ФЕДЕРАЛЬНОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ВИРУСОЛОГИИ И БИОТЕХНОЛОГИИ «ВЕКТОР» ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА

На правах рукописи

Арипов Вазирбек Салахиддинович

ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ SARS-COV-2, ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА

1.5.3 – молекулярная биология

Диссертация
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель
к.б.н. Щербаков Д.Н.

Кольцово – 2025

Оглавление

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 7

ВВЕДЕНИЕ 10

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 15

1.1 Однодоменные антитела 15

1.1.1 Особенности строения и физико-химические свойства однодоменных антител 18

1.1.2 Применение однодоменных антител в диагностике и терапии 21

1.1.3 Технология получения однодоменных антител методом фагового дисплея 34

1.1.3.1 Особенности создания различных библиотек 36

1.1.3.2 Основные методические этапы фагового дисплея 38

1.1.3.3 Особенности проведения аффинной селекции 42

Заключение по литературному обзору 46

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ 47

2.1 Материалы 47

2.1.1 Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы 47

2.1.2 Питательные среды 49

2.1.3 Растворы и буферы 49

2.1.4 Клеточные линии, штаммы бактерий и вирусов 50

2.1.5 Рекомбинантные белки и фаговая библиотека 51

2.1.6 Биоматериалы 52

2.1.7 Программное обеспечение 52

2.2 Методы 53

2.2.1 Подбор и оптимизация генетических последовательностей, дизайн праймеров 53

2.2.2 Амплификация нуклеотидных последовательностей RBD, S белка и однодоменных антител 54

2.2.3 Ферментативный гидролиз 55

2.2.4 Лигирование 55

2.2.5 Выделение и очистка плазмидной и фрагментированной ДНК 55

2.2.6 Определение нуклеотидной последовательности ДНК 56

2.2.7 Химическая трансформация клеток *E. coli* 56

2.2.8 Получение продуцентов RBD и S белков в эукариотической системе экспрессии 57

2.2.9 Очистка рекомбинантных белков RBD и S 58

2.2.10 Аффинная селекция (биопэннинг) 59

2.2.11 Наработка фаговых клонов 60

2.2.12 Ампфлификация фага-помощника М13К07 61

2.2.13 Определение биологического титра фаговой библиотеки и фага-помощника М13К07 61

2.2.14 Твердофазный иммуноферментный анализ 62

2.2.15 Получение продуцентов однодоменных антител в прокариотической системе экспрессии 64

2.2.16 Очистка синтезированных однодоменных антител 64

2.2.17 Анализ рекомбинантных белков методом SDS-ПААГ и спектрофотометрии 65

2.2.18 Конкурентный ИФА 65

2.2.19 Оценка вируснейтрализующей активности антител 66

2.2.20 Статистическая обработка данных 67

2.2.21 Моделирование трёхмерной структуры белков 68

2.2.22 Молекулярный (белок-белковый) докинг 69

2.2.23 Молекулярно-динамическое моделирование 69

2.2.24 Анализ структур однодоменных антител и комплексов «антитело-антиген» 70

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ 72

3.1 Получение плазмидных конструкций, обеспечивающих синтез RBD и S белков SARS-CoV-2 72

3.2 Синтез RBD и S белков, их очистка и первичный анализ 75

3.3 Оценка специфичности полученных вариантов RBD и S белков 78

3.4 Отбор специфических фаговых клонов из библиотеки к SARS-CoV-2 81

3.5 Анализ последовательностей однодоменных антител 82

3.6 Изучение взаимодействия фаговых клонов с тримерами S белка SARS-CoV-2 88

3.7 Дизайн и конструирование плазмидных генетических конструкций, обеспечивающих экспрессию в прокариотической системе *E.coli* рекомбинантных однодоменных антител 90

3.8 Анализ вариабельности аминокислотных последовательностей однодоменных антител 93

3.9 Получение продуцентов однодоменных антител, их первичный анализ и очистка 95

3.10 Ингибирующая и нейтрализующая активность однодоменных антител 97

3.11 Молекулярное моделирование и прогнозирование геометрических параметров однодоменных антител 101

3.12 Анализ подвижности элементов вторичной структуры однодоменных антител 102

3.13 Докинг взаимодействия однодоменных антител с RBD 103

3.14 Молекулярно-динамическое моделирование комплексов однодоменных антител с RBD 105

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ 108

4.1 Выбор схемы биопэннинга 108

4.2 Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей отобранных однодоменных антител 112

4.3 Анализ эффективности отбора и селекционных потерь вариантов однодоменных антител 115

4.4 Сравнительный анализ данных ингибирования взаимодействия ACE2 с S белком и вируснейтрализации однодоменными антителами 118

4.5 Сравнительный анализ теоретических расчетов с экспериментальными данными по взаимодейсвию однодоменных антител 120

4.6 Влияние структуры и доменной архитектуры на эпитоп-связывание однодоменных антител 124

Заключение 128

Выводы 132

Список литературы 134

Благодарности 162

ПРИЛОЖЕНИЯ 164

Приложение 1. Нуклеотидные последовательности отобранных однодоменных антител 164

Приложение 2. Аминокислотные последовательности отобранных однодоменных антител 168

Приложение 3. Результаты молекулярного моделирования и прогнозирования геометрических параметров однодоменных антител 170

Приложение 4. Результаты молекулярного (белок-белкового) докинга однодоменных антител PRV, KWL, SKP, RC с RBD вариантов Wuhan, Delta, Omicron 173

Приложение 5. Результаты молекулярного моделирования и прогнозирования геометрических параметров однодоменных антител 180

Приложение 6. Анализ межмолекулярных взаимодейсвий аминокислотных остатков антител с RBD 186

Приложение 7. Области эпитопного распознования для пространства взаимодействия RBM S белка SARS-CoV-2 вариантов Wuhan, Delta, Omicron, XBB1.5, JN.1 с антителами 189

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

А.о. – аминокислотный остаток

БОЕ – бляшкообразующая единица

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ — желудочно-кишечный тракт

ИФА – иммуноферментный анализ

ИХА – иммунохроматографический анализ

кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота

КОЕ – колониеобразующая единица

МД – молекулярная динамика

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

$ОП_{450}$ (OD_{450}) – оптическая плотность при 450 нм

ПААГ – полиакриламидный гель

П.н. – пары нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

ТМБ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин

Трис – трисгидроксиметиламинометан

ЦПД – цитопатическое действие

ΔG_{bind} ($\Delta G_{MM\text{-}GBSA}$) – энергия связывания лиганда и белка, рассчитанная методом молекулярной механики с учётом обобщённой борновской модели сольватации (MM-GBSA)

ACE2 – Angiotensin-converting enzyme 2 (ангиотензинпревращающий фермент 2)

BSA – Bovine serum albumin (Бычий сывороточный альбумин)

CAIX – Carbonic Anhydrase IX (карбоангидраза IX, мембранный белок, маркер гипоксии и опухолевого роста)

CAR-T – Chimeric Antigen Receptor T-cells (Т-клетки с химерным рецептором антигена)

CDR – Complementarity Determining Region (комплементарно-определяющий участок) – участок антитела, определяющий связывание с антигеном

Clash (столкновения) – стерические затруднения, возникающие при взаимодействии аминокислотных остатков антитела и антигена в зоне контакта

CXCR4 – C-X-C chemokine receptor type 4 (рецептор хемокина CXCR4, участвующий в миграции иммунных клеток и прогрессии опухолей)

EMA – European Medicines Agency (Европейское агентство по лекарственным средствам)

Fc – Fragment crystallizable (постоянная (кристаллизуемая) область антитела, обеспечивающая связывание с рецепторами иммунной системы)

FDA – Food and Drug Administration (управление по контролю за продуктами и лекарствами, США)

FR – framework (консервативные каркасные участки в структуре антител)

HCAb – heavy-Chain only Antibodies (антитела, состоящие только из тяжелых цепей)

HER2 – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа, опухолевый маркёр молочной железы)

HRP – Horseradish peroxidase (пероксидаза хрена)

iB20 – широконейтрализующее человеческое моноклональное антитело против SARS-CoV-2

IPTG – isopropyl-β-D-thiogalactoside (изопропил-β-D-тиогалактозид)

KD – равновесная константа диссоциации (характеризует прочность взаимодействия между антителом и антигеном)

LDDT – Local Distance Difference Test (локальный тест разницы расстояний) – метрика, используемая для оценки качества предсказанной 3D-структуры белка, основанная на сравнении межатомных расстояний с эталонной моделью

M ± SD – Mean ± Standard Deviation (среднее значение ± стандартное отклонение)

NPT — термодинамический ансамбль, моделирующий систему при постоянных числе частиц (N), давлении (P) и температуре (T); применяется в молекулярной динамике для приближения к реальным условиям

PBS – Phosphate buffered saline (натрий фосфатный буфер)

PBS-T – натрий фосфатный буфер с добавлением Tween-20

PDB – Protein Data Bank (база данных структур белков и других биомолекул)

PIPER – алгоритм молекулярного докинга для прогнозирования взаимодействия белков

PIPER pose energy – энергия комплекса, рассчитанная методом молекулярного докинга PIPER

PIPER pose score — числовая оценка качества пространственной укладки комплекса, рассчитанная методом докинга PIPER

pLDDT – predicted Local Distance Difference Test (предсказанный показатель уверенности в локальной точности 3D-структуры белка)

RBD – receptor binding domain (рецептор-связывающий домен SARS-CoV-2)

RBM – receptor-binding motif (рецептор-связывающий мотив – ключевая область RBD, где расположен сайт связывания ACE2)

RMSD – root-mean-square deviation (среднеквадратичное отклонение положений атомов)

scFv – single-chain variable fragment (химерная молекула, включающая вариабельные домены тяжёлой и лёгкой цепей, соединённые пептидным линкером)

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate (додецилсульфат натрия)

TBS – Tris-Buffered Saline (трис-солевой буфер)

TBS-T – трис-солевой буфер с добавлением Tween-20

$TCID_{50}$ – Tissue Culture Infectious Dose 50% (доза вируса, вызывающая цитопатический эффект в 50% инфицированных культур клеток)

VH – Variable domain of Heavy chain (вариабельный домен тяжёлой цепи антитела)

VHH – Variable domain of Heavy chain of Heavy-chain antibody (вариабельный домен тяжёлой цепи тяжёлочепочечного антитела) (син.: однодоменное антитело, наноантитело)

VHH9 – однодоменное антитело, специфичное к ВИЧ-1

VL – Variable domain of Light chain — (вариабельный домен лёгкой цепи антитела).

ВВЕДЕНИЕ

Однодоменные антитела, также известные как наноантитела, представляют собой вариабельные домены особых неканонических антител, состоящих исключительно из тяжёлых цепей. Благодаря малому размеру (~15 кДа), эти молекулы способны эффективно связываться со «скрытыми» конформационными эпитопами антигенов, недоступными для полноразмерных антител. Кроме того, они обладают высокой растворимостью, устойчивостью к низким значениям pH и стабильной конформацией в широком температурном диапазоне. Указанные свойства делают однодоменные антитела перспективными для применения в медицине, биотехнологии, экологии и смежных науках. Особый интерес вызывает их использование против различных патогенов. С момента открытия однодоменных антител продолжаются активные исследования, направленные на их получение и использование против инфекционных агентов. Особенно интенсивно эти работы развивались после появления вируса SARS-CoV-2 — возбудителя заболевания COVID-19, вызвавшего глобальный кризис в здравоохранении. В связи с этим наноантитела привлекли повышенное внимание как объекты для разработки новых терапевтических и диагностических средств. Благодаря способности связываться с труднодоступными регионами S белка SARS-CoV-2, скрытыми под гликозилированными участками, однодоменные антитела представляют собой эффективный инструмент для нейтрализации данного вируса. Однако высокая скорость мутаций SARS-CoV-2 приводит к тому, что эффективность полученных антител снижается к вновь возникающим вариантам вируса, что создаёт необходимость в разработке новых молекул, способных нейтрализовать спектр вариантов вируса.

Доминирующим методом получения однодоменных антител является технология фагового дисплея. Использование иммунной библиотеки в сочетании с корректно построенной схемой отбора позволяет с высокой вероятностью выделить варианты антител с заданными свойствами. Однако эффективность селекции во многом зависит от условий биопэннинга: числа раундов, типа (способ получения, форма и вариантная принадлежность) антигена и порядка

использования антигенов. Современные исследования по получению однодоменных антител, способных нейтрализовать гетерологичные варианты вируса, как правило, опираются на фаговые библиотеки, сконструированные на основе антительного разнообразия после иммунизации животного несколькими вариантами антигенов. Однако такой подход требует значительных временных затрат и не всегда позволяет оперативно реагировать на появление новых вариантов, что особенно критично в условиях быстрой эволюции вируса. Таким образом, возникает потребность в альтернативных подходах, позволяющих отбирать эффективные однодоменные антитела из библиотек, сформированных после иммунизации одним антигеном.

Настоящее исследование посвящено разработке схемы селекции однодоменных антител, нейтрализующих спектр вариантов SARS-CoV-2, из фаговой библиотеки, созданной на основе иммунного репертуара животного, иммунизированного одним вариантом антигена.

Цель работы – получить однодоменные антитела, способные нейтрализовать спектр вариантов SARS-CoV-2.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи**:

1. разработать панель рекомбинантных поверхностных белков SARS-CoV-2, включающих спайковый белок и его рецептор связывающий домен;

2. разработать схему биопэннинга и осуществить отбор фаговых клонов из иммунной библиотеки однодоменных антител с использованием полученных белков SARS-CoV-2;

3. получить однодоменные антитела в прокариотической системе экспрессии;

4. провести анализ полученных однодоменных антител при помощи конкурентного иммуноферментного анализа;

5. оценить нейтрализующие свойства полученных однодоменных антител с использованием панели штаммов SARS-CoV-2;

6. построить модель взаимодействия однодоменных антител с рецептор-связывающим доменом спайкового белка SARS-CoV-2.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Научная новизна работы заключается в разработке и применении схемы аффинной селекции, моделирующей изменчивость SARS-CoV-2 *in vitro*, с последовательным использованием рекомбинантных антигенов — RBD вариантов Wuhan, Beta, Delta и S белка варианта Omicron, в порядке их появления.

Получены оригинальные однодоменные антитела, для которых проведён комплексный анализ иммунохимических свойств, включающий оценку ингибирующей и вируснейтрализующей активности. Впервые охарактеризовано однодоменное антитело KWL, полученное из иммунной библиотеки на основе RBD варианта Wuhan-Hu-1, продемонстрировавшее нейтрализующую активность в отношении штаммов SARS-CoV-2 Wuhan-Hu-1, Delta (B.1.617.2), Omicron (B.1.1.529) и XBB.1.5.

Для четырёх полученных однодоменных антител (PRV, KWL, SKP, RC) впервые построены теоретические модели взаимодействия с RBD вариантов Wuhan, Delta и Omicron, а также выявлены предполагаемые сайты связывания и предложены молекулярные механизмы нейтрализации.

Теоретическая значимость исследования состоит в расширении представлений о возможностях технологии фагового дисплея для отбора однодоменных антител с перекрёстной нейтрализующей активностью. Практическая значимость обусловлена получением однодоменных антител, способных распознавать различные варианты SARS-CoV-2, что делает их перспективными для разработки универсальных терапевтических и диагностических средств, особенно в условиях появления новых штаммов. Предложенная схема селекции может быть адаптирована для быстрого реагирования на будущие вспышки вирусных инфекций. Методологическую основу работы составили современные методы молекулярной биологии, иммунологии и микробиологии, включая молекулярное клонирование, технологию фагового дисплея, хроматографические методы и иммуноферментный анализ.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фаговая библиотека однодоменных антител, полученная после иммунизации животного RBD вариантом Wuhan, содержит клоны, взаимодействующие не только с RBD варианта Wuhan, но и эволюционно отдалённых вариантов SARS-CoV-2, включая Delta, Omicron и XBB.

2. Схема биопэннинга, основанная на последовательном применении рекомбинантных RBD вариантов Wuhan, Beta, Delta и спайкового белка варианта Omicron в четырёх раундах аффинной селекции, позволяет отобрать однодоменные антитела, нейтрализующие панель штаммов SARS-CoV-2.

3. Однодоменные антитела, ингибирующие взаимодействие ACE2 с RBD вариантов Wuhan, Delta и Omicron, проявляют вируснейтрализующую активность в отношении штаммов соответствующих вариантов SARS-CoV-2.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждается использованием адекватных и воспроизводимых методов молекулярной биологии и иммунологии, включением положительных и отрицательных контролей, повторяемостью экспериментов, а также согласованностью полученных данных с результатами других авторов. Все эксперименты выполнялись с контролями и проводились в биологических и технических повторах: биологические повторы обеспечивали независимость результатов за счёт использования различных образцов, а технические — воспроизводимость внутри одного и того же образца. Результаты подвергались статистической обработке и согласуются с данными, представленными в научной литературе, что подтверждает корректность их интерпретации.

Основные положения диссертации были представлены на всероссийских и международных научных конференций:

1. Всероссийская конференция молодых учёных, посвящённая 55-летию НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева (15 апреля 2022 г., Санкт-Петербург);

2. XXII Зимняя молодёжная школа по биофизике и молекулярной биологии (27 февраля – 4 марта 2023 г., Санкт-Петербург);

3. Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика – 2023» (14–16 ноября 2023 г., Москва).

Публикации по материалам работы

По результатам работы опубликованы: три статьи в журналах, входящих в перечень ВАК Министерства образования и науки РФ, рекомендованных для защиты диссертаций, три тезиса, два патента Российской Федерации.

Личный вклад соискателя

Все основные этапы диссертационного исследования, включая постановку задач, анализ рекомбинантных поверхностных белков, проведение аффинной селекции фаговых клонов, синтез и очистку рекомбинантных однодоменных антител, постановку и выполнение иммунохимических анализов, статистическую обработку и интерпретацию полученных данных, выполнены лично соискателем.

Получение поверхностных белков SARS-CoV-2 выполнялись совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной и синтетической биологии к.б.н. Меркульевой Ю.А., к.х.н. Исаевой А.А., Несмеяновой В.С. Очистку белков проводили в отделе разработки технологий и пилотного производства биопрепаратов (и.о. зав. отделом к.б.н. Волосникова Е.А.). Работы с живым вирусом SARS-CoV-2 проводились сотрудником отдела «Коллекция микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора к.б.н. Зайковской А.В. Секвенирование нуклеотидных последовательностей выполнялось к.х.н Бондарем А.А. Структурное моделирование взаимодействия однодоменных антител с антигеном проведено сотрудниками ЦКП СКИФ: д.х.н. Борисевич С.С., Мустаевым Е.А., к.х.н. Ильиной М.Г. и к.х.н. Архиповым С.Г.

Структура и объём диссертации:

Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, результатов, их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 190 страницах, включает 34 рисунка, 7 таблиц, 7 приложений. Список литературы включает 262 источника.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Однодоменные антитела

Согласно господствующей парадигме у антител за связывание с антигеном отвечает их антигенсвязывающий фрагмент, состоящий из вариабельных доменов тяжёлой (VH) и лёгкой (VL) цепей. Но способен ли вариабельный домен тяжёлой цепи связываться с антигеном самостоятельно, без участия лёгкой цепи, и функционировать как отдельная единица? Исследования, направленные на изучение этого вопроса, показали, что VH-домен в отсутствие VL обладает низкой растворимостью, слабой стабильностью и связывается с антигеном с десятикратно меньшим сродством (Ward E. et al., 1989). В 1993 году в журнале Nature была опубликована статья об обнаружении в сыворотке одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) уникальных антител, полностью лишённых лёгких цепей. У этих антител антигенсвязывающий фрагмент состоял лишь из одного вариабельного домена тяжёлой цепи (рисунок 1б) (Hamers-Casterman C. et al., 1993). Казалось, что подобное нарушение в структуре антител с утратой диверсификации тяжёлых и лёгких цепей могло быть вызвано заболеванием, известным на тот момент как болезнь тяжелоцепочечных антител (Franklin E. et al., 1964; Wahner-Roedler D. et al., 1992). Однако впоследствии было установлено, что эти антитела полностью функциональны и способствуют увеличению разнообразия антигенсвязывающих молекул в крови верблюда. Обнаруженные функциональные антитела получили название Heavy-Chain-only Antibodies (HCAb) — из-за полного отсутствия в их составе лёгких цепей. Дальнейшие исследования показали, что HCAb присутствуют у всех представителей семейства *Camelidae* (Flajnik M. et al., 2011), составляют от 10 до 80% (в зависимости от вида) общего количества IgG в сыворотке крови (van der Linden R. et al., 2000; De Genst E. et al., 2006; Tu Z. et al., 2020; Arbabi-Ghahroudi M., 2022; Liu Y., et al., 2023) и функционируют наряду с классическими антителами, что свидетельствует о важной роли HCAb в иммунном ответе. Впоследствии схожие по структуре антитела, также лишённые лёгких цепей, были обнаружены у акул (*Orectolobus maculatus, Ginglymostoma cirratum*)

(Greenberg A. et al., 1995) и представителей семейства химеровых (*Chimaeridae*). Это, вероятнее всего, свидетельствует о том, что гомодимерные антитела, лишённые лёгких цепей, возникали независимо — по крайней мере, трижды — в ходе конвергентной эволюции (Cory L. et al., 2018). Причиной утраты лёгких цепей у антител стала точечная мутация, нарушающая сигнал сплайсинга на 3'-конце экзона CH1 в генах Cγ (Nguyen V. et al., 2002; Woolven B. et al., 1999).

Антигенсвязывающий участок HCAb состоит только из одного вариабельного домена – **V**ariable domain of the **H**eavy chain of the **H**eavychain antibody (VHH) (рисунок 1в). Благодаря способности самостоятельно связываться с антигеном, без участия константных доменов, VHH также называют однодоменными антителами. В англоязычной литературе они часто обозначаются как nanobody (наноантитело, нанотело). Автор осознаёт важность единообразного использования терминологии в отношении однодоменных антител. В настоящей работе применяются различные обозначения в зависимости от контекста. Так, в разделе, посвящённом структурным особенностям, преимущественно используется термин VHH — в силу необходимости сравнения с вариабельным доменом тяжёлой цепи — VH. В разделе с описанием экспериментальных результатов предпочтительно используется термин "однодоменные антитела", как наиболее полно отражающий исследуемые молекулы. В литературном обзоре или в главе обсуждение встречается также термин "наноантитело", поскольку он широко употребим в зарубежных публикациях, и используется при сравнении с данными других авторов. Несмотря на варьирование терминов, во всех случаях речь идёт об одном и том же объекте исследования — однодоменном антителе.

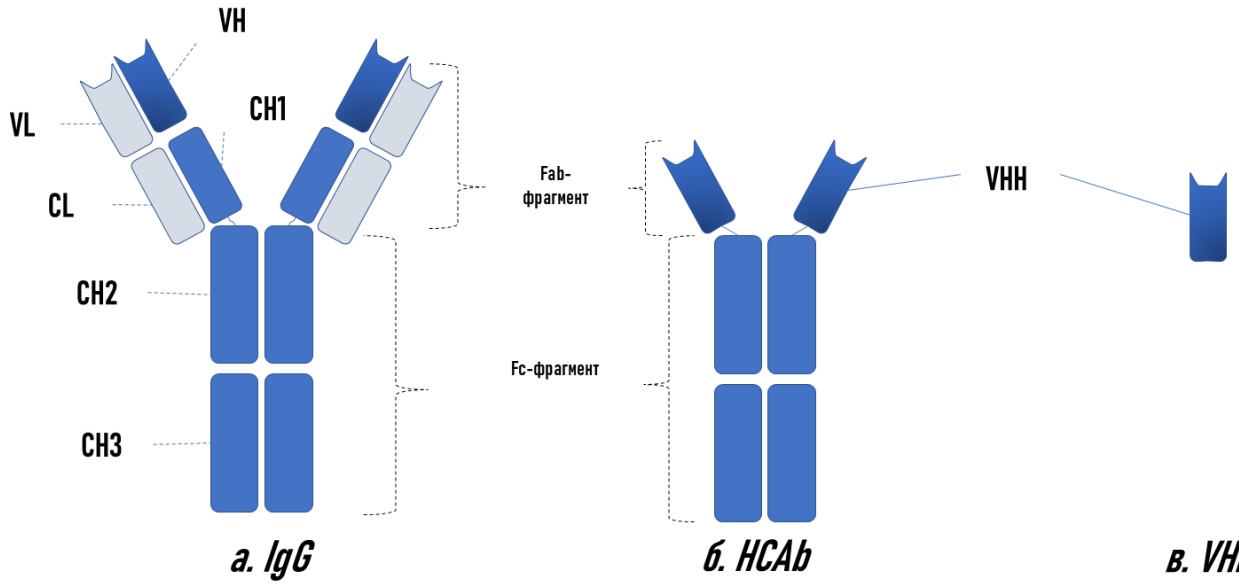


Рисунок 1 – Сравнение структуры IgG с его тяжелоцепочечным изотопом HCAb. а – антитело IgG, состоящее из двух тяжёлых и двух лёгких цепей; б – антитело HCAb, состоящее только из тяжёлых цепей; в – однодоменное антитело (наноантитело) – вариабельный домен HCAb. VL – вариабельный домен лёгкой цепи; VH – вариабельный домен тяжёлой цепи; CL – константный домен лёгкой цепи; CH1 – первый константный домен тяжёлой цепи; CH2 – второй константный домен тяжёлой цепи; CH3 – третий константный домен тяжёлой цепи; Fab – антигенсвязывающий фрагмент антитела; Fc – кристаллизуемый (эффекторный) фрагмент антитела.

До открытия однодоменных антител наименьшей среди рекомбинантных антигенсвязывающих молекул считалась scFv — Single-chain variable fragment. Это химерная белковая молекула, состоящая из вариабельных участков тяжёлой и лёгкой цепей, соединённых коротким пептидным линкером, с молекулярной массой 30 кДа (Bird R. et al., 1988). После открытия однодоменных антител этот статус перешёл к VHH, которые характеризуются малой молекулярной массой (12-15 кДа) и компактными линейными размерами порядка 4×2,5×3 нм, что следует из обобщения структурных данных (Тиллиб С.В., 2020; Jovcevska I. et al., 2020; Pillay et al., 2021; Jin B., et al., 2023;). Открытие верблюжьего VHH также показало, что единственный вариабельный домен может эффективно связываться с антигеном, особенно с труднодоступными для полноразмерных антител конформационными эпитопами (Greenberg A. et al., 1995). В настоящее время наименьшей молекулой с антигенсвязывающей способностью считается pictobody — участок сверхдлинной

гипервариабельной петли особых антител крупного рогатого скота (Passon M. et al., 2023).

1.1.1 Особенности строения и физико-химические свойства однодоменных антител

Из-за точечной мутации в донорском сайте сплайсинга у HCAb отсутствует первый константный домен H-цепи (CH1), который взаимодействует с L-цепями в гетеротетрамерном антителе (Nguyen V. et al., 1999; Woolven B. et al., 1999). Шарнирные области HCAb напрямую связаны с их вариабельными областями. Вариабельный фрагмент тяжелоцепочечных антител представляет собой высокоаффинный V-подобный домен, возникший в результате значительных изменений в последовательности классических IgG (Streltsov V. et al., 2005; Dooley H. et al., 2005; De Genst E. et al., 2004, 2005). Подобно VH у IgG, VHH у HCAb содержит девять β-слоёв, формирующих типичную IgV-складку. Однако утрата VL привела к заметным отличиям между VH и VHH, особенно в консервативных каркасных участках (framework 2, FR2) и гипервариабельных петлях CDR3. Если FR2 у VH включает четыре высококонсервативные гидрофобные аминокислоты (Val37, Gly44, Leu45 и Trp47), которые совместно с Gln39, Tyr91 и Trp103 формируют гидрофобную границу (~700 Å²), способствующую присоединению к VL (Padlan E. et al., 1994), то в VHH, при отсутствии VL, эти гидрофобные остатки заменяются на более гидрофильные аминокислоты (Phe37, Glu44, Arg45 и Gly47) (Muyldermans S. et al., 1994; Vu K. et al., 1997; Muyldermans S., 2013), что снижает экспонирование гидрофобной поверхности в раствор (рисунок 2). Кроме того, прилегающие к этой границе аминокислотные остатки претерпевают конформационные изменения, повышающие гидрофильность поверхности VHH. Также петля CDR3 VHH накрывает эту границу, заменяя собой взаимодействия, ранее осуществлявшиеся с VL (Muyldermans S. et al., 2001).

