кодирующих токсин А и /или В. Имеется методика, позволяющая амплифицировать специфический участок гена, кодирующий токсин А, не дающий перекрестной реакции с ДНК штаммов *C. sordelii* [Лобзин Ю.В. 2002]. Коллективом авторов под руководством Kuhl S.J. разработан двухступенчатый

протокол ПЦР, в котором используются праймеры к участку 16S рибосомальной РНК *C. difficile* и участку гена, кодирующего токсин В [Лобзин Ю.В. 2002]. Однако у него имеется ряд недостатков: опасность ложноположительных результатов в связи с относительно невысокой специфичностью; необходимость специализированного оборудования и дороговизна.

Таким образом, любой из методов имеет как достоинства, так и недостатки, поэтому для оптимального определения *C. difficile*-ассоциированных болезней и их своевременной лабораторной диагностики необходимо применять несколько методик, для сопоставления их результатов [Лобзин Ю.В. 2002].

В нашей работе, были получены однодоменные антитела, обладающие высоким сродством к CROPS домену токсина В *C. difficile*. Выбор мишени был обусловлен не только принципом актуальности в целях диагностического применения антител, но и с точки зрения разработки средств иммунопрофилактики. Для указанных задач особый интерес представляет С-концевой участок TcdB, называемый доменом В или CROPs доменом. Он ответствен за взаимодействие молекулы токсина с рецепторами эукариотических клеток: хондроитин сульфат протеогликан 4 (CSPG4), а также представителями семейства Frizzled рецепторов (FZD). Перспективным подходом, позволяющим снизить вирулентность *C. difficile* является нейтрализация токсигенной активности TcdA и TcdB за счет связывания доменов CROPs. Блокирование взаимодействия токсинов с клеточными рецепторам способно предотвратить их токсигенное действие еще на внеклеточном этапе их присутствия в организме человека.

На предыдущем этапе исследования, мы изучили возможность использования однодоменных антител в диагностике бактериальной инфекции *M. hominis* различными методами, такими как ИФА, иммуноблоттинг, метод иммуноцитохимии, проточной цитофлуориметрии.

На модели токсина В *C. difficile* мы изучили возможность применения однодоменных антител для создания биосенсоров, основанных на методе

плазмонного резонанса. Поверхностный плазмонный резонанс (ППР) — это возбуждение поверхностного плазмона на его резонансной частоте внешней электромагнитной волной в тонком слое проводящего материала, который помещен между двух сред с разными показателями преломления [Перлин Е.Ю 2008].

Применение биосенсоров с использованием метода поверхностного плазмонного резонанса (ППР) имеет большой потенциал в области медицинской диагностики, продовольственной безопасности при выявлении пищевых патогенов и токсинов, мониторинга окружающей среды для установления загрязнений и ряде других областей науки, в том числе и фармацевтической. В настоящее время явление ППР широко применяется при создании химических и биологических сенсоров (биосенсоров) [Перлин Е.Ю 2008]. При контакте с биообъектами (ДНК, вирусы, антитела) плазмонные эффекты позволяют более чем на порядок увеличить интенсивность сигналов флуоресценции. Это дает возможность активно использовать такую при обнаружении и идентификации биологических объектов [Перлин Е.Ю 2008]. Метод ППР является удобным инструментом при определении констант взаимодействия антител со специфическими антигенами [Сотников Д.В. 2015]. Метод детекции межмолекулярных взаимодействий по изменению плазмонного резонанса имеет существенное преимущество благодаря отсутствию необходимости использовать флуоресцентные метки или ферментативные реакции для визуализации. Еще одним его преимуществом является то, что связанные с детектором молекулярные комплексы можно затем анализировать соответствующими способами, например, масс-спектрометрией [Сотников Д.В. 2015].

В области медицины определение биомаркеров методом ППР позволяет идентифицировать заболевания на ранней стадии, еще до появления симптомов. Также обнаружение биомаркеров в биологических жидкостях помогает определить предрасположенность к заболеванию [Vaisocherová Н., 2006]. Например, для диагностики рака простаты определяют

простатоспецифический антигена [Vaisocherová H., 2006]; орофарингеальной плоскоклеточной карциномы - интерлейкин-8 [Vaisocherová H., 2006]; для раннего выявления поражений миокарда - тропонин I и миоглобин [Сотников Д.В. 2015]. Существуют сенсоры для определения противоинсулиновых аутоантител (маркеров сахарного диабета I типа) для дифференциальной диагностики диабета I и II типа, изучения состояния иммунорезистентности [Бураковский А. И. 2008].

Также данная методика позволяет определять наличие техногенных загрязнителей, патогенных бактерии и токсинов. Среди бактериальных патогенов определяют *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, *Yersenia enterocolitica* and *Escherichia coli* O157:H7 [Dostálek J., 2006]. Имеются данные об определении наличия домоевой кислоты (нейротоксина, выделяемого *Pseudonitzshia pungens*), стафилококковых энтеротоксинов [Nedelkov D., 2000], микотоксинов [Tüdös A. J. 2003],  $\beta$ -токсина *Clostridium perfringens* [Hsieh H. V. 1998]. В работе [Гойстер О. С. 2009] предложено использование оптического иммунного биосенсора с эффектом поверхностного плазмонного резонанса для экспрессного определения трихотеценового микотоксина Т-2 в растворах. Разработан метод, позволяющий определить за короткий срок (в течение 10 минут) содержание дифтерийного и коклюшного токсинов, а также антител против них в биологических средах [Vaisocherová H., 2006].

На основе принципа поверхностного плазмонного резонанса разработаны биосенсоры для выявления спор возбудителя сибирской язвы [Wang D.В. 2009] и холерного вибриона O1 серогруппы. Wilkor и соавторы, 2004 также использовали такой сенсор для обнаружения антител против холерного токсина. Иммуобилизацию токсина проводили путем сочетания метода микропечати и ковалентной связи белка с NHS-активированным концевыми группами на самоорганизующийся монослой тиолов. Определение проводили при концентрации антител 10 - 100 мг/мл. [Vaisocherová H., 2006]. Ladd J . и соавторы (2006) разработали биосенсор на основе сэндвич-анализа с поликлональными антителами, иммобилизованными с помощью биотин-

стрептавидин взаимодействий. Методика позволяет выявлять ботулотоксин серотипов А, В и F. Минимальные концентрации, обнаруженные в буфере, были 1 нг/мл, 1 нг/мл и 0,5 нг/мл соответственно.

Таким образом, применение поверхностного плазмонного резонанса активно используется в биомедицинских исследованиях. Применение сенсоров на основе ППР становится одним из основных подходов при исследовании разнообразных межмолекулярных взаимодействий. Они позволяют регистрировать взаимодействия между практически любыми молекулярными объектами в широком диапазоне концентраций. ППР-биосенсоры имеют очень высокую точность, воспроизводимость и чувствительность, что и обуславливает их активное применение в фундаментальных и прикладных исследованиях.

В результате проведенной работы в нашем исследовании были получены оригинальные однодоменные антитела к CROPS домену токсина *B. C. difficile*, на основе которых были созданы биосенсоры, предназначенные для обнаружения токсина методом плазмонного резонанса. При этом, как показали результаты исследования, благодаря высокой стабильности однодоменных антител, биосенсоры на их основе в отличие от канонических антител способны сохранять чувствительность после многократных циклов регенерации, что является существенным преимуществом.

Исследования по созданию биосенсоров были выполнены в рамках опытно-конструкторской работы «Создание тест-системы индикации и идентификации патогенных биологических агентов на основе однодоменных антител» при реализации федеральной целевой программы «Национальная система химической и биологической безопасности Российской Федерации (2015-2022 годы)». В результате исследования была создана тест-система «ОДНОДОМЕН-БИО» для индикации и идентификации патогенных биологических агентов на основе панели однодоменных антител на основе панели однодоменных антител, которая предназначена для специфической индикации и идентификации патогенных биологических агентов II–IV групп: 3

патогенов бактериальной природы (*Clostridioides difficile*, *Clostridium tetani*, *Clostridium botulinum*) и 1 патогена вирусной природы (вируса бешенства) методом плазмонного резонанса. На тест-систему разработана техническая документация и успешно проведены технические испытания.

Таким образом, в результате проведения исследования были получены уникальные однодоменные антитела на бактериальные мишени и показано, что такие антитела могут успешно применяться в качестве диагностикумов в различных приложениях как в виде мономерных молекулы, так и в виде модифицированных антител.

В целом, описанные исследования показали, что однодоменные антитела, благодаря особенностям своего строения, физико-химических свойств, широким возможностям по получению иммунных библиотек и последующей селекции, простоте генно-инженерных модификаций и подходов, направленных на усиление их специфической активности, могут быть эффективным инструментом при создании средств диагностики и терапии инфекционных заболеваний. В результате проведенного исследования была не только разработана универсальная технологическая платформа, позволяющая получать такие антитела, но и показана, как на вирусных так и на бактериальных мишенях, возможность создания на их основе препаратов для клинического использования.

## **Заключение**

В результате проведенного исследования был разработан и апробирован комплекс методических подходов (технологическая платформа), позволяющих создавать и тестировать препараты на основе однодоменных антител, направленных на борьбу с инфекционными заболеваниями человека. Разработанная технологическая платформа включает ряд оригинальных подходов, включающих разработку наиболее эффективных схем иммунизации верблюдовых (альпака, двугорбый верблюд) с использованием как рекомбинантных белков, так и рекомбинантных аденовирусных векторов, несущих гены целевого белка мишени и их комбинаций, позволяющих получать иммунные библиотеки неканонических однодоменных антител, характеризующихся большим разнообразием индивидуальных клонов; селекции однодоменных антител методом фагового дисплея с применением различных фагов-помощников; способов проведения элюции, позволяющих минимизировать содержание неспецифических фагов в библиотеке, а также применение различных модификаций, направленных на увеличения времени циркуляции антител в организме, усиление нейтрализующей активности и расширение спектра активности в отношении различных мишеней. Проведенные комплексные исследования показали перспективность использования технологической платформы на основе однодоменных антител для разработки средств экстренной профилактики и этиотропной терапии различных инфекционных заболеваний. В клинических исследованиях показано, что препараты на основе однодоменных антител обладают низкой иммуногенностью (отсутствие образования антител к препарату в течение всего срока наблюдения), длительной фармакокинетикой (за счет применения Fc-фьюжн модификаций), а также благоприятным профилем безопасности.

На 4 инфекционных моделях было установлено, что технологическую платформу можно эффективно использовать для разработки средств экстренной профилактики и терапии инфекционных заболеваний, вызванных как вирусными, так и бактериальными возбудителями. В частности, на модели

инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2, была показана возможность получения препарата (ГамКовиМаб), обладающего высокой нейтрализующей активностью, а также широким спектром нейтрализации различных вариантов вируса SARS-CoV-2, вызывающих опасение по классификации ВОЗ (VOC): альфа, бета, гамма, дельта и омикрон. В настоящее время завершены клинические исследования Фазы II «Открытое исследование безопасности и описания параметров эффективности лекарственного препарата для экстренной профилактики и ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, при однократном применении у пациентов с верифицированным диагнозом COVID-19». На модели инфекции, вызванной вирусом лихорадки Эбола, была также продемонстрирована возможность отбора однодоменных антител, обладающих высокой нейтрализующей активностью. На моделях бактериальной токсинемии было показано, что однодоменные антитела и их модификации специфические ботулотоксину типа А *C.botulinum* и токсину Б (TcdB) *C.difficile* имеют высокий терапевтический потенциал в качестве средств экстренной терапии. В частности, были получены однодоменные антитела к ботулотоксину типа А, способные обеспечивать 100% защиту мышей от летальной интоксикации (5LD50) в терапевтической дозе 1мкг/мышь. На основе полученных антител разработан препарат для экстренной профилактики и терапии интоксикации ботулотоксином типа А, который в настоящее время проходит клинические исследования безопасности, фармакокинетики и иммуногенности на здоровых добровольцах. Впервые получены однодоменные антитела, связывающиеся с поверхностным антигеном *M. hominis*, идентифицирована специфическая мишень – субстрат-связывающий белок ABC-транспортера *M. hominis*, а также показано, что модификация VHH, содержащая Fc-фрагмент иммуноглобулина G2a мыши, обеспечивает доставку таких молекул на поверхность слизистой оболочки уrogenитального тракта, что оказывает защитный эффект на модели экспериментальной уrogenитальной инфекции у мышей, вызванной *M. hominis*. В целом, высокий клинический потенциал разработанной платформы был

подтвержден в трех клинических исследованиях препаратов на основе отобранных однодоменных антител.

Кроме того, проведенные исследования показали перспективность разработанной технологической платформы и для разработки тест-систем для выявления инфекционных агентов. В частности, на модели антител к *M. hominis* было продемонстрировано, что молекулы на основе специфических VHH могут быть использованы для детекции *M. hominis*, в том числе методом проточной флуориметрии. Кроме того, показано, что однодоменные антитела, связывающиеся с CROPS доменом токсина TcdB *C.difficile* могут быть использованы для разработки биосенсоров для детекции токсина *Clostridioides difficile* методом плазмонного резонанса. Эффективность использования однодоменных антител в указанном приложении была продемонстрирована в сравнительных исследованиях, проводимых в рамках разработки тест-системы «Однодомен-Био».

В целом, проведенная научно-исследовательская работа демонстрирует большие перспективы практического использования разработанного комплекса методических подходов в качестве универсального инструмента для разработки средств диагностики и терапии различных инфекционных заболеваний, как вирусной так и бактериальной природы.

## Выводы

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

2. На модели инфекции, вызванной вирусом лихорадки Эбола, показана возможность получения молекул однодоменных антител, обладающих прямой вируснейтрализующей активностью. Разработан препарат «ГамЭзумаб» для экстренной профилактики и этиотропной терапии болезни, вызванной вирусом лихорадки Эбола. В доклинических и клинических исследованиях Фазы 1 показаны высокая эффективность и безопасность препарата.

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

4. На моделях бактериальной токсинемии показана возможность получения молекул однодоменных антител и их модификаций, обладающих нейтрализующей активностью в отношении ботулотоксина типа А *C.botulinum* и токсина Б (TcdB) *C.difficile*. Получены модифицированные молекулы, обладающие высокой терапевтической активностью в качестве средств экстренной терапии интоксикаций на моделях *in vivo* и *in vitro*.

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

## Список литературы

1. Альтшулер Е.П. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности. / Альтшулер Е.П., Серебряная Д.В., Картуха А.Г. // Успехи биологической химии. – 2010. – № 50. – С. 203–258.
2. Бураковский А.И. Методы иммунобиосенсорного анализа: принципиальные основы и возможности практического использования. / Бураковский А.И. // Международный журнал иммунопатологии, аллергологии, инфектологии. – 2008. – № 1. – С. 11–15.
3. Гойстер О. С. Определение Т–2 токсина методом поверхностного плазмонного резонанса. / Гойстер О.С., Хмельницкий Г. А., Дзядевич С. В., Назаренко В. И., Минченко А. Г. // Біотехнологія. – 2009. – Т. 2. – № 2. – С. 111–117.
4. Деев С.М. Моноклональные антитела для диагностики и терапии. / Деев С.М., Поляновский О. Л. // Биотехнология. – 2008. – № 2. – С. 3–13.
5. Должикова И.В. Векторные вакцины против болезни, вызванной вирусом Эбола. / Должикова И.В., Токарская Е.А., Джаруллаева А.Ш., Тухватулин А.И., Щепляков Д.В., Воронина О.Л., Сыромятникова С.И., Борисевич С.В., Пантюхов В.Б., Бабира В.Ф., Колобухина Л.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. // Acta Naturae. – 2017. – Т. 9. – № 3 (34). – с. 4–12.
6. Лобзин Ю.В. Современные представления об инфекции *Clostridioides difficile*. / Лобзин Ю.В. // Клиническая микробиология. – 2002. – Т. 4. – № 3. – С. 200–232.
7. Малов В.А. Антибиотикоассоциированные диареи. / Малов В.А. // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – №1. – С. 22–32.
8. Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств Часть вторая. / Миронов А.Н. // М.: Гриф и К. – 2012.

9. Перлин Е.Ю. Физика твердого тела. Оптика полупроводников, диэлектриков, металлов: учебное пособие. / Перлин Е.Ю., Вартамян Т. А., Федоров А. В. // СПб.: СПбГУ ИТМО. – 2008. — 216 с.
10. Попова А.Ю. Эпидемиологические особенности болезни, вызванной вирусом Эбола, в странах Западной Африки в 2013–2015 гг. / Попова А.Ю., Сафронов В.А., Воіго М.У., Куклев Е.В. и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – Вып. 3. – С. 42–48.
11. Сизикова Т.Е. Молекулярные механизмы проникновения вируса Эбола в пермиссивные клетки. / Сизикова Т.Е., Лебедев В.Н., Пантюхов В.Б., Борисевич С.В. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2015. – Вып. 3. – С. 89–93.
12. Сотников Д.В. Детекция межмолекулярных взаимодействий, основанная на регистрации поверхностного плазмонного резонанса / Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. // Успехи биологической химии. – 2015. – Т. 55. – С. 391–420.
13. Сухина М. А. Распространённость антибиотикорезистентных штаммов *Clostridioides difficile* у пациентов с антибиотикоассоциированной диареей. / Сухина М.А., ШЮА., Фролов С.А., Сафин А.Л. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2018. – 160. – 40–46.
14. Тиллиб С.В. Фингерпринтный анализ селекции «наноантител» методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников. / Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Васильев Л.А. // Acta Naturae. – 2010. – Т. 2. – № 3. – С. 100–108.
15. Abbady A.Q. Chaperonin GroEL a Brucella immunodominant antigen identified using Nanobody and MALDI-TOF-MS technologies. / Abbady A.Q., Al-Daoude A., Al-Mariri A., Zarkawi M., Muyltermans S. // Vet Immunol Immunopathol. – 2012. – 146. – 254–63.
16. Abeijon C. Use of VHH antibodies for the development of antigen detection test for visceral leishmaniasis. / Abeijon C., Dilo J., Tremblay J.M., Viana A.G., Bueno L.L., Carvalho S.F.G., et al. // Parasite Immunol 2018. – 40. – e12584

17. Agger W.A. Epidemiologic factors and urogenital infections associated with preterm birth in a midwestern U.S. population. / Agger W.A., Siddiqui D., Lovrich S.D., Callister S.M., Borgert A.J., Merkitch K.W., Mason T.C., Baumgardner D.J., Burmester J.K., Shukla S.K., Welter J.D., Stewart K.S., Washburn M.J., Bailey H.H. // *Obstet Gynecol.* – 2014. – T. 124. – № 5. – C. 969–77.
18. Albrecht D. Dual color single particle tracking via nanobodies. / Albrecht D., Winterflood C.M., Ewers H. // *Methods Appl Fluoresc.* – 2015. – Vol. 3. – 2. – 024001.
19. Alibakhshi A. Targeted cancer therapy through antibody fragments–decorated nanomedicines. / Alibakhshi A., Kahaki F.A., Ahangarzadeh S., Yaghoobi H., et al. // *J. Control Release.* – 2017. – 268. – 323– 334
20. Alicino C. Increasing incidence of *Clostridioides difficile* infections: results from a 5–year retrospective study in a large teaching hospital in the Italian region with the oldest population. / Alicino C., Giacobbe D.R., Durando P., Bellina D., DIB A.M., Paganino C., et al. // *Epidemiol Infect.* – 2016. – 144. – 2517– 2526.
21. Andersen D.C. Recombinant protein expression for therapeutic applications. / Andersen D.C., Krummen L. // *Curr. Opin. Biotechnol.* – 2002. – Vol. 13. – № 2. – 117– 123.
22. Arbabi–Ghahroudi M. Prokaryotic expression of antibodies. / Arbabi–Ghahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. // *Cancer Metastasis Rev.* – 2005. – T. 24. – № 4. – C. 501–19.
23. Armour K. L. Recombinant human IgG molecules lacking Fcγ receptor I binding and monocyte triggering activities. / Armour K. L., et al. // *European journal of immunology.* – 1999. – T. 29. – №. 8. – C. 2613– 2624.
24. Arnon S. Botulinum toxin as a biological weapon—Medical and public health management. / Arnon S., Schechter R., Inglesby T., Henderson D.A., Bartlett J.G., Ascher M.S., Eitzen E., Fine A.D., Hauer J., Layton M., et al. // *JAMA.* – 2001. – 285. – 1059–1070.
25. Arya O.P. Is *Mycoplasma hominis* a vaginal pathogen? / Arya O.P., Tong C.Y., Hart C.A., Pratt B.C., Hughes S., Roberts P., Kirby P., Howel J.,

McCormick A., Goddard A.D. // *Sex Transm Infect.* – 2001. – T. 77. – № 1. – C. 58–62.

26. Audet J. Immune evasion in ebolavirus infections. / Audet J., Kobinger G.P. // *Viral Immunol.* – 2015. – Vol. 28. – № 1. – P. 10–18.

27. Baek H. An improved helper phage system for efficient isolation of specific antibody molecules in phage display. / Baek H., Suk K., Kim Y., Cha S. // *Nucleic Acids Research.* – 2002. – T. 30. – № 5. – C. e18–e18.

28. Bannas P. Validation of nanobody and antibody based in vivo tumor xenograft NIRF–imaging experiments in mice using ex vivo flow cytometry and microscopy. / Bannas P., Lenz A., Kunick V., Fumey W., Rissiek B., Schmid J., Haag F., Leingärtner A., Trepel M., Adam G., Koch–Nolte F. // *J Vis Exp.* – 2015a. – № 98. – C. e52462.

29. Bannas P. Molecular imaging of tumors with nanobodies and antibodies: Timing and dosage are crucial factors for improved in vivo detection. / Bannas P., Lenz A., Kunick V., Well L., Fumey W., Rissiek B., Haag F., Schmid J., Schütze K., Eichhoff A., Trepel M., Adam G., Ittrich H., Koch–Nolte F. // *Contrast Media Mol Imaging.* – 2015b.

30. Baral T.N. Expression of single–domain antibodies in bacterial systems. / Baral T.N., Arbabi–Ghahroudi M. // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – T. 911. – C. 257–75.

31. Barnes C. O. Structures of human antibodies bound to SARS– CoV–2 spike reveal common epitopes and recurrent features of antibodies. / Barnes C. O., et al. // *Cell.* – 2020. – 182. – 828–842. – e16.

32. Barreto T. Single–chain antibodies from alpaca for the detection of *Fasciola hepatica* antigens. / Barreto T., Alfonso Y., Lafaye P., García Lazaro M.D. P., Agueda Perez L., Herrera–Velit P., et al. // *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* – 2018. – 35. – 573–80.

33. Barykova Y.A. Association of *Mycoplasma hominis* infection with prostate cancer. / Barykova Y.A., Logunov D.Y., Shmarov M.M., Vinarov A.Z., Fiev D.N., Vinarova N.A., Rakovskaya I.V., Baker P.S., Shyshynova I., Stephenson A.J.,

Klein E.A., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L., Gudkov A.V. // *Oncotarget*. – 2011. – T. 2. – № 4. – C. 289–97.

34. Bazl M.R. Production of chimeric recombinant single domain antibody–green fluorescent fusion protein in Chinese hamster ovary cells. / Bazl M.R., Rasae M.J., Foruzandeh M., Rahimpour A., Kiani J., Rahbarizadeh F., Alirezapour B., Mohammadi M. // *Hybridoma (Larchmt)*. – 2007. – T. 26. – № 1. – C. 1–9.

35. Beer B. Characteristics of Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. / Beer B., Kurth R., Bukreyev A. // *Naturwissenschaften*. – 1999. – Vol. 86. – № 1. – P. 8–17.

36. Belouzard S. Mechanisms of coronavirus cell entry mediated by the viral spike protein. / Belouzard S., Millet J. K., Licitra B. N., Whittaker G. R. // *Viruses*. – 2012. – 4. – 1011–1033.

37. Bharat T.A. Structural dissection of Ebola virus and its assembly determinants using cryo–electron tomography. / Bharat T.A., Noda T., Riches J.D., Kraehling V., Kolesnikova L., Becker S., Kawaoka Y., Briggs J.A. // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2012. – Vol. 109. – № 11. – P. 4275–4280.

38. Bobkov V. Nanobody–Fc constructs targeting chemokine receptor CXCR4 potently inhibit signaling and CXCR4–mediated HIV–entry and induce antibody effector functions. / Bobkov V., et al. // *Biochemical pharmacology*. – 2018. – T. 158. – C. 413–424.