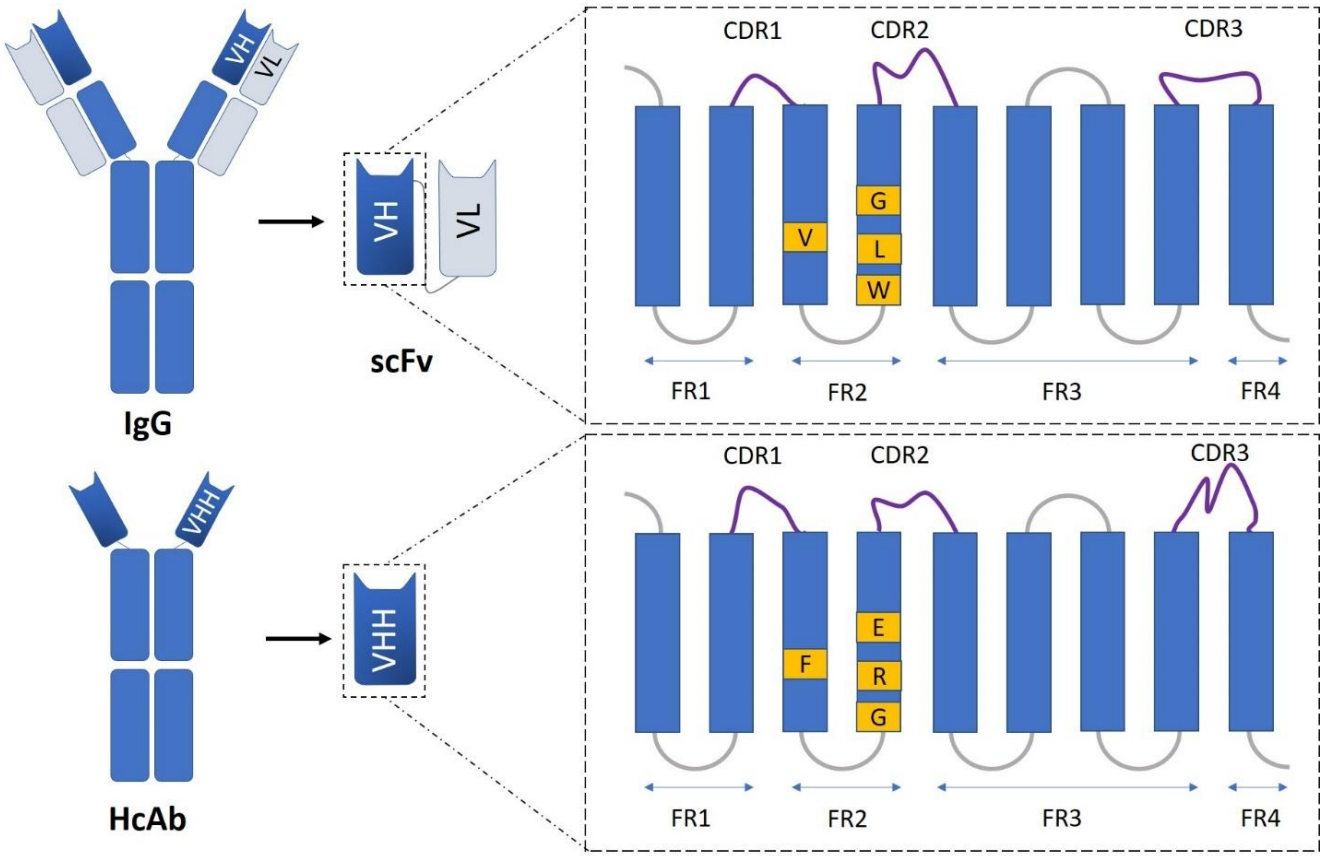


Рисунок 2 – Структурные различия между VH и VHH (На основе статьи Asaadi Y. et al., 2021). Подобно VH-домену VHH-домен HCAb состоит из трех CDR, разделенных четырьмя более консервативными каркасными (framework) участками (FR 1-4), в совокупности образующими пространственную структуру из двух β-складчатых слоев. CDR 1 и CDR 3 участки у VHH удлинены, по сравнению с VH.

Расширение гипервариабельных петель в VHH компенсирует утрату трёх CDR домена VL и комбинаторного разнообразия VH-VL. Удлинённые CDR1 и CDR3 увеличивают антигенсвязывающую поверхность на 600–800 Å², которую в случае VH-VL обеспечивают шесть петель (Muyldermans S., 2013; Siontorou C., 2013). Изменчивость VL, обусловленная соматическими мутациями в остатках 28 и 30 CDR1 в процессе аффинного созревания (Desmyter A. et al., 1996; Decanniere K. et al., 1999), в VHH компенсируется удлинённым CDR1 с участками повышенной мутационной активности, закодированными на зародышевом уровне (Nguyen V. et al., 2000). Хотя удлинённый CDR3 способен достигать эпитопов, недоступных для классических антител, он также увеличивает гибкость, снижая энтропийные потери при связывании (Muyldermans S., 2013; Siontorou C., 2013). Появление дополнительной дисульфидной связи в районах CDR1, CDR2 или FR2 в процессе

эволюции решает эту проблему (Govaert J. et al., 2012; Muyldermans S., 2013; Siontorou C., 2013), способствуя лучшей ориентации CDR3 относительно антигена (Flajnik M. et al., 2011; Decanniere K. et al., 2000).

Недавний анализ 105 кристаллических структур комплексов VHH-антиген с разрешением < 3 Å показал, что VHH предпочитают жёсткие, вогнутые, структурированные и консервативные эпитопы, обогащённые ароматическими, полярными, заряженными и гидрофобными аминокислотами (Zavrtanik U. et al., 2018). Было показано, что CDR3 участвует в ~50% взаимодействий, CDR2 — в 20%, а CDR1 — в 13%. Примечательно, что 16% взаимодействий приходятся на остатки, не относящиеся к CDR, но расположенные в четырёх каркасных участках VHH. Таким образом, паратоп VHH использует все доступные остатки в зоне взаимодействия для усиления сродства (Zavrtanik U. et al., 2018; Arbabi-Ghahroudi M., 2022). Эти особенности обуславливают высокое сродство VHH к антигену, благодаря разнообразию паратопов и широкой геометрии петель, отличной от канонической структуры VH.

Благодаря структурным отличиям, VHH демонстрируют уникальные свойства *in vitro* и *in vivo*. Малый размер облегчает проникновение в ткани и приводит к короткому периоду полураспада из-за клубочковой фильтрации, поскольку масса VHH ниже порога фильтрации (65 кДа) (Kim T. et al., 2019; Debie P. et al., 2020; Muyldermans S., 2021). Одновременно отсутствие константных доменов исключает нежелательный фоновый сигнал в диагностике, возникающий от взаимодействий с Fc-фрагментами (Khan F., 2014; Holliger P. et al., 2005; Горшкова Е. и др., 2016; He L. et al., 2023).

Как уже упоминалось, у VHH в FR2 гидрофильные аминокислоты заменяют гидрофобные у VH. Это повышает растворимость и снижает склонность к агрегации. Такая замена улучшает как молекулярную, так и термодинамическую стабильность VHH, а также делает их устойчивыми к денатурантам и протеазам (Hussack G. et al., 2012). Они также сохраняют активную конформацию при колебаниях pH и ионной силы (Van Audenhove I. et al., 2016). Дополнительная дисульфидная связь ограничивает гибкость и предотвращает термическую

агрегацию, что повышает стабильность (Ewert S. et al., 2002; Fernandes C. et al., 2017; Kunz P. et al., 2018, 2019; Lecocq Q. et al., 2019; Jovcevska I. et al., 2020). Из-за высокой стабильности VHH обладают способностью к эффективному повторному сворачиванию, что позволяет сохранять их активность после термического стресса без потери структуры или функции (Dmitriev O. et al., 2016).

Хотя VH-VL и VHH демонстрируют сопоставимое сродство, VHH обеспечивают лучший доступ к труднодоступным участкам антигенов, включая ионные каналы (Danquah W. et al., 2016), вирусные гликопротеины (Henry K. et al., 2018) и иммунные синапсы (Cartwright A. et al., 2014), в то время как VH-VL эффективнее взаимодействуют с плоскими линейными эпитопами. Благодаря удлинённой CDR3, VHH формируют выпуклую поверхность, позволяющую проникать в вогнутые эпитопы. Это также снижает неспецифическое фоновое связывание (Hassanzadeh-Ghassabeh G. et al., 2013).

Одной из ключевых характеристик VHH является высокое сходство с человеческими VH (семейство VH3) — ~75-90% идентичности (Asaadi Y. et al., 2021), что обусловливает низкую иммуногенность при клиническом применении (Harmsen M. et al., 2007; Vincke C. et al., 2009). Тем не менее, учитывая компактную структуру VHH (110–130 аминокислот), необходимо точное проектирование для гуманизации. Избыточные модификации снижают аффинность, стабильность или экспрессию (van Faassen H. et al., 2020).

Одной из оптимальных систем синтеза VHH являются дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* (Chee M. et al., 2012), поскольку органеллы, такие как эндоплазматический ретикулум и аппарат Гольджи, обеспечивают правильное формирование дисульфидных связей и гликозилирование (van der Vaart J., 2002).

1.1.2 Применение однодоменных антител в диагностике и терапии

Первые десять лет исследований однодоменных антител были сосредоточены на изучении их геномного происхождения, определении структуры, анализе кристаллических комплексов наноантитело-антиген и разработке методов синтеза в бактериальных и дрожжевых системах (Arbabi-Ghahroudi M. et al., 1997;

Vu K. et al., 1997; Nguyen V. et al., 1998, 2000, 2002; Decanniere K. et al., 1999; Desmyter A. et al., 1996, 2001, 2002; van der Linden R. et al., 2000; Harmsen M. et al., 2000; Perez J. et al., 2001; Dumoulin M. et al., 2002; Spinelli S. et al., 2004). Применение однодоменных антител активно развивалось во втором десятилетии после основания компании Ablynx, которая инициировала разработку терапевтических и диагностических решений на основе наноантител. В 2003–2013 годах наблюдался экспоненциальный рост числа публикаций и патентов, посвящённых терапевтическому и диагностическому применению однодоменных антител (Saerens D. et al., 2008; Wesolowski J. et al., 2009; Steeland S. et al., 2016).

Выбор области применения VHH во многом определяется их физико-химическими свойствами. Небольшой размер способствует быстрому проникновению в ткани и выведению из организма. Этот эффект может быть снижен слиянием нескольких VHH между собой или с альбумином человека (Harmsen M. et al., 2007; Hoefman S. et al., 2015; Henry K. et al., 2015; Rashidian M. et al., 2016; van Faassen H. et al., 2021). Благодаря модульной структуре VHH могут быть сконструированы как одно-, так и многовалентные молекулы с би- или мультиспецифичностью (рисунок 3), обладающие низким риском агрегации и иммуногенности (Holt L., 2003; Li J. et al., 2010; Rozan C. et al., 2013). Многочисленные исследования подтверждают, что мультивалентные форматы эффективнее одновалентных (Ibanez L. et al., 2011; Cardoso F. et al., 2014; Xiang Y. et al., 2020).

Термостабильность и устойчивость к агрессивным условиям (pH, давлению, условиям ЖКТ) делают VHH перспективными для пероральной и аэрозольной доставки, а также для иммобилизации на биосенсорах (Riazi A. et al., 2013; Hussack G. et al., 2014; Yang E. et al., 2020; Muyldermans S., 2021; Rao D. et al., 2021; Arbabi-Ghahroudi M., 2022).

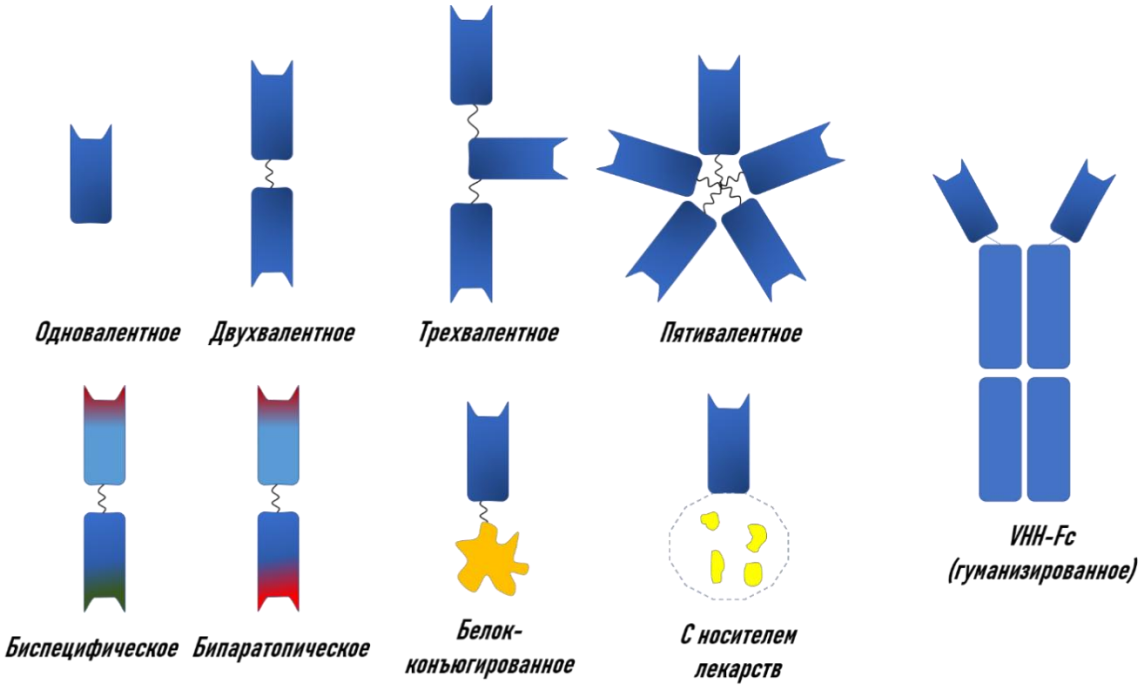


Рисунок 3 – Схематическое изображение различных производных однодоменных антител

На сегодняшний день однодоменные антитела используются в диагностике инфекций, терапии рака и аутоиммунных заболеваний, мониторинге окружающей среды и контроле пищевой безопасности (Arbabi-Ghahroudi M., 2022; Jin B. et al., 2023). В частности, они применяются для обнаружения низкомолекулярных веществ (кофеин, токсины, пестициды) (Bever C. et al., 2016) и патогенов, включая *Ustilaginoidea virens* — возбудителя болезней риса (Wang W. et al., 2022). Широкий спектр возможных применений (рисунок 4) говорит об огромном потенциале однодоменных антител.



Рисунок 4 – Различные области применения однодоменных антител

Также однодоменные антитела нашли широкое применение в ИХА – быстром тесте на основе тонкослойной хроматографии, в котором они заменяют классические антитела благодаря высокой стабильности, термостойкости, разнообразию паратопов и возможности создания мультивалентных конструкций (Koczula K. et al., 2016; Jin B. et al., 2023). В частности, успешно использовалась пара однодоменных антител для выявления пируваткиназы *Trypanosoma congolense* с чувствительностью 80% и

специфичностью 92% (Pinto Torres J. et al., 2018). Схожие подходы позволили получить однодоменные антитела против других гликолитических ферментов: енолазы — для диагностики *T. evansi*, и альдолазы — для диагностики *T. congolense* (Li Z., Pinto Torres J.E. et al., 2020; Odongo S. et al., 2016; Pinto J. et al., 2017). Кроме того, сообщалось об использовании ИХА с применением однодоменного антитела для диагностики норовирусной инфекции человека, показавшей чувствительность 80% и специфичность 86% по четырём различным штаммам вируса (Doerflinger S. et al., 2016). Существуют также литературные данные об использовании однодоменных антител в иммуноферментном анализе. На основе наноантител были разработаны системы, направленные на выявление онкомаркеров (глипикана-3 (Yu S., 2021), фибриногеноподобного белка 1 (Zhang W.T., Liu T.T., et al., 2021)), токсинов (тетра-бромбисфенола А (Li Z., Wang Y., et al., 2020), охратоксина А (Liu X. et al., 2017)) и бактерий, представляющих опасность для пищевой безопасности (*Listeria monocytogenes* (Tu Z. et al., 2016), *Salmonella enteritidis* (Gu K. et al., 2022), *Staphylococcus aureus* (Hu Y. et al., 2021)). Также описан конкурентный ИФА с использованием однодоменного антитела для диагностики антител к вирусу ящура у крупного рогатого скота (Gelkop S. et al., 2018).

Несмотря на широкое использование ИФА и ИХА, их диагностические возможности ограничены анализом биологических жидкостей и не позволяют выявлять и локализовать опухоли в организме. В таких случаях применяются методы *in vivo*-диагностики, включая медицинскую оптическую и ядерную визуализацию — позитронно-эмиссионную томографию и однофотонно-эмиссионную компьютерную томографию. Эти методы используют флуоресцентно или радиоактивно меченые антитела для визуализации опухолей непосредственно в организме. Компактный размер однодоменных антител, их высокая проникающая способность в ткани, удобство модификации и быстрая элиминация из организма делают их перспективными кандидатами для создания флуоресцентных и радиоактивных индикаторов, специфичных к мишени, для *in vivo*-диагностики (Bobkov V. et al., 2018; Salvador J. et al., 2019; Yang E. et al., 2020; de Beer M. et al., 2020). Однодоменное антитело 7D12 к рецептору эпидермального

фактора роста (биомаркер эпителиального рака человека) было конъюгировано с флуорофором IRDye800CW для сравнения с коммерческим моноклональным антителом Cetuximab®. Результаты показали, что 7D12 проявляло измеряемый сигнал через 30 мин после инъекции и обладало большей проникающей способностью в опухоли (Oliveira S. et al., 2012). Кроме того, для оптической визуализации прединвазивного рака молочной железы был протестирован подход с комбинацией двух однодоменных антител (CAIX и HER2-специфичных), которые показали лучшее связывание в биспецифическом формате, чем в моновалентном. Это открывает возможности применения однодоменных антител для ранней диагностики рака молочной железы (Kijanka M. et al., 2016).

Относительно новое применение однодоменных антител — это разработка биосенсоров на их основе. Биосенсор представляет собой устройство, в котором биорецептор, специфичный к антигену-мишени, прикреплён к полупроводнику. В случае связывания между рецептором и антигеном-мишенью происходит изменение электрического потенциала, которое трансформируется в измеряемый сигнал (Katz H., 2021). Самым большим преимуществом биосенсора является то, что результаты получаются мгновенно — в течение нескольких секунд, что превосходит другие тест-системы. Однодоменные антитела являются идеальными кандидатами в качестве биорецепторов, поскольку их способность выдерживать высокие температуры, а также изменения pH позволяет хранить их в различных условиях (Fan R. et al., 2021). Биосенсор, использующий однодоменные антитела для определения фибриногена — биомаркера сердечно-сосудистых заболеваний — показал предел обнаружения в 0,044 мкг/мл; верификация этого теста была проведена с использованием международного стандарта фибриногенной плазмы (Campuzano S. et al., 2014). Также было показано, что однодоменные антитела являются кандидатами для разработки биосенсоров при обнаружении S белков SARS-CoV-2 и MERS-CoV, что делает их многообещающим инструментом в комплексе мер по борьбе с этими вирусами (Guo K. et al., 2021; Koklu A. et al., 2022).

Возможно, область, в которой использование однодоменных антител имеет наибольшие перспективы с точки зрения терапевтического применения — это

лечение аутоиммунных заболеваний. В 2018 году препарат caplacizumab® для лечения редкого нарушения свертываемости крови — тромботической тромбоцитопенической пурпуры — был одобрен EMA (Duggan S. et al., 2018). Вскоре после этого, в 2019 году, этот препарат также был одобрен FDA (Hollifield A. et al., 2020) и сразу вышел на рынок. Другим препаратом на базе однодоменного антитела, который вышел на коммерческий рынок, является ozoralizumab®, разработанный компанией Taisho Pharmaceuticals (Keam S., 2023). В сентябре 2022 года ozoralizumab®, нацеленный на фактор некроза опухоли-альфа, был одобрен для лечения ревматоидного артрита в Японии (Keam S., 2023). Vobarilizumab® является ещё одним многообещающим препаратом на основе однодоменного антитела для лечения ревматоидного артрита, а также системной красной волчанки, путем воздействия на рецептор интерлейкина-6. В настоящее время по данным клинического регистра ClinicalTrials.gov (NCT02518620) опубликованы данные клинических исследований фазы II, сведения о дальнейшем продвижении препарата в более поздние фазы клинической разработки в открытых источниках отсутствуют (на январь 2026 г). На различных стадиях клинических испытаний находятся и другие препараты для терапии аутоиммунных заболеваний: sonelokimab®, нацеленный на интерлейкины-17A и и IL-17F, в рандомизированном плацебо-контролируемом клиническом исследовании фазы II продемонстрировал выраженный положительный эффект у пациентов с активным псориатическим артритом (McInnes I.B. et al., 2025; ClinicalTrials.gov: NCT05640245); gefurulimab®, направленный на аутоантитела к ацетилхолиновым рецепторам при генерализованной миастении, в настоящее время находится на третьей фазе клинических испытаний согласно данным клинического регистра ClinicalTrials.gov (NCT05556096). При этом, по данным пресс-релиза компании-разработчика, опубликованного в отраслевом издании, в исследовании фазы III были достигнуты первичные конечные точки эффективности (Applied Clinical Trials, 2025); M6495, нацеленный на дезинтегрин и металлопротеиназу с тромбоспондиновыми мотивами-5 (ADAMTS-5), исследуется при остеоартрите и прошёл фазу Ib клинических испытаний (ClinicalTrials.gov: NCT03583346); V565, направленный

против фактора некроза опухоли при болезни Крона, находится на второй фазе клинических испытаний (ClinicalTrials.gov: NCT02976129). Имеются также кандидатные молекулы на основе антител, которые демонстрируют обнадёживающие результаты, хотя пока не достигли стадии клинических испытаний, например, для лечения рассеянного склероза (Sadeghian-Rizi T. et al., 2019) и эозинофильной астмы (Ma L. et al., 2022).

Превосходные возможности распознавания уникальных антигенов делают однодоменные антитела многообещающими кандидатами в области терапии рака. Одним из направлений такой терапии является разработка Т-клеток с химерным антигенным рецептором (CAR-T-клетки), экспрессирующих на своей поверхности однодоменные антитела, специфичные к опухолевым антигенам. CAR-T-клетки, использующие фрагменты scFv, могут столкнуться с проблемами надлежащей сборки и ориентации домена при экспрессии на Т-клетках. Использование однодоменных антител может повысить эффективность экспрессии рекомбинантного Т-клеточного рецептора (Benmebarek M. et al., 2019). Для создания CAR-T у пациента извлекаются Т-клетки, которые затем генетически модифицируются для экспрессии на их поверхности однодоменного антитела, специфичного к опухолевому антигену, и повторно вводятся пациенту. Это позволяет Т-клеткам связывать и уничтожать опухолевые клетки с помощью таких механизмов, как высвобождение цитотоксических молекул, индукция апоптоза через активацию рецептора фактора некроза опухоли и секреция воспалительных цитокинов (Jin B. et al., 2023). В 2018 году результаты клинических испытаний первой фазы Т-клеточного кандидата для лечения рефрактерной/рецидивирующей множественной миеломы показали многообещающие результаты (Zhao W.H., 2018). Последующее исследование, проведённое в 2022 году, спустя четыре года после первоначального введения, также подтвердило безопасность и долгосрочную сохранность модифицированных Т-клеток (Zhao W. et al., 2022). После успешного завершения второй фазы клинических испытаний в том же году, в марте, препарат под названием ciltacabtagene® был одобрен FDA (Mullard A. et al., 2022). Также проведён ряд исследований, подтверждающих концепцию создания CAR-T-клеток,

экспрессирующих одиночные, биспецифические или бипаратопические однодоменные антитела, нацеленные на такие опухолевые биомаркеры, как CD20, EGFR и HER2 (Jamnani F. et al., 2014; Albert S. et al., 2017; De Munter S. et al., 2020).

Другим направлением терапии рака является индуцированная гибель клеток посредством активации каспазы-3 и каспазы-8 с использованием поливалентных однодоменных антител, нацеленных на специфические рецепторы опухолевых клеток (Huet H. et al., 2014). Пятивалентное однодоменное антитело к рецептору DR5 способно индуцировать более высокие уровни апоптоза опухолевых клеток, чем четырёхвалентное антитело *in vitro*, демонстрируя при этом более выраженный противоопухолевый эффект (Huet H. et al., 2014). Также возможно применение однодоменных антител, конъюгированных с токсинами, для эндоцитоза в опухолевую клетку. Например, слияние экзотоксина А бактерий рода *Pseudomonas* с однодоменным антителом, специфичным к фактору роста эндотелия сосудов 2, показало перспективность такого подхода (Zhang F. et al., 2017; Behdani M. et al., 2013).

Однодоменные антитела могут быть использованы и в радионуклидной терапии, при которой антитело к опухолевому антигену конъюгируется с радиофармпрепаратом для специфической доставки в опухоль. Так, радиомеченное однодоменное антитело ^{131}I-GMIB-anti-HER2-VHH1 было исследовано в клиническом исследовании первой фазы, в котором продемонстрированы приемлемый профиль безопасности и специфическая аккумуляция в HER2-положительных опухолях у пациентов с раком молочной железы, что подтверждает перспективность данного подхода для HER2-направленной радионуклидной диагностики и терапии (D'Huyvetter M. et al., 2021). Наконец, было показано, что однодоменное антитело, конъюгированное с Fc-областью против рецептора хемокина CXCR4, проявляет антителозависимую клеточную цитотоксичность и усиливает эффекторные функции в отношении опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих CXCR4, без побочных реакций на клетки, не экспрессирующие CXCR4 или имеющие его низкий уровень (Bobkov V. et al., 2018).

Однодоменные антитела также могут быть использованы для нацеливания на определённые мишени внутри клеток и внутриклеточных патогенов. Например, использование флуоресцентно меченых однодоменных антител (хромобелков) внесло значительный вклад в понимание межбелковых взаимодействий и поведения белков-мишеней *in vivo* (Kirchhofer A. et al., 2010; Helma J. et al., 2015; Dmitriev O. et al., 2016; Beghein E. et al., 2017). Многочисленные примеры применения однодоменных антител в качестве блокирующих реагентов при внутриклеточной экспрессии рассмотрены в работе Soetens E. et al. (2020). Ведутся исследования, направленные на предотвращение заражения патогенами путём блокировки проникновения вирусов или бактерий в клетки — например, таких агентов, как вирус иммунодефицита человека (Weiss et al., 2019), респираторно-синцитиальный вирус (Rossey et al., 2017) и бактерии *Salmonella enterica* (Huen et al., 2019). Также изучаются подходы, основанные на ингибировании внутриклеточной репликации вирусов, как, например, в случае вируса гепатита С (Jittavisutthikul et al., 2015).

Благодаря высокой специфичности к целевым структурам по сравнению с низкомолекулярными препаратами, ещё одной потенциальной областью применения однодоменных антител является лечение нейродегенеративных заболеваний. Доставка белковых терапевтических препаратов в мозг представляет собой сложную задачу, поскольку лишь незначительная часть введённых моноклональных антител (0,1–0,2%) достигает мозга из-за ГЭБ. Биспецифические антитела, нацеленные на рецептор трансферрина, обеспечивают трансмиграцию через ГЭБ, перемещая связывающие белки в мозг, что приводит к увеличению доставки препарата в 5–10 раз (Yu Y. et al., 2011; Soleimanizadeh A. et al., 2021). Препараты на основе однодоменных антител, обладающие способностью проникать через ГЭБ, могут открыть новое окно возможностей для исследований и лечения заболеваний мозга. Из фаговой библиотеки однодоменных антител было выделено несколько клонов, способных проникать в слои эндотелиальных клеток мозга с помощью рецептор-опосредованного процесса и доставлять прикреплённый терапевтический «груз» в мозг грызунов (Muruganandam A. et al.,

2002; Abulrob A. et al., 2005; Li T. et al., 2012; Caljon G. et al., 2012; Webster C. et al., 2016; Pothin E. et al., 2020). Несколько однодоменных антител (FC5, FC44, анти-IGF1R5 и анти-VCAM) в различных форматах (моновалентные, биспецифические, липосомально опосредованные или связанные с Fc-фрагментом), выделенные из наивных или иммунных библиотек, продемонстрировали улучшение доставки целевых пептидов в 10–30 раз по сравнению с контролем без использования однодоменных антител (Farrington G. et al., 2014; Glassman P. et al., 2020).

Ещё одна область, в которой для однодоменных антител получены многообещающие результаты — это лечение отравлений змеями и скорпионами. Сообщалось о различных форматах (биспецифических или гуманизированных) однодоменных антител для нейтрализации токсина скорпиона *Androctonus australis hector* (Hmila I. et al., 2010; Ezzine A. et al., 2012; Ben Abderrazek R. et al., 2011), α-кобратоксина змеи *Naja kaouthia* и различных компонентов змеиного яда *Bothrops atrox* (Richard G. et al., 2013; Bailon Calderon H. et al., 2020).

Противоположность наличия широкого спектра однодоменных антител-кандидатов для лечения аутоиммунных и онкологических заболеваний, в терапии инфекционных болезней подобных антител разработано значительно меньше. В 2013 году была опубликована статья о получении однодоменного антитела ARP1 против ротавирусной инфекции, находившегося на второй фазе клинических испытаний (Sarker S. et al., 2013). Однако на январь 2026 года не было представлено обновлений по данному исследованию. Наиболее продвинутым клиническим кандидатом на основе однодоменных антител для лечения инфекционного заболевания является LMN-101. Данный препарат, представляющий собой VHH-производное ингибитора *Campylobacter jejuni*, был изучен в рамках рандомизированного двойного-слепого плацебо-контролируемого клинического исследования фазы II (ClinicalTrials.gov: NCT04182490). Несмотря на завершение этого этапа, подробные результаты исследования не опубликованы в рецензируемой литературе, и сведения о переходе к фазе III в открытых источниках отсутствуют.

Отсутствие одобренных терапевтических однодоменных антител против инфекционных заболеваний не означает их непригодность для борьбы с вирусами, бактериями или паразитами, а скорее указывает на то, что эта область всё ещё находится в зачаточном состоянии. В обзорной литературе последних лет (De Vlieger D. et al., 2018; Wang J. et al., 2021; Mei Y. et al., 2022; Bhattacharya M. et al., 2023; Duan Q. et al. 2025) отмечается устойчивый рост числа работ, обобщающих данные о получении и применении однодоменных антител против различных инфекционных агентов — от вирусов до паразитов и их токсинов (таблица 1).

Однодоменные антитела также могут использоваться в терапии паразитарных инфекций. В исследовании Dietrich M. et al. (2022) были получены два высокоаффинных однодоменных антитела (F5 и F10) против Pfs230 — поверхностного белка, экспрессирующегося во время половой фазы развития *Plasmodium falciparum*, возбудителя малярии. Антитела F5 и F10 уменьшали эксфлагелляцию и нарушали стадию полового размножения мужских микрогамет, тем самым блокируя передачу малярии (Dietrich M. et al., 2022). Однодоменные антитела также представляют интерес для создания препаратов против бактерий и их токсинов. Например, было показано, что три высокоаффинных однодоменных антитела, направленных против поверхностного белка интерналина B, способны нейтрализовать *Listeria monocytogenes in vitro* (King M. et al., 2018). Кроме того, установлено, что одно одновалентное и два двухвалентных биспецифических однодоменных антитела к субъединице B шига-токсина (*Stx*) *Escherichia coli* эффективно нейтрализуют факторы вирулентности *E. coli* (Bernedo-Navarro R. et al., 2018; Lu Z. et al., 2022). В таблице 1 представлены литературные данные о однодоменных антителах, разработанных против различных инфекционных агентов.