39. Bock J.L. How sensitive is a prostate–specific antigen measurement? How sensitive does it need to be? / Bock J.L., Klee G.G. // *Arch Pathol Lab Med*. – 2004. – 128. – 341–3.

40. Boiko E.V. High Frequency of Latent Conjunctival *C. trachomatis*, *M. hominis*, and *U. urealyticum* Infections in Young Adults with Dry Eye Disease. / Boiko E.V., Pozniak A.L., Maltsev D.S., Suetov A.A., Nuralova I.V. // *J Ophthalmol*. – 2014. – T. 2014. – C. 154627.

41. Boulenouar H. Nanobodies and their medical applications. / Boulenouar H., et al. // *Genetics and Molecular Research*. – 2020. – T. 19. – № 1.

42. Cacciotto C. *Mycoplasma agalactiae* MAG\_5040 is a Mg<sup>2+</sup>-dependent, sugar-nonspecific SNase recognised by the host humoral response during natural infection. / Cacciotto C., Addis M.F., Coradduzza E., Carcangiu L., Nuvoli A.M., Tore G., Dore G.M., Pagnozzi D., Uzzau S., Chessa B., Pittau M., Alberti A. // *PLoS ONE*. – 2013. – T. 8. – № 2. – C. e57775.
43. Caleo M. Exploiting botulinum neurotoxins for the study of brain physiology and pathology. / Caleo M., Restani L. // *Toxins (Basel)*. – 2018. – 10. – 175.
44. Cavanagh D. Coronaviruses in poultry and other birds. / Cavanagh D. // *Avian Pathol.* – 2005. – 34. – 439–448.
45. Chatham-Stephens K. Clinical features of foodborne and wound botulism: a systematic review of the literature, 1932–2015. / Chatham-Stephens K., Fleck-Derderian S., Johnson S.D., Sobel J., Rao A.K., Meaney-Delman D. // *Clin Infect Dis.* – 2017. – 66(suppl\_1). – S. 11–16.
46. Chavanayarn C. Humanized-single domain antibodies (VH/VHH) that bound specifically to *Naja kaouthia* phospholipase A2 and neutralized the enzymatic activity. / Chavanayarn C., Thanongsaksrikul J., Thueng-In K., Bangphoomi K., Sookrung N., Chaicumpa W. // *Toxins*. – 2012. – T. 4. – № 7. – C. 554–67.
47. Chen J. Nanobody medicated immunoassay for ultrasensitive detection of cancer biomarker alpha-fetoprotein. / Chen J., He Q.H., Xu Y., Fu J.H., Li Y.P., Tu Z., et al. // *Talanta*. – 2016. – 147. – 523–30.
48. Chen P. SARS-CoV-2 neutralizing antibody LY-CoV555 in outpatients with Covid-19. / Chen P., et al. // *New England Journal of Medicine*. – 2021. – T. 384. – №. 3. – C. 229–237.
49. Chen Y. Emerging coronaviruses: genome structure, replication, and pathogenesis. / Chen Y., Liu Q., Guo D. // *J. Med. Virol.* – 2020. – 92. – 418–423.
50. Choi A. Serum Neutralizing Activity of mRNA-1273 Against SARS-CoV-2 Variants. / Choi A., Koch M., Wu K., Dixon G., Oestreicher J., Legault H., et al. // *J Virol.* – 2021. – 95. – e0131321.

51. Choi M.L. Crucial role of protein oligomerization in the pathogenesis of Alzheimer's and Parkinson's diseases. / Choi M.L., Gandhi S. // FEBS J. – 2018. – doi:10.1111/febs.14587.
52. Coffield J.A. In vitro characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined electrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches. / Coffield J.A., Bakry N., Zhang R.D., Carlson J., Gomella L.G., Simpson L.L. // J Pharmacol Exp Ther. – 1997. – 280. – 1489–98.
53. Connie Henke Yarbro; Michelle Goodman; Margaret Hansen Frogge. Cancer Nursing: Principles and Practice. / Connie Henke Yarbro. // Sudbury, Mass. – Jones and Bartlett Publishers. – 2005. – Chapter 21 Biologic and targeted therapy. – P. 529.
54. Coppieters K. Formatted Anti-Tumor Necrosis Factor Alpha VHH Proteins Derived From Camelids Show Superior Potency and Targeting to Inflamed Joints in a Murine Model of Collagen-Induced Arthritis. / Coppieters K., Dreier T., Silence K., de Haard H., Lauwereys M., Casteels P., et al. // Arthritis Rheum. – 2006. – 54. – 1856–66.
55. Corti D. Protective monotherapy against lethal Ebola virus infection by a potently neutralizing antibody. / Corti D., et al. // Science. – 2016. – T. 351. – № 6279. – C. 1339–1342.
56. Crasson O. Enzymatic functionalization of a nanobody using protein insertion technology. / Crasson O., Rhazi N., Jacquin O., Freichels A., Jérôme C., Ruth N., Galleni M., Filée P., Vandevenne M. // Protein Eng. Des. Sel. – 2015.
57. Crobach M.J.T. Understanding Clostridioides difficile Colonization. / Crobach M.J.T., Vernon J.J., Loo V.G., Kong L.Y., Pechine S., Wilcox M.H., et al. // Clin Microbiol Rev. – 2018. – 31.
58. Cui Y. Heavy chain single-domain antibodies to detect native human soluble epoxide hydrolase. / Cui Y., Li D., Morisseau C., Dong J.-X.X., Yang J., Wan D., Rossotti M.A.A., Gee S.J., González-Sapienza G.G., Hammock B.D. // Anal Bioanal Chem. – 2015. – T. 407. – № 24. – C. 7275–83.

59. Cui J. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. / Cui J., Li F., Shi Z.-L. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2019. – 17. – 181–192.
60. Darling T. L. Intracellular crosslinking of filoviral nucleoproteins with xintrabodies restricts viral packaging. / Darling T. L., Sherwood L. J., Hayhurst A. // *Frontiers in immunology.* – 2017. – T. 8. – C. 1197.
61. De Vlieger. Single-domain antibodies and their formatting to combat viral infections. / De Vlieger D., et al. // *Antibodies.* – 2018. – T. 8. – №. 1. – C. 1.
62. De Wit E. SARS and MERS: recent insights into emerging coronaviruses. / De Wit E., Van Doremalen N., Falzarano D., Munster V. J. // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2016. – 14. – 523–534.
63. Deckers N. Nanobodies, a promising tool for species-specific diagnosis of *Taenia solium* cysticercosis. / Deckers N., Saerens D., Kanobana K., Conrath K., Victor B., Wernery U., et al. // *Int J Parasitol.* – 2009. – 39. – 625–33.
64. Della Pia E.A. Single domain antibodies as a powerful tool for high quality surface plasmon resonance studies. / Della Pia E.A., Martinez K.L. // *PLoS ONE.* – 2015. – T. 10. – № 3. – C. e0124303.
65. Demarchi J. Existence of type D botulism in man. / Demarchi J., Mourgues C., Orio J., Prevot A.R. // *Bull Acad Natl Med.* – 1958. – 142. – 580–2. – PMID:13560962.
66. Descotes J. Immunotoxicity of monoclonal antibodies. / Descotes J. // *mAbs.* – 2009. – T. 1. – № 2. – C. 104111.
67. Desmyter A. Three camelid VHH domains in complex with porcine pancreatic alpha-amylase. Inhibition and versatility of binding topology. / Desmyter A., Spinelli S., Payan F., Lauwereys M., Wyns L., Muyldermans S., Cambillau C. // *J. Biol. Chem.* – 2002. – T. 277. – № 26. – C. 23645–50.
68. Desmyter A. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. / Desmyter A., Transue T.R., Ghahroudi M.A., Thi M.H., Poortmans F.P., Hamers R., Muyldermans S., Wyns L. // *Nature structural biology.* – 1996. – T. 3. – № 9. – C. 803–11

69. Dessì D. Mycoplasma hominis and Trichomonas vaginalis: a unique case of symbiotic relationship between two obligate human parasites. / Dessì D., Rappelli P., Diaz N., Cappuccinelli P., Fiori P.L. // *Front. Biosci.* – 2006. – T. 11. – C. 2028–34.
70. Detalle L. Generation and characterization of ALX–0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. / Detalle L., Stohr T., Palomo C., Piedra P.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2016. – Vol. 60. – № 1. – P. 6–13.
71. Dolzhikova I. V. Safety and immunogenicity of GamEvac–Combi, a heterologous VSV–and Ad5–vectored Ebola vaccine: An open phase I/II trial in healthy adults in Russia. / Dolzhikova I. V., et al. // *Human vaccines & immunotherapeutics.* – 2017. – T. 13. – № 3. – C. 613–620.
72. Dolzhikova I.V. Sputnik Light Booster After Sputnik V Vaccination Induces Robust Neutralizing Antibody Response to B.1.1.529 (Omicron) SARS–CoV–2 Variant. / Dolzhikova I.V., Iliukhina A.A., Kovyrshina A.V., Kuzina A.V., Gushchin V.A., Siniavin A.E., et al. // *MedRxiv Preprint Server Health Sci.* – 2021.
73. Domingo R. M. Infant Botulism: Two Recent Cases and Literature Review. / Domingo R. M., Haller J. S., Gruenthal M. // *Journal of Child Neurology.* – 2008. – Vol. 23. – № 11. – P. 1336–1346.
74. Dooley H. Selection and characterization of naturally occurring single–domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. / Dooley H., Flajnik M.F., Porter A.J. // *Mol. Immunol.* – 2003. – Vol. 40. – № 1. – P. 25–33.
75. Dostálek J. Biosensors for Detection of Biological and Chemical Analytes. / Dostálek J., Ladd J., Jiang S., Homola J. // *SPR Springer Ser Chem Sens Biosens.* – № 4. – Springer–Verlag Berlin Heidelberg. – 2006. – P. 177–190.
76. Dougan M. Bamlanivimab Plus Etesevimab in Mild or Moderate Covid–19. / Dougan M., Nirula A., Azizad M., Mocherla B., Gottlieb .RL., Chen P., et al. // *N Engl J Med.* – 2021. – Vol. 385. – P. 1382–92.

77. Du J. Preparation and Imaging Investigation of Dual-targeted C<sub>3</sub>F<sub>8</sub>-filled PLGA Nanobubbles as a Novel Ultrasound Contrast Agent for Breast Cancer. / Du J., Li X.-Y., Hu H., Xu L., et al. // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 3887.
78. Dubois B. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon. / Dubois B., Feldman H.H., Jacova C., Cummings J.L., et al. // *Lancet Neurol.* – Vol. 9. – № 11. – P. 1118–1127.
79. Dumoulin M. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. / Dumoulin M., Conrath K., Meirhaeghe A., Meersman F., Heremans K., Frenken L., Muyldermans S., Wyns L., Matagne A. // *Protein science: a publication of the Protein Society.* – 2002. – T. 11. – № 3. – C. 500–15
80. ECDC. Ebola outbreak in the Democratic Republic of the Congo [Электронный ресурс]. URL: <https://ecdc.europa.eu/en/ebola-virus-disease-outbreak-democratic-republic-congo-ongoing>.
81. Ecker D.M. The therapeutic monoclonal antibody market. / Ecker D.M., Jones S.D., Levine H.L. // *MAbs.* – 2015. – Vol. 7. – № 1. – P. 9–14.
82. El Sayed S.M. Updates in diagnosis and management of Ebola hemorrhagic fever. / El Sayed S.M., Abdelrahman A.A., Ozbak H.A., Hemeg H.A., Kheyami A.M., Rezk N., El-Ghoul M.B., Nabo M.M., Fathy Y.M. // *J Res Med Sci.* – 2016. – Vol. 21. – P. 84.
83. Ellis D.S. Ebola virus: a comparison, at ultrastructural level, of the behaviour of the Sudan and Zaire strains in monkeys. / Ellis D.S., Bowen E. T. ., Simpson D. I., Stamford S. // *Br J Exp Pathol.* – 1978. – Vol. 59. – № 6. – P. 584–593.
84. Even-Desrumeaux K. Phage display and selections on cells. / Even-Desrumeaux K., Chames P. // *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.).* – 2012. – T. 907. – C. 225–35.
85. Fagan R.P. Initial recovery and rebound of type f intestinal colonization botulism after administration of investigational heptavalent botulinum antitoxin. / Fagan R.P., Neil K.P., Sasich R., Luquez C., Asaad H., Maslanka S., Khalil W. // *Clin Infect Dis.* – 2011. – Vol. 53. – № 9. – P. e125–e128.