Таблица 1 – Однодоменные антитела против различных патогенов

Инфекционный агент	**Название**	**Особенности структуры**	**Литературные источники**
SARS-CoV-2	MR3	двухвалентное, биспецифическое, гуманизированное	Li T. et al., 2021
	aRBD-2, aRBD-3, aRBD-5, aRBD-7, aRBD-41, aRBD-42, aRBD-54	Биспецифическое, с His tag, гуманизированное	Ma H. et al., 2021
	Fu2	двухвалентное, биспецифическое, трёхвалентное, гуманизированное	Hanke L. et al., 2022
	VHH60	гуманизированное	Liu Q. et al., 2024
	Tri-Ty1, Tri-TMH, Tri-TMV	мультивалентные	Hannula L. et al., 2024
	Nbs-104, Nbs-110, Nbs-145	моновалентные	Pavan M. et al., 2024
	S2-VHH-1, S2-VHH-2, S2-VHH-3	Моновалентные, бивалентные, мультивалентные	De Cae S. et al. 2025
MERS-CoV	NbMS10	двухвалентное	He L. et al., 2019;
Вирус гриппа H7N9	NB7-14	двухвалентное	Cunha-Santos C. et al., 2020; Gaiotto T. et al., 2021
Вирусы гриппа A и B	MD3606	трехвалентное, гуманизированное	Laursen N. et al., 2018
Вирус гепатита B	125s	гуманизированное	Wang Y. et al., 2022
Вирус гепатита C	D03	одновалентное	Tarr A. et al., 2013
Вирус Эбола	aEv6	гуманизированное	Esmagambetov I. et al., 2021
Вирус Денге	VHH	одновалентное	Fatima A. et al., 2014
Полиовирус	VHH	множество одновалентных	Thys B. et al., 2010
Норовирус	Nano-26, Nano-85, Nano-4, Nano-26, Nano-42, Nano-27	множество одновалентных	Koromyslova A. et al., 2017
	NB-45, M4	моновалентные	Kher G. et al., 2023
Вирус бешенства	VHH	двухвалентное, бипаратопическое, связанное с альбумином	Terryn S. et al., 2014
ВИЧ	CXCR4	одновалентное и бивалентное	Jähnichen S. et al., 2010; Cunha-Santos C. et al., 2020
	J3, CAP256.J3LS		Zhou T. et al., 2022; Zhang B. et al. 2023

Продолжение таблицы 1

Вирусная диарея крупного рогатого скота	Nb1	VHH-eGFP	Duan H. et al., 2020
Латентная инфекция, вызванная цитомегаловирусом человека (HCMV)	VUN100	Конъюгированное с фотосенсибилизаторами, двухвалентное, VHH-His tag	De Groof T. et al., 2019; De Groof T. et al., 2021
Шига токсины (*Stx*), продуцируемая *Escherichia coli*	Nb113,	двухвалентное, биспецифическое	Bernedo-Navarro R. et al., 2018
	VHH	трёхвалентное, биспецифическое	Mejías M. et al., 2016
Ehrlichia chaffeensis	D7	конъюгированное с CPP	Zhang W., Lin M., et al., 2021

Таким образом, однодоменные антитела демонстрируют широкий потенциал применения в медицине и биотехнологии благодаря своим уникальным физико-химическим свойствам. Они находят применение в терапии аутоиммунных, онкологических, нейродегенеративных и инфекционных заболеваний, используются в диагностике, разработке биосенсоров и систем доставки лекарств. Несмотря на ограниченное количество одобренных препаратов, исследования в этой области активно развиваются, открывая новые возможности для клинического использования однодоменных антител.

1.1.3 Технология получения однодоменных антител методом фагового дисплея

Различные технологии отбора рекомбинантных антител позволяют получать высокоспецифичные антитела *in vitro* фактически против любых мишеней. При этом разнообразие может достигаться за счёт серии соматических гипермутаций и процессов аффинного созревания в В-клетках. Также разнообразие может быть достигнуто синтетическим путём (Jin B. et al., 2023). Существует множество методов селекции рекомбинантных антител. Одним из основных является метод фагового дисплея, который занимает доминирующее положение в случае однодоменных антител (Arbabi-Ghahroudi M., 2022).

Данный метод основан на особенностях строения и функционирования хорошо изученного нитевидного бактериофага M13. Бактериофаг M13 представляет собой вирус нитевидной формы, состоящий из приблизительно 2700 копий белка оболочки pVIII, окружающих одноцепочечную ДНК. На одном из концов фаговой частицы находится по пять копий минорных оболочечных белков pIII и pVI, на другом — белки pVII и pIX (рисунок 5а).

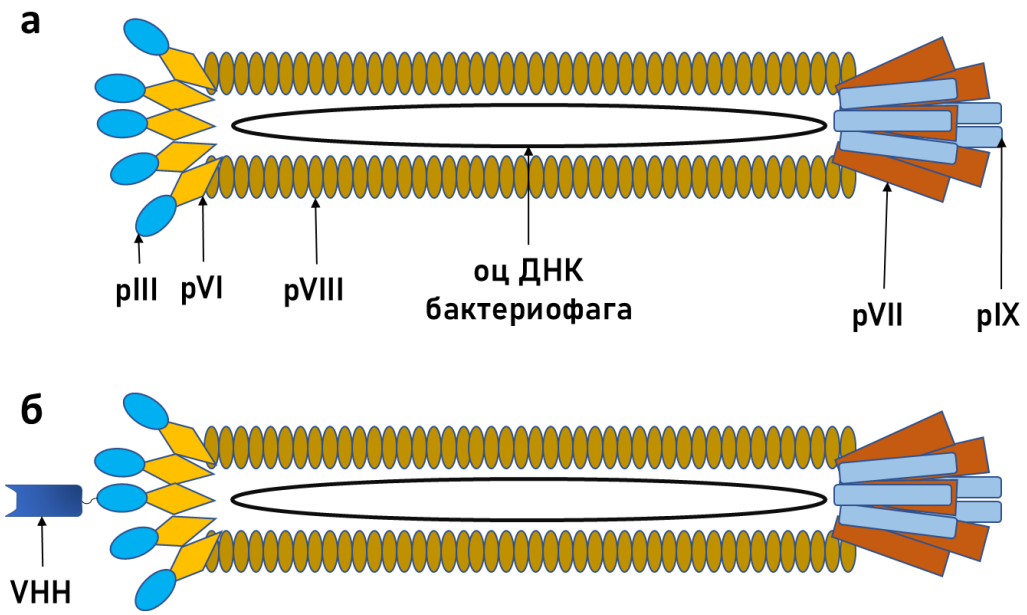


Рисунок 5 – Строение нитчатого бактериофага M13 (а). M13, экспонирующий на своей поверхности в составе белка pIII рекомбинантное однодоменное антитело (б)

Для инфицирования клеток *E. coli* оболочечный белок бактериофага pIII специфически взаимодействует с верхушкой F-пили бактерий и притягивает вирус к клетке (Maneewannakul K. et al., 1993). После попадания фаговой ДНК в цитоплазму она при помощи ферментов репликации *E. coli* превращается в двуцепочечную, плазмидоподобную репликативную форму и впоследствии служит матрицей для транскрипции и трансляции фаговых белков. Сборка фаговых частиц не приводит к лизису клеток-хозяев, и инфицированные клетки продолжают расти и делиться, хотя и медленнее, чем неинфицированные (Model P. et al., 1988). Путём встраивания последовательностей генов VHH во фагмиду, в единую рамку трансляции с геном, кодирующим белок pIII, можно получить репертуар бактериофагов, каждый из которых экспонирует на своей поверхности уникальное

однодоменное антитело (рисунок 5б). Далее из этой библиотеки отбираются фаговые клоны, экспонирующие высокоаффинные варианты.

1.1.3.1 Особенности создания различных библиотек

Отправной точкой получения однодоменных антител является создание библиотеки, содержащей большое разнообразие антител. В зависимости от источника генного репертуара библиотеки их можно разделить на три типа: иммунные, наивные и синтетические (Salvador J. et al., 2019; Muyldermans S., 2021). Однодоменные антитела могут быть отобраны из всех трёх типов библиотек. Однако следует учитывать, что иммунная библиотека содержит репертуар высокоаффинных однодоменных антител к конкретному антигену, в то время как наивная библиотека является универсальным источником антител против любого антигена, но с меньшим сродством. Синтетические библиотеки также обеспечивают универсальные антитела с более низким сродством (по сравнению с иммунными), но их легче сконструировать (Tikunova N.V. et al., 2009).

Наивные библиотеки получают из репертуара естественно реорганизованных генов, кодирующих вариабельные участки HCAb (Olichon A. et al., 2012; Yan J. et al., 2014; Sabir J. et al., 2014). Соответственно, для их создания можно обойтись без иммунизации животных. Некоторые молекулы, такие как РНК или ДНК, являются слабоиммуногенными или, по крайней мере, не вызывают иммунного ответа HCAb, тогда как другие соединения могут быть слишком токсичными или вредными для животных (Muyldermans S., 2021). Для извлечения высокоаффинных однодоменных антител из наивных библиотек следует использовать библиотеки размером 10^9–10^{10} отдельных клонов, из которых более 80% должны кодировать однодоменные антитела (Muyldermans S., 2021). Для создания большой и разнообразной наивной библиотеки рекомендуется забирать кровь у нескольких животных, а не у одного, поскольку это снижает риск смещения разнообразия антител в сторону возможного аллергена или перенесённой инфекции у конкретного животного. По оценкам, на 1 мл крови приходится около 10^6 лимфоцитов (De Genst E. et al., 2006), и, учитывая, что лишь часть из них — это

В-лимфоциты, из которых около 50% экспрессируют HCAb, потребуется более 10 литров крови для создания библиотеки из 10^{10} различных клонов (Muyldermans S., 2021). Кроме того, хотя наивные библиотеки являются более универсальным источником однодоменных антител практически к любому целевому антигену, сродство выделенных антител часто находится в микромолярном диапазоне и редко достигает наномолярного уровня (Monegal A. et al., 2009; Yan J. et al., 2015).

Конструирование синтетических библиотек основано на использовании универсального, хорошо охарактеризованного каркаса VHH с рандомизированными областями CDR (Goldman E. et al., 2006; Moutel S. et al., 2016; Liu B. et al., 2022). Аминокислотное разнообразие сосредоточено в трёх CDR или в непосредственной близости от них. Поскольку длина CDR3 сильно варьируется в однодоменных антителах, синтетическая библиотека строится с использованием различных длин CDR3 (Moutel S. et al., 2016; Zimmermann I. et al., 2020). Учитывая, что многие позиции кодонов рандомизированы и заменены несколькими вариантами кодонов, теоретическое разнообразие всегда на несколько порядков превышает количество реально сгенерированных клонов. Преимущество этого подхода в том, что каждый клон в библиотеке будет уникальным.

Альтернативой наивным и синтетическим библиотекам являются иммунные библиотеки. Их получают после иммунизации животных семейства верблюдовых не менее четырёх раз в течение двух месяцев (Muyldermans S., 2021; Jin B. et al., 2023). Следует отметить, что соотношение HCAb к классическим антителам выше у верблюдов и дромадеров по сравнению с ламами и альпаками (De Genst E. et al., 2006). Это означает, что большее разнообразие однодоменных антител может быть получено от иммунизированного верблюда, чем от иммунизированных лам. Для увеличения разнообразия получаемых однодоменных антител к заранее определённым эпитопам рекомендуется иммунизировать более одного животного, поскольку каждый организм формирует уникальный иммунный ответ. Такой подход позволяет получить более широкую панель однодоменных антител и повышает вероятность отбора наиболее эффективных клонов (Muyldermans S., 2021). Одним из преимуществ иммунных библиотек является то, что они содержат

репертуар высокоаффинных однодоменных антител, сформированный *in vivo*. Вероятность успешного получения однодоменных антител из иммунной библиотеки близка к 100%, если в качестве иммуногена используется белок с нативной конформацией (Muyldermans S., 2021). Особенности подходов к созданию трёх типов библиотек обобщены в таблице 2.

Таблица 2 – Особенности различных библиотек

	Иммунная	**Наивная**	**Синтетическая**
Иммунизация	+	-	-
Необходимый размер библиотеки для отбора VHH	10^6-10^8	10^9-10^{11}	10^9-10^{15}
Среднее сродство отбираемых антител к антигену	Высокое	Среднее	Среднее
Универсальность библиотеки	Низкая	Средняя	Высокая
Вероятность отбора антител к неиммуногенным мишеням	Низкая	Средняя	Высокая

Наиболее распространенным способом получения однодоменных антител является сочетание методов создания иммунной библиотеки и последующего отбора с помощью аффинной селекции. По данным статьи Wilton E. et al. (2018), сочетание этих методов позволило выделить и охарактеризовать однодоменные антитела более чем к тысяче различных антигенов.

1.1.3.2 Основные методические этапы фагового дисплея

Для получения иммунных или наивных библиотек однодоменных антител из лимфоцитов крови животного выделяют мРНК и на её основе синтезируют кДНК. Основное отличие получения иммунной библиотеки от наивной заключается в необходимости предварительной иммунизации животного целевым антигеном (рисунок 6а). Далее применяют двухэтапную полимеразную цепную реакцию – на первом этапе с использованием праймеров CALL001 и CALL002 на матрице кДНК амплифицируют вариабельные участки классических IgG и HCAb, в результате чего получают фрагменты ДНК, соответствующие тяжёлым цепям IgG (≈1000 п.н.) и HCAb (≈700 п.н.) (Pardon E. et al., 2014). На втором после разделения продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле с матрицы тяжёлой цепи

HCAb проводят повторную ПЦР для селективной амплификации последовательностей VHH с использованием праймеров VHH-Back и VHH-For (рисунок 6б) (Pardon E. et al., 2014). Полученные ампликоны лигируют в состав вектора и трансформируют бактериальные клетки (Wang Y. et al., 2021; Baghban R. et al., 2016; Zhao Y. et al., 2021; Muyldermans S., 2021).

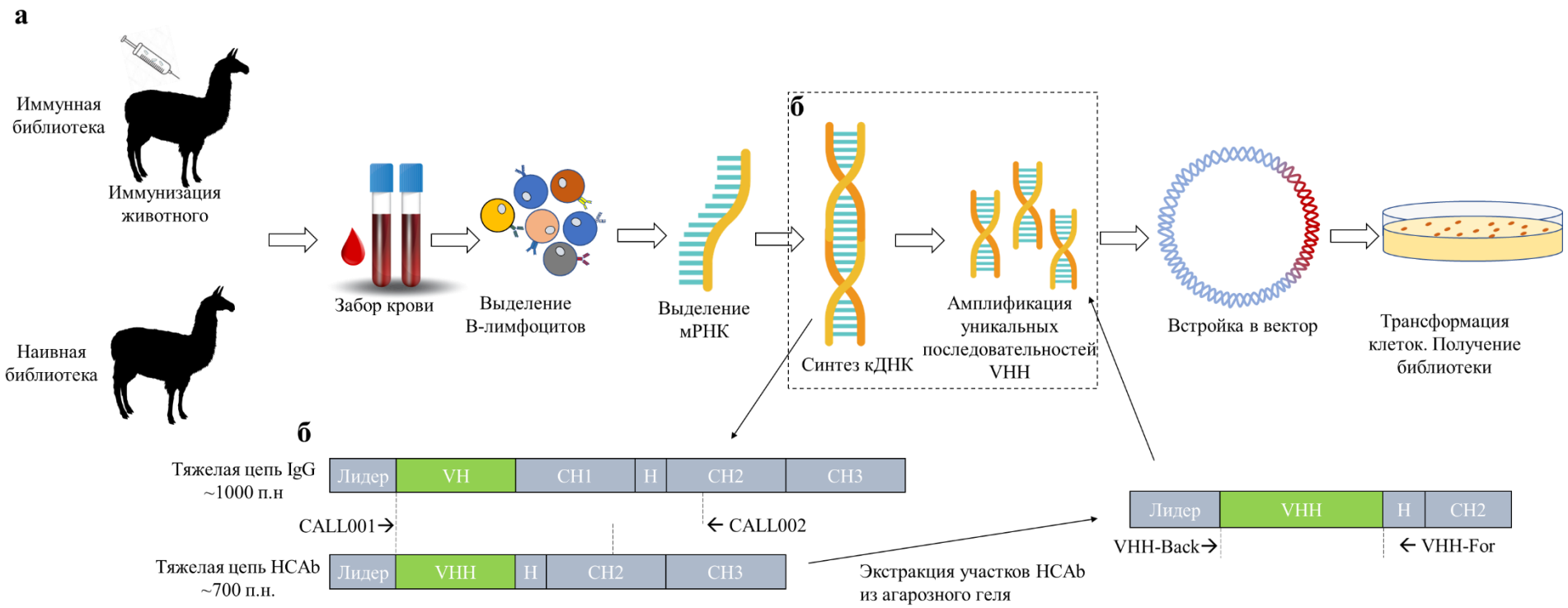


Рисунок 6 – Схематическое представление этапов работы получения натуральных библиотек (а) с подробной схемой амплификации последовательностей VHH (б)

В качестве вектора для встраивания последовательностей однодоменных антител можно использовать фагмидные или фаговые векторы. Интеграция последовательности антитела непосредственно в геном нитевидного бактериофага (фаговый вектор) потенциально приводит к многовалентному дисплею белков на поверхности фага или к протеолитической деградации, что может вызвать удаление части встроенного антитела (Ledsgaard L., 2018). По этой причине на практике чаще применяют фагмидные векторы (фагмиды) (Muyldermans S., 2021). Фагмида — это гибрид фагового вектора и плазмиды, содержащий три ключевых элемента: ген устойчивости к антибиотику, ген рекомбинантного антитела, сшитый с белком pIII бактериофага, и точку начала репликации бактериофага. Для получения функциональных фаговых частиц, экспонирующих на поверхности белок pIII-VHH, клетки *E. coli*, содержащие фагмиду, заражают фагом-помощником. Фаг-помощник содержит полный геном бактериофага M13, кодирующий все белки, необходимые для сборки фага. При формировании фаговых частиц в клетках *E. coli*, содержащих фагмиду и фаг-помощник, белок pIII дикого типа конкурирует с рекомбинантным белком за включение в состав фага. Поэтому около 90% полученной популяции фагов содержат только pIII дикого типа, а подавляющее большинство фагов, экспонирующих pIII–VHH, несут лишь одну копию модифицированного белка (рисунок 7) (Hoogenboom H. et al., 1998; Ledsgaard L. et al., 2018).

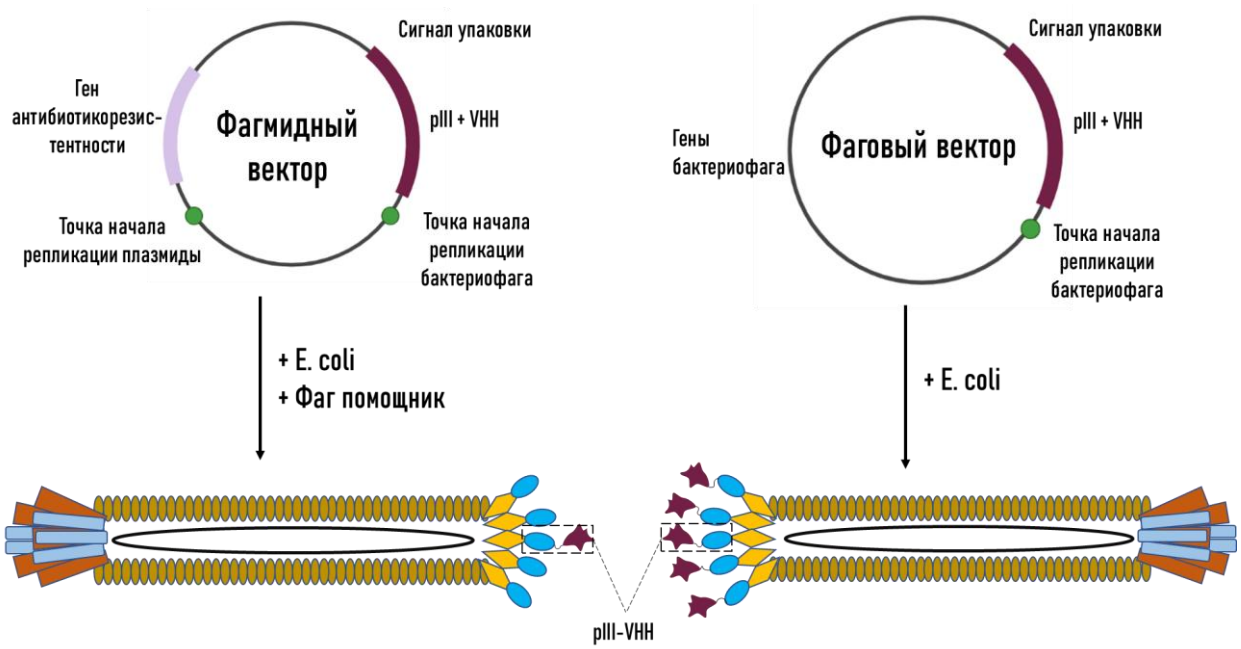


Рисунок 7 – Отличие фаговых и фагмидных векторов и их влияние на сборку фаговых частиц

После трансформации *E. coli* полученным репертуаром фагмид формируют библиотеку бактериофагов, каждый из которых экспонирует на поверхности индивидуальное однодоменное антитело. Полученные библиотеки характеризуют по нескольким параметрам: уровню аффинности антител, размеру библиотеки и функциональному размеру. Под размером библиотеки понимают количество клонов, выросших после трансформации *E. coli* всем репертуаром фагмид, тогда как функциональный размер — это количество клонов, содержащих корректно собранные гены без делеции, сдвига рамки считывания и стоп-кодонов. Функциональный размер всегда несколько ниже номинального, но именно он определяет свойства отбираемых антител.

1.1.3.3 Особенности проведения аффинной селекции

За этапом получения фаговой библиотеки следует этап аффинного обогащения, или биопэннинга — процесса обогащения исходного репертуара антител, присутствующих в библиотеке, антителами, специфически направленными к целевому антигену. Для этого фаговую библиотеку инкубируют с антигеном, удаляют несвязавшиеся фаговые антитела, а

связавшиеся элюируют и нарабатывают в *E. coli* (рисунок 8). В идеальном случае достаточно одного раунда, однако неспецифическое связывание ограничивает степень обогащения за один цикл, и на практике требуется несколько раундов селекции. В то же время после каждого раунда биопэннинга увеличивается количество клонов с дефектной вставкой в генах, кодирующих антитела (Tikunova N.V. et al., 2009). Это означает, что на практике достаточно проведения не более трёх–четырёх раундов селекции.

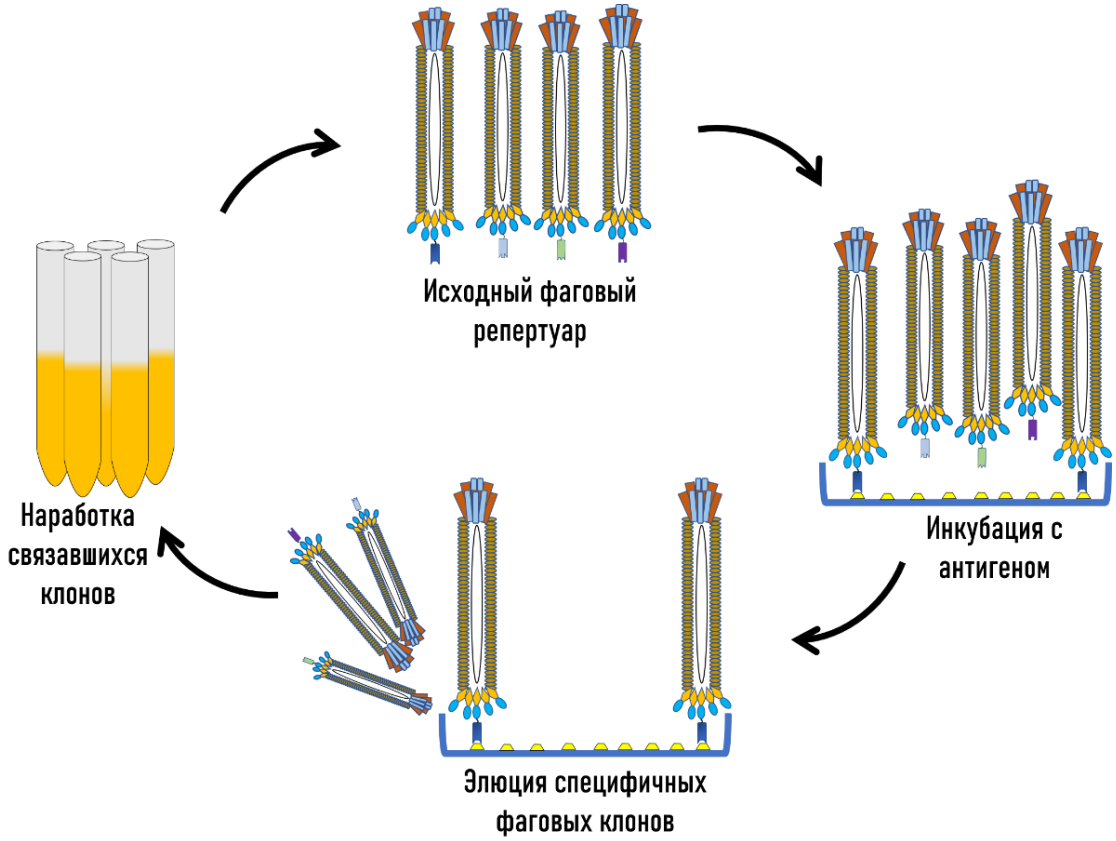


Рисунок 8 – Схема процедуры биопэннинга. Многократные раунды биопэннинга позволяют избавиться от бактериофагов, экспонирующих неспецифические однодоменные антитела, и увеличить количество специфических в исходном репертуаре.

При проведении биопэннинга большую роль играет корректная презентация антигена однодоменным антителам в составе фаговой частицы (Ledsgaard L. et al., 2018). При прямой иммобилизации антигена на пластиковой поверхности лунки он может подвергаться конформационным изменениям. Это приводит к отбору антител против искажённой или денатурированной формы антигена и, как следствие, накоплению фагов с

низким сродством к его нативной конформации (Ledsgaard L. et al., 2018). Кроме того, антигены могут связываться с поверхностью только определёнными участками, что препятствует отбору однодоменных антител к этим участкам. Такая ситуация может быть критичной, если соответствующий участок важен для нейтрализации антигена (Ledsgaard L. et al., 2018). Одним из способов обхода этой проблемы является непрямая иммобилизация антигена с использованием антиген-специфических антител. Также может применяться подход с использованием биотинилированного антигена: сорбирующую поверхность предварительно покрывают стрептавидином (или нейтравидином), после чего добавляют антиген, пришитый к биотину. Основное преимущество такой иммобилизации заключается в том, что антиген удалён от поверхности, что улучшает его презентацию и открывает доступ к большему числу эпитопов (Laustsen A. et al., 2017). Однако важно учитывать, что соотношение биотина и антигена может играть критическую роль: чрезмерное биотинилирование может существенно уменьшить доступную площадь поверхности антигена и препятствовать связыванию с фагом. Кроме того, это может изменить физико-химические свойства антигена, вызывая нежелательные эффекты, такие как агрегация (Laustsen A. et al., 2017).

После нескольких раундов аффинной селекции исходный репертуар бактериофагов в основном состоит из фагов, экспонирующих специфичные однодоменные антитела. При этом каждый отдельный бактериофаг является носителем уникального однодоменного антитела и соответствующей генетической последовательности. Иммунохимические методы позволяют оценить специфичность отдельных фаговых антител и провести дополнительный отбор, исключающий случайные варианты. Переклонировав последовательности, кодирующие однодоменные антитела, из фагмид в экспрессионные векторы (прокариотические или эукариотические), можно получить продуценты специфических однодоменных антител (Pardon E. et al.,

2014; Salvador J. et al., 2019; Muyldermans S., 2021; Su Q. et al., 2022) (рисунок 9).

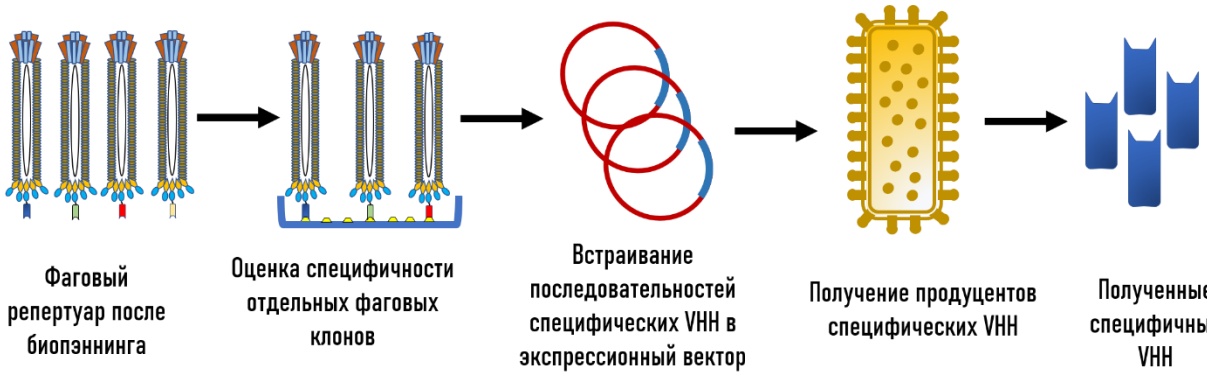


Рисунок 9 – Схема получения специфических однодоменных антител из фагового репертуара

Заключение по литературному обзору

Однодоменные антитела, наноантитела, VHH — вариабельный домен особых неканонических антител (HCAb) верблюдовых, состоящих только из укороченных тяжёлых цепей, без участия лёгких цепей. Небольшие размеры однодоменных антител делают их удобными молекулами, способными эффективно связываться с недоступными для полноразмерных антител «скрытыми» конформационными эпитопами антигена. Однодоменные антитела более стабильны в широком диапазоне pH и температур, не склонны к агрегации и обладают повышенной растворимостью по сравнению с тяжёлыми цепями антиген-связывающих участков IgG. Уникальные свойства однодоменных антител позволяют применять их в различных областях медицины, биологии и экологии. В настоящее время активно ведутся исследования по их применению в диагностике инфекционных заболеваний, терапии рака и аутоиммунных патологий, а также для обнаружения химических веществ в окружающей среде.