86. Farrington G.K. A novel platform for engineering blood–brain barrier–crossing bispecific biologics. / Farrington G.K., Caram–Salas N., Haqqani A.S., Brunette E., et al. // *FASEB J.* – 2014. – Vol. 28. – № 11. – P. 4764–4778.
87. Fatima A. Development of VHH antibodies against dengue virus type 2 NS1 and comparison with monoclonal antibodies for use in immunological diagnosis. / Fatima A., Wang H., Kang K., Xia L., Wang Y., Ye W., et al. // *PLoS One.* – 2014. – Vol. 9. – № 4. – e95263.
88. Favorskaya I. A. Single–domain antibodies efficiently neutralize SARS–CoV–2 variants of concern. / Favorskaya I. A., et al. // *Frontiers in Immunology.* – 2022. – T. 13. – C. 822159.
89. Ferrari A. Activity modulation of microbial enzymes by llama (*Lama glama*) heavy–chain polyclonal antibodies during in vivo immune responses. / Ferrari A., Weill F.S., Paz M.L., Cela E.M., González Maglio D.H., Leoni J. // *Animal.* – 2012. – T. 6. – № 3. – C. 510–7.
90. Finlay W. Natural and man–made V–gene repertoires for antibody discovery. / Finlay W., Almagro J. // *Frontiers in Immunology.* – 2012. – T. 3.
91. Fiori P.L. Association of *Trichomonas vaginalis* with its symbiont *Mycoplasma hominis* synergistically upregulates the in vitro proinflammatory response of human monocytes. / Fiori P.L., Diaz N., Cocco A.R., Rappelli P., Dessì D. // *Sex Transm Infect.* – 2013. – T. 89. – № 6. – C. 449–54.
92. Flajnik M. Case Of Convergence: Why Did a Simple Alternative to Canonical Antibodies Arise in Sharks and Camels? / Flajnik M., Deschacht N., Muyldermans S. // *PLoS Biology.* – 2011. – T. 9. – № 8.
93. Forster B. Application of Antibody–Mediated Therapy for Treatment and Prevention of *Clostridioides difficile* Infection. / Forster B., Chung P.K., Crobach M.J.T., Kuijper E.J. // *Front Microbiol.* – 2018. – Vol. 9. – 1382.
94. Fraile S. NanoPad: an integrated platform for bacterial production of camel nanobodies aimed at detecting environmental biomarkers. / Fraile S., Jiménez J.I., Gutiérrez C., De Lorenzo V. // *Proteomics.* – 2013. – Vol. 13. – P. 2766–75.

95. Freeman J. Pan-European longitudinal surveillance of antibiotic resistance among prevalent *Clostridioides difficile* ribotypes. / Freeman J., Vernon J., Morris K., Nicholson S., Todhunter S., Longshaw C., et al. // *Clin Microbiol Infect.* – 2015. – Vol. 21. – № 248. – e249–248. – e216.
96. Frenken L.G. Recent advances in the large-scale production of antibody fragments using lower eukaryotic microorganisms. / Frenken L.G., Hensing J.G., Hondel C.A. Van den., Verrips C.T. // *Res. Immunol.* – 1998. – T. 149. – № 6. – C. 589–99.
97. Frenken L.G. Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. / Frenken L.G., Linden R.H. van der., Hermans P.W., Bos J.W., Ruuls R.C., Geus B. de, Verrips C.T. // *J. Biotechnol.* – 2000. – T. 78. – № 1. – C. 11–21.
98. Frigotto L. Codon-Precise, Synthetic, Antibody Fragment Libraries Built Using Automated Hexamer Codon Additions and Validated through Next Generation Sequencing. / Frigotto L., Smith M., Brankin C., Sedani A., Cooper S., Kanwar N., Evans D., Svobodova S., Baar C., Glanville J., Ullman C., Hine A. // *Antibodies.* – 2015. – T. 4. – № 2.
99. Fu D. Structural basis for SARS-CoV-2 neutralizing antibodies with novel binding epitopes. / Fu D., et al. // *PLoS Biol.* – 19. – 2021. – e3001209.
100. Fung, T. S. Human coronavirus: host-pathogen interaction. / Fung T. S., Liu D. X. // *Annu. Rev. Microbiol.* – 73. – 2019. – 529–557.
101. Gainkam L.O. Correlation between epidermal growth factor receptor-specific nanobody uptake and tumor burden: a tool for noninvasive monitoring of tumor response to therapy. / Gainkam L.O., Keyaerts M., Caveliers V., Devoogdt N., Vanhove C., Van Grunsven L., et al. // *Mol Imaging Biol.* – 2011. – Vol. 13. – P. 940–8.
102. Garaicoechea L. Llama-Derived Single-Chain Antibody Fragments Directed to Rotavirus VP6 Protein Possess Broad Neutralizing Activity In Vitro and Confer Protection against Diarrhea in Mice. / Garaicoechea L., Olichon A.,

Marcoppido G., Wigdorovitz A., Mozgovoj M., Saif L., Surrey T., Parreño V. // *Journal of Virology*. – 2008. – T. 82. – № 19. – C. 9753–9764.

103. Gelkop S. The development and validation of a novel nanobody-based competitive ELISA for the detection of foot and mouth disease 3ABC antibodies in cattle. / Gelkop S., Sobarzo A., Brangel P., Vincke C., Romão E., Fedida–Metula S., et al. // *Front Vet Sci*. – 2018. – Vol. 5. – P. 250.

104. Georgiou G. Preparative expression of secreted proteins in bacteria: status report and future prospects. / Georgiou G., Segatori L. // *Curr. Opin. Biotechnol*. – 2005. – T. 16. – № 5. – C. 538–45

105. Ghahroudi M.A. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. / Ghahroudi M.A., Desmyter A., Wyns L., Hamers R., et al. // *FEBS lett*. – 1997. – Vol. 414. – № 3. – P. 521–526.

106. Giau V.V. Recent advances in the treatment of *C. difficile* using biotherapeutic agents. / Giau V.V., Lee H., An S.S.A., Hulme J. // *Infect Drug Resist* 2019. – Vol. 12. – P. 1597–1615.

107. Gill D. Bacterial toxins—A table of lethal amounts. / Gill D. // *Microbiol. Rev*. – 1982. – Vol. 46. – P. 86–94.

108. Godakova S. A. Camelid VHHs fused to human fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin a in mice. / Godakova S. A., et al. // *Toxins*. – 2019. – T. 11. – №. 8. – C. 464.

109. González–González E. Anti–Ebola therapies based on monoclonal antibodies: current state and challenges ahead. / González–González E., Alvarez M.M., Márquez–Ipiña A.R., Trujillo–de Santiago G., Rodríguez–Martínez L.M., Annabi N., Khademhosseini A. // *Crit. Rev. Biotechnol*. – 2015. – Vol. 26. – P. 1–16.

110. Goodchild S.A. Isolation and characterisation of Ebolavirus-specific recombinant antibody fragments from murine and shark immune libraries. / Goodchild S.A., Dooley H., Schoepp R.J., Flajnik M., Lonsdale S.G. // *Mol Immunol*. – 2011. – Vol. 48. – P. 2027–37.

111. Goonetilleke A. Clostridial neurotoxins. / Goonetilleke A., Harris J. B. // *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. – 2004. – T. 75. – №. suppl 3. – C. iii35–iii39.
112. Gorlani A. Expression of VHHs in *Saccharomyces cerevisiae*. / Gorlani A., Haard H. de, Verrips T. // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – T. 911. – C. 277–86.
113. Govaert J. Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments. / Govaert J., Pellis M., Deschacht N., Vincke C., Conrath K., Muyltermans S., Saerens D. // *J. Biol. Chem.* – 2012. – T. 287. – № 3. – C. 1970–9
114. Graham R. The effect of formalin on botulinum toxins A, B and C. / Graham R., Thorp F. // *J. Immunol.* 1929. – Vol. 16. – P. 391–401.
115. Greenberg A.S. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. / Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E.C., Flajnik M.F. // *Nature*. – 1995. – T. 374. – № 6518. – C. 168–73
116. Guardiola S. (2018). Blocking EGFR Activation with Anti-EGF Nanobodies via Two Distinct Molecular Recognition Mechanisms. / Guardiola S., Varese M., Sánchez-Navarro M., Vincke C., et al. // *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* – 2018. – Vol. 57. – № 42. – P. 13843–13847.
117. Gudkov A.V. Inflammation and p53: A Tale of Two Stresses. / Gudkov A.V., Gurova K.V., Komarova E.A. // *Genes Cancer*. – 2011. – T. 2. – № 4. – C. 503–16.
118. Guo Y. A SARS- CoV-2 neutralizing antibody with extensive spike binding coverage and modified for optimal therapeutic outcomes. / Guo, Y., et al. // *Nat. Commun.* – 2021. – 12. – 2623.
119. Gupta A. Early Treatment for Covid-19 With SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody Sotrovimab. / Gupta A., Gonzalez-Rojas Y., Juarez E., Crespo Casal M., Moya J., Falci D.R., et al. // *N Engl J Med*. – 2021. – Vol. 385. – № 21. – P. 1941–1950.

120. Gupta A. A Novel Helper Phage Enabling Construction of Genome-Scale ORF-Enriched Phage Display Libraries. / Gupta A., Shrivastava N., Grover P., Singh A., Mathur K., Verma V., Kaur C., Chaudhary V. // PLoS ONE. – 2013. – T. 8. – № 9.
121. Gushchin V.A. Neutralizing Activity of Sera From Sputnik V Vaccinated People Against Variants of Concern (VOC: B.1.1.7, B.1.351, P.1, B.1.617.2, B.1.617.3) and Moscow Endemic SARS-CoV-2 Variants. / Gushchin V.A., Dolzhikova I.V., Shchetinin A.M., Odintsova A.S., Siniavin A.E., Nikiforova M.A., et al. // Vaccines (Basel). – 2021. – Vol. 9. – № 7.
122. Gutsche I. Structural virology. Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid. / Gutsche I., Desfosses A., Effantin G., Ling W.L., Haupt M., Ruigrok R.W., Sachse C., Schoehn G. // Science. – 2015. – Vol. 348. – № 6235. – P. 704–707.
123. Habib I. V(H)H (nanobody) directed against human glycophorin A: a tool for autologous red cell agglutination assays. / Habib I., Smolarek D., Hattab C., Grodecka M., Hassanzadeh-Ghassabeh G., Muyldermans S., et al. // Anal Biochem. – 2013. – Vol. 438. – P. 82–9.
124. Hamark C. Glycans confer specificity to the recognition of ganglioside receptors by botulinum neurotoxin A. / Hamark C., Berntsson Ronnie P.A., Masuyer G., Henriksson Linda M., Gustafsson R., Stenmark P., Widmalm G. // J. Am. Chem. Soc. – 2016. – T. 139. – C. 218–230.
125. Hamers-Casterman C. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. / Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E., Bendahman N., Hamers R. // Nature. – 1993. – T. 363. – № 6428. – C. 446–8.
126. Hammers C. Antibody Phage Display: Technique and Applications. / Hammers C., Stanley J. // Journal of Investigative Dermatology. – 2014. – T. 134. – № 2. – C. e17.

127. Hamre D. A new virus isolated from the human respiratory tract. / Hamre D., Procknow J. J. // *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* – 1966. – Vol. 121. – P. 190–193.
128. Hansel T. The safety and side effects of monoclonal antibodies. / Hansel T., Kropshofer H., Singer T., Mitchell J., George A. // *Nature reviews. Drug discovery.* – 2010. – T. 9. – № 4. – C. 325–38
129. Harmsen M.M. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. / Harmsen M.M., Haard D. // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2007. – T. 77. – № 1. – C. 13–22.
130. Harmsen M.M. Enhancement of toxin- and virus-neutralizing capacity of single-domain antibody fragments by N-glycosylation. / Harmsen M.M., Van Solt C.B., Fijten H.P.D. // *Applied Microbiology and Biotechnology.* – 2009. – T. 84. – № 6. – C. 1087–1094.
131. Harrison A. G. Mechanisms of SARS-CoV-2 transmission and Pathogenesis. / Harrison A. G., Lin T., Wang, P. // *Trends Immunol.* – 2020. – Vol. 41. – P. 1100–1115.
132. Harvey W.T. SARS-CoV-2 Variants, Spike Mutations and Immune Escape. / Harvey W.T., Carabelli A.M., Jackson B., Gupta R.K., Thomson E.C., Harrison E.M., et al. // *Nat Rev Microbiol.* – 2021. – Vol. 19. – P. 409–24.
133. Hernandez L.D. Epitopes and Mechanism of Action of the Clostridioides difficile Toxin A-Neutralizing Antibody Actoxumab. / Hernandez L.D., Kroh H.K., Hsieh E., Yang X., Beaumont M., Sheth P.R., et al. // *J Mol Biol.* – 2017. – Vol. 429. – P. 1030–1044.
134. Hisada H. High production of llama variable heavy-chain antibody fragment (VHH) fused to various reader proteins by *Aspergillus oryzae*. / Hisada H., Tsutsumi H., Ishida H., Hata Y. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2013. – T. 97. – № 2. – C. 761–6.
135. Holliger P. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. / Holliger P., Hudson P. // *Nature biotechnology.* – 2005. – T. 23. – № 9. – C. 1126–36.

136. Hsieh H. V. Measurement of *Clostridioides perfringens*  $\beta$ -toxin production by surface plasmon resonance immunoassay / H. V. Hsieh, B. Stewart, P. Hauer, P Haaland, R. Campbell // *Vaccine*. – 1998. – Vol. 16. – №. 9. – P. 997–1003.
137. Huang C. Generation and application of fluorescent anti-human beta2-microglobulin VHH's via amino modification. / Huang C., Li D., Ren J., Ji F., Jia L. // *Molecules*. – 2019. – Vol. 24. – P. 2600.
138. Huang H. Risk factors of *Clostridioides difficile* infections among patients in a university hospital in Shanghai, China. / Huang H., Wu S., Chen R., Xu S., Fang H., Weintraub A., et al. // *Anaerobe*. – 2014. – Vol. 30. – P. 65–69.
139. Huang L. Nanobodies®: proficient tools in diagnostics. / Huang L., Muyldermans S., Saerens D. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* – 2010. – Vol. 10. – № 6. – P. 777–785.
140. Humeau Y. How botulinum and tetanus neurotoxins block neurotransmitter release. / Humeau Y., Doussau F., Grant N.J., Poulain B. // *Biochimie*. – 2000. – Vol. 82. – P. 427–46.
141. Huo J. Hapten synthesis, antibody development, and a highly sensitive indirect competitive chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of dicamba. / Huo J., Barnych B., Li Z., Wan D., Li D., Vasylieva N., et al. // *J Agric Food Chem*. – 2019. – Vol. 67. – P. 5711–9.
142. Hurlburt N. K. Structural basis for potent neutralization of SARS-CoV-2 and role of antibody affinity maturation. / Hurlburt, N. K., et al. // *Nat. Commun.* – 2020. – Vol. 11. – P. 5413–5413.
143. Hussack G. Protease-resistant single-domain antibodies inhibit *Campylobacter jejuni* motility. / Hussack G., Riazi A., Ryan S., van Faassen H., MacKenzie R., Tanha J., et al. // *Protein Eng Des Sel.* – 2014. – Vol. 27. – P. 191–8.
144. Inoue A. Loss-of-function screening by randomized intracellular antibodies: identification of hnRNP-K as a potential target for metastasis. / Inoue A., Sawata S.Y., Taira K., Wadhwa R. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2007. – T. 104. – № 21. – C. 8983–8.

145. Ivanova T.A. Measurement of genital mycoplasma concentration by using a microbiological and molecular–biological methods. / Ivanova T.A., Gushchin A.E., Gamova N.A., Barkhatova O.I., Rakovskaia I.V. // *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* – 2014. – № 2. – С. 25–9.
146. Jailkhani N. Noninvasive imaging of tumor progression, metastasis, and fibrosis using a nanobody targeting the extracellular matrix. / Jailkhani N., Ingram J.R., Rashidian M., Rickelt S., Tian C., Mak H., et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2019.– Vol. 116. – P. 14181–90.
147. Jain M. Engineering antibodies for clinical applications. / Jain M., Kamal N., Batra S. // *Trends in Biotechnology.* – 2007. – Т. 25. – № 7.
148. Jeffery I.A. Botulism. / Jeffery I.A., Karim S. // In: *StatPearls [Internet].* – Treasure Island (FL): StatPearls Publishing. – 2022.
149. Johns Hopkins. Coronavirus Resource Center. COVID–19 dashboard [Электронный ресурс]. URL: <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>.
150. Joosten V. The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. / Joosten V., Lokman C., Den Hondel C.A. Van, Punt P.J. // *Microb. Cell Fact.* – 2003. – Т. 2. – № 1. – С. 1.
151. Kaplon H. Antibodies to watch in 2019. / Kaplon H., Reichert J.M. // *MAbs.* – 2019. – Vol. 11. – P. 219–38.
152. Kastelic D. A single–step procedure of recombinant library construction for the selection of efficiently produced llama VH binders directed against cancer markers. / Kastelic D., Frković–Grazio S., Baty D., Truan G., Komel R., Pompon D. // *Journal of immunological methods.* – 2009. – Т. 350. – № 1–2. – С. 54–62.
153. Kazemi–Lomedasht F. (2015). Inhibition of angiogenesis in human endothelial cell using VEGF specific nanobody. / Kazemi–Lomedasht F., Behdani M., Bagheri K.P., Habibi–Anbouhi M., et al. // *Mol. Immunol.* – 2015. – Vol. 65. – № 1. – P. 58–67. Dekempeneer Y. Targeted alpha therapy using short–lived alphaparticles and the promise of nanobodies as targeting vehicle. / Dekempeneer Y., Keyaerts M., Krasniqi A., Puttemans J., et al. // *Expert Opin. Biol. Ther.* – 2016. – Vol. 16. – № 8. – P. 1035–1047.

154. Keane F.E. The association of *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma genitalium* with bacterial vaginosis: observations on heterosexual women and their male partners. / Keane F.E., Thomas B.J., Gilroy C.B., Renton A., Taylor–Robinson D. // *Int J STD AIDS*. – 2000. – T. 11. – № 6. – C. 356–60.
155. Keyaerts M. Phase I study of <sup>68</sup>Ga–HER2–nanobody for PET/CT assessment of HER2 expression in breast carcinoma. / Keyaerts M., Xavier C., Heemskerk J., Devoogdt N., Everaert H., Ackaert C., et al. // *J Nucl Med*. – 2016. – Vol. 57. – P. 27–33.
156. Kim H.J. Isolation of alpaca anti–haptan heavy chain single domain antibodies for development of sensitive immunoassay. / Kim H.J., McCoy M.R., Majkova Z., Dechant J.E., Gee S.J., Tabares–da Rosa S., et al. // *Anal Chem*. – 2012. – Vol. 84. – P. 1165–71.
157. Knapp J. Z. “Absolute” Sterility and “Absolute” Freedom from Particle Contamination. / Knapp J. Z. // *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology*. – 1998. – T. 52. – № 4. – C. 173–181.
158. Koch K. Selection of nanobodies with broad neutralizing potential against primary HIV–1 strains using soluble subtype C gp140 envelope trimers. / Koch K., Kalusche S., Torres J.L., Stanfield R.L., et al. // *Sci. Rep*. – 201. – Vol. 7. – № 1. – P. 8390
159. Koch–Nolte F. Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto–ADP–ribosyltransferase ART2.2 in vivo. / Koch–Nolte F., Reyelt J., Schöβow B., Schwarz N., Scheuplein F., Rothenburg S., Haag F., Alzogaray V., Cauerhff A., Goldbaum F. // *The FASEB Journal*. – 2007. – T. 21. – № 13. – C. 3490–3498.
160. Koh W.W. Generation of a family–specific phage library of llama single chain antibody fragments that neutralize HIV–1. / Koh W.W., Steffensen S., Gonzalez–Pajuelo M., Hoorelbeke B., Gorlani A., Szynol A., Forsman A., Aasa–Chapman M.M.M., Haard H. de, Verrips T., Weiss R.A. // *The Journal of biological chemistry*. – 2010. – T. 285. – № 25. – C. 19116–24.

161. Kohler G. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. / Kohler G., Milstein C. // *Nature*. – 1975. – Vol. 256. – P. 495–7.
162. Krasniqi A. Theranostic radiolabeled anti-CD20 sdAb for targeted radionuclide therapy of non-Hodgkin lymphoma. / Krasniqi A., D'Huyvetter M., Xavier C., Van der Jeught K., Muyldermans S., Van Der Heyden J., et al. // *Mol Cancer Ther.* – 2017. – Vol. – 16. – P. 2828–39
163. Kristensen P. Proteolytic selection for protein folding using filamentous bacteriophages. / Kristensen P., Winter G. // *Folding and Design*. – 1998. – T. 3. – №. 5. – C. 321–328.
164. Ladenson R.C. Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment. / Ladenson R.C., Crimmins D.L., Landt Y., Ladenson J.H. // *Anal Chem.* – 2006. – Vol. 78. – P. 4501–8.
165. Lee J.Y., Effectiveness of Regdanvimab Treatment in High-Risk COVID-19 Patients to Prevent Progression to Severe Disease. / Lee J.Y., Lee J.Y., Ko J.H., Hyun M., Kim H.A., Cho S., et al. // *Front Immunol.* – 2021.
166. Lentz E.M. Translational fusion and redirection to thylakoid lumen as strategies to improve the accumulation of a camelid antibody fragment in transplastomic tobacco. / Lentz E.M., Garaicoechea L., Alfano E.F., Parreño V., Wigdorovitz A., Bravo-Almonacid F.F. // *Planta*. – 2012. – T. 236. – № 2. – C. 703–14.
167. Li H. A nanobody-based electrochemiluminescent immunosensor for sensitive detection of human procalcitonin. / Li H., Sun Y., Elseviers J., Muyldermans S., Liu S., Wan Y. // *Analyst*. – 2014. – Vol. 139. – P. 3718–21.
168. Li T. Nanobody-based dual epitopes protein identification (DepID) assay for measuring soluble CD38 in plasma of multiple myeloma patients. / Li T., Li S.L., Fang C., Hou Y.N., Zhang Q., Du X., et al. // *Anal Chim Acta*. – 2018. – Vol. 1029. – P. 65–71.

169. Linden R.H. van der, Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. / Linden R.H. van der, Frenken L.G., de Geus B., Harmsen M.M., Ruuls R.C., Stok W., de Ron L., Wilson S., Davis P., Verrips C.T. // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1999. – T. 1431. – № 1. – C. 37–46.
170. Lindstrom M. Laboratory diagnostics of botulism. / Lindstrom M., Korkeala H. // *Clinical microbiology reviews.* – 2006. – T. 19. – №. 2. – C. 298–314.
171. Liu J. L. Selection, characterization, and thermal stabilization of llama single domain antibodies towards Ebola virus glycoprotein. / Liu J. L., et al. // *Microbial Cell Factories.* – 2017. – T. 16. – №. 1. – C. 1–12.
172. Liu J.L. Selection of cholera toxin specific IgNAR single-domain antibodies from a naïve shark library. / Liu J.L., Anderson G.P., Delehanty J.B., Baumann R., Hayhurst A., Goldman E.R. // *Mol Immunol.* – 2007. – Vol. 44. – P. 1775–83
173. Liu J.L. Improving biosensing activity to carcinoembryonic antigen with orientated single domain antibodies. / Liu J.L., Raghu D., Anderson G.P., Goldman E.R., Christodoulides J.A., Raphael M.P. // *Heliyon.* – 2017. – Vol. 3. – e00478.
174. Liu J.L. Selection of single-domain antibodies towards western equine encephalitis virus. / Liu J.L., Shriver-Lake L.C., Zabetakis D., Goldman E.R., Anderson G.P. // *Antibodies (Basel).* – 2018. – Vol. 7. – P. 44.
175. Liu X. Sandwich pair nanobodies, a potential tool for electrochemical immunosensing serum prostate-specific antigen with preferable specificity. / Liu X., Wang D., Chu J., Xu Y., Wang W. // *J Pharm Biomed Anal.* – 2018. – Vol. 158. – P. 361–9.
176. Lunder M. Ultrasound in phage display: a new approach to nonspecific elution. / Lunder M., Bratkovic T., Urleb U., Kreft S., Strukelj B. // *BioTechniques.* – 2008. – T. 44. – № 7. – C. 893–900.
177. Lundgren J. ACTIV-3/TICO LY-CoV555 Study Group. A neutralizing monoclonal antibody for hospitalized patients with Covid-19. / Lundgren J. D., et al. // *N Engl J Med.* – 2021. – T. 384. – №. 10. – C. 905–914.