Разработка и совершенствование технологий создания библиотек, а также методов селекции, включая фаговый дисплей и биопэннинг, обеспечили надёжный и воспроизводимый способ получения однодоменных антител с высоким сродством и специфичностью. В настоящее время основным подходом получения специфических однодоменных антител является аффинная селекция из иммунной библиотеки, которая позволяет получать антитела к широкому спектру антигенов и служит основой для их применения в научных и клинических целях. За последнее десятилетие несколько препаратов на основе однодоменных антител получили одобрение FDA и EMA для лечения различных заболеваний, таких как ревматоидный артрит и нарушения свёртываемости крови. Однако одобренных однодоменных антител против инфекционных патогенов пока не существует. Это свидетельствует о начальной стадии развития данного направления и подчёркивает необходимость дальнейших исследований, направленных на получение и изучение новых однодоменных антител.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы

2.1.1 Основные компоненты для приготовления питательных сред, реактивы, реагенты и прочие материалы

Реактивы производства АО «Сибэнзим» (Россия): эндонуклеазы рестрикции с прилагаемыми буферами, ДНК-лигаза фага Т4 с буфером, маркер молекулярной массы ДНК 1 kb, дезоксинуклеозидтрифосфаты (dNTPs), полимераза Pfu с буфером.

Реактивы производства ООО «Евроген» (Россия): буфер быстрого лигирования 5× Quick Ligation Buffer, набор Cleanup Standard для очистки ДНК из агарозного геля и реакционных смесей, набор Plasmid Miniprep для выделения плазмидной ДНК, реагент ExtractRNA для выделения мРНК, набор Mint Kit для обратной транскрипции.

Реактивы производства New England Biolabs (США): высокоточная ДНК-полимераза Q5 с прилагаемым 5× буфером и 5× Q5 High-Fidelity Enhancer.

Реактивы производства AntibodySystem (Китай): рекомбинантный человеческий ACE2, конъюгированный с пероксидазой хрена (HRP).

Реактивы производства PanReac Applichem (Испания): 3,3′,5,5′-тетраметилбензидин (TMB).

Реактивы производства «Serva» (Германия): акриламид, N,N,N′,N′-тетраметилэтилендиамин (TEMED), трис(гидроксиметил)аминометан (Tris), N,N-метиленбисакриламид, изопропил-β-D-тиогалактозид (IPTG), додецилсульфат натрия (SDS).

Реактивы производства Sigma-Aldrich (США): бромистый этидий, бычий сывороточный альбумин (BSA), агароза, ацетат калия, β-меркаптоэтанол, бакто-агар, бакто-триптон, дрожжевой экстракт, диметилсульфоксид (DMSO), антивидовые антитела, конъюгированные с пероксидазой.

Реактивы производства ООО «Гротекс» (Россия): вода для инъекций, 40% раствор глюкозы.

Реактивы производства Thermo Fisher Scientific (США): РНКаза, маркеры молекулярной массы белков PageRuler Prestained Protein Ladder (диапазоны 10–180 кДа и 10–250 кДа), античеловеческие IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (anti-Human IgG-HRP).

Реактивы производства «Abcam» (Великобритания): антитела против бактериофага M13, конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP Anti-M13 Bacteriophage).

Реактивы производства АО «Реахим» (Россия): хлористоводородная кислота, хлорид натрия, гидроксид натрия, этанол, изопропанол. Степень очистки всех веществ — не ниже «ч.д.а.» (чистые для анализа).

Реактивы производства ОАО «Синтез» (Россия): антибиотики ампициллин и канамицин.

Реактивы производства ООО «Росмедбио» (Россия): PBS.

Реактивы производства «Qiagen» (Германия): сорбент для аффинной хроматографии Ni-NTA.

Олигонуклеотидные праймеры: синтез праймеров выполнен в коммерческой научно-производственной фирме ООО «ДНК-Синтез» (г. Москва).

Таблица 3 – Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Название	Нуклеотидная последовательность 5′-3′
RBD-F	AAAAAAGAATTCGCTGGCTAGCCATGTTTGTTTTTCTTGTTTTATTGCCAC TAGTCTCTAGTCAGTGTGTGGAAAAGGGCATCTACCAGAC
RBD-R	AAAAAAGTCGACGAGGCTGATCAGCGGTTTAAACTTAAGCTTAGTGGTGG TGATGGTGATGATGGTGGTGATGGAAGTTCAC
Spike-F	AAAAAAGCTAGCAGCCATGTTTGTT
Spike-R	TCGGTCGACTTAGTGGTGGTGATGGTGATGATGGTGGTGATGCAGAAAGG TAGACAGCAGCACCCACTCGCCATCCTTTCTCACATAGGCCTGGCCATCT CTAGGGGCCTCAGGGATGTAGCCGGGCCA
Phage-F	AAAAAACATATGAAATACCTATTGCCTACGGCA
Phage-R	AAAAAAGTCGACACCACTACCGCTACCTGAGGAGACGGTGACCTGGG

2.1.2 Питательные среды

Для работ с клетками *E.coli* использовались следующие питательные среды:

Питательная среда YT×2: 16 г/л бактотриптона, 10 г/л дрожжевого экстракта, 5 г/л NaCl, pH среды доводился до 7,2 с использованием раствора NaOH (5 М).

Питательная среда YT×2/agar: композиция питательной среды LB с добавлением 15 г/л бактоагара.

Питательная среда SOB: 20 г/л тритона, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0,5 г/л NaCl, 0,037 г/л KCl.

Для работы с клетками млекопитающих применялись следующие среды: *Питательная среда DMEM/F-12* (1:1), стерильная, без L-глутамина (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор», р.п. Кольцово, Россия).

Питательная среда MEM с L-глутамином (Gibco, США) для поддержания культуры клеток Vero E6.

2.1.3 Растворы и буферы

Электрофорез ДНК в агарозном геле: TAE-буфер: 40 мМ Tris-HCl, 40 мМ уксусной кислоты (CH_3COOH), 2 мМ ЭДТА, pH 8,0.

Электрофорез белков в SDS-ПААГ: Электродный буфер: 25 мМ Tris, 192 мМ глицин, 0,1% SDS, pH 8,3. Разрешающий гель: 44% акриламид, 1,5 М Tris-HCl (pH 8,8), 50 мг/мл персульфат аммония, 3 мкл/мл TEMED. Концентрирующий гель: 30% акриламид, 0,5 М Tris-HCl (pH 6,8), 50 мг/мл персульфат аммония, 4 мкл/мл TEMED. Буфер для нанесения образцов: 0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксиленцианол, 50% водный раствор глицерина. Раствор для окрашивания Кумасси R-250: 0,1–0,2% Кумасси R-250, 40–50% этанол, 10% уксусная кислота.

Аффинная хроматография: Базовый буфер: 30 мМ NaH_2PO_4, 0,5 М NaCl, 20 мМ имидазол. Элюирующий буфер: 30 мМ NaH_2PO_4, 0,5 М NaCl, 0,5 М имидазол.

Твердофазный и конкурентный ИФА: Буфер для сорбции антигенов: 0,1 М $NaHCO_3$. pH 8,0. Блокирующий буфер: 1% BSA в PBS-T (137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl, 10 мМ Na2HPO4, 1,8 мМ KH2PO4, 0,05% Tween-20, pH 7,4). Промывочный буфер: 0,5% PBS-T. Буфер для остановки реакции: 1 Н HCl.

Аффинная селекция фаговых клонов: Буфер для сорбции антигенов: 0,1 М $NaHCO_3$. pH 8,0. Блокирующий буфер: 5% BSA в 0,1 М $NaHCO_3$. Буфер TBS: 50 мМ Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, pH 7,5. Буфер TBS-T: 0,1%Tween-20 в TBS. Элюирующий буфер: 0,2 М глицин-HCl, 1мг/мл BSA. Нейтрализующий буфер: 1 М Трис-HCl, pH 9,1.

Осаждение фаговых частиц: Раствор PEG/NaCl: 2,5 М NaCl, 20% (от общего объёма) полиэтиленгликоль (PEG 8000).

2.1.4 Клеточные линии, штаммы бактерий и вирусов

Для проведения генно-инженерных манипуляций использовались клетки *Escherichia coli* штамма NEB Stable (генотип: F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zzf::Tn10 (TetR) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrrhsdRMS-mcrBC)) (New England Biolabs, США).

Для получения электрокомпетентных клеток использовался штамм *E. coli* XL1-Blue [endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac F′ proAB lacIqZΔM15 Tn10 (Tet^R)] (New England Biolabs, США).

Для амплификации фаговой библиотеки и фага-помощника применялся штамм *E. coli* TG1 [traD36 proAB lacIqZ ΔM15] supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(rK - mK -) (New England Biolabs, США).

Для получения рекомбинантных форм однодоменных антител использовались клетки *E. coli* штамма BL21(DE3) (генотип: F– ompT gal dcm lon hsdSB(rB–mB–) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λS)).

Для ампификации фаговых клонов использовали фаг-помощник M13K07 (New England Biolabs, США), содержащий ген устойчивости к канамицину.

Для оценки вируснейтрализующей активности однодоменных антител *in vitro* применялась перевиваемая клеточная линия Vero E6 (почка африканской зелёной мартышки), полученная из Коллекции культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Новосибирская область, Россия).

В качестве вирусных агентов использовались штаммы SARS-CoV-2: Wuhan (hCoV-19/Australia/VIC01/2020), Delta (hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021), Omicron 1 (hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021) и XBB.1.5 (hCoV-19/Russia/TYU-SRC-8642/2023), предоставленные Государственной коллекцией возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (р.п. Кольцово, Россия).

2.1.5 Рекомбинантные белки и фаговая библиотека

В настоящем исследовании использовались рекомбинантные RBD и тримеры S белка SARS-CoV-2 вариантов Wuhan-Hu-1, Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529). Рекомбинантные RBD и тример S белка варианта Wuhan-Hu-1 ранее получены и описаны в работе (Merkuleva I. et al., 2022). Варианты Beta (B.1.351), Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529) получены в рамках данной работы. Для краткости, во всех разделах диссертации все варианты обозначаются как Wuhan, Beta, Delta и Omicron без указания полных номенклатурных наименований.

Фаговая библиотека, полученная на основе В-лимфоцитов ламы, иммунизированной RBD варианта Wuhan, была любезно предоставлена Институтом молекулярной и клеточной биологии СО РАН (зав. отд. молекулярной иммунологии Таранин А.В.).

2.1.6 Биоматериалы

Для оценки антигенных свойств полученных RBD и S белков использовали сыворотки крови людей, перенёсших COVID-19 (Shaprova et al., 2023). Протокол исследования был утверждён Этическим комитетом Алтайского государственного медицинского университета (Протокол 9 от 23 октября 2020 года). Все участники подписали форму информированного согласия до участия в этом исследовании.

2.1.7 Программное обеспечение

Для планирования и верификации схем клонирования, подбора рестриктаз и анализа ожидаемых фрагментов при рестрикционном расщеплении ДНК, а также для анализа результатов секвенирования и проверки корректности вставок использовалась программа SnapGene, версия 3.2.1.

Для выравнивания нуклеотидных и аминокислотных последовательностей однодоменных антител использовалось программное обеспечение BioEdit, версия 7.2.5. Анализ частоты встречаемости аминокислот в каждой позиции проводился с использованием веб-инструмента WebLogo, версия 3.7.9.

Прогнозирование третичной структуры однодоменных антител выполнялось с использованием нейросетевого алгоритма AlphaFold2 (Jumper J. et al., 2021). Оценка возможности взаимодействия комплексов антитело–антиген осуществлялась с помощью протокола белок-белкового докинга PIPER (Kozakov D. et al., 2006). Анализ пространственных моделей третичных структур антител и комплексов антитело–антиген проводился в программном комплексе VMD (Visual Molecular Dynamics) с использованием инструмента RMSD Trajectory Tool (Humphrey W. et al., 1996).

2.2 Методы

2.2.1 Подбор и оптимизация генетических последовательностей, дизайн праймеров

Последовательности генов SARS-CoV-2, кодирующих белок S, включающий RBD в своем составе, извлекали из базы данных GenBank или GISAID и проводили оптимизацию кодонного состава для клеток CHO при помощи инструмента GeneOptimizer. ID последовательностей в базе данных для варианта Beta (B.1.351): GISAID EPI_ISL_712096; Delta (B.1.617.2): GenBank MZ724413.1; Omicron (B.1.1.529): GenBank OL672836.1. Индекс адаптации кодонов CAI (англ. Codon Adaptation Index) был улучшен с 0,63 до 0,73. Итоговую нуклеотидную последовательность синтезировали на заказ в ООО «ДНК-синтез» в составе вектора pGH.

Амплификацию фрагментов RBD вариантов Beta и Delta проводили с использованием праймеров RBD-F/RBD-R, в состав которых были включены последовательности, кодирующие сигнальный пептид, десять остатков гистидина, а также сайты гидролиза AsuNHI и SalI.

Для амплификации нуклеотидной последовательности S белка вариантов Delta и Omicron использовали модифицированный ген поверхностного белка с удалённым сайтом протеолитического расщепления S1/S2, а также аминокислотными заменами K984P и V985P в области S2. С помощью праймеров Spike-f и Spike-r в нуклеотидную последовательность был добавлен домен тримеризации фибритина бактериофага T4 (foldon), обеспечивающий формирование тримерной структуры, десять остатков гистидина и сайты рестрикции AsuNHI и SalI. Нуклеотидные последовательности праймеров приведены в таблице 3 (раздел 2.1.1.).

Для амплификации нуклеотидных последовательностей, кодирующих однодоменные антитела, были сконструированы праймеры Phage-F и Phage-R. В их состав были включены сайты рестрикции FauNDI и SalI, обеспечивающие возможность направленного встраивания в экспрессионный вектор pET21a(-).

2.2.2 Амплификация нуклеотидных последовательностей RBD, S белка и однодоменных антител

Для проведения реакции амплификации RBD/S белков реакционные смеси, объемом 50 мкл, содержали 5-10 нг ДНК-матрицы; 0,2 мМ каждого из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов; 0,2 мкМ каждого праймеров; 5 мкл 10× SE-буфера для PfuSE ДНК полимеразы («СибЭнзим», г. Новосибирск); 1 мг/мл BSA; 2,5 ед/акт. PfuSE ДНК полимеразы («СибЭнзим», г. Новосибирск). Температурный профиль реакции состоял из начальной денатурации при 95 °С в течение 3 мин и 30 циклов (30 с денатурации при 95 °С, 20 с отжига при 60 °С и 2 мин элонгации при 72 °С) с финальной элонгацией в течение 5 мин при 72 °С.

Для амплификации однодоменных антител в качестве матрицы использовались фагмиды, выделенные из индивидуальных фаговых клонов. Реакционная смесь полимеразной цепной реакции объёмом 50 мкл включала: 10 мкл 5× буфера для Q5 (New England Biolabs, США), 10 мкл 5× Q5 High-Fidelity Enhancer, 1 мкл смеси dNTP (25 мМ суммарно; конечная концентрация 0,125 мМ каждого нуклеотида), по 1 пмоль каждого олигонуклеотидного праймера (Phage-F и Phage-R), 1 мкл Q5 ДНК-полимеразы 100 нг фагмидной ДНК. Реакционную смесь доводили до конечного объёма 50 мкл деионизированной водой. Амплификацию проводили в термоциклере Veriti (Applied Biosystems, США). Температурный режим ПЦР включал предварительное денатурирование при 98 °С в течение 30 с (1 цикл), затем 30 циклов, состоящих из денатурирования при 98 °С в течение 10 с, отжига праймеров при 58 °С в течение 30 с и элонгации при 72 °С в течение 15 с, с последующей заключительной элонгацией при 72 °С в течение 2 мин (1 цикл).

Полученные ампликоны RBD/Sбелка/однодоменных антител анализировались методом электрофоретического разделения в 1% агарозном геле в буфере ТАЕ с добавлением интеркалирующего красителя. Целевые фрагменты вырезались и очищались из геля с использованием коммерческого набора (Cleanup Mini, Евроген, Россия).

2.2.3 Ферментативный гидролиз

Рестрикционный гидролиз ДНК проводился в реакционной смеси объёмом 25 мкл, содержащей 1-2 мкг ДНК, рестриктазу из расчёта 1-2 единицы активности на 1 мкг ДНК и 2 мкл соответствующего буфера для рестриктазы (1× концентрации), предоставленного производителем (НПО «Сибэнзим», Россия). Инкубация осуществлялась в условиях, рекомендованных производителем, при оптимальной температуре для используемого фермента, в течение 1-2 ч. Затем продукты реакции очищали от компонентов рестрикционной смеси для проведения лигирования.

Очищенные ампликоны RBD вариантов Beta и Delta, а также вектор pVEAL2 обрабатывали эндонуклеазами рестрикции AsuNHI и SalI. Ампликоны S белка вариантов Delta и Omicron, а также вектор pVEAL3 обрабатывали эндонуклеазами AsuNHI и SalI.

Очищенные ампликоны однодоменных антител, а также вектор pET21a(–) подвергались рестрикционному расщеплению эндонуклеазами FauNDI и SalI.

2.2.4 Лигирование

Полученные фрагменты лигировались с вектором с использованием ДНК-лигазы бактериофага T4 в условиях, рекомендованных производителем фермента. Лигирование ДНК осуществлялось при комнатной температуре (≈25 °C) в течение 30 мин. Реакционная смесь объёмом 20 мкл содержала 2 мкг амплифицированных фрагментов, 1 мкг векторной плазмиды, 20 единиц активности ДНК-лигазы фага T4 и 1× буфер для лигирования, входящий в состав коммерческого набора (Thermo Scientific, США).

2.2.5 Выделение и очистка плазмидной и фрагментированной ДНК

Выделение плазмидной ДНК осуществлялось с использованием набора «Plasmid Miniprep» (Евроген, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Процедура включала щелочной лизис бактериальных клеток, осаждение белков и хромосомной ДНК, адсорбцию плазмидной ДНК на

силикагелевую мембрану, промывку и элюирование в буфере с низкой ионной силой. Элюирование производилось в объёме 30-50 мкл стерильной деионизированной воды или специализированного буфера из набора.

Очистка фрагментов ДНК из агарозного геля, а также из ферментативных реакционных смесей (включая продукты ПЦР, рестрикции и лигирования) осуществлялась с использованием набора «Cleanup Mini» (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Для очистки применялись стадии адсорбции ДНК на силикагелевую мембрану, промывки и элюирования в буфере с низкой ионной силой. Элюирование очищенной ДНК проводилось в 30-50 мкл стерильной деионизированной воды или специализированного буфера из набора.

2.2.6 Определение нуклеотидной последовательности ДНК

Секвенирование ДНК проводилось методом Сэнгера в ЦКП «Геномика» СО РАН. В качестве реактивов использовался набор CEQ2000 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (Beckman Coulter, США). Анализ флуоресцентно-меченых фрагментов проводился с применением 16-капиллярного автоматического секвенатора ABI 3130xlGenetic Analyzer (Applied Biosystems, США).

2.2.7 Химическая трансформация клеток *E. coli*

Трансформация клеток *E. coli* штамма NEB Stable проводилась методом температурного шока. К 100 мкл предварительно оттаянных компетентных клеток добавлялось 10 мкл лигазной смеси в соотношении 1:10 (ДНК:вектор), после чего суспензия инкубировалась на льду в течение 30 мин. Затем клетки подвергались температурному шоку при 42 °C в течение 45 с, после чего немедленно охлаждались на льду в течение 2 мин. К суспензии добавлялось 200 мкл среды SOB, и клетки инкубировались при 37 °C в течение 60 мин без аэрации для восстановления. По завершении инкубации культура наносилась на поверхность агаризованной LB-среды, содержащей соответствующий антибиотик. Инкубация чашек Петри проводилась при 37 °C в течение 16 ч.

Трансформация клеток *E. coli* штамма BL21(DE3) проводилась с использованием метода, основанного на обработке хлористым кальцием. Дневную культуру получали посевом 50 мкл ночной культуры в 5 мл LB среды с последующей инкубацией при 37 °C в течение 2–3 ч до достижения оптической плотности 0,6 - 0,8. Культуру распределяли по 1,5 мл в пробирки и охлаждали на льду 15 мин. После центрифугирования при 6000 об/мин в течение 2 мин при 4 °C супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 700 мкл предварительно охлаждённого 0,1 М раствора $CaCl_2$, после чего образцы инкубировали на льду в течение 15 мин. Осадок вновь собирали центрифугированием, ресуспендировали в 100 мкл раствора $CaCl_2$ с добавлением 1 мкл плазмидной ДНК, и инкубировали при 4 °C в течение 30 мин. Далее образцы подвергали инкубации при 37 °C в течение 5 мин. После этого добавляли 100 мкл LB среды и инкубировали при 37 °C без аэрации в течение 1 ч для восстановления. Завершающим этапом было растираниие 200 мкл трансформированной суспензии на поверхность агаризованной LB среды. Посевы инкубировали при 37 °C в течение 16 ч.

2.2.8 Получение продуцентов RBD и S белков в эукариотической системе экспрессии

Рекомбинантные белки RBD и тримеризованного S белка SARS-CoV-2 получали синтезированием в клетках линии CHO-K1. Для получения RBD использовали плазмидные конструкции pVEAL2_RBDβ (вариант Beta) и pVEAL2_RBDΔ (вариант Delta), а для получения S белка pVEAL3_SΔ (вариант Delta) и pVEAL3_SO (вариант Omicron).

Клетки CHO-K1 ко-трансфицировали экспрессионными плазмидами, содержащими последовательности целевых белков, совместно со вспомогательной плазмидой pCSB100, кодирующей транспозазу SB100, с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с рекомендациями производителя. Экспрессия транспозазы обеспечивала интеграцию экспрессионной кассеты в геном клеток. После

трансфекции клетки культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (FBS), 2 мМ L-глутамина и 100 Ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при температуре 37 °C в атмосфере 5% CO_2. Отбор трансфицированных клеток проводили в присутствии селективного антибиотика пуромицина в концентрации 5 мкг/мл в течение 7–10 суток до формирования стабильного пула продуцентов.

Из полученного пула клеток CHO-K1-RBD и CHO-K1-S проводили выделение отдельных клонов методом лимитирующего разведения в 96-луночных планшетах. Продукцию рекомбинантных белков оценивали методом «сэндвич»-ИФА с использованием специфических антител W25 (Modhiran N. et al., 2023) в качестве сорбированных на планшете захватывающих антител, а также моноклональных антител к полигистидиновой последовательности (anti-His-HRP, Abcam, Великобритания) для детекции. Клоны, характеризующиеся наибольшим сигналом в ИФА, отбирали для дальнейшего масштабирования и культивирования.

Культивирование отобранных клонов осуществляли в T75 флаконах и далее в роллерных бутылях 2000 мл в роллерной установке (120 об/мин) в течение 4–6 суток с накоплением секретируемых рекомбинантных белков в культуральной среде. Культуральную среду собирали и очищали от клеточного дебриса центрифугированием при 4000 g в течение 15 мин при 4 °C и последующей фильтрацией через мембранные фильтры с размером пор 0,22 мкм.

2.2.9 Очистка рекомбинантных белков RBD и S

Очистку рекомбинантных белков из культуральной среды проводили методом металл-хелатной аффинной хроматографии на сорбенте Ni-NTA (Qiagen, Германия) за счёт наличия С-концевого гистидинового тега. Связывание белка с сорбентом осуществляли в буфере 20 мМ Na-фосфат, 300

мМ NaCl, 10 мМ имидазол, pH 7,4, отмывку буфером с добавлением 20–40 мМ имидазола, элюцию буфером, содержащим 250 мМ имидазола.

Дополнительную очистку белков проводили методом ионообменной хроматографии на сорбентах SP-сефароза (катионообменная) и Q-сефароза (анионообменная) (GE Healthcare, США). Разделение проводили в градиенте концентрации NaCl от 50 до 1000 мМ в буфере 20 мМ Tris-HCl, pH 7,5. Полученные фракции анализировали и объединяли на основании данных УФ-абсорбции при 280 нм и электрофоретического анализа. Чистоту и молекулярную массу рекомбинантных белков оценивали методом электрофореза в 12,5% SDS-ПААГ в денатурирующих условиях.

2.2.10 Аффинная селекция (биопэннинг)

Основным различием между раундами биопэннинга являлась используемая мишень для отбора фаговых клонов. В первых трёх раундах в качестве мишеней применялись рекомбинантные домены RBD вариантов SARS-CoV-2: Wuhan-Hu-1, Beta (B.1.351) и Delta (B.1.617.2). В четвёртом раунде использовался рекомбинантный тример S белка варианта Omicron (B.1.1.529).

Сорбция антигенов проводилась в 96-луночных планшетах путём нанесения по 150 нг растворённого в сорбционном буфере рекомбинантного белка в каждую лунку. Планшеты инкубировались при 4 °C в течение 16 ч. После инкубации проводилась блокировка неспецифических сайтов добавлением 150 мкл блокирующего буфера (5% BSA в 0,1M $NaHCO_3$) на лунку с последующей инкубацией в течение 1 ч при 4 °C. Промывка планшетов осуществлялась раствором TBS-T. Затем в лунки вносилась суспензия фагов с титром 1×10^{10} БОЕ/мл, и инкубация проводилась при комнатной температуре в течение 1 ч. После инкубации лунки промывались тем же буфером. Для элюции связавшихся фагов добавлялось по 100 мкл элюирующего буфера на лунку, с последующей инкубацией при комнатной

температуре в течение 15 мин на шейкере при 25 об/мин. Реакция завершалась добавлением 15 мкл нейтрализующего буфера.

Все этапы биопэннинга проводились в трёх независимых повторах. Полученные элюаты амплифицировались, после чего нуклеотидные последовательности отдельных фаговых клонов подвергались секвенированию методом Сэнгера.

2.2.11 Наработка фаговых клонов

Для наработки фаговых клонов использовалась дневная культура *E. coli* штамма TG1 с оптической плотностью OD_{600} = 1,0. К 1 мл клеточной суспензии добавлялось 20 мкл фагового элюата, после чего инкубация проводилась при комнатной температуре в течение 15 мин без перемешивания. Далее добавлялось 10 мкл раствора ампициллина (100 мг/мл), и инкубация продолжалась в шейкер-инкубаторе при 37 °C в течение 1 ч. После этого вносилось дополнительно 15 мкл ампициллина, и инкубация продолжалась при тех же условиях ещё 1 ч. Затем к клеточной суспензии добавлялся фаг-помощник M13K07 в объеме 1 мл (титр 1×10^{10} БОЕ/мл), 148 мл среды LB, предварительно подогретой до 37 °C, и 75 мкл раствора ампициллина (100 мг/мл). Инкубация продолжалась при 37 °C в шейкер-инкубаторе в течение 2 ч. Далее добавлялось 280 мкл раствора канамицина (50 мг/мл), и инкубация продолжалась при тех же условиях в течение 16 ч. Культура центрифугировалась при 5000 об/мин в течение 15 мин при 4 °C. Супернатант переносился в чистую охлаждённую центрифужную бутылку, после чего добавлялся раствор PEG/NaCl в объёме 1/5 от общего объёма супернатанта. Инкубация производилась при 4 °C в течение 1–1,5 ч. Осаждённые фаговые частицы концентрировались центрифугированием при 9000 об/мин в течение 15 мин при 4 °C. Надосадочная жидкость удалялась, осадок ресуспендировался в 2 мл буфера TBS. Образовавшаяся суспензия переносилась в микроцентрифужные пробирки и дополнительно

центрифугировалась при 13000 об/мин в течение 5 мин при 4 °С. Полученный супернатант содержал очищенные фаговые частицы и хранился при 4 °С.

2.2.12 Ампфликация фага-помощника M13K07

Для амплификации фага-помощника M13K07 использовалась культура *E. coli* штамма TG1 с оптической плотностью OD_{600} = 0,4. На 10 мл клеточной суспензии вносился фаг-помощник M13K07 в количестве ≈8×10^{10} БОЕ. Смесь инкубировалась при 37 °С в течение 30 мин без перемешивания. После завершения инкубации добавлялось 200 мл среды LB, содержащей 200 мкл раствора канамицина (50 мг/мл), и инкубация продолжалась в шейкер-инкубаторе при 37 °С в течение 16 ч. По окончании инкубации культура центрифугировалась при 10 000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. К полученному супернатанту добавлялось 1/5 объёма раствора осаждающего реагента PEG/NaCl, после чего суспензия инкубировалась при 4 °С в течение 16 ч. Фаговые частицы осаждались центрифугированием при 15 000 об/мин в течение 15 мин при 4 °С. Образовавшийся осадок ресуспендировался в 2 мл буфера TBS и дополнительно очищался путём повторного центрифугирования при 15 000 об/мин в течение 10 мин при 4 °С. Полученный препарат фага-помощника M13K07 хранился при 4 °С.

2.2.13 Определение биологического титра фаговой библиотеки и фага-помощника M13K07

Для титрования фаговой суспензии в микроцентрифужные пробирки вносилось по 45 мкл стерильной среды LB. В первую пробирку добавлялось 5 мкл фаговой суспензии, после чего смесь аккуратно перемешивалась и 5 мкл переносились в следующую пробирку. Таким образом, готовилась серия десятикратных разведений.

Параллельно в отдельные пробирки вносилось по 150 мкл культуры *E. coli* штамма TG1 с оптической плотностью OD_{600} = 0,4–0,5. К каждой пробирке с клетками добавлялось по 25 мкл соответствующего разведения

фаговой суспензии. Смеси инкубировались при 37 °С в течение 30 мин без перемешивания для обеспечения инфицирования.

По завершении инкубации клеточно-фаговые смеси наносились на поверхность агаризованной LB-среды, содержащей соответствующий антибиотик. Инкубация чашек Петри проводилась при 37 °С в течение 16 ч. После инкубации подсчитывалось количество колониеобразующих единиц для определения титра фаговой суспензии.

2.2.14 Твердофазный иммуноферментный анализ

В ходе выполнения диссертационной работы твердофазный иммуноферментный анализ использовали на различных этапах исследования для оценки антигенных свойств рекомбинантных белков RBD и S SARS-CoV-2, а также специфичности фаговых клонов и полученных однодоменных антител. Основные этапы проведения ИФА были унифицированы, при этом в зависимости от цели эксперимента в методику вносились отдельные изменения. Методика конкурентного ИФА представлена отдельно в разделе 2.2.18.

Фаговые клоны, отобранные после третьего и четвертого раундов биопэннинга, анализировали на специфичность с рекомбинантными тримерами S белка SARS-CoV-2 вариантов: Wuhan-Hu-1, Delta и Omicron. Белки, растворённые в 0,1М растворе $NaHCO_3$, наносились в количестве 200 нг на лунку планшета и инкубировались при 4 °С в течение 16 ч. После инкубации раствор удалялся, и в каждую лунку добавлялось по 200 мкл блокирующего буфера (1% BSA в буфере PBS-T). Блокировка проводилась при 37 °С в течение 2 ч. Далее планшеты промывались трижды буфером PBS-T. После промывки в лунки вносилось по 150 мкл амплифицированных фаговых клонов, предварительно разведённых в блокирующем буфере до титра 1×10^9 БОЕ/мл. В качестве положительного контроля применялась поликлональная сыворотка реконвалесцента COVID-19, а в качестве отрицательного — фаг-помощник M13K07. Инкубация проводилась при 37 °С

в течение 2,5 ч. По завершении инкубации осуществлялась семикратная промывка планшета буфером PBS-T. Затем в лунки добавлялись соответствующие конъюгаты: HRP-конъюгированные антитела против бактериофага M13 (HRP Anti-M13 Bacteriophage, Abcam, Кембридж, Великобритания) в разведении 1:4000 и античеловеческие IgG, конъюгированные с пероксидазой хрена (anti-Human IgG-HRP, Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:5000. Инкубация с конъюгатами проводилась при 37 °C в течение 1,5 ч. После инкубации планшеты вновь промывались буфером PBS-T. Для выявления сигнала в лунки добавлялось по 100 мкл субстрата TMB (Вектор, Россия). Реакция останавливалась добавлением 100 мкл 1 М раствора HCl. Измерение оптической плотности проводилось при длине волны 450 нм на мультимодальном ридере Varioskan LUX (Thermo Scientific, США).

Оценку антигенных свойств полученных RBD и S белков проводили по описанной выше методике с рядом модификаций. В качестве сорбируемых антигенов использовали рекомбинантные RBD (варианты Wuhan, Beta, Delta) и тримеризованные S белки (варианты Wuhan, Delta, Omicron) в количестве 200 нг на лунку, а также тример гликопротеина GP вируса Марбург в качестве отрицательного контроля. В лунки планшета вносили сыворотки крови людей, перенёсших COVID-19 (Shaprova et al., 2023), и здоровых доноров (по 5 образцов в каждой группе), разведённые 1:100 в блокирующем буфере. Детекцию связывания проводили с использованием античеловеческих IgG, конъюгированных с пероксидазой хрена (anti-Human IgG-HRP).

Оценку специфичности RBD и S белков проверяли на взаимодействии с рекомбинантным рецептором ACE2 (AntibodySystem, Китай). В качестве сорбируемых антигенов использовали рекомбинантные RBD (варианты Wuhan, Beta, Delta) и тримеризованные S белки (варианты Wuhan, Delta, Omicron) в количестве 200 нг на лунку, а также тример гликопротеина GP вируса Марбург в качестве отрицательного контроля. В лунки к антигенам после этапа блокирования вносили рекомбинантный ACE2, конъюгированный

с пероксидазой хрена (ACE2-HRP). Детекцию взаимодействия осуществляли путём регистрации оптической плотности при 450 нм. Титрование ACE2 не проводили, поскольку эксперимент носил полуколичественный характер и был направлен на подтверждение способности полученных белков связываться с рецептором.

2.2.15 Получение продуцентов однодоменных антител в прокариотической системе экспрессии

Клетки *E. coli* штамма BL21(DE3), трансформированные рекомбинантными плазмидами, культивировались в 150 мл жидкой среды LB, содержащей ампициллин натриевой соли в рабочей концентрации 20 мкг/мл. При достижении оптической плотности OD_{600} = 1,0 в культуральную среду добавлялся IPTG до конечной концентрации 0,5 мМ. Индукция синтеза целевого рекомбинантного белка осуществлялась в течение 3 ч при 30 °C и скорости аэрации 180 об/мин. Для извлечения белка в растворимой форме после завершения индукции клетки ресуспендировали в буфере TBS-T, лизировали, и полученные лизаты подвергались шести циклам замораживания и размораживания. Каждый цикл включал замораживание при –80 °C в течение 15-20 мин и последующее размораживание в водяной бане при 37 °C в течение 15-20 мин. После последнего цикла клеточный осадок ресуспендировался в буфере TBS-T. Отбор продуктивных клонов *E. coli* осуществлялся по наличию синтезируемого белка, определяемого методом электрофореза лизатов клеток в 10% SDS-ПААГ. В качестве отрицательного контроля использовался лизат клеток, индуцированных в аналогичных условиях и трансформированных исходной плазмидой pET21a (-) без вставки целевого гена.

2.2.16 Очистка синтезированных однодоменных антител

Очистку однодоменных антител, содержащих полигистидиновый блок, проводили при помощи аффинной хроматографией на Ni-хелатной смоле IMAC Sepharose 6 Fast Flow (GE HealthCare, Швеция). На колонку с сорбентом,

насыщенным 0,2M $NiCl_2$, нанесли раствор с белком и поэтапно промыли двумя промывочными буферами (трис-глициновом буфер с 10мМ и 100мМ имидазолом). Элюировали целевые белки с помощью трис-глицинового буфера с 300мМ имидазолом.

2.2.17 Анализ рекомбинантных белков методом SDS-ПААГ и спектрофотометрии

Электрофоретическое разделение белков проводили в SDS-ПААГ с использованием 1× трис-глицин-SDS буферного раствора: тримеризованные S белки анализировали в 10% геле, тогда как белки RBD и однодоменные антитела в 12,5% геле. Образцы наносились в лунки концентрирующего (верхнего) геля. Электрофорез осуществлялся при постоянном напряжении 150 В в течение 1 ч. По завершении электрофореза гели окрашивались раствором Кумасси G-250.

Концентрацию рекомбинантных белков рассчитывали по величине фотометрической абсорбции при 280 нм в спектрофотометре Nano Drop OneC (Thermo Fisher Scientific, США). Для повышения точности расчёта концентрации использовались индивидуальные коэффициенты экстинкции, рассчитанные на основе аминокислотной последовательности каждого однодоменного антитела с помощью онлайн-калькулятора ProtParam (ExPASy). Полученные значения составили: PRV – 1,435, KWL – 2,380, SKP – 2,370 и RC – 1,966 (мл·мг$^{-1}$·см$^{-1}$).

2.2.18 Конкурентный ИФА

Оценка специфичности синтезированных однодоменных антител проводилась методом конкурентного ИФА с использованием рекомбинантных тримеров поверхностного белка S SARS-CoV-2 вариантов Wuhan, Delta и Omicron. Рекомбинантные белки сорбировались в лунках 96-луночного планшета в количестве 400 нг/лунку в течение 16 ч при 4 °C в сорбционном буфере. После блокировки неспецифических сайтов в лунки вносились лизаты *E. coli* –продуцентов четырёх различных вариантов

однодоменных антител. В качестве положительного контроля использовалось широконейтрализующее человеческое моноклональное антитело против SARS-CoV-2 – iB20, полученное в Институте молекулярной и клеточной биологии СО РАН (Gorchakov A.A., et al., 2021; Kulemzin S.V., et al., 2022). В качестве отрицательного контроля продуцента применялся лизат индуцированных клеток, трансформированных вектором pET21a(–) без вставки гена однодоменного антитела. В качестве контроля гетерологичного антитела использовалось наноантитело VHH9 (Koch K., et al., 2017), специфичное к ВИЧ, полученное в лаборатории молекулярной и синтетической биологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора. Затем в лунки, содержащие лизаты с наноантителами, добавлялся рекомбинантный белок ACE2, конъюгированный с пероксидазой хрена, в разведении 1:1000, а в лунки с iB20 добавлялись вторичные антитела anti-Human IgG, конъюгированные с HRP (Thermo Fisher Scientific, США), в разведении 1:5000. В качестве 100% взаимодействия принимался уровень сигнала при прямом связывании ACE2 с рекомбинантным S белком без добавления конкурирующих компонентов. Положительным результатом считались образцы, в которых оптическая плотность при 450 нм была ниже, чем в отрицательном контроле продуцента.

2.2.19 Оценка вируснейтрализующей активности антител

Титр нейтрализующих антител определялся с использованием реакции вируснейтрализации в культуре клеток. В исследовании применялись штаммы SARS-CoV-2: Wuhan (hCoV-19/Australia/VIC01/2020), Delta (hCoV-19/Russia/PSK-2804/2021), Omicron 1 (hCoV-19/Russia/Moscow171619-031221/2021), XBB.1.5 (hCoV-19/Russia/TYU-SRC-8642/2023) и JN.1 (hCoV-19/Russia/NVS-SRC-4559/2024), полученные из Государственной коллекции возбудителей вирусных инфекций и риккетсиозов ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Препараты однодоменных антител готовили в виде серии двухкратных разведений в диапазоне концентраций от 50 мкг/мл до 0,0015 мкг/мл. К каждому разведению добавляли вирус SARS-CoV-2 в дозе 100 $TCID_{50}$ на лунку в соотношении 1:1. Смесь вируса и антител инкубировали при 37 °C, после чего наносили в трех повторностях на монослой клеток линии Vero, выращенный в 96-луночных планшетах. После инкубации оценивали наличие специфического поражения клеточного монослоя (цитопатического действия, ЦПД). На основании полученных данных строили кривые зависимости процента ингибирования ЦПД от концентрации антител. По этим данным рассчитывали показатель IC_{50} – концентрацию антител, обеспечивающую 50% ингибирование вируса, который использовался для количественного сравнения нейтрализующей активности различных антител.

В качестве положительного контроля использовалась сыворотка реконвалесцента COVID-19 с ранее установленной вируснейтрализующей активностью (разведение 1:20). В качестве отрицательного контроля применялась культуральная питательная среда без добавления вируса и антител.

2.2.20 Статистическая обработка данных

Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием программы Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, США). Количественные показатели представлены в виде среднего значения (M) ± стандартное отклонение (SD). Все значения были получены на основании трёх независимых экспериментов (n = 3).

Для оценки статистических различий между двумя независимыми группами применяли U-критерий Манна–Уитни. Данный подход использовали при анализе результатов ИФА связывания рекомбинантных белков SARS-CoV-2 (RBD и S) с сыворотками крови людей, переболевших COVID-19, и сыворотками здоровых доноров.

Для анализа данных, включающих более двух групп, применяли однофакторный дисперсионный анализ (one-way ANOVA) с последующими post hoc тестами с поправкой на множественные сравнения. В случае сравнения с отрицательным контролем использовали тест Dunnett. При попарных сравнениях между всеми группами применяли тест Tukey. В частности, статистическую обработку результатов ИФА связывания фаговых клонов с тримерами SARS-CoV-2 проводили с использованием post hoc теста Dunnett. Для оценки различий в конкурентном ИФА, а также при анализе взаимодействия рекомбинантных белков с рецептором ACE2 применяли однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим post hoc тестом Tukey. Аналогичный подход использовали при анализе данных вируснейтрализации: для каждого варианта SARS-CoV-2 проводили однофакторный дисперсионный анализ с последующим применением post hoc теста Tukey для попарного сравнения значений IC_{50} между исследуемыми однодоменными антителами.

Уровень статистической значимости во всех случаях принимали равным $p < 0,05$. Формальные тесты нормальности распределения не применялись в связи с малым числом биологических повторов ($n = 3$), при котором такие тесты не обладают достаточной статистической мощностью. Применение однофакторного дисперсионного анализа считали допустимым ввиду симметричного распределения значений, отсутствия выраженных выбросов и малого относительного стандартного отклонения.

2.2.21 Моделирование трёхмерной структуры белков

Для построения трёхмерной структуры белка использовалась нейросетевая система предсказания пространственной укладки AlphaFold2, установленная на прототипе вычислительного кластера Центра коллективного пользования «СКИФ». Расчёты выполнялись в режиме *monomer* с использованием полной базы данных, актуальной на 18 ноября 2023 года. Выбор оптимальных белковых структур осуществлялся на основании

внутренних оценочных метрик модели. Геометрические параметры RBD домена S белка трёх вариантов SARS-CoV-2 (Wuhan, Delta, Omicron) были получены из базы данных Protein Data Bank (PDB) (Berman H., 2000). Модельные структуры RBD и однодоменных антител проверялись на наличие геометрических ошибок. При необходимости в структуры добавлялись недостающие боковые цепи аминокислот, восстанавливались множественные связи, удалялись молекулы растворителя, а также добавлялись атомы водорода. При подготовке модельных структур к расчётам учитывалось значение pH среды, а геометрические параметры оптимизировались методом молекулярной механики с использованием силового поля OPLS4 (Lu C., 2021).

2.2.22 Молекулярный (белок-белковый) докинг

Для оценки возможности взаимодействия комплексов антитело–антиген применялся протокол белок-белкового докинга PIPER (Kozakov D. et al., 2006), основанный на систематическом вращении лиганда (антитела) относительно рецептора (антигена) с возможностью изменения конформации при необходимости. Для расчётов использовался специализированный режим *Antibody*, в котором в качестве лиганда рассматривались четыре варианта однодоменных антител (PRV, KWL, SKP, RC), а в качестве рецептора — домен RBD S белка вариантов SARS-CoV-2 Wuhan, Delta и Omicron. Для генерации и оценки возможных положений комплексов применялась сетка с максимальным угловым разрешением около 5 °. Все взаимодействующие компоненты рассматривались как жёсткие тела, без дополнительной оптимизации межфазной (контактной) области. Результатом расчёта являлись скоринговые оценки положения лиганда (PIPER score), а также энергетические параметры взаимодействия между молекулами.

2.2.23 Молекулярно-динамическое моделирование

Геометрические параметры третичных структур белков, полученных с использованием нейросетевого алгоритма пространственной укладки AlphaFold, уточнялись с помощью молекулярно-динамических (МД)

симуляций. Для подготовки стартовых конфигураций также использовались структурные данные белок-белковых комплексов антитело–антиген, сформированных по результатам молекулярного докинга с использованием протокола PIPER (Kozakov D. et al., 2006). Для молекулярно-динамического моделирования рассматривались оптимальные позиции докинга, отобранные на основании совокупности энергетических характеристик, пространственной ориентации антитела относительно антигена и характера взаимодействий с ключевыми аминокислотными остатками.

Антитела и комплексы антитело–антиген помещались в кубическую симуляционную ячейку (бокс) с длиной ребра 20 Å, заполненную буферным раствором 0,15 M NaCl. Во всех расчётах применялась модель воды TIP3P. Для нейтрализации общего заряда системы добавлялись противоионы (Na^+ и/или Cl^-). Перед основным этапом симуляции все системы проходили процедуру релаксации в течение 2 нс с целью минимизации внутренних напряжений. В расчётах использовался алгоритм интегрирования RESPA с временным шагом 2 фс, термостат Nosé–Hoover и термодинамический ансамбль NPT. Основная симуляция выполнялась в течение 200 нс. Общее количество проанализированных фреймов составляло 10 000.

2.2.24 Анализ структур однодоменных антител и комплексов «антитело-антиген»

Положение атомов аминокислотных остатков в белковых структурах, предсказанных с использованием описанных выше методик, сравнивалось между собой с целью расчёта среднеквадратичного отклонения (RMSD). Анализ проводился с использованием инструмента RMSD Trajectory Tool программного комплекса VMD (Visual Molecular Dynamics) (Humphrey W. et al., 1996). Анализ траекторий молекулярно-динамических симуляций включал оценку межмолекулярных взаимодействий и проведение кластеризации с целью идентификации статистически значимых структурных состояний. Для отобранных кластеров антитело–антигенных комплексов оценивалась энергия

связывания (ΔG_{bind}) с использованием диэлектрической модели Борна, в которой в качестве растворителя учитывалась вода (Genheden S., 2015).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

Однодоменные антитела, также известные как наноантитела или VHH, — это вариабельные домены особых неканонических антител верблюдовых *(Camelidae)*, состоящих только из укороченных тяжелых цепей. По сравнению с антигенсвязывающими участками тяжелых цепей IgG, они более стабильны в широком диапазоне pH и температур, не склонны к агрегации и обладают повышенной растворимостью. Небольшие размеры (~15 кДа) однодоменных антител делают их удобными молекулами, способными эффективно связываться со «скрытыми» конформационными эпитопами антигена, недоступными для полноразмерных антител. Существуют различные подходы к получению специфических однодоменных антител, но доминирующим методом является аффинная селекция из иммунных библиотек, позволяющим с большой вероятностью получить антитела с высоким сродством к антигену. При этом выбор антигенов и методики применения в раундах биопэннинга играют решающее значение для характеристик отбираемых антител. В настоящей работе были получены рекомбинантные белки RBD (варианты Beta, Delta) и S (варианты Delta, Omicron), использованные в качестве гетерологичных антигенов при реализации оригинальной схемы биопэннинга. Предполагалось, что подход, моделирующий вирусную эволюцию *in vitro*, позволит отобрать из фаговой библиотеки, сформированной на основе одного варианта RBD, однодоменные антитела, способные взаимодействовать с гетерологичными вариантами SARS-CoV-2.

3.1 Получение плазмидных конструкций, обеспечивающих синтез RBD и S белков SARS-CoV-2

Поверхностный S белок SARS-CoV-2 представляет собой гликопротеин, структура и антигенные свойства которого в значительной степени определяются характером его гликозилирования. В связи с этим для получения рекомбинантного белка с нативными свойствами целесообразно использовать системы экспрессии в клетках млекопитающих,

обеспечивающие корректное протекание посттрансляционных модификаций. Первым этапом получения рекомбинантных RBD и S SARS-CoV-2 в клетках млекопитающих была разработка рекомбинантных интеграционных плазмид, включающих гены, кодирующие данные белки. Нуклеотидные последовательности вариантов SARS-CoV-2, использованных в нашей работе, были получены из баз данных GISAID (Beta (B.1.351) – EPI_ISL_712096) и GenBank (Delta (B.1.617.2) – MZ724413.1; Omicron (B.1.1.529) – OL672836.1.). Гены были синтезированы в составе вектора pGH.

Амплификацию участка RBD проводили с использованием праймеров, содержащих последовательности, кодирующие сигнальный пептид и десять остатков гистидина, а также сайты рестрикции AsuNHI и SalI. Полученные фрагменты подвергали гидролизу соответствующими эндонуклеазами и клонировали в составе вектора pVEAL2. Наличие вставки в полученных конструкциях pVEAL2_RBDβ и pVEAL2_RBDΔ (рисунок 10) подтверждали секвенированием по методу Сенгера.

Для синтеза тримеризованного S белка SARS-CoV-2 были получены плазмидные конструкции, содержащие модифицированный ген S белка SARS-CoV-2 вариантов Delta и Omicron. В используемых конструкциях из последовательности S белка был удалён участок, кодирующий сайт протеолитического расщепления S1/S2. Для стабилизации префузионной конформации белка в область S2 были введены аминокислотные замены K984P и V985P. В С-конец белка был добавлен домен тримеризации фибритина бактериофага T4 (foldon), обеспечивающий формирование тримерной структуры, а также десять остатков гистидина для последующей аффинной очистки. Нуклеотидные поледовательности гена S белка были фланкированы сайтами рестрикции AsuNHI и SalI, что обеспечивало их направленное клонирование в состав интегративного экспрессионного вектора pVEAL3. В результате были получены плазмидные конструкции pVEAL3_SΔ (рисунок 11) и pVEAL3_SO, кодирующие S белок вариантов

Delta и Omicron соответственно. Корректность сборки конструкций подтверждали секвенированием по методу Сенгера.

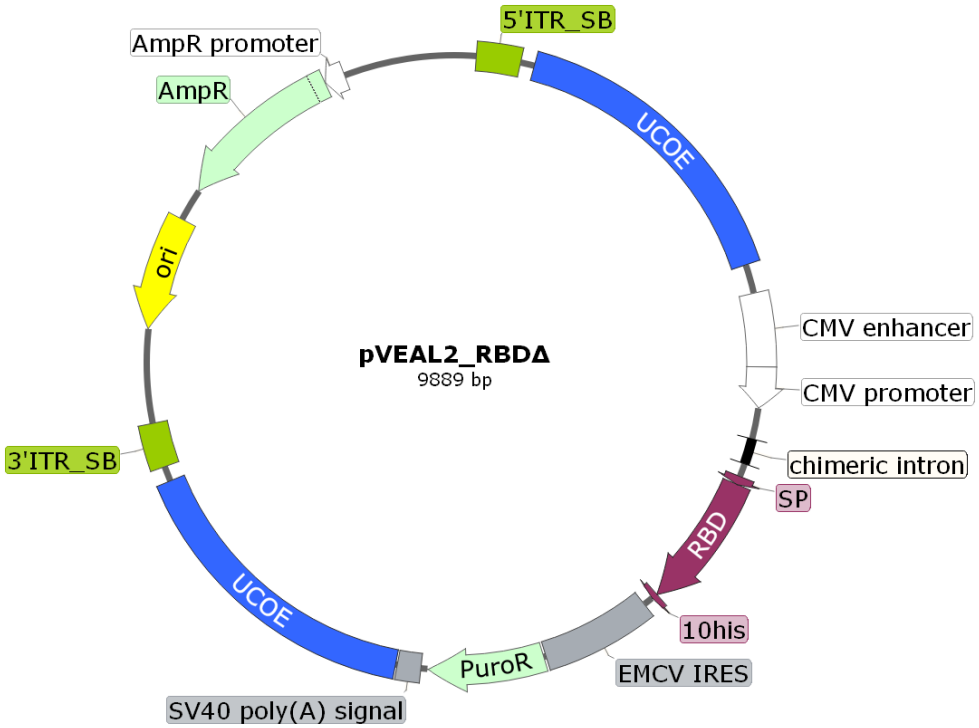


Рисунок 10 – Генетическая карта интегративного плазмидного вектора pVEAL2_RBDΔ, имеющего размер 9889 п.н. и содержащего следующие элементы: ori – участок начала репликации (7591-8179); 3′ITR_SB (6876–7105) и 5′ITR_SB (114–343) – инвертированные терминальные повторы транспозона Sleeping Beauty, фланкирующие экспрессионную кассету и обеспечивающие её интеграцию в геном клеток; последовательности UCOE, предотвращающие хромосомное «замалчивание» рекомбинантной экспрессионной кассеты (416 – 1964, 5247-6795); CMV энхансер (2115-2494), CMV промотор (2495-2706); Chimeric intron (2867-2999) – химерный интрон, повышающий уровень экспрессии целевого гена; лидерный пептид SP (3069-3113), обеспечивающий секрецию белка; кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность гена RBD (3114-3815); последовательность 10his – полигистидиновый тэг для очистки рекомбинантного белка с помощью металлоаффинной хроматографии (3816-3845); участок внутренней посадки рибосомы EMCV IRES (3895-4469); последовательность PuroR, кодирующая фактор устойчивости к антибиотику пуромицину (4482-5081); последовательность SV40 poly(A) signal для стабилизации мРНК-транскриптов за счет полиаденилирования (5116-5237); ген устойчивости к антибиотику ампициллину AmpR (8350-9210) и бактериальный промотор гена устойчивости к ампициллину (9211-9315), позволяющие проводить амплификацию плазмиды в *E.coli*.

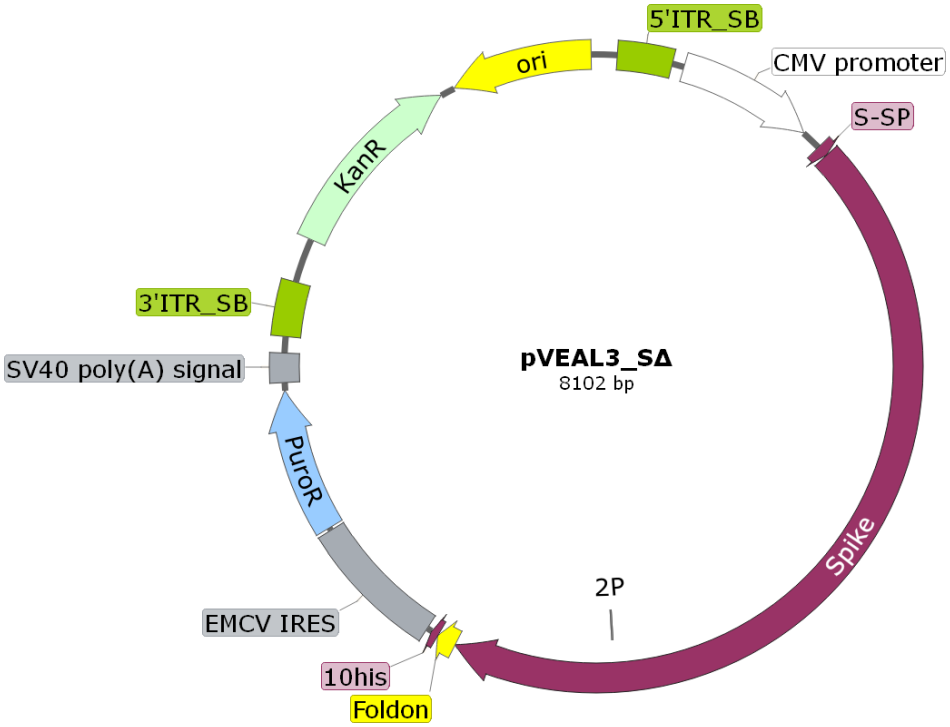


Рисунок 11 – Генетическая карта интегративного плазмидного вектора pVEAL3_SΔ, имеющего размер 8102 п.н. и содержащего следующие элементы: участок начала репликации ori (7494-8081); 3′ITR_SB (6200–6429) и 5′ITR_SB (88–317) – инвертированные терминальные повторы транспозона Sleeping Beauty, фланкирующие экспрессионную кассету и обеспечивающие её интеграцию в геном клеток; CMV промотора (369-937); лидерный пептид S-SP (1024-1068), обеспечивающий секрецию белка; кодон-оптимизированная нуклеотидная последовательность гена S (1069-4656) с участком, соответствующий мутациям K986P и V987P, обеспечивающие стабилизацию префузионной конформации белка (2P); Foldon – обеспечивающая формирование тримерной структуры белка (4657-4737); последовательность 10his – полигистидиновый тэг для очистки рекомбинантного белка с помощью металлоаффинной хроматографии (4738-4767); участок внутренней посадки рибосомы EMCV IRES (4789-5363); последовательность PuroR, кодирующая фактор устойчивости к антибиотику пуромицину (5376-5975); последовательность SV40 poly(A) signal для стабилизации мРНК-транскриптов за счет полиаденилирования (6010-6131); ген устойчивости к антибиотику канамицину KanR (6616-7431), позволяющие проводить амплификацию плазмиды в *E.coli*.

3.2 Синтез RBD и S белков, их очистка и первичный анализ

Для получения продуцентов рекомбинантного RBD клетки CHO-K1 трансфицировали плазмидами pVEAL2_RBDβ и pVEAL2_RBDΔ, кодирующие RBD вариантов Beta и Delta соответственно. Для получения

тримеризованного S белка применяли плазмиды pVEAL3_SΔ и pVEAL3_SO, кодирующие последовательности S белка вариантов Delta и Omicron. Клетки CHO-K1, содержащие последовательности целевых белков, ко-трансфицировали вспомогательной плазмидой pCSB100, кодирующей транспозазу SB100. Синтез транспозазы обеспечивала интеграцию экспрессионной кассеты вектора, ограниченной инвертированными терминальными повторами (ITR_SB), в геном клеток. Отбор трансфицированных клеток проводили в присутствии селективного антибиотика пуромицина. Из полученного пула клеток CHO-K1-RBD и CHO-K1-S были выделены наиболее продуктивные клоны. Продукцию рекомбинантного белка оценивали методом «сэндвич»-ИФА с использованием специфических антител W25 (Modhiran N. et al., 2023), сорбированных на поверхности планшета в качестве захватывающих антител, и моноклональных антител к полигистидиновой последовательности для детекции. Клон, характеризующийся наибольшим сигналом в ИФА, был выбран для дальнейшего масштабирования и культивирования.

Очистку рекомбинантного RBD и S белков из культуральной среды клеток-продуцентов проводили методом металл-хелатной аффинной хроматографии на сорбенте Ni-NTA с последующей ионообменной хроматографией на SP- и Q-сефарозе. Анализ полученных препаратов проводили методом электрофоретического разделения в SDS-ПААГ (рисунки 12 и 13). Для комплексного анализа используемых белков перед этапом аффинной селекции также были проанализированы RBD и S белок варианта Wuhan-Hu-1, ранее описанных в работе Merkuleva I. et al. (2022).

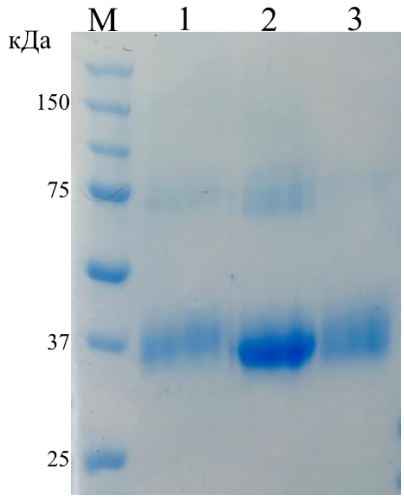


Рисунок 12 – Электрофоретическое разделение препаратов RBD в 12,5% SDS-ПААГ после хроматографической очистки. М – белковые маркеры молекулярной массы с указанием слева веса в кДа (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards, Bio-Rad, США); 1 – препарат RBD варианта Wuhan; 2 – препарат RBD варианта Beta; 3 – препарат RBD варианта Delta.