178. Lutwick Suzanne M. Beyond Anthrax || Botulism. / Lutwick Suzanne M., Lutwick Larry I. // 2009. – Chapter 5. – P. 85–105.
179. Ma Z. A novel biotinylated nanobody–based blocking ELISA for the rapid and sensitive clinical detection of porcine epidemic diarrhea virus. / Ma Z., Wang T., Li Z., Guo X., Tian Y., Li Y., et al. // J Nanobiotechnology. – 2019. – Vol. 17. – P. 96.
180. Maass D. Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). / Maass D., Sepulveda J., Pernthaner A., Shoemaker C. // Journal of Immunological Methods. – 2007. – T. 324. – № 1–2. – C. 1325.
181. Mahtab M. A Heterodimer of a VHH (Variable Domains of Camelid Heavy Chain–only) Antibody That Inhibits Anthrax Toxin Cell Binding Linked to a VHH Antibody That Blocks Oligomer Formation Is Highly Protective in an Anthrax Spore Challenge Model. / Mahtab M., Clinton E. L., Jacqueline M. T., Catherine V., Devorah C., Stephen H. L., Charles B. S. // Journal of Biological Chemistry. – 2015. – Vol. 290. – № 10. – P. 6584–6595.
182. Malmberg A.C. Selection of binders from phage displayed antibody libraries using the BIAcore biosensor. / Malmberg A.C., Dueñas M., Ohlin M., Söderlind E., Borrebaeck C.A. // J. Immunol. Methods. – 1996. – T. 198. – № 1. – C. 51–7.
183. Marathe B. M. A pharmacologically immunosuppressed mouse model for assessing influenza B virus pathogenicity and oseltamivir treatment. / Marathe B. M., et al. // Antiviral research. – 2017. – T. 148. – C. 20–31.
184. Maslanka S.E. A novel botulinum neurotoxin, previously reported as serotype H, has a hybrid–like structure with regions of similarity to the structures of serotypes A and F and is neutralized with serotype A antitoxin. / Maslanka S.E., Lúquez C., Dykes J.K., et al. // J Infect Dis. – 2016. – Vol. 213. – P. 379–85.
185. Masters P. S. The molecular biology of coronaviruses. / Masters P. S. // Adv. Virus Res. – 2006. – Vol. 66. – P. 193–292.

186. Matz J. Phage display and selections on purified antigens. / Matz J., Chames P. // *Methods Mol. Biol.* – 2012. – T. 907. – C. 213–24.
187. Maussang D. Llama-derived single variable domains (nanobodies) directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth in vivo. / Maussang D., Mujić–Delić A., Descamps F. // *J Biol Chem.* – 2013. – Vol. 288. – № 41. – P. 29562–72.
188. McConnell S.J. Biopanning phage display libraries using magnetic beads vs. polystyrene plates. / McConnell S.J., Dinh T., Le M.H., Spinella D.G. // *BioTechniques.* – 1999. – T. 26. – № 2. – C. 208–10, 214.
189. McEwan W. A. Intracellular antibody-bound pathogens stimulate immune signaling via the Fc receptor TRIM21. / McEwan W. A., et al. // *Nature immunology.* – 2013. – T. 14. – №. 4. – C. 327–336.
190. Mejias A. Development and clinical applications of novel antibodies for prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection. / Mejias A., Garcia–Maurino C., Rodriguez–Fernandez R., Peeples M.E., et al. // *Vaccine.* – 2017. – Vol. 35. – № 3. – P. 496–502.
191. Melli L.J. Development and evaluation of a novel VHH-based immunocapture assay for high-sensitivity detection of Shiga toxin Type 2 (Stx2) in stool samples. / Melli L.J., Zylberman V., Hiriart Y., Lauche C.E., Baschkier A., Pardo R., et al. // *J Clin Microbiol.* – 2020. – Vol. 58. – e01566–19.
192. Meyer T. De. Comparison of VHH-Fc antibody production in *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana benthamiana* and *Pichia pastoris*. / Meyer T. De., Laukens B., Nolf J., Lerberge E. Van, Rycke R. De, Beuckelaer A. De, Buck S. De, Callewaert N., Depicker A. // *Plant Biotechnol. J.* 2015. – T. 13. – № 7. – C. 938–47.
193. Miranda C. Isolation of *Mycoplasma hominis* from extragenital cultures. / Miranda C., Camacho E., Reina G., Turiño J., Rodríguez–Granger J., Yeste R., Bautista M.F., García M., Alados J.C., Rosa M. De la. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 2005. – T. 24. – № 5. – C. 334–7.

194. Moekotte A. L. Monoclonal antibodies for the treatment of Ebola virus disease. / Moekotte A. L., et al. // *Expert opinion on investigational drugs*. – 2016. – T. 25. – №. 11. – C. 1325–1335.
195. Mohseni Moghadam N. Isolation and molecular identification of mycoplasma genitalium from the secretion of genital tract in infertile male and female. / Mohseni Moghadam N., Kheirkhah B., Mirshekari T.R., Fasihi Harandi M., Tafsiiri E. // *Iran J Reprod Med*. – 2014. – T. 12. – № 9. – C. 601–8.
196. Morales–Yáñez F. Fast one–step ultrasensitive detection of *Toxocara canis* antigens by a nanobody–based electrochemical magnetosensor. / Morales–Yáñez F., Trashin S., Hermy M., Sariego I., Polman K., Muyldermans S., et al. // *Anal Chem*. – 2019. – Vol. 91. – P. 11582–8.
197. Morales–Yáñez F. Electrochemical detection of *Toxocara canis* excretory–secretory antigens in children from rural communities in Esmeraldas Province, Ecuador: association between active infection and high eosinophilia. / Morales–Yáñez F., Trashin S., Sariego I., Roucher C., Paredis L., Chico M., et al. // *Parasit Vectors*. – 2020. – Vol. 13.– P. 245.
198. Morgan S. Identification and Characterization of Neutralizing Nanobodies Against Dengue Virus. / Morgan S. // 2019.
199. Murad H. Exploiting nanobodies in the detection and quantification of human growth hormone via phage–sandwich enzyme–linked immunosorbent assay. / Murad H., Assaad J.M., Al–Shemali R., Abbady A.Q. // *Front Endocrinol (Lausanne)*. – 2017. – Vol. 8. – P. 115.
200. Murin C.D. Structures of protective antibodies reveal sites of vulnerability on Ebola virus. / Murin C.D., Fusco M.L., Bornholdt Z.A., Qui X., Olinger G.G., Zeitlin L., Kobinger G.P., Ward A.B., Saphire E.O. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2014. – Vol. 111. – P. 17182–17187.
201. Muruganandam A. Selection of phage–displayed llama single–domain antibodies that transmigrate across human blood–brain barrier endothelium. / Muruganandam A., Tanha J., Narang S., Stanimirovic D. // *The FASEB Journal*. – 2001. – Vol. 16. – № 2. – P. 240–2.

202. Muyldermans S. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. / Muyldermans S., Atarhouch T., Saldanha J., Barbosa J.A., Hamers R. // *Protein Eng.* – 1994. – T. 7. – № 9. – C. 1129–35.
203. Nantel A.J. *Clostridioides botulinum*—International Programme on Chemical Safety—Bacteria. / Nantel A.J. // World Health Organization: Geneva, Switzerland. – 1999.
204. Nedelkov D. Multitoxin biosensor–mass spectrometry analysis: a new approach for rapid, real–time, sensitive analysis of staphylococcal toxins in food / Nedelkov D., Rasooly A., Nelson R.W. // *Int J Food Microbiol* – 2000. – Vol. 60. – № 1. – P. 1–13.
205. Nian R. Chromatographic biopanning for the selection of peptides with high specificity to Pb<sup>2+</sup> from phage displayed peptide library. / Nian R., Kim D., Nguyen T., Tan L., Kim C.–W., Yoo I.–K., Choe W.–S. // *Journal of Chromatography A*. – 2010. – T. 1217. – № 38. – C. 5940–5949.
206. Nowakowski A. Potent neutralization of botulinum neurotoxin by recombinant oligoclonal antibody. / Nowakowski A., Wang C., Powers D., Amersdorfer P., Smith T.J., Montgomery V.A., Sheridan R., Blake R., Smith L.A., Marks J.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2002. – Vol. 99. – P. 11346–11350.
207. Nuttall S.D. Selection and affinity maturation of IgNAR variable domains targeting *Plasmodium falciparum* AMA1. / Nuttall S.D., Humberstone K.S., Krishnan U.V., Carmichael J.A., Doughty L., Hattarki M., et al. // *Proteins*. – 2004. – Vol. 55. – P. 187–97.
208. Obishakin E. Generation of a nanobody targeting the paraflagellar rod protein of trypanosomes. / Obishakin E., Stijlemans B., Santi–Rocca J., Vandenberghe I., Devreese B., Muldermans S., et al. // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – e115893.
209. Ozaki E. *Clostridioides difficile* colonization in healthy adults: transient colonization and correlation with enterococcal colonization. / Ozaki E., Kato H., Kita

H., Karasawa T., Maegawa T., Koino Y., et al. // *J Med Microbiol.* – 2004. – Vol. 53. – P. 167–172.

210. Pardon E. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology. / Pardon E., Laeremans T., Triest S., Rasmussen S., Wohlkönig A., Ruf A., Muyltermans S., Hol W., Kobilka B., Steyaert J. // *Nature protocols.* – 2014. – T. 9. – № 3. – C. 674–93.

211. Parvege M.M. Genome-wide Analysis of *Mycoplasma hominis* for the Identification of Putative Therapeutic Targets. / Parvege M.M., Rahman M., Hossain M.S. // *Drug Target Insights.* – 2014. – T. 8. – C. 51–62.

212. Peng Z. Update on Antimicrobial Resistance in *Clostridioides difficile*: Resistance Mechanisms and Antimicrobial Susceptibility Testing. / Peng Z., Jin D., Kim H.B., Stratton C.W., Wu B., Tang Y.W., et al. // *J Clin Microbiol.* – 2017. – Vol. 55. – P. 1998–2008.

213. Perez X.A. Determining serotonin and dopamine uptake rates in synaptosomes using high-speed chronoamperometry. / Perez X.A., Bressler A.J., Andrews A.M. // 1st edn. *Electrochemical Methods for Neuroscience.* Bookshelf. US. – 2007.

214. Pérol M. Maintenance therapy in advanced non-small cell lung cancer: A new paradigm? / Pérol M., Arpin D. // *Presse Med.* – 2011. – Vol. 40. – № 4. – P. 404–414.

215. Pinto Torres J.E. Development of a nanobody-based lateral flow assay to detect active *Trypanosoma congolense* infections. / Pinto Torres J.E., Goossens J., Ding J., Li Z., Lu S., Vertommen D., et al. // *Sci Rep.* – 2018. – Vol 8. – P. 9019.

216. Planas D. Reduced Sensitivity of SARS-CoV-2 Variant Delta to Antibody Neutralization. / Planas D., Veyer D., Baidaliuk A., Staropoli I., Guivel-Benhassine F., Rajah M.M., et al. // *Nature.* – 2021. – Vol. 596. – P. 276–80.

217. Ponsel D. High affinity, developability and functional size: the holy grail of combinatorial antibody library generation. / Ponsel D., Neugebauer J., Ladetzki-Baehs K., Tissot K. // *Molecules.* – 2011. – T. 16. – № 5. – C. 3675–700.