На электрофореграмме наблюдался основной белковый бэнд с молекулярной массой около 37 кДа, соответствующий рекомбинантному RBD. Кроме того, выявлялась минорная полоса с молекулярной массой около 75 кДа, которая, вероятно, соответствует димерной форме белка.

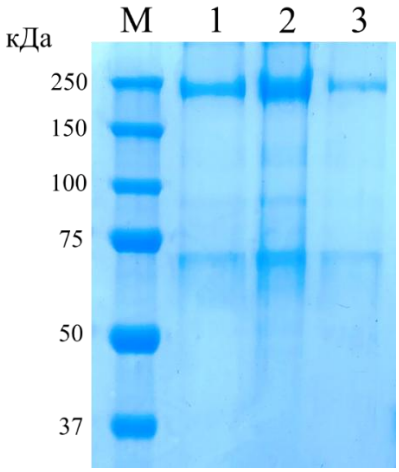


Рисунок 13 – Электрофоретическое разделение препаратов S белка в 10% SDS-ПААГ после хроматографической очистки. М – белковые маркеры молекулярной массы с указанием слева веса в кДа (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards, Bio-Rad, США); 1 – препарат S белка варианта Wuhan; 2 – препарат S белка варианта Delta; 3 – препарат S белка варианта Omicron.

На электрофореграмме выявляется доминирующие белковые бэнды с молекулярной массой около 200 кДа, соответствующий рекомбинантному S белку. Дополнительно наблюдаются менее интенсивные полосы в области ~70–75 кДа, которые, вероятно, обусловлены наличием белка BSA.

3.3 Оценка специфичности полученных вариантов RBD и S белков

Оценку антигенных свойств полученных вариантов RBD (Beta и Delta), а также S белка (Delta и Omicron) проводили методом иммуноферментного анализа по связыванию с сыворотками крови людей, переболевших COVID-19. Для комплексной оценки используемых в аффинной селекции белков в анализ также были включены RBD и S белок варианта Wuhan, ранее описанные в работе Merkuleva I. et al. (2022).

Все исследуемые варианты RBD и S белка специфично взаимодействовали с сыворотками людей, переболевших COVID-19. Наиболее высокие значения $ОП_{450}$ наблюдались для варианта Wuhan, что, вероятно, связано с тем, что используемые сыворотки были получены от пациентов, инфицированных данным вариантом вируса. В качестве контрольной группы использовали сыворотки здоровых доноров, которые не демонстрировали связывания ни с одним из исследуемых вариантов белков. В качестве отрицательного контроля использовали тримеризованный белок GP вируса Марбург, для которого уровень $ОП_{450}$ связывания сывороток людей, переболевших COVID-19, был сопоставим с фоном. Статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Во всех случаях уровень связывания исследуемых белков с сыворотками крови людей, переболевших COVID-19, был статистически значимо выше по сравнению с сыворотками здоровых доноров ($p < 0,01$) (рисунок 14а). При сравнении значений $ОП_{450}$ внутри группы сывороток переболевших COVID-19 с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим post hoc тестом Tukey было показано, что уровень связывания сывороток с поверхностными белками

SARS-CoV-2 был статистически значимо выше по сравнению с рекомбинантным тримером GP вируса Марбург ($p < 0,01$).

Оценку специфичности полученных белков проводили методом ИФА по связыванию с рекомбинантным рецептором ACE2, конъюгированным с пероксидазой хрена. Наиболее высокие значения связывания как для RBD, так и для S белка наблюдались для варианта Delta ($ОП_{450} > 2,5$) (рисунок 14б). Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим post hoc тестом Tukey с поправкой на множественные сравнения. Все варианты достоверно отличались от отрицательного контроля – рекомбинантного тримера GP вируса марбург ($p < 0,01$).

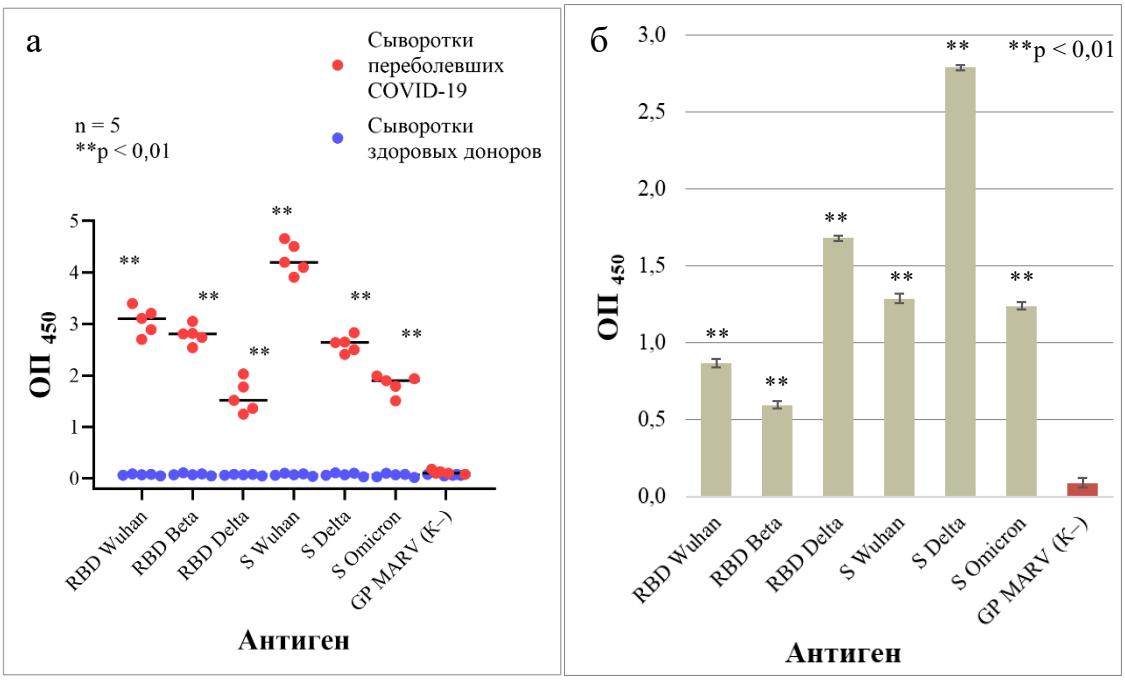


Рисунок 14 – Оценка специфичности RBD вариантов Wuhan, Beta, Delta и S белка вариантов Wuhan, Delta, Omicron. а – оценка связывания белков с сыворотками людей, переболевших COVID-19. В качестве контрольной группы использованы сыворотки здоровых доноров. В качестве отрицательного контроля использован рекомбинантный тример GP вируса Марбург (GP MARV). Данные представлены в виде индивидуальных значений с указанием медианы. Статистический анализ связывания сывороток переболевших COVID-19 и здоровых доноров проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни. Сравнение связывания сывороток переболевших COVID-19 с белками SARS-CoV-2 и отрицательным контролем (GP MARV) проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с post hoc тестом Tukey. Во всех случаях различия были статистически значимы ($p < 0,01$). б – анализ взаимодействия белков с рекомбинантным рецептором ACE2. В качестве отрицательного контроля использован рекомбинантный тример GP вируса Марбург (GP MARV). Данные представлены как M ± SD, n = 3 независимых эксперимента. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с post hoc тестом Tukey. Связывание всех вариантов с ACE2 было статистически значимо выше по сравнению с отрицательным контролем (GP MARV) ($p < 0,01$).

Между вариантами RBD (Wuhan, Beta и Delta) наблюдались статистически значимые различия по уровню связывания с ACE2 ($p < 0,01$). Среди тримеров S белка статистически значимые различия были выявлены только для варианта Delta, тогда как значения оптической плотности для вариантов Wuhan и Omicron не различались статистически значимо ($p > 0,05$).

3.4 Отбор специфических фаговых клонов из библиотеки к SARS-CoV-2

Для отбора антител против SARS-CoV-2 использовалась фаговая библиотека с биологическим титром 3×10^{10} БОЕ/мл, полученная на основе В-лимфоцитов ламы, иммунизированной RBD варианта Wuhan. Библиотека была любезно предоставлена Институтом молекулярной и клеточной биологии СО РАН (зав. отд. молекулярной иммунологии Таранин А.В.).

Для отбора фаговых клонов, экспонирующих на своей поверхности однодоменные антитела к различным вариантам SARS-CoV-2, было проведено четыре раунда биопэннинга. Отдельный сбор однодоменных антител производился после третьего и четвёртого раундов. После трех раундов биопэннинга из фаговой библиотеки однодоменных антител было отобрано 30 фаговых клонов. В качестве мишеней-антигенов в трех раундах были последовательно использованы рекомбинантные RBD поверхностного белка S SARS-CoV-2 вариантов Wuhan-Hu-1, Beta, Delta. Каждый раунд отличался только мишенью. Дополнительный четвертый раунд был проведен с использованием рекомбинантного тримера S белка варианта Omicron, и было отобрано еще 24 фаговых клона. На рисунке 15 приведена схема проведения раундов биопэннинга. Отбор отдельных клонов после третьего и четвертого раундов объяснялся желанием оценить влияние проведения четвертого раунда на обогащение фаговой библиотеки и на характеристики отбираемых однодоменных антител.

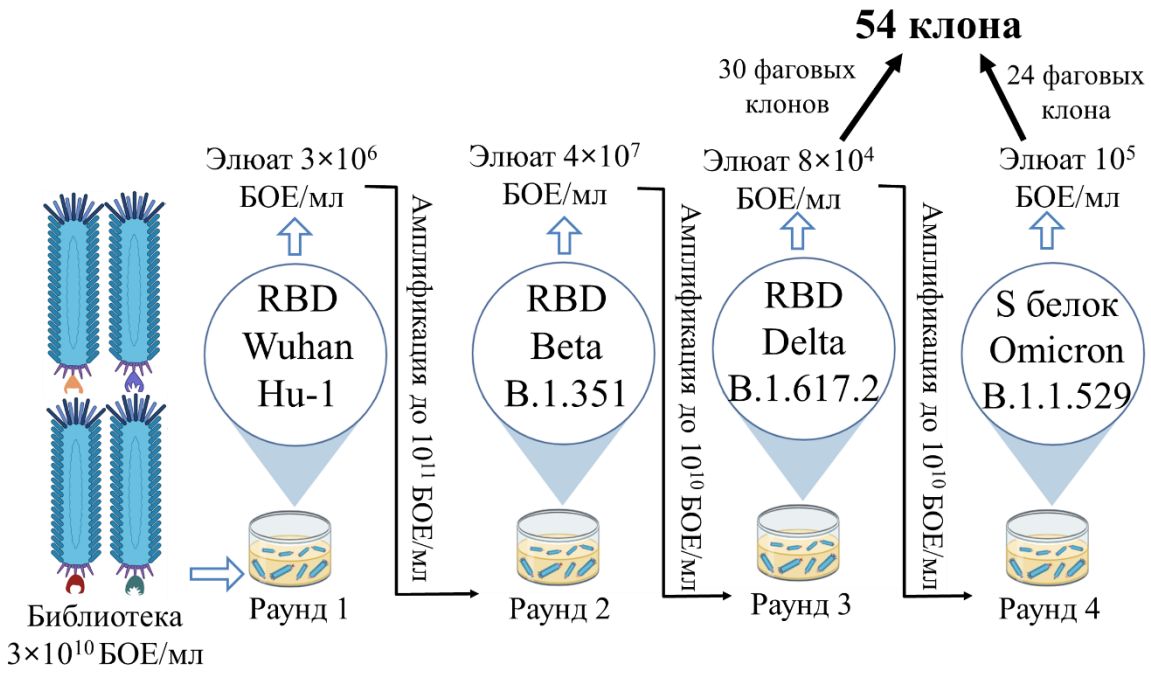


Рисунок 15 – Схема проведения аффинной селекции с указанием антигенов, титра элюатов и амлификатов каждого раунда

Суммарно после четырех раундов аффинной селекции было отобрано 54 фаговых клона, экспонирующих на своей поверхности однодоменные антитела. После проведения каждого раунда определялся биологический титр полученного элюата.

Для анализа нуклеотидных последовательностей однодоменных антител чувствительную к фагам бактериальную культуру штамма *E. coli* TG1 заражали фаговыми клонами, после чего из инфицированных клеток выделяли фагмидную ДНК.

3.5 Анализ последовательностей однодоменных антител

Определение нуклеотидных последовательностей, кодирующих однодоменные антитела в составе фагмид, проводили при помощи секвенирования по методу Сэнгера. Данные секвенирования показали, что гены однодоменных антител без стоп-кодонов были у 22 фаговых клонов (15 после третьего и 7 после четвертого раундов аффинной селекции).

Сравнение нуклеотидных последовательностей позволяет выявить изменения на уровне генетического кода, включая мутации и сдвиги рамки

считывания, которые могут повлиять на аминокислотную последовательность и, следовательно, на структуру и функцию антител. В то же время, несколько кодонов могут кодировать одну аминокислоту, и для более полного понимания возможных функциональных изменений целесообразным является сравнение как нуклеотидных, так и аминокислотных последовательностей. Нуклеотидные и аминокислотные последовательности однодоменных антител были выравнены в программе BioEdit (версия 7.2.5) относительно последовательности однодоменного антитела Nb56 (Xu J., et al. 2021). Выбор Nb56 в качестве референсного обусловлен тем, что оно так же было получено из фаговой библиотеки, полученной на основе иммунного разнообразия ламы, иммунизированной рекомбинантным стабилизированным тримером S белка SARS-CoV-2. На основе выравненных последовательностей (выравненные нуклеотидные последовательности генов однодоменных антител приведены в приложении 1) проведен анализ общей схожести обоих типов последовательностей с референсным однодоменным антителом, а также уровень идентичности критически важных участков CDR1, CDR2 и CDR3. Выбор этих регионов объясняется тем, что они определяют способность однодоменного антитела к специфическому связыванию с антигеном, а их изменчивость может повлиять на эффективность взаимодействия. Дополнительно был проведён подсчёт числа нуклеотидных замен, делеций и вставок в последовательностях однодоменных антител относительно референсной последовательности. Подсчет идентичности проводился путем сравнения нуклеотидов/аминокислот каждой позиции с референсом в выровненной последовательности и рассчитывался по формуле: идентичность (%) = (количество совпадающих позиций / общее количество позиций) × 100. За замену принимали точечную замену нуклеотида/аминокислоты в соответствущей позиции, за вставку – появление дополнительного нуклеотида/аминокислоты, которого нет в референсной последовательности, за делецию – отсутствие нуклеотида/аминокислоты,

присутствующего в референсе. В таблицах 4 и 5 можно ознакомиться с результатами сравнительного анализа.

Для наглядности данные в таблицах были представлены с использованием градиентной цветовой шкалы, применённой отдельно для каждой колонки. Последовательности антител упорядочены по убыванию числа замен.

Таблица 4 – Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей полученных однодоменных антител с Nb56

		Идентичность с Nb56 в %						
№	**Однодоменное антитело**	**Общая**	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**Мутации**	**Делеции**	**Вставки**
1	PRV	54	40	36,7	30	146	31	13
2	TWTN	74,3	53,3	46,7	27,1	95	1	10
3	TWFO	74,8	56,7	53,3	24,3	93	1	10
4	FTF	74,3	53,3	50	24,3	93	2	11
5	FTT	74,82	56,7	46,7	30	93	1	10
6	ONTWR	74,6	60	53,3	24,3	92	2	11
7	BRN	74,8	56,7	50	25,7	91	2	11
8	THTR	77,7	70	36,7	48,6	81	7	4
9	TF	80,6	70	53,3	48,6	69	7	4
10	TWS	81,1	66,7	53,3	48,6	67	7	4
11	TOR	78,9	73,3	53,3	30	67	16	4
12	RPH	81,4	70	56,7	47,1	66	7	4
13	TWT	79,2	73,3	53,3	30	66	16	4
14	TTH	79,2	70	53,3	34,3	66	16	4
15	TTR	79,2	66,7	53,3	34,3	66	16	4
16	FOF	81,6	70	56,67	48,6	65	7	4
17	FOS	81,6	70	56,7	48,6	65	7	4
18	TO	81,6	83,3	56,7	44,3	65	7	4
19	THT	79,4	70	53,3	34,3	65	16	4
20	THTH	79,4	73,3	53,3	31,4	65	16	4
21	OFR	79,4	73,3	53,3	31,4	65	16	4
22	FOFR	79,4	66,7	56,7	34,3	65	16	4
23	TFOR	79,4	73,3	53,3	30	65	16	4
24	TSR	79,4	70	56,7	34,3	65	16	4
25	TTWR	79,4	73,3	56,7	31,4	65	16	4
26	FTER	79,4	73,3	50	32,9	65	16	4
27	ON	79,7	73,3	56,7	31,4	64	16	4
28	MCHL	79,7	66,7	56,7	34,3	64	16	4
29	THS	81,8	70	53,3	48,6	64	7	4

Продолжение таблицы 4

30	LNR	82,1	70	56,7	48,6	63	7	4
31	TS	79,9	73,3	53,3	34,3	63	16	4
32	TSXR	82,1	80	56,7	42,9	63	7	4
33	KWL	82,3	80	56,7	42,9	62	7	4
34	SPL	82,3	80	53,3	40	62	7	4
35	FOTR	82,3	80	56,7	41,4	62	7	4
36	TWOR	82,3	80	56,7	42,9	62	7	4
37	THFRR	82,3	83,3	56,7	41,4	62	7	4
38	SKP	82,6	80	53,3	42,9	61	7	4
39	TWTR	81,1	80	60	40	61	13	4
40	THSV	82,8	80	56,7	42,9	60	7	4
41	OOR	81,4	76,7	60	41,4	60	13	4
42	THFR	81,6	76,7	60	41,4	59	13	4
43	DNT	81,8	83,3	60	37,1	58	13	4
44	OER	81,8	76,7	60	41,4	58	13	4
45	SHRD	79,9	80	60	41,4	57	13	13
46	OSVR	82,1	80	60	41,4	57	13	4
47	THSR	82,1	76,7	60	41,4	57	13	4
48	TN	82,3	83,3	56,7	41,4	56	13	4
49	TFR	82,3	76,7	60	41,4	56	13	4
50	RC	82,6	80	60	41,4	55	13	4
51	OSR	82,8	80	60	42,9	54	13	4
52	TER	82,8	83,3	60	41,4	54	13	4
53	THO	82,3	80	53,3	44,3	50	19	4
54	CSY	82,6	80	53,3	44,3	49	19	4

Наибольшее количество нуклеотидных замен (146), делеций (31) и вставок (13) было выявлено в последовательности однодоменного антитела PRV, которая характеризовалась минимальной степенью идентичности (54%) с референсной последовательностью. При анализе выравненной последовательности PRV также установлено, что участок CDR3 данного наноантитела является самым коротким (36 п.н.) среди всех исследованных, что обусловлено большим количеством делеций в данной области.

Среди всех отобранных последовательностей однодоменных антител выделяется группа антител TWTN, TWFO, FTF, FTT, ONTWR и BRN для которых характерны увеличенная длина нуклеотидных последовательностей (до 393 п.н.), значительное количество замен (91–95), большое количество

вставок (10–11, преимущественно в области CDR3) и минимальное количество делеций (1–2). Нуклеотидные последовательности участка CDR3 данных антител демонстрировали наименьшую идентичность с референсной последовательностью (< 27%). Оставшиеся однодоменные антитела (№ 8-54) формируют вторую группу, для которой характерно меньшее количество мутаций (<81), вставок, а также более высокая идентичность последовательностей (77,7–82,8%) по сравнению с первой группой (74,3–74,8%).

Таблица 5 – Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей полученных однодоменных антител с Nb56

		Идентичность с Nb56 в %						
№	**Однодоменное антитело**	**Общая**	**CDR1**	**CDR2**	**CDR3**	**Замены**	**Делеции**	**Вставки**
1	TWTN	62,3	30	10	8,7	47	1	4
2	FTT	62,3	30	10	8,7	47	1	4
3	BRN	63,7	30	20	4,3	45	1	4
4	FTF	63,7	30	20	8,7	45	1	4
5	ONTWR	63,7	30	20	13	45	1	4
6	TWFO	64,4	30	30	8,7	44	1	4
7	PRV	58,7	20	10	21,7	41	11	5
8	TO	69,5	60	20	30,4	37	3	2
9	TF	69,5	50	30	30,4	37	3	2
10	TWTR	68,1	50	30	21,7	37	5	2
11	TTWR	67,3	50	20	17,3	37	6	2
12	ON	68,1	50	20	17,3	36	6	2
13	TWT	68,1	50	20	17,3	36	6	2
14	TWS	70,2	40	30	34,7	36	3	2
15	FOFR	68,2	60	20	21,7	36	6	2
16	TSR	68,1	40	30	21,7	36	6	2
17	TOR	68,1	50	20	17,3	36	6	2
18	THTR	70,2	50	30	34,7	36	3	2
19	TSXR	70,2	70	20	26	36	3	2
20	RPH	71	50	30	30,4	35	3	2
21	FOS	71	50	30	34,7	35	3	2
22	MCHL	68,8	60	20	21,7	35	6	2
23	TTH	68,8	40	30	21,7	35	6	2
24	TS	68,8	50	20	21,7	35	6	2
25	THT	68,8	40	30	21,7	35	6	2

Продолжение таблицы 5

26	THTH	68,8	50	20	17,3	35	6	2
27	OFR	68,8	50	20	17,3	35	6	2
28	TWOR	71	70	20	26	35	3	2
29	TTR	68,8	60	20	21,7	35	6	2
30	TFOR	68,8	50	20	17,3	35	6	2
31	THFR	69,5	50	30	21,7	35	5	2
32	FTER	68,8	50	20	17,2	35	6	2
33	LNR	71,7	50	30	34,7	34	3	2
34	FOF	71,7	50	30	34,7	34	3	2
35	DNT	70,2	60	30	21,7	34	5	2
36	KWL	71,7	70	20	26	34	3	2
37	THS	71,7	50	30	34,7	34	3	2
38	OOR	70,2	50	30	21,7	34	5	2
39	OER	70,2	50	30	21,7	34	5	2
40	THFRR	71,7	70	20	26	34	3	2
41	FOTR	72,4	70	20	26	33	3	2
42	THSR	71	50	30	21,7	33	5	2
43	SKP	73,1	70	20	30,4	32	3	2
44	TFR	71,7	50	30	21,7	32	5	2
45	TER	71,7	60	30	21,7	32	5	2
46	SHRD	70,2	50	30	26	31	5	5
47	SPL	73,9	70	20	30,4	31	3	2
48	THSV	73,9	70	30	30,4	31	3	2
49	OSR	73,1	60	30	26	30	5	2
50	OSVR	73,1	70	30	26	30	5	2
51	TN	73,9	70	30	26	29	5	2
52	RC	73,9	70	30	26	29	5	2
53	CSY	73,9	60	30	34,7	27	7	2
54	THO	73,9	60	30	34,7	27	7	2

Анализ аминокислотных последовательностей однодоменных антител выявил сходное разделение на две группы, как и при анализе нуклеотидных последовательностей (таблица 4). Антитела TWTN, FTT, BRN, FTF, ONTWR и TWFO характеризуются большим числом аминокислотных замен (44–47) по сравнению с остальными (<37). Их идентичность с референсной последовательностью ниже (62,3–64,4%) по сравнению со второй группой (67,3–71%).

Сопоставление нуклеотидных и аминокислотных последовательностей показало, что почти во всех случаях уровень идентичности аминокислотных последовательностей был ниже, чем нуклеотидных, при этом разница составляла 10 ± 3% (M ± SD). Для гипервариабельных участков данная величина составляла 20 ± 10% (CDR1), 30 ± 7% (CDR2) и 14 ± 6% (CDR3).

3.6 Изучение взаимодействия фаговых клонов с тримерами S белка SARS-CoV-2

Секвенирование нуклеотидных последовательностей также показало, что 32 фаговых клона имели стоп-кодоны в гене однодоменных антител. Поскольку клоны со стоп-кодонами не могли продуцировать полноразмерные однодоменные антитела при стандартных условиях экспрессии, они были исключены из дальнейшего анализа. Фаговые клоны, имеющие функциональные гены, амплифицировали для проверки методом ИФА на связывание с рекомбинантными тримерами поверхностного S белка SARS-CoV-2 трех вариантов – Wuhan, Delta и Omicron. Выбор тримеров обусловлен желанием оценить возможность узнавания RBD отобранными фаговыми клонами в контексте полноразмерного S белка. 15 фаговых клонов, отобранных после третьего раунда, показали различную степень взаимодействия. В среднем уровень сигнала взаимодействия ($ОП_{450}$) фаговых клонов был выше для варианта Delta ($ОП_{450} > 3$-4) по сравнению с тримерами Wuhan и Omicron ($ОП_{450} > 2$-3). Один фаговый клон не показал реактивности (рисунок 16). В результате ИФА, проведенного с фаговыми клонами, отобранными после трех раундов, для дальнейшей работы было выбрано 14 фаговых клонов, показавших реактивность хотя бы к одному из трех вариантов тримера. После четвертого раунда биопэннинга для ИФА анализа было выбрано семь однодоменных антител, поскольку гены остальных содержали терминирующие стоп-кодоны «амбер» (TAG) или «опал» (TGA). Из семи отобранных фаговых клонов, экспонирующих уникальные однодоменные антитела, только один специфически взаимодействовал со

всеми тремя вариантами тримера S белка. Однако сигнал взаимодействия с тримером Omicron ($ОП_{450}$ = 2,8) был ниже, чем с тримерами Wuhan и Delta ($ОП_{450}$ > 4,4) (рисунок 17).

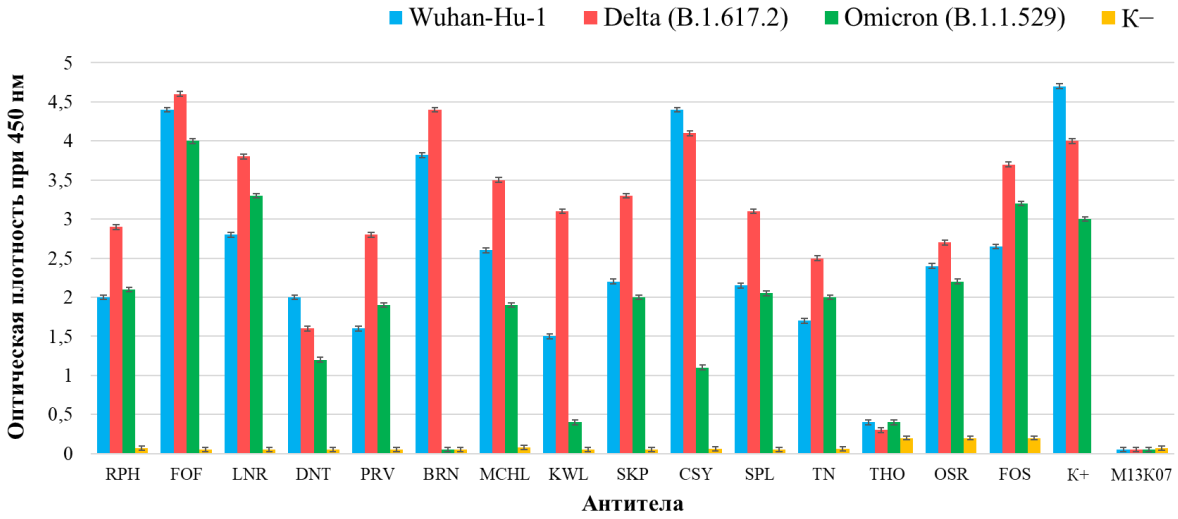


Рисунок 16 – Оценка связывания фаговых клонов, отобранных после третьего раунда аффинной селекции, с тримерами S белка SARS-CoV-2. В качестве положительного контроля (К+) использовали сыворотку человека, переболевшего COVID-19, в качестве отрицательного контроля (К–) рекомбинантный белок DIII вируса Западного Нила. Отрицательным контролем системы был M13K07-фаг-хелпер. Данные представлены как M ± SD, n = 3 независимых эксперимента. Post hoc анализ Dunnett при сравнении с отрицательными контролями (M13K07-фаг-хелпер и рекомбинантный белок DIII вируса Западного Нила) показал, что большинство отобранных фаговых клонов демонстрировали статистически значимое связывание с тримерами S белка SARS-CoV-2 по сравнению с контролями ($p < 0,01$). Клон THO не демонстрировал статистически значимых отличий от отрицательных контролей ($p \geq 0,05$).

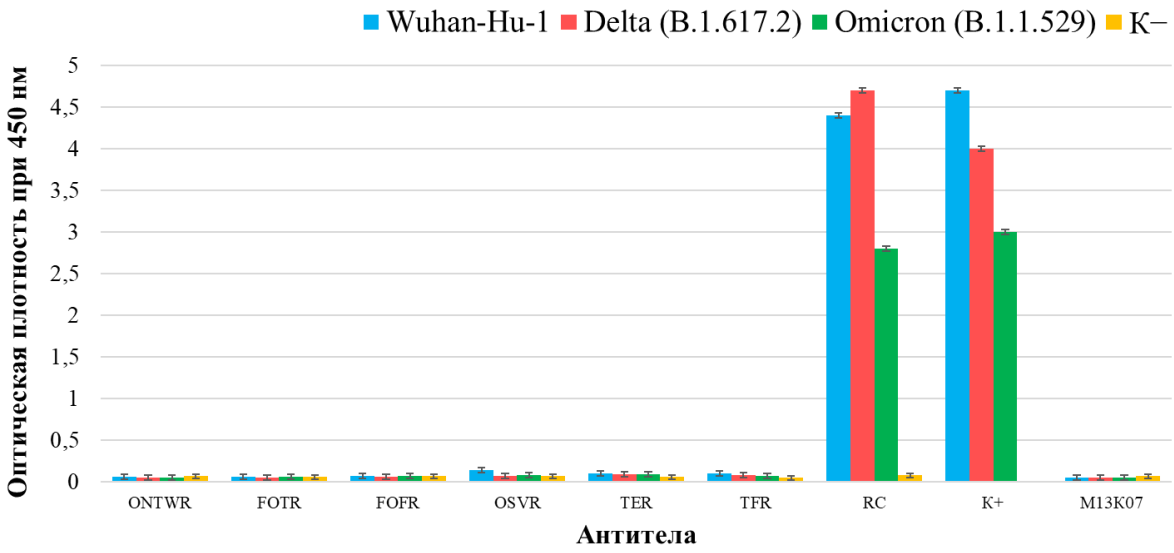


Рисунок 17 – Оценка связывания фаговых клонов, отобранных после четвертого раунда аффинной селекции, с тримерами S белка SARS-CoV-2. В качестве положительного контроля (K+) использовали сыворотку человека, переболевшего COVID-19, в качестве отрицательного контроля (K–) рекомбинантный белок DIII вируса Западного Нила. Отрицательным контролем системы был M13K07-фаг-хелпер. Данные представлены как M ± SD, n = 3 независимых эксперимента. Post hoc анализ Dunnett показал, что только один из исследованных фаговых клонов – RC демонстрировал статистически значимое связывание с тримерами S белка по сравнению с отрицательными контролями ($p < 0,01$), тогда как остальные шесть клонов не отличались от контролей ($p \geq 0,05$).

Таким образом, после четырех раундов аффинной селекции семь отобранных фаговых клонов не проявили реактивности и, скорее всего они, содержат варианты неспецифичных однодоменных антител, которые могли отобраться случайно на этапе биопэннинга. В результате проведенного ИФА из 22 фаговых клонов, экспонирующих однодоменные антитела, для дальнейшей работы было отобрано 15 клонов, способных связываться хотя бы с одним из трёх вариантов тримера S белка.

3.7 Дизайн и конструирование плазмидных генетических конструкций, обеспечивающих экспрессию в прокариотической системе *E.coli* рекомбинантных однодоменных антител

Обязательным этапом получения рекомбинантных однодоменных антител является конструирование плазмид, содержащих гены, кодирующие

уникальные однодоменные антитела против SARS-CoV-2. Для амплификации генов были рассчитаны праймеры с включением в их состав последовательностей, соответствующих сайтам гидролиза FauNDI и SalI, для последующего встраивания гена в вектор pET21a(–). В качестве матрицы для амплификации генов однодоменных антител использовали фагмиды отобранных 15 фаговых клонов, показавших специфическое взаимодействие в ИФА с рекомбинантными тримерами. Анализ ампликонов проводили при помощи электрофоретического разделения реакционной смеси в 1% агарозном геле (рисунок 18). Размер ампликона составил около 500 п.н., что соответствовало теоретически рассчитанной длине.

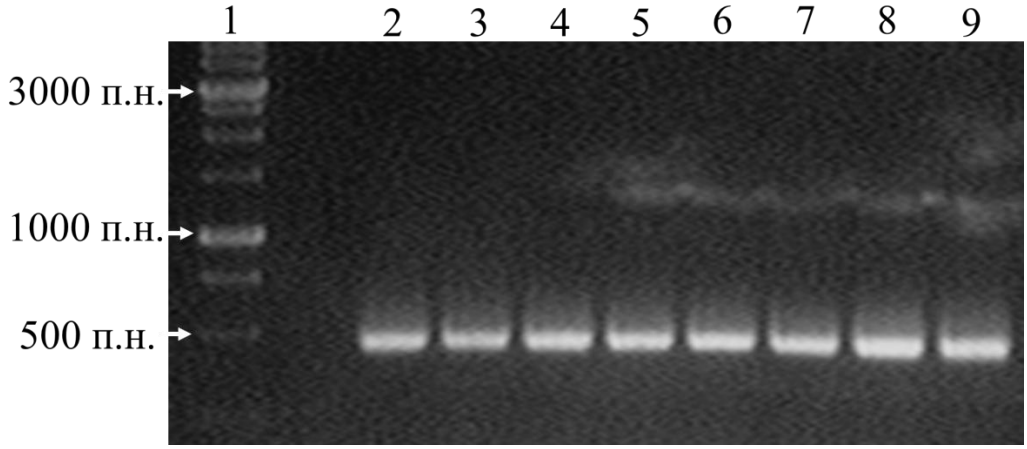


Рисунок 18 – Электрофореграмма продуктов амплификации нуклеотидных последовательностей VHH в 1% агарозном геле. 1 – маркер длин ДНК (SibEnzyme, Россия), слева показана длина ДНК в п.н; 2-9 – ампликоны.

С помощью эндонуклеаз рестрикции FauNDI и SalI провели ферментативный гидролиз продуктов амплификации и вектора pET21a(–). Продукты гидролиза очищали из геля агарозы и лигировали с помощью лигазы бактериофага T4. Схема клонирования приведена на рисунке 19.

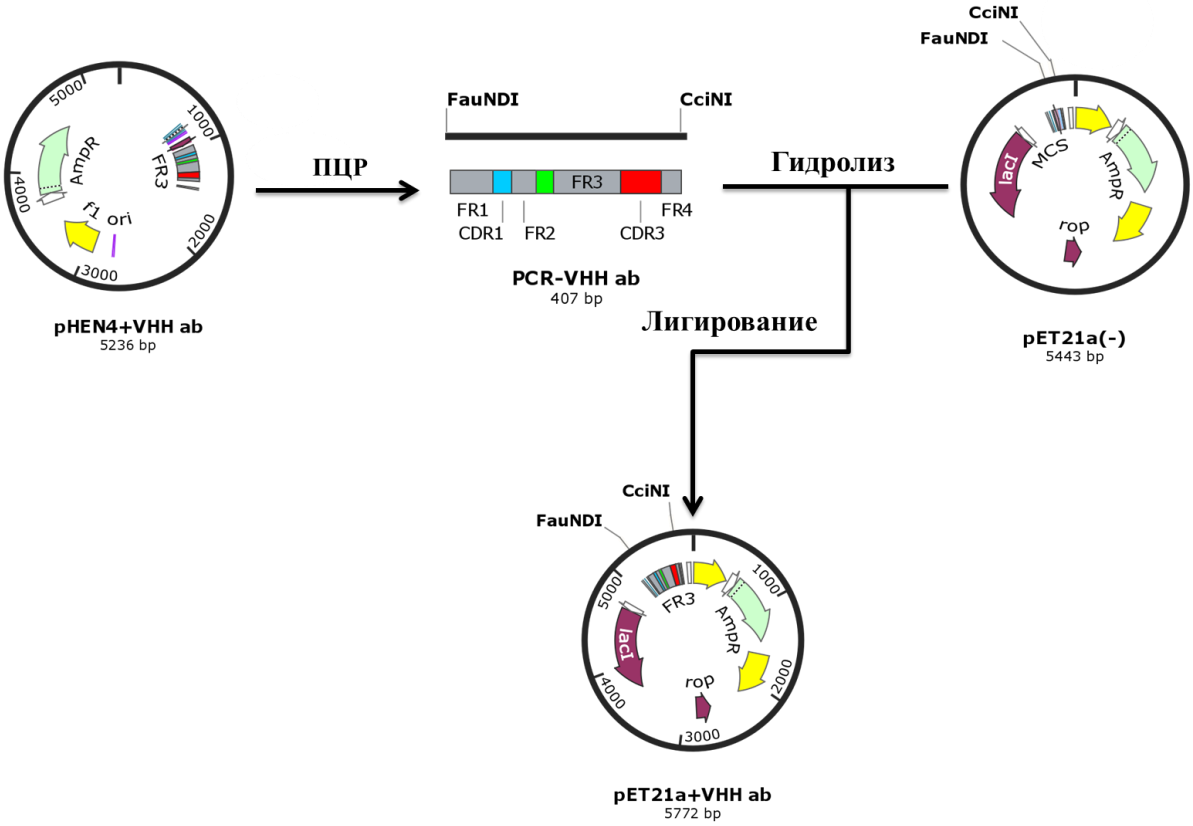


Рисунок 19 – Схема конструирования рекомбинантной плазмиды, обеспечивающей синтез однодоменных антител

Колонии выросшие после трансформации, нарабатывали и из них выделяли плазмидную ДНК. Проверку встройки гена, кодирующего однодоменное антитело, проводили методом рестрикционного анализа. Подбор эндонуклеаз рестрикции для проведения рестрикционного анализа проводили в программном обеспечении SnapGene (версия 3.2.1). Для проведения ферментативного гидролиза рекомбинантных ДНК использовали эндонуклеазы рестрикции XbaI и PstI. Результаты электрофоретического разделения продуктов гидролиза в 1% агарозном геле после рестрикционного анализа представлены на рисунке 20.

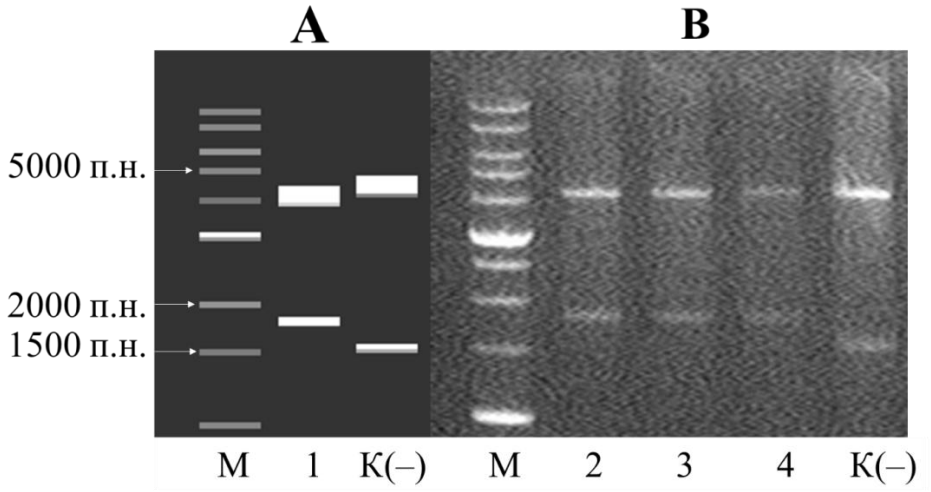


Рисунок 20 – Электрофоретическое разделение в 1% геле агарозы продуктов рестрикционного анализа отобранных клонов. А – симуляция электрофоретического разделения в 1% агарозном геле рестрикционного анализа клонов, проведенная в программном обеспечении SnapGene. В – электрофореграмма продуктов ферментативного гидролиза в 1% агарозном геле. Обозначения в обоих панелях: М – маркер длин ДНК (SibEnzyme, Россия), слева показана длина ДНК в п.н; 1 - 4 – рекомбинантная плазмида pET21a, содержащая вставку нуклеотидной последовательности, кодирующей однодоменное антитело; К(–) – отрицательный контроль, исходная плазмида pET21a(–), не содержащая нуклеотидной последовательности однодоменного антитела.

Электрофоретическое разделение продуктов ферментативного гидролиза плазмидной ДНК отобранных клонов показало, что в 13 образцах присутствует встройка гена, кодирующего однодоменное антитело. Для анализа наличия замен и делеций плазмидную ДНК отобранных клонов секвенировали по методу Сэнгера.

3.8 Анализ вариабельности аминокислотных последовательностей однодоменных антител

С помощью программы BioEdit проведено выравнивание последовательностей тринадцати однодоменных антител, выбранных для экспрессии в *E.coli*. С целью выявления консервативных мотивов, а также определения участков с высокой изменчивостью, потенциально вовлечённых во взаимодействие с антигеном, проведена оценка частоты встречаемости

аминокислот в каждой позиции с использованием программного обеспечения WebLogo (рисунок 21).

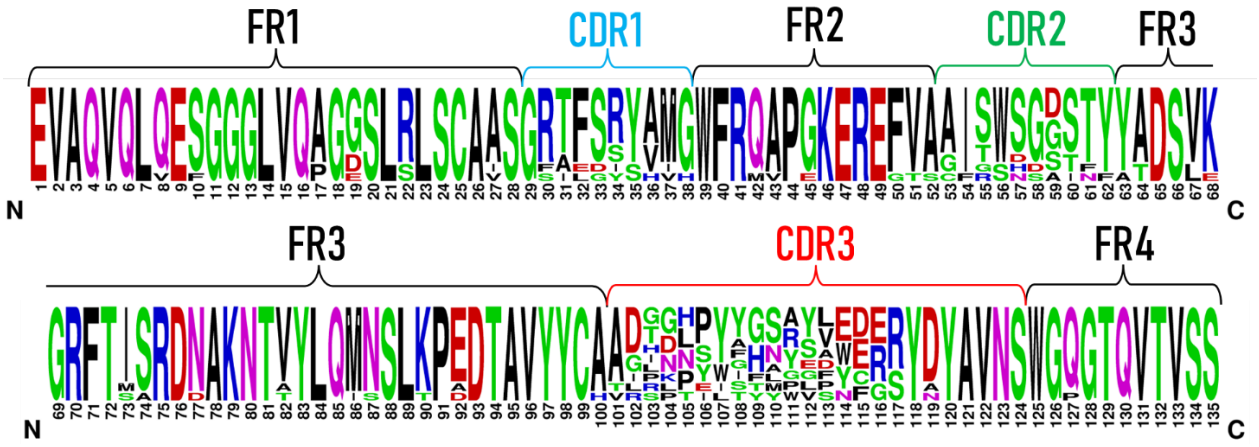


Рисунок 21 – Сравнительный анализ аминокислотных последовательностей однодоменных антител. FR – Framework regions, каркасные регионы. CDR – Complementarity-Determining Regions, гипервариабельные участки, участвующие в распознавании антигена.

По результатам визуализации аминокислотных последовательностей наблюдается разделение на консервативные и вариабельные участки. В каркасных регионах (FR1, FR2, FR3 и FR4) аминокислоты представлены однородно, что указывает на высокую консервативность этих участков. В то же время в гипервариабельном участке CDR1 (позиции 29–38) отмечено преобладание ограниченного набора аминокислотных остатков, формирующих консенсусный мотив (GRTFSRYAMG). По сравнению с CDR1 и CDR2 участок CDR3 характеризуется большей вариабельностью аминокислотного состава и увеличенной длиной (~2,5 раза). Следует отметить, что аминокислоты в позициях 121–124 встречаются только в наноантителе BRN, но их представленность на графике остается высокой, поскольку программное обеспечение WebLogo учитывает только присутствующие аминокислоты и не снижает их значимость из-за пропусков в других последовательностях. В результате данные позиции могут интерпретироваться как консервативные, что приводит к отображению аминокислот с максимальной высотой.

Также отмечено, что максимальное разнообразие аминокислотных остатков локализуется в центральной части гипервариабельных участков, тогда как позиции, прилегающие к границам каркасных регионов (FR), характеризуются большей консервативностью. В частности, для участка CDR3 наблюдается увеличение числа вариантов аминокислотных остатков от начала участка (позиции 101–103: 3, 5 и 8 вариантов соответственно) к его центральной части, с последующим снижением вариабельности к концу (позиции 116–118: 3, 2 и 1 вариант соответственно).

3.9 Получение продуцентов однодоменных антител, их первичный анализ и очистка

Полученными рекомбинантными плазмидами, содержащими в своем составе нуклеотидные последовательности, кодирующие однодоменные антитела, трансформировали клетки *E.coli* штамм BL21 (DE3). Была проведена серия экспериментов по подбору оптимальных условий синтеза однодоменных антител в *E.coli*, путем добавления индуктора в культуры клеток при оптической плотности 0,6; 0,8 и 1,0 с последующей инкубацией при температурах 25 °С и 30 °С. Для четырех из одиннадцати штаммов-продуцентов, при индукции на стадии оптической плотности 1,0 и инкубации при температуре 30 °С фиксировали накопление однодоменных антител в растворимой форме в количествах, достаточных для проведения иммунохимического анализа (не менее 30 % от суммарного белка клетки). Клеточные лизаты продуцентов однодоменных антител анализировали методом белкового электрофореза по Лэммли в SDS-ПААГ (рисунок 22).

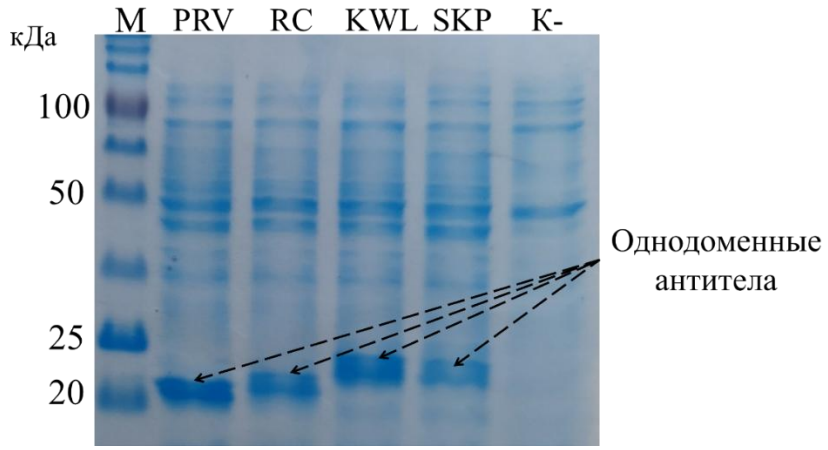


Рисунок 22 – Электрофоретическое разделение лизатов клеток *E.coli* в 10% SDS-ПААГ. М – белковые маркеры молекулярной массы с указанием слева веса в кДа (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards, Bio-Rad, США); PRV, RC, KWL, SKP – продуценты однодоменных рекомбинантных антител; В качестве отрицательного контроля (К-) – биомасса *E. coli*, содержащая плазмиду pET21a(–).

Так как в одну рамку считывания с однодоменными антителами была добавлена последовательность шести остатков His, очистку рекомбинантных белков проводили аффинной хроматографией на Ni-хелатной смоле. Очищенные рекомбинантные белки анализировали методом белкового электрофореза по методу Лэммли в SDS-ПААГ (рисунок 23).

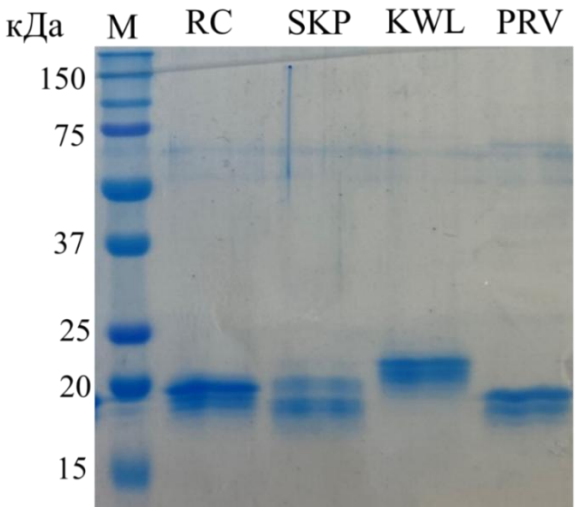


Рисунок 23 – Электрофоретическое разделение препаратов однодоменных антител в 10% SDS-ПААГ после хроматографической очистки. М – белковые маркеры молекулярной массы с указанием слева веса в кДа (Precision Plus Protein™ Dual Xtra Prestained Protein Standards, Bio-Rad, США); RC, SKP, KWL, PRV – очищенные препараты однодоменных антител.

3.10 Ингибирующая и нейтрализующая активность однодоменных антител

Методом конкурентного ИФА проведена оценка возможности однодоменных антител ингибировать взаимодействие между рекомбинантными тримерами поверхностного белка S SARS-CoV-2 (вариантов Wuhan, Delta и Omicron) и ACE2. Поочередное добавление рекомбинантных антител и ACE2 к иммобилизованным антигенам позволяет оценить взаимодействие антител с целевым белком в присутствии конкурирующего за взаимодействие ACE2. Три однодоменных антитела (PRV, KWL и SKP) ингибировали связывание ACE2 с тримером Wuhan и хотя бы с одним другим тримером. Два из них (KWL и SKP) ингибировали связывание с тримером Delta, но не с Omicron. Однодоменное антитело PRV, которое блокировало взаимодействие между ACE2 и тримером Wuhan, также ингибировало связывание с Omicron, но не с Delta. Значения ингибирования для однодоменного антитела RC отличались от отрицательного контроля не более чем на 20%. Результаты связывания ACE2 с рекомбинантными тримерами S белка SARS-CoV-2 при ингибировании взаимодействия однодоменными антителами приведены на рисунке 24.

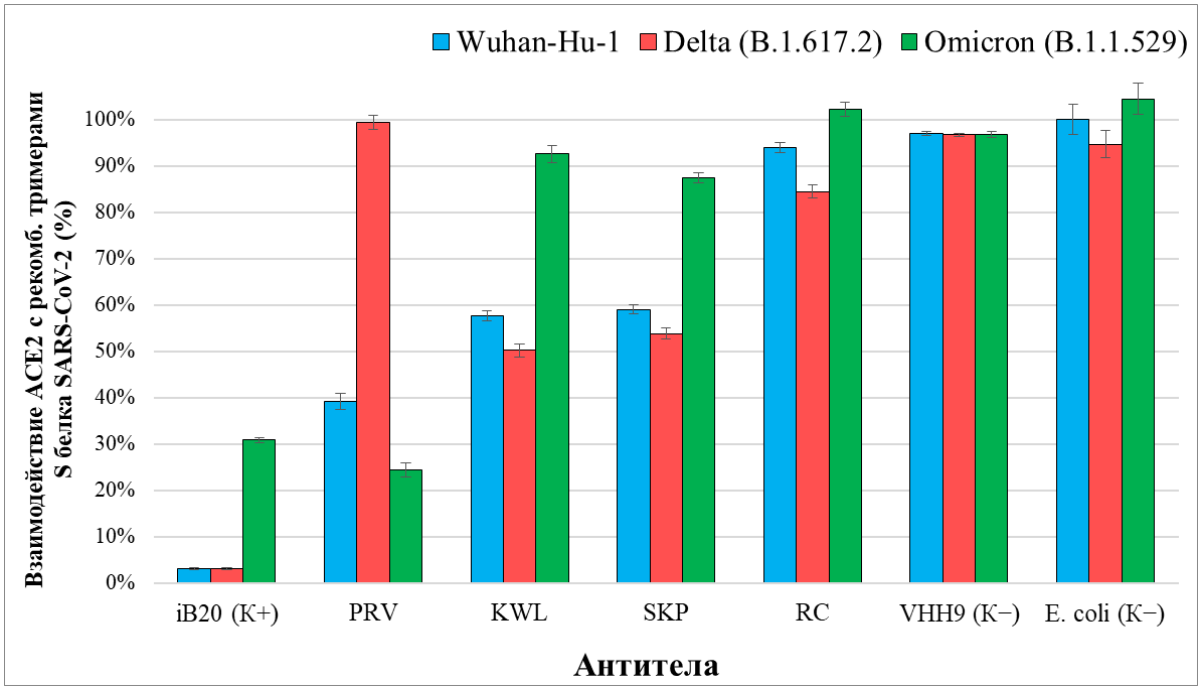


Рисунок 24 – Связывание ACE2 с рекомбинантными тримерами S белка SARS-CoV-2 при ингибировании взаимодействия однодоменными антителами. За 100% взаимодействия взято уровень сигнала прямого взаимодействия между тримером и ACE2. PRV, KWL, SKP, RC – лизаты продуцентов однодоменных антител; E.coli (К–) – отрицательный контроль продуцента, лизат клеток, трасформированных плазмидой pET21a(–); VHH9 (К–) – однодоменное антитело, специфическое к ВИЧ-1 (Koch K., et al. 2017), отрицательный контроль гетерологичного антитела; iB20 – широконейтрализующее человеческое моноклональное антитело против SARS-CoV-2 (Kulemzin S.V., et al. 2022), положительный контроль. Данные представлены как M ± SD, n = 3 независимых эксперимента. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с post hoc тестом Tukey отдельно для каждого варианта SARS-CoV-2. Выявлены статистически значимые различия между исследуемыми однодоменными антителами и отрицательными контролями ($p < 0,01$).

Достоверность выявленных различий в ингибировании взаимодействия ACE2 с S тримерами SARS-CoV-2 подтверждена результатами однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с последующим применением post hoc теста Tukey, проведённых отдельно для каждого варианта вируса (Wuhan, Delta и Omicron). Для всех вариантов SARS-CoV-2 однофакторный дисперсионный анализ выявил наличие различий между группами однодоменных антител ($p < 0,01$). Результаты post hoc анализа

показали, что ингибирующая активность антител PRV, KWL и SKP статистически отличалась от отрицательных контролей (VHH9 и *E. coli*), однако имела вариант-специфический характер: антитело PRV не отличалось от отрицательных контролей при анализе варианта Delta, а антитела KWL и SKP при анализе варианта Omicron. Однодоменное антитело RC показывает статистическое отличие от отрицательного контроля только для варианта Delta.

Анализ вируснейтрализующей активности однодоменных антител против SARS-CoV-2 проводили с использованием штаммов Wuhan, Delta, Omicron, XBB.1.5 и JN.1. В качестве референсного нейтрализующего контроля использовали антитело iB20, а отрицательного – VHH9. Результаты, представленные в таблице 6, показывают, что все четыре однодоменных антитела способны нейтрализовать вирус, однако степень нейтрализации различается в зависимости от штамма SARS-CoV-2. В случае однодоменного антитела PRV значения IC_{50} для штаммов Wuhan и Omicron составили 2,30 и 4,04 мкг/мл соответственно, тогда как для штамма Delta нейтрализующая активность не наблюдалась. Обратная картина, при которой значение нейтрализующей концентрации для штамма Delta (IC_{50} = 5,43 мкг/мл) было ниже, чем для штаммов Wuhan (IC_{50} =17,91 мкг/мл) и Omicron (IC_{50} = 20,09 мкг/мл), наблюдалась для однодоменного антитела RC. Однодоменное антитело KWL отличалось тем, что наряду с нейтрализующей активностью против штаммов Wuhan (IC_{50} = 5,69 мкг/мл), Delta (IC_{50} = 4,61 мкг/мл) и Omicron (IC_{50} = 6,59 мкг/мл) сохраняло активность против штамма XBB.1.5 (IC_{50} = 40,82 мкг/мл). Ни одно из однодоменных антител не проявило нейтрализующей активности против штамма JN.1. Положительный контроль – антитело iB20 продемонстрировало высокую эффективность против всех исследованных вариантов, тогда как отрицательный контроль, антитело VHH9 специфичное в отношении ВИЧ-1 не обладал вируснейтрализующей активностью.

Таблица 6 – Значения IC_{50} (мкг/мл) однодоменных антител в отношении различных штаммов SARS-CoV-2

	Wuhan	Delta	Omicron	XBB.1.5	JN.1
PRV	**2,30** ± 0,08	*	**4,04** ± 0,14	*	*
KWL	**5,69** ± 0,20	**4,61** ± 0,16	**6,59** ± 0,23	**40,82** ± 1,35	*
SKP	**8,69** ± 0,28	**4,04** ± 0,14	**9,70** ± 0,32	*	*
RC	**17,91** ± 0,53	**5,43** ± 0,17	**20,09** ± 0,69	*	*
iB20	**0,096** ± 0,002	**0,197** ± 0,005	**0,38** ± 0,01	**49,90** ± 1,50	**21,58** ± 0,73
VHH9	**н/о**	**н/о**	**н/о**	**н/о**	**н/о**



0,01 мкг/мл 50 мкг/мл

Данные представлены как M ± SD, рассчитанные на основании трёх независимых экспериментов (n = 3). Стандартное отклонение составляло не более 3,5 % от соответствующего среднего значения. «*» – вируснейтрализация не наблюдается в исследованном диапазоне концентраций (0,0015–50 мкг/мл). «н/о» – вируснейтрализация отсутствует. С целью повышения наглядности и удобства интерпретации данных таблицы применена градиентная окраска. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с post hoc тестом Tukey ($p < 0,01$).

Однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) выявил статистически значимые различия в значениях IC_{50} для исследуемых однодоменных антител для каждого варианта SARS-CoV-2 (Wuhan, Delta, Omicron и XBB.1.5) ($p < 0,01$). Попарное сравнение с использованием post hoc теста Tukey с поправкой на множественные сравнения выявило статистически значимые различия в вируснейтрализующей активности между однодоменными антителами PRV, KWL, SKP, RC и контрольным антителом iB20 для SARS-CoV-2 вариантов Wuhan, Delta, Omicron и XBB.1.5 ($p < 0,01$). В частности, однодоменное антитело KWL статистически значимо эффективнее нейтрализовало вариант XBB.1.5 по сравнению с iB20 ($p < 0,01$).

3.11 Молекулярное моделирование и прогнозирование геометрических параметров однодоменных антител

Методами молекулярного моделирования была выполнена оценка возможности связывания четырех однодоменных антител с RBD S белка SARS-CoV-2 вариантов Wuhan, Delta и Omicron. Третичные структуры антител получены в результате процедуры фолдинга, уточнены методом молекулярной механики. Проведен молекулярный (протеин-протеин) докинг, геометрические параметры оптимальных докинг-позиций динамически аннотированы. В качестве объектов исследования использовали однодоменные антитела – SKP, PRV, KWL, RC и геометрические параметры RBD S белка SARS-CoV-2 вариантов Wuhan, Delta и Omicron с соответствующими PDB кодами кристаллических структур 7WNB, 8I5H и 7YOW (Shitaoka K., et al. 2023). Анализ результатов демонстрирует высокий уровень предсказания: средний результат значений pLDDT находится в интервале от 88,2 до 90,1. Графики изменения значений pLDDT для моделей однодоменных антител представлены в приложении 3 (рисунок 3.1). Хуже всего результаты прогнозирования соответствуют концевым доменам антител, особенно это характерно для С-концевой части белка. Тем не менее, результаты расчетов позволяют рассматривать предсказанные структуры однодоменных антител как достоверные и использовать их в дальнейших расчетах.