218. Qi H. Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. / Qi H., Lu H., Qiu H.-J., Petrenko V., Liu A. // *Journal of Molecular Biology*. – 2012. – T. 417. – № 3.
219. Qiu X. Ebola GP-specific monoclonal antibodies protect mice and guinea pigs from lethal Ebola virus infection. / Qiu X., et al. // *PLoS neglected tropical diseases*. – 2012. – T. 6. – №. 3. – C. e1575.
220. Qiu X. Successful treatment of Ebola virus-infected cynomolgus macaques with monoclonal antibodies. / Qiu X., et al. // *Science translational medicine*. – 2012. – T. 4. – №. 138. – C. 138ra81–138ra81.
221. Raj V. Chimeric camel/human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection. / Raj V., Okba, N., Gutierrez-Alvarez J., Drabek, D., van Dieren B., Widagdo, W., Lamers M.M., Widjaja I., Fernandez-Delgado R., Sola, I., et al. // *Sci. Adv.* – 2018. – Vol. 4. – P. eaas9667.
222. Rao A.K. Clinical characteristics and ancillary test results among patients with botulism—United States, 2002–2015. / Rao A.K., Lin N.H., Jackson K.A., Mody R.K., Griffin P.M. // *Clin Infect Dis.* – 2017. – Vol. 66. – № suppl\_1. – S4–10.
223. Rao A.K. Clinical Guidelines for Diagnosis and Treatment of Botulism, 2021. / Rao A.K, Sobel J., Chatham-Stephens K., Luquez C. // *MMWR Recomm Rep.* – 2021. – Vol. 70. – № 2. – P. 1–30.
224. Rashidian M. Noninvasive imaging of immune responses. / Rashidian M., Keliher E.J., Bilate A.M., Duarte J.N., Wojtkiewicz G.R., Jacobsen J.T., Cragolini J., Swee L.K., Victora G.D., Weissleder R., Ploegh H.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2015. – T. 112. – № 19. – C. 6146–51.
225. Ratier L. Relevance of the diversity among members of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family analyzed with camelids single-domain antibodies. / Ratier L., Urrutia M., Paris G., Zarebski L., Frasch A.C., Goldbaum F.A. // *PloS one.* – 2008. – T. 3. – № 10. – C. e3524

226. Ren X. Nanobody-based apolipoprotein E immunosensor for point-of-care testing. / Ren X., Yan J., Wu D., Wei Q., et al. // ACS Sens. – 2017. – Vol. 2. – № 9. – P. 1267–1271.
227. Reveles K.R. The rise in *Clostridioides difficile* infection incidence among hospitalized adults in the United States: 2001–2010. / Reveles K.R., Lee G.C., Boyd N.K., Frei C.R.. // Am J Infect Control. – 2014. – Vol. 42. – P. 1028–1032.
228. Riazi A. Pentavalent single-domain antibodies reduce *Campylobacter jejuni* motility and colonization in chickens. / Riazi A., Strong P.C., Coleman R., Chen W., Hirama T., van Faassen H., et al. // PLoS One. – 2013. – Vol. 8. – P. e83928.
229. Riggs M.M. Asymptomatic carriers are a potential source for transmission of epidemic and nonepidemic *Clostridioides difficile* strains among long-term care facility residents. / Riggs M.M., Sethi A.K., Zabarsky T.F., Eckstein E.C., Jump R.L., Donskey C.J. // Clin Infect Dis. – 2007. – Vol. 45. – P. 992–998.
230. Gottlieb R.L. Effect of bamlanivimab as monotherapy or in combination with etesevimab on viral load in patients with mild to moderate COVID-19: a randomized clinical trial. / Gottlieb R.L., Nirula A., Chen P., et al. // JAMA. – 2021. – T. 325. – №. 7. – C. 632–644.
231. Roberts R.F. Direct visualization of alpha-synuclein oligomers reveals previously undetected pathology in Parkinson's disease brain. / Roberts R.F., Wade-Martins R., Alegre-Abarrategui J. // Brain. – 2015. – Vol. 138. – № 6. – P. 1642–1657
232. Robinson J.P. Public health response to biological and chemical weapons: WHO guidance. / Robinson J.P. // World Health Organization, Geneva. – 2004.
233. Romão E. Identification of nanobodies against the acute myeloid leukemia marker CD33. / Romão E., Krasniqi A., Maes L., Vandenbrande C., Sterckx Y.G., Stijlemans B., et al. // Int J Mol Sci. – 2020. – Vol. 21. – P. 310.

234. Rondot S. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. / Rondot S., et al. // *Nature biotechnology*. – 2001. – T. 19. – № 1. – C. 75–78.
235. Roovers R.C. Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. / Roovers R.C., Laeremans T., Huang L., De Taeye S., et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* – 2007. – Vol. 56. – № 3. – P. 303–317.
236. Rosano G.L.L. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. / Rosano G.L.L., Ceccarelli E.A. // *Front Microbiol.* – 2014. – T. 5. – C. 172.
237. Rossler A. SARS-CoV-2 B.1.1.529 Variant (Omicron) Evades Neutralization by Sera From Vaccinated and Convalescent Individuals. / Rossler A., Riepler L., Bante D., von Laer D., Kimpel J. // *MedRxiv: Preprint Server Health Sci.* – 2021.
238. Ryckaert S. Isolation of antigen-binding camelid heavy chain antibody fragments (nanobodies) from an immune library displayed on the surface of *Pichia pastoris*. / Ryckaert S., Pardon E., Steyaert J., Callewaert N. // *J. Biotechnol.* – 2010. – Vol. 145. – № 2. – P. 93–98.
239. Saerens D. Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing. / Saerens D., Frederix F., Reekmans G., Conrath K., Jans K., Brys L., et al. // *Anal Chem.* – 2005. – Vol. 77. – P. 7547–55.
240. Saerens D. Single-Domain Antibodies as Building Blocks for Novel Therapeutics. / Saerens D., Ghassabeh G.H., Muyldermans S. // *Curr Opin Pharmacol.* – 2008. – Vol. 8. – P. 600–8.
241. Salema V. High yield purification of nanobodies from the periplasm of *E. coli* as fusions with the maltose binding protein. / Salema V., Fernández L.Á. // *Protein Expr. Purif.* – 2013. – T. 91. – № 1. – C. 42–8.

242. Sanchez A. Biochemical Analysis of the Secreted and Virion Glycoproteins of Ebola Virus. / Sanchez A., Yang Z.Y., Xu L., Nabel G.J., Crews T., Peters C.J. // *J Virol.* – 1998. – Vol. 72. – № 8. – P. 6442–6447.

243. Sanchez A. Filoviridae: Marburg and Ebola viruses. / Sanchez A., et al. // *Fields virology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. – 2006. – P. 1409–1448.

244. Schlör A. Generation and validation of murine monoclonal and camelid recombinant single domain antibodies specific for human pancreatic glycoprotein 2. / Schlör A., Holzlöhner P., Listek M., Griess C., Butze M., Micheel B., et al. // *N Biotechnol.* – 2018. – Vol. 45. – P. 60–8.

245. Sepulveda J. Efficient serum clearance of botulinum neurotoxin achieved using a pool of small antitoxin binding agents. / Sepulveda J., et al. // *Infection and immunity.* – 2010. – T. 78. – № 2. – C. 756–763.

246. Shah D. Antibody biodistribution coefficients: inferring tissue concentrations of monoclonal antibodies based on the plasma concentrations in several preclinical species and human. / Shah D., Betts A. // *mAbs.* – 2013. – T. 5. – № 2. C. 297–305.

247. Shah D.N. Economic burden of primary compared with recurrent *Clostridioides difficile* infection in hospitalized patients: a prospective cohort study. / Shah D.N., Aitken S.L., Barragan L.F., Bozorgui S., Goddu S., Navarro M.E., et al. // *J Hosp Infect.* – 2016. – Vol. 93. – P. 286–289.

248. Shcheblyakov D. Development and characterization of two GP-specific monoclonal antibodies, which synergistically protect non-human primates against Ebola lethal infection. / Shcheblyakov D., et al. // *Antiviral Research.* – 2019. – T. 172. – C. 104617.

249. Shi R. A human neutralizing antibody targets the receptor-binding site of SARS-CoV-2. / Shi R., et al. // *Nature.* – 2020. – Vol. 584. – P. 120–124.

250. Shields R. L. High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with

improved binding to the Fc $\gamma$ R. / Shields R. L., et al. // *Journal of Biological Chemistry*. – 2001. – T. 276. – №. 9. – C. 6591–6604.

251. Shimizu T. A triacylated lipoprotein from *Mycoplasma genitalium* activates NF- $\kappa$ B through Toll-like receptor 1 (TLR1) and TLR2. / Shimizu T., Kida Y., Kuwano K. // *Infection and immunity*. – 2008. – T. 76. – №. 8. – C. 3672–3678.

252. Shkarupeta M.M. Experimental *Mycoplasma hominis* infection of the genital tract in BALB/c mice. / Shkarupeta M.M., Lazarev V.N., Govorun V.M. // *Bulletin of experimental biology and medicine*. – 2004. – T. 137. – № 1. – C. 53–5.

253. Shukla G.S. Phage–displayed combinatorial peptide libraries in fusion to beta–lactamase as reporter for an accelerated clone screening: Potential uses of selected enzyme–linked affinity reagents in downstream applications. / Shukla G.S., Krag D.N. // *Comb. Chem. High Throughput Screen*. – 2010. – T. 13. – № 1. – C. 75–87.

254. Sidhu S. Synthetic therapeutic antibodies. / Sidhu S., Fellouse F. // *Nature chemical biology*. – 2006. – T. 2. – № 12. – C. 682–8.

255. Siragam V. Animal models for filovirus infections. / Siragam V., Wong G., Qiu X. G. // *Zoological research*. – 2018. – T. 39. – №. 1. – C. 15.

256. Sobel J. Clinical recovery and circulating botulinum toxin type F in adult patient. / Sobel J., Dill T., Kirkpatrick C.L., Riek L., Luedtke P., Damrow T.A. // *Emerg Infect Dis*. – 2009. – Vol. 15. – P. 969–71.

257. Sobel J. Botulism. / Sobel J. // *Beyond anthrax: the weaponization of infectious diseases*. – 2009. – C. 85–105.

258. Sobouti B. Colonization of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women and their transmission to offspring. / Sobouti B., Fallah S., Mobayen M., Noorbakhsh S., Ghavami Y. // *Iran J Microbiol*. – 2014. – T. 6. – № 4. – C. 219–24.

259. Song G. Cross– reactive serum and memory B– cell responses to spike protein in SARS– CoV–2 and endemic coronavirus infection. / Song, G., et al. // *Nat. Commun*. – 2021. – Vol. 12. – P. 2938.

260. Sørensen M.D. Selection of antibodies against a single rare cell present in a heterogeneous population using phage display. / Sørensen M.D., Kristensen P. // *Nature protocols*. – 2011. – T. 6. – № 4. – C. 509–22.
261. Spickler A. Adjuvants in Veterinary Vaccines: Modes of Action and Adverse Effects. / Spickler A., Roth J. // *Journal of Veterinary Internal Medicine*. – 2003. – T. 17. – № 3. – C. 273–281.
262. Spigaglia P. Recent advances in the understanding of antibiotic resistance in *Clostridioides difficile* infection. / Spigaglia P. // *Ther Adv Infect Dis*. – 2016. – Vol. 3. – P. 23–42.
263. St Claire M. C. Animal models of Ebolavirus infection. / St Claire M. C., et al. // *Comparative Medicine*. – 2017. – T. 67. – № 3. – C. 253–262.
264. Swartz J.R. Advances in *Escherichia coli* production of therapeutic proteins. / Swartz J.R. // *Curr. Opin. Biotechnol*. – 2001. – T. 12. – № 2. – C. 195–201.
265. Ta D.T. An efficient protocol towards site-specifically clickable nanobodies in high yield: cytoplasmic expression in *Escherichia coli* combined with intein-mediated protein ligation. / Ta D.T., Steen Redeker E., Billen B., Reekmans G., Sikulu J., Noben J.-P.P., Guedens W., Adriaensens P. // *Protein Eng. Des. Sel*. – 2015.
266. Tabares-da Rosa S. Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response. / Tabares-da Rosa S., Rossotti M., Carleiza C., Carrión F., Pritsch O., Ahn K.C., Last J.A., Hammock B.D., González-Sapienza G. // *Analytical chemistry*. – 2011. – T. 83. – № 18. – C. 7213–20.
267. Tabrizi M. Biodistribution mechanisms of therapeutic monoclonal antibodies in health and disease. / Tabrizi M., Bornstein G., Suria H. // *The AAPS journal*. – 2010. – T. 12. – № 1. – C. 33–43.
268. Takada A. Infectivity-enhancing antibodies to Ebola virus glycoprotein. / Takada A., Watanabe S., Okazaki K., Kida H., Kawaoka Y. // *J. Virol*. – 2001. – Vol. 75. – P. 2324–2330.

269. Taylor–Robinson D. A colour test for the measurement of antibody to certain mycoplasma species based upon the inhibition of acid production. / Taylor–Robinson D., Purcell R.H., Wong D.C., Chanock R.M. // *J Hyg (Lond)*. – 1966. – T. 64. – №1. – C. 91–104.
270. Teh Y.–H.A.H. High–level expression of Camelid nanobodies in *Nicotiana benthamiana*. / Teh Y.–H.A.H., Kavanagh T.A. // *Transgenic Res*. – 2010. – T. 19. – № 4. – C. 575–86.
271. The Antibody Society. In: Approved antibodies [Электронный ресурс]. URL: <https://www.antibodysociety.org>.
272. 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., Saakyan S.A., Gribova I.Y., Tutykhina I.L., Sedova E.S., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *Antiviral Res*. – 2013. – T. 97. – № 3. – C. 245–54.
273. Tokuhara D. Rice–based oral antibody fragment prophylaxis and therapy against rotavirus infection. / Tokuhara D., Álvarez B., Mejima M., Hiroiwa T., Takahashi Y., Kurokawa S., Kuroda M., Oyama M., Kozuka–Hata H., Nochi T., Sagara H., Aladin F., Marcotte H., Frenken L.G., Iturriza–Gómara M., Kiyono H., Hammarström L., Yuki Y. // *J. Clin. Invest*. – 2013. – T. 123. – № 9. – C. 3829–38.
274. Tüdös A. J. Rapid surface plasmon resonance–based inhibition assay of deoxynivalenol. / Tüdös A. J., Lucas–van den Bos E. R., Stigter E. C. A. // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. – 2003. – Vol. 51. – № 20. – P. 5843–5848.
275. Vaidyanathan G. Preclinical evaluation of 18F–labeled anti–HER2 nanobody conjugates for imaging HER2 receptor expression by immuno–PET. / Vaidyanathan G., McDougald D., Choi J., Koumariou E., et al. // *J. Nucl. Med*. – 2016. – Vol. 57. – № 6. – P. 967–973.
276. Vaisocherová H. SPR Biosensors for Medical Diagnostics. / Vaisocherová H., Homola J. // *SPR Springer Ser Chem Sens Biosens*. – Springer–Verlag Berlin Heidelberg. – 2006. – № 4. – P. 229–247.

277. Van Audenhove I. Nanobodies as versatile tools to understand, diagnose, visualize and treat cancer. / Van Audenhove I., Gettemans J.J.E. // *EBioMedicine*. – 2016. – Vol. 8. – P. 40–48
278. Van Bockstaele F. The development of nanobodies for therapeutic applications. / Van Bockstaele F., Holz J–B., Revets H. // *Curr. Opin. Investig Drugs*. – 2009. – Vol. 10. – № 11. – P. 1212–1224.
279. VanBlargan L.A. An Infectious SARS–CoV–2 B.1.1.529 Omicron Virus Escapes Neutralization by Several Therapeutic Monoclonal Antibodies. / VanBlargan L.A., Errico J.M., Halfmann P.J., Zost S.J., Crowe J.E. Jr., Purcell L.A., et al. // *Biorxiv: Preprint Server Biol.* – 2021.
280. Vaneycken I. Immuno–imaging using nanobodies. / Vaneycken I., D’Huyvetter M., Hernot S., De Vos J., Xavier C., Devoogdt N., et al. // *Curr Opin Biotechnol.* – 2011. – Vol. 22. – P. 877–81.
281. Vanhaecke E. Endotoxin testing. / Vanhaecke E., Pijck J., Vuye A. // *Journal of clinical pharmacy and therapeutics*. – 1987. – T. 12. – № 4. – C. 223–235.
282. Vanlandschoot P. Nanobodies®: new ammunition to battle viruses. / Vanlandschoot P., Stortelers C., Beirnaert E., Ibañez L.I., et al. // *Antiviral Res.* – 2011. – Vol. 92. – № 3. – P. 389–407.
283. Veggiani G. Improved quantitative and qualitative production of single–domain intrabodies mediated by the co–expression of Erv1p sulfhydryl oxidase. / Veggiani G., Marco A. de. // *Protein Expr. Purif.* – 2011. – T. 79. – № 1. – C. 111–4.
284. Viridi V. Orally fed seeds producing designer IgAs protect weaned piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. / Viridi V., Coddens A., Buck S. De, Millet S., Goddeeris B.M., Cox E., Greve H. De, Depicker A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* – 2013. – T. 110. – № 29. – C. 11809–14.
285. Viridi V. Role of plant expression systems in antibody production for passive immunization. / Viridi V., Depicker A. // *Int. J. Dev. Biol.* – 2013. – T. 57. – № 6–8. – C. 587–93.

286. Wang Q.–Y.Y. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in female outpatients, 2009–2013. / Wang Q.–Y.Y., et al. // *J Microbiol Immunol Infect.* – 2014a.
287. Walls A. C. Structure, function, and antigenicity of the SARS– CoV–2 spike glycoprotein. / Walls, A. C. et al. // *Cell.* – 2020. – Vol. 181. – P. 281–292.
288. Wang D. (2015). Characterization of single–domain antibodies against Foot and Mouth Disease Virus (FMDV) serotype O from a camelid and imaging of FMDV in baby hamster kidney–21 cells with single–domain antibody–quantum dots probes. / Wang D., Yang S., Yin S., Shang Y., et al. // *BMC Vet. Res.* – 2015. – Vol. 11. – № 1. – P. 120.
289. Wang D.B. Label–free detection of *B. anthracis* spores using a surface plasmon resonance biosensor // Wang D.B., Bi L.J., Zhang Z.P., Chen Y.Y., Yang R.F., Wei H.P., Zhou Y.F., Zhang X. N. // *Analyst.* – 2009. – Vol. 134. –№ 4. – P. 738–742.
290. Wang F. Nanobodies in laboratory diagnosis luminescent enzyme immunoassay and bioluminescent enzyme immunoassay for tenuazonic acid mycotoxin by exploitation of nanobody and nanobody–nanoluciferase fusion. / Wang F., Li Z.F., Yang Y.Y., Wan D.B., Vasylieva N., Zhang Y.Q., et al. // *Anal Chem.* – 2020. – Vol. 92. – P. 11935–42.
291. Wang Y. Nanobody–derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications. / Wang Y., Fan Z., Shao L., Kong X., et al. // *Int. J. Nanomedicine.* – 2016. – Vol. 11. – P. 3287–3303.
292. Weinreich D. M. REGN–COV2, a neutralizing antibody cocktail, in outpatients with Covid–19. / Weinreich D. M., et al. // *New England Journal of Medicine.* – 2021. – T. 384. – №. 3. – C. 238–251.
293. Weiss S. R. Coronavirus pathogenesis and the emerging pathogen severeacute respiratory syndrome coronavirus. / Weiss S. R., Navas–Martin S. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* – 2005. – Vol. 69. – P. 635–664.
294. WHO. WHO R&D Blueprint – Ad–hoc Expert Consultation on clinical trials for Ebola Therapeutics. Appendix 4 [Электронный ресурс]. URL:

<https://www.who.int/ebola/drc-2018/treatments-approved-for-compassionate-use-update/en/>.

295. Wilcox M.H. Bezlotoxumab for Prevention of Recurrent Clostridioides difficile Infection. / Wilcox M.H., Gerding D.N., Poxton I.R., Kelly C., Nathan R., Birch T., et al. // New Engl J Med. – 2017. – Vol. 376. – P. 305–317.

296. Wolfson W. Ablynx Makes Nanobodies from Llama Bodies. / Wolfson W. // Chemistry & Biology. – 2006. – T. 13. – № 12. – C. 1243–1244.

297. World Health Organization. Middle East respiratory syndrome coronavirus [Электронный ресурс]. [https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndromecoronavirus-mers#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndromecoronavirus-mers#tab=tab_1).

298. Wrapp, D. Cryo-EM structure of the 2019-nCoV spike in the prefusion conformation. / Wrapp, D., et al. // Science. – 2020. – Vol. 367. – P. 1260–1263.

299. Wrapp D. Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies. / Wrapp D., et al. // Cell. – 2020. – Vol. 181. – P. 1004–1015.e15.

300. Wu Y. Single-domain antibodies as therapeutics against human viral diseases. / Wu Y., Jiang S., Ying T. // Frontiers in immunology. – 2017. – T. 8. – C. 1802.

301. Wu F. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. / Wu F., et al. // Nature. – 2020. – Vol. 579. – P. 265–269.

302. Wu H.C. Characterization of neutralizing antibodies and identification of neutralizing epitope mimics on the Clostridioides botulinum neurotoxin type A. / Wu H.C., Yen C.T., Huang Y.L., Tarn L.J., Lung C.C. // Appl. Environ. Microbiol. – 2001. – Vol. 67. – P. 3201–3207.

303. Wu Y. A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. / Wu Y., et al. // Science. – 2020. – Vol. 368. – P. 1274–1278.

304. Yan J. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications.

/ Yan J., Li G., Hu Y., Ou W., Wan Y. // Journal of Translational Medicine. – 2014. – T. 12. – № 1. – C. 343.

305. Yao, G. A camelid single-domain antibody neutralizes botulinum neurotoxin A by blocking host receptor binding. / Yao G., Lam K.H., Weisemann J., Peng L., Krez N., Perry K., Shoemaker C.B., Dong M., Rummel A., Jin R. // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7. – P. 7438.

306. Yuan M. A highly conserved cryptic epitope in the receptor binding domains of SARS-CoV-2 and SARS-CoV. / Yuan M., et al. // Science. – 2020. – Vol. 368. – P. 630–633.

307. Yuan M. Structural basis of a shared antibody response to SARS-CoV-2. / Yuan M., et al. // Science. – 2020. – Vol. 369. – P. 1119–1123.

308. Zarschler K. High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli. / Zarschler K., Witecy S., Kapplusch F., Foerster C., Stephan H. // Microbial Cell Factories. – 2013. – T. 12. – № 1. – C. 97.

309. Zhang Y.Q. Isolation of Bactrian camel single domain antibody for parathion and development of one-step dc-FEIA method using VHH-alkaline phosphatase fusion protein. / Zhang Y.Q., Xu Z.L., Wang F., Cai J., Dong J.X., Zhang J.R., et al. // Anal Chem. – 2018. – Vol. 90. – P. 12886–92.

310. Zheng Z. Monoclonal antibodies for the S2 subunit of spike of SARS-CoV-1 cross-react with the newly-emerged SARS-CoV-2. / Zheng Z., et al. // Euro Surveill. – 2020. – Vol. 25. – 2000291.

311. Zhou Z. Fluorine-18 labeling of the HER2-targeting singledomain antibody 2Rs15d using a residualizing label and preclinical evaluation. / Zhou Z, Vaidyanathan G, McDougald D, Kang CM, et al. // Mol. Imaging. Biol. – 2017. – Vol. 19. – № 6. – P. 867–877.

312. Zhu M. Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1. / Zhu M, Gong X, Hu Y, Ou W, Wan Y. // J Transl Med. – 2014. – Vol. 12. – P. 352.

313. Zhu W. The roles of Ebola virus soluble glycoprotein in replication, pathogenesis, and countermeasure development. / Zhu W., et al. // *Viruses*. – 2019. – T. 11. – №. 11. – C. 999.

314. Zivcec M. Validation of assays to monitor immune responses in the Syrian golden hamster (*Mesocricetus auratus*). / Zivcec M., Safronetz D., Haddock E., Feldmann H., Ebihara H. // *J Immunol Methods*. – 2011. – Vol. 368. – № 1–2. – P. 24–35.

315. Zou T. Nanobody–functionalized PEG–b–PCL polymersomes and their targeting study. / Zou T., Dembele F., Beugnet A., Sengmanivong L., et al. // *J. Biotechnol.* – 2015. – Vol. 214. – P. 147–155.