Геометрические параметры третичных структур однодоменных антител, предсказанных с помощью методологии AlphaFold, уточняли с помощью молекулярно-динамических симуляций. В приложении 3 (рисунки 3.2-3.5) представлены графики возмущения RMSD. Анализ графиков демонстрирует, что структуры антител уравнялись к концу МД симуляций, амплитуда колебаний не превышает 2Å, что является хорошим показателем адекватности проведенных расчетов.

Третичные структуры антител, полученные в результате процедуры кластеризации траекторий МД симуляций, представлены на рисунке 25.

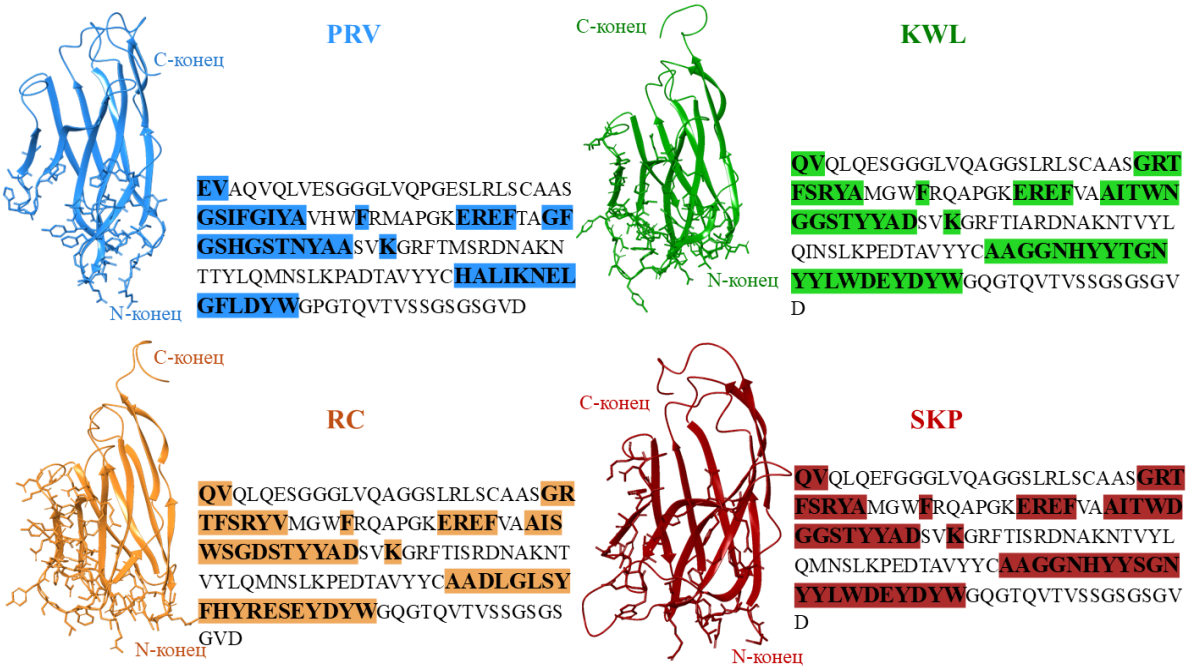


Рисунок 25 – Третичные структуры антител после анализа траекторий МД симуляций: цветами выделены вариабельные а.о. антитела, определяющие взаимодействие с антигеном

Данные структуры антител соответствуют наиболее популяционной конформации, т. е. подобное расположение а.о. и положений их боковых цепей встречается чаще всего в течение всей МД симуляции.

3.12 Анализ подвижности элементов вторичной структуры однодоменных антител

Изменение элементов вторичной структуры антител в течение МД симуляций позволяет определить наиболее подвижные (разупорядоченные) части белка. Подобный анализ будет полезен при планировании экспериментов по кристаллизации антител и комплексов «антитело-антиген» с целью дальнейшей расшифровки кристаллической структуры и получения геометрических параметров комплексов методом рентгеноструктурного анализа. На рисунке 26 показаны изменения вторичной структуры антител, которые происходят в течение МД стимуляций.

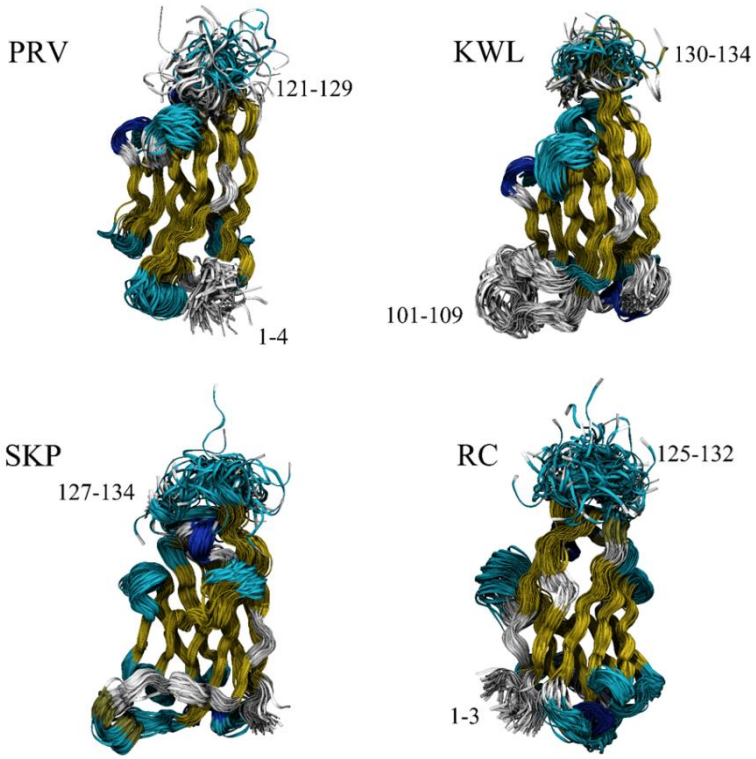


Рисунок 26 – Изменения вторичной структуры однодоменных антител, которые происходят в течение МД. Синим цветом изображены α-спирали, желтым цветом – β-листы, голубым цветом – γ-петли, белый цвет – неструктурированные элементы. Числовые значения указывают наиболее подвижные участки однодоменного антитела.

Была оценена подвижность аминокислотных остатков для всех четырех структур антител по анализу траекторий. Для этого провели наложение кадров (каждый 100 кадр) и визуально проанализировали, какие аминокислотные остатки совершают наиболее активные движения. Таким образом, для однодоменного антитела PRV наиболее подвижные участки 1-4 и 121-129, для антитела KWL наиболее подвижные участки 101-109 и 130-134, для антитела SKP наиболее подвижные участки 127-134, для антитела RC наиболее подвижные участки 1-3 и 125-132.

3.13 Докинг взаимодействия однодоменных антител с RBD

Процедура белок-белкового докинга была выполнена при условиях, когда геометрические параметры однодоменного антитела и антигена не оптимизируются. В таком случае требуется тщательный анализ полученных

докинг-решений. В приложении 4 представлены таблицы 4.1-4.6, в которых приведены значения энергетических параметров взаимодействия четырех однодоменных антител с RBD вариантов Wuhan, Delta, Omicron. Результатом белок-белкового докинга было 30 докинг решений для каждой пары наноантитело-антиген. Анализ докинг-решений включал в себя визуальное фильтрование положений наноантитела относительно RBD. Так на примере комплекса KWL-RBD Delta выбор оптимальной докинг позиции проводился среди комплексов, в которых антитело расположено в интерфейсе связывания домена с ACE2 (приложение 4, таблица 4.7). Одним из критериев выбора оптимальной докинг-позиции являлось сравнение ориентации однродоменного антитела относительно RBD с экспериментально определённой кристаллической структурой комплекса Nb20-RBD (рисунок 27). Такое сравнение позволяло оценить корректность локализации антитела в области интерфейса связывания RBD с ACE2 и подтвердить биологическую релевантность выбранной модели.

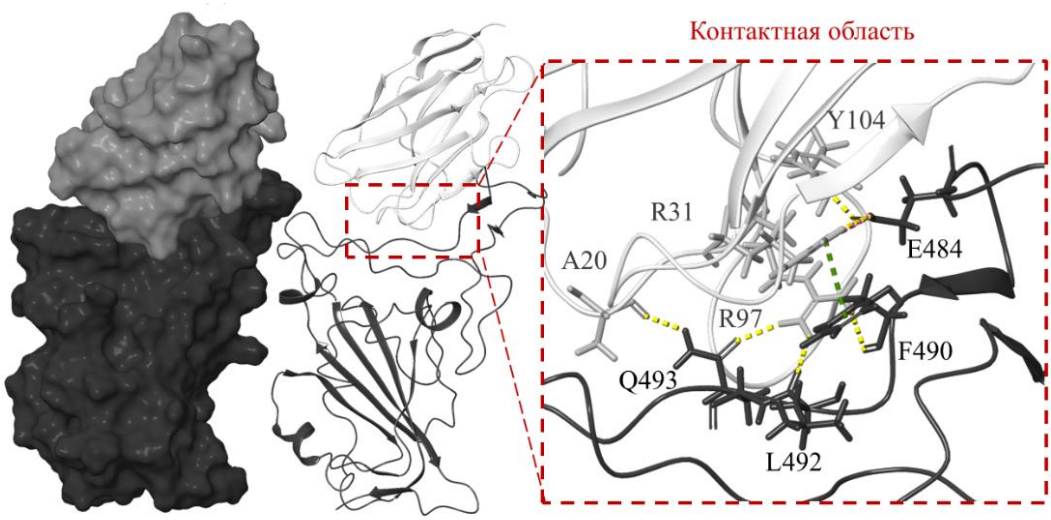


Рисунок 27 – Белок-белковый комплекс однодоменного антитела Nb20 с RBD: визуализация сделана на основании геометрических параметров комплекса, депонированного в базу данных (PDB код 7JVB (Xiang Y., 2020). Водородные связи показаны желтыми прерывистыми линиями, солевой мостик и π-катион стекинг взаимодействия – пурпурным и зеленым, соответственно.

Во всех отобранных позициях значение RMSD едва превышает 1.8Å. Для молекулярно-динамических симуляций выбрали позицию 4, с

наибольшим количеством реализованных межмолекулярных контактов (таких как водородные связи, солевые мостики, π-π стекинг взаимодействия) с относительно небольшим количеством нежелательных Clash-взаимодействий. При этом данная докинг-позиция характеризуется минимальным значением PIPER energy (приложение 4, таблица 4.7). В таблицах 4.1-4.6 оптимальные докинг позиции выделены зеленым цветом. Подобным образом выбрали оптимальные докинг-позиции для остальных комплексов наноантитело-антиген для процедур МД симуляций. В приложении 5 представлены данные оптимальных докинг позиций с указанием характера межмолекулярных взаимодействий между а.о. гипервариабельных петель однодоменных антител и интерфейса связывания RBD с ACE2.

3.14 Молекулярно-динамическое моделирование комплексов однодоменных антител с RBD

Молекулярно-динамические симуляции комплексов антитело-антиген завершились успешно. Амплитуда колебаний RMSD атомов основной цепи антител и антигенов не превышает 2Å, о чем свидетельствуют графики, представленные в приложении 3 (рисунки 3.3-3.5). Оценка функций радиального распределения не проводилась при анализе траекторий МД симуляций. В подобном расчете нет смысла, так как функции радиального распределения и координационного числа позволяют получить информации об усредненной локальной организации какой-либо молекулы или катиона в растворе. В нашем случае крайне важно, чтобы комплексы наноантитело-RBD не диссоциировали в течение всего времени МД-симуляций, а значит и функция радиального распределения будет представлять собой прямую.

На рисунке 28 представлены комплексы наноантитело-RBD на примере взаимодействия с вариантом Wuhan. Все наноантитела располагаются в области интерфейса связывания рецептор связывающего домена с ACE2 в различной степени перекрывают его.

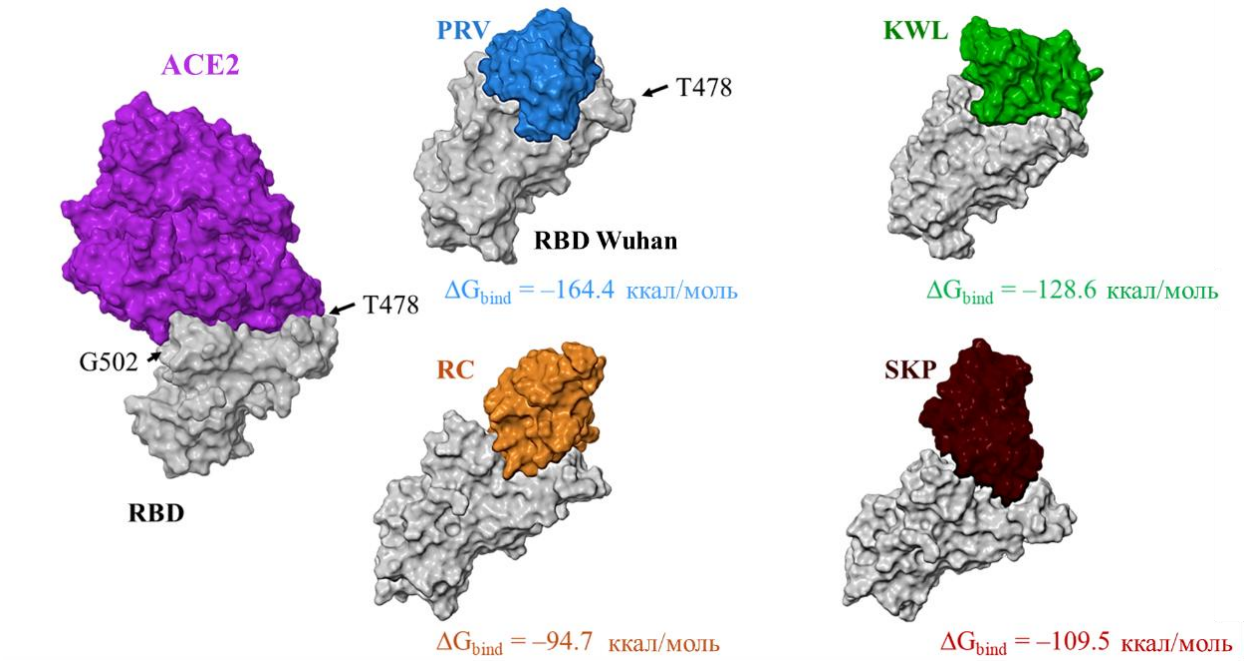


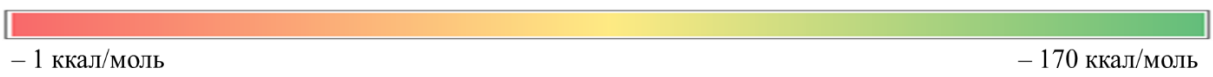
Рисунок 28 – Вид комплексов однодоменное антитело-RBD, по сравнению с комплексом ACE2 с RBD

Аналогичная ситуация наблюдается при связывании исследуемых антител с RBD вариантов Delta и Omicron. Подробные диаграммы, демонстрирующие характер межмолекулярных взаимодействий между а.о. гипервариабельных петель однодоменных антител с интерфейсом RBD представлены в приложении 6.

В таблице 7 представлены результаты оценки энергии связывания (ΔG_{bind}) четырех однодоменных антител с RBD S белка вариантов Wuhan, Delta, Omicron.

Таблица 7 – Значения энергии связывания (в ккал/моль), оцененные по методу молекулярного моделирования для статистически значимых комплексов

	RBD Wuhan-Hu-1	**RBD Delta (B.1.617.2)**	**RBD Omicron (B.1.1.529)**
PRV	–164,35	–94,83	–44,56
KWL	–128,61	–116,5	–72,88
SKP	–109,57	–85,28	–73,42
RC	–94,72	–27,71	–64,95



Анализ результатов, представленных в таблице 7, показывает, что комплексы однодоменных антител с RBD варианта Wuhan характеризуются наибольшей термодинамической стабильностью по сравнению с комплексами, образованными с вариантами Delta и Omicron. Наименее термодинамически стабильным является комплекс RC-RBD Delta. Также можно отметить тенденцию к снижению термодинамической стабильности комплексов однодоменных антител с RBD варианта Omicron.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

Фаговый дисплей является широко распространённым методом для получения антител с интересующими характеристиками. Каждый этап этого процесса — от выбора антигена-мишени и порядка его использования до способов сорбции и условий промывания — представляют факторы, влияющие на характеристики отбираемых антител. Вариабельность этих факторов делает каждый случай использования технологии фагового дисплея индивидуальным. При этом для успешного отбора целевых антител при помощи технологии фагового дисплея рекомендуется соблюдать два условия: использование адекватной библиотеки фаговых антител и подбор подходящих условий биопэннинга (Panagides N. et al., 2022; Liu Y. et al., 2023).

4.1 Выбор схемы биопэннинга

Анализ работ по поиску антител против SARS-CoV-2 показывает, что исследователи, стремящиеся получить однодоменные антитела, нейтрализующие гетерологичные варианты вируса, как правило, используют фаговые библиотеки, созданные на основе иммунного репертуара животного, последовательно иммунизированного несколькими вариантами SARS-CoV-2 (Aksu M. et al., 2024; Solodkov P. et al., 2024). Однако при таком подходе выявление новых вариантов однодоменных антител для быстро изменяющихся вирусов (к которым относится SARS-CoV-2) отстаёт от скорости их эволюции, поскольку получение новой библиотеки требует дополнительного времени. Для таких вирусов альтернативным решением может стать поиск вариантов антител, обладающих широкой перекрёстной реактивностью, в библиотеке, полученной на основе антительного разнообразия животного, иммунизированного только одним антигенным вариантом. Данный подход основан на гипотезе о консервативности структуры некоторых регионов вирусных поверхностных белков, несмотря на накопление мутаций в ходе эволюции (Morris C. et al., 2017; Watanabe A. et al., 2019; Park J. et al., 2025). В спайковом белке SARS-CoV-2 действительно

происходило накопление аминокислотных замен, однако ряд участков, в том числе в домене RBD, обеспечивающих связывание с рецептором ACE2 остались неизменны (Abbasian M., 2023). Соответственно, библиотека, сформированная на основе репертуара В-лимфоцитов животного, иммунизированного RBD варианта Wuhan, может содержать клоны, способные распознавать более поздние варианты вируса. На рисунке 29 схематически изображено гипотетическое перекрытие эпитопов, встречающихся у различных вариантов SARS-CoV-2. Области пересечения кругов отражают наличие общих эпитопов между несколькими вариантами, а центральная зона (обозначенная пунктирной рамкой) указывает на общие эпитопы, встречающиеся в этих вариантах. Эти консервативные участки являются потенциальными мишенями для перекрёстно-реактивных однодоменных антител, представленных в библиотеке, полученной на основе репертуара антител животного, иммунизированного антигеном варианта Wuhan.

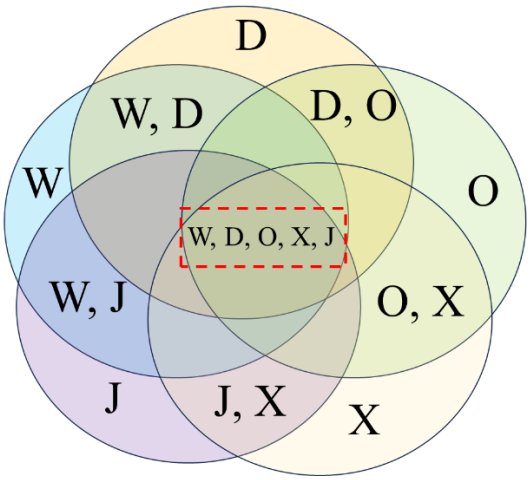


Рисунок 29 – Гипотетическое перекрытие эпитопов у различных (под)вариантов SARS-CoV-2, представленных в библиотеке однодоменных антител, полученной на основе иммунизации вариантом Wuhan. Цветные круги обозначают эпитопные участки, характерные для отдельных вариантов вируса: W – Wuhan, D – Delta, O – Omicron, X – XBB, J – JN.

В нашей работе был реализован подход, где для биопэннинга в качестве антигена-мишени использовался репертуар различных антигенных вариантов. Каждый раунд отличался лишь вариантом используемого антигена – Wuhan,

Beta, Delta, Omicron. Из фаговой библиотеки однодоменных антител после проведения четырёх раундов биопэннинга были отобраны 54 фаговых клона (30 — после третьего и 24 — после четвёртого раунда). Выбор стратегии отбора антигенов (Wuhan → Beta → Delta → Omicron) был основан на предположении, что последовательное использование антигенов в порядке их естественного появления в популяции воспроизводит вирусную эволюцию в условиях *in vitro* и способствует отбору однодоменных антител, способных связываться с гетерологичными вариантами вируса. По мнению автора, такой подход может способствовать сохранению в библиотеке однодоменных антител, специфичных не только к варианту Omicron, но и к более ранним вариантам, таким как Wuhan и Delta. В условиях, когда в биопэннинге последовательно используется только один вариант антигена, например Wuhan, происходит обогащение библиотеки преимущественно клонами, специфичными к этому варианту (Ma H. et al., 2022). Использование "поздних" вариантов антигена, таких как Omicron, на ранних этапах биопэннинга, также может привести к ограничению специфичности отобранных однодоменных антител исключительно к этим вариантам. При использовании гетерологичных антигенов в разных раундах биопэннинга отбор может способствовать накоплению вариантов однодоменных антител, связывающихся с более общими участками RBD, сохраняющими консервативность у различных вариантов SARS-CoV-2. В то же время, поскольку фаговая популяция, несущая на своей поверхности разнообразный репертуар однодоменных антител, на каждом последующем раунде биопэннинга взаимодействует с новым антигеном, селективное давление может сдвигать процесс обогащения в сторону клонов с высокой аффинностью к текущей мишени. Это, в свою очередь, может привести к утрате клонов, обладающих более широким нейтрализующим потенциалом, но низкой аффинностью. Графическое выражение этого процесса представлено на рисунке 30. Несмотря на то, что исходная библиотека, использованная в нашей работе, включала большее количество антител,

специфичных к варианту Wuhan (так как именно этим вариантом была иммунизирована лама), анализ нейтрализующей активности показал, что однодоменные антитела, отобранные после третьего раунда, лучше всего нейтрализовали вариант Delta. Этот результат не был неожиданным, поскольку в третьем раунде биопэннинга использовался рекомбинантный RBD варианта Delta.

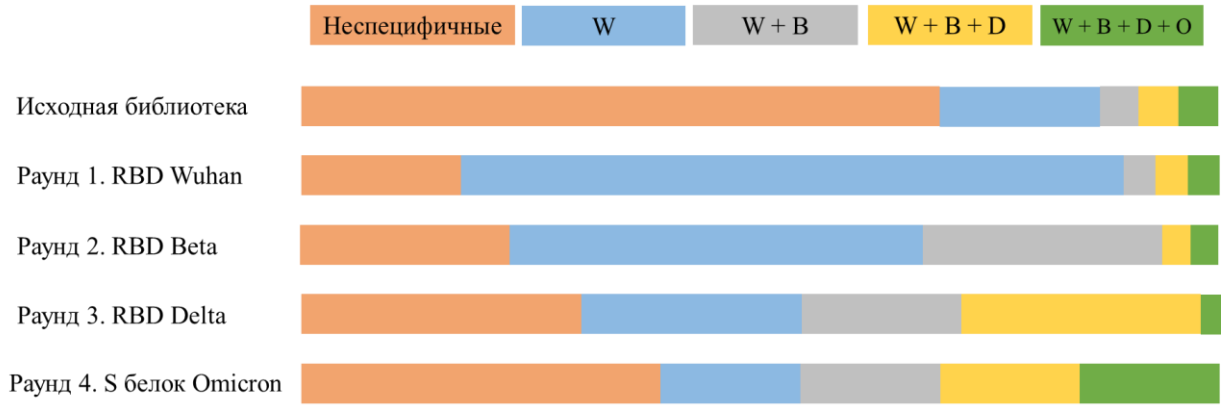


Рисунок 30 – Изменение пропорции фаговых клонов, распознающих один или несколько вариантов антигенов, в зависимости от применяемых мишеней-антигенов на каждом этапе биопэннинга. Длина каждого прямоугольника (сегмента) соответствует доле фаговых клонов от общего числа фагов. Оранжевый сегмент обозначает неспецифичные клоны, не распознающие ни один из вариантов. W (синий сегмент) – клоны, специфичные только к варианту Wuhan; W + B (серый сегмент) – перекрестно-реактивные клоны, специфичные одновременно к вариантам Wuhan и Beta; W + B + D (желтый сегмент) – перекрестно-реактивные клоны, распознающие варианты Wuhan, Beta и Delta; W + B + D + O (зеленый сегмент) – перекрестно-реактивные клоны, специфичные сразу к четырём вариантам - Wuhan, Beta, Delta и Omicron. Слева указаны мишени-антигены, использованные в соответствующих раундах биопэннинга. Цифровая шкала не приводится, поскольку диаграмма отражает относительные, а не абсолютные значения.

На основе вышеизложенного можно предположить, что использование гетерологичных антигенов для аффинной селекции в определённой последовательности может способствовать обогащению фаговой библиотеки клонами, способными взаимодействовать с широким спектром вариантов SARS-CoV-2. Анализ последовательностей отобранных антител может

дополнительно прояснить характеристики клонов, обладающих широкой специфичностью.

4.2 Сравнительный анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей отобранных однодоменных антител

После проведения аффинной селекции и отбора однодоменных антител был проведён анализ их нуклеотидных и аминокислотных последовательностей. В работе в качестве внешнего референса было решено использовать однодоменное антитело Nb56. Анализ проводился как по полным нуклеотидным и аминокислотным последовательностям, так и по отдельным участкам CDR1, CDR2 и CDR3. Сравнение нуклеотидных последовательностей отобранных однодоменных антител с референсным показало различные значения схожести. У однодоменного антитела PRV оно составило 54 %, в то время как у остальных клонов находилось в диапазоне от 74,3 % до 82,8 %. Аналогичное сравнение аминокислотных последовательностей выявило различные степени идентичности в диапазоне от 58,7 % до 73,9 %.

Интересным наблюдением стала разница между уровнями сходства нуклеотидных и аминокислотных последовательностей с референсным антителом. Почти во всех случаях на уровне аминокислотной последовательности степень различия оказалась ниже. Например, разница в различие между нуклеотидными и аминокислотными последовательностями между референсом и антителом THS составила 10 %. Аналогичные значения (10 ± 3 %) были получены и для других однодоменных антител. Несмотря на то, что с учётом кодоновой избыточности обычно ожидается обратная тенденция, в данном случае это объясняется большей длиной нуклеотидных последовательностей и, как следствие, меньшим вкладом каждой отдельной замены в общий процент идентичности. Зависимость значения процента идентичности от длины выравнивания последовательностей ранее была отмечена в исследованиях (Wood T. et al., 1999), где подчёркивалось, что длина

сравниваемых последовательностей оказывает влияние на итоговое значение идентичности. При анализе отдельных участков CDR1, CDR2 и CDR3 установлено, что величина разницы между нуклеотидной и аминокислотной идентичностью отличается от наблюдаемой для полной последовательности и составляет 20 ± 10 % (CDR1), 30 ± 7 % (CDR2) и 14 ± 6 % (CDR3). Увеличение разницы в CDR-областях, вероятно, указывает на то, что нуклеотидные замены в этих участках чаще приводят к изменению аминокислотной последовательности по сравнению с остальной частью антитела, что может свидетельствовать о более высоком уровне несинонимичных мутаций. В нуклеотидных последовательностях однодоменных антител, приведённых в приложении 1, на примере антител RPH и LNR обозначены синонимичные мутации. В последовательности RPH их выявлено четыре, из которых три располагались в каркасных участках FR1 и FR3. Одна синонимичная мутация находилась в области перехода от CDR3 к FR4, которая также характеризуется относительной консервативностью. В последовательности LNR выявлено пять синонимичных мутаций, три из которых также располагались в каркасных участках FR1 и FR3.

Анализ нуклеотидных последовательностей также показал повышение их уникальности по регионам CDR1 (<17,7 %), CDR2 (<40 %) и CDR3 (<51,4 %). Для аминокислотных последовательностей эти значения составили: CDR1 (<80 %), CDR2 (<90 %) и CDR3 (<95,7 %), что в целом коррелирует с увеличением уникальности на уровне нуклеотидов. По-видимому, это связано с функциональной ролью этих петель в распознавании антигена. CDR1 участвует примерно в 13 % всех взаимодействий, в то время как CDR2 и CDR3 — в 20 % и 50 %, соответственно (Zavrtanik U. et al., 2018; Arbabi-Ghahroudi M., 2022).

Результаты секвенирования последовательностей однодоменных антител в составе фагмиды также выявили наличие стоп-кодонов амберного (TAG) и опалового (TGA) типов в последовательностях однодоменных антител у 32 из 54 клонов. Наличие стоп-кодонов в последовательностях

бактериофагов считается естественным явлением, поскольку в их геномах часто наблюдается рекодирование стоп-кодонов, особенно в так называемых «поздних вставках» — участках, содержащих гены структурных белков (например, капсидных и хвостовых), а также гены, участвующие в лизисе клетки-хозяина, то есть экспрессируемые на поздних этапах инфекционного цикла. Это рекодирование позволяет контролировать временну́ю экспрессию белков и избегать преждевременного завершения трансляции (Borges A. et al., 2022). В нашей работе среди 32 фаговых клонов со стоп-кодонами в 13 случаях был обнаружен стоп-кодон опалового типа (TGA), при этом в 12 из них он находился в одной и той же позиции — 53-я позиция, соответствующая участку CDR2 однодоменного антитела. При более детальном анализе можно наблюдать, что эти антитела демонстрируют высокую степень схожести между собой, что может указывать на их общее происхождение. Вероятно, один клон с исходной последовательностью был отобран на этапе аффинной селекции, после чего в процессе амплификации в бактериальной культуре происходили точечные мутации, в результате чего накапливались близкородственные, но мутировавшие потомки данного клона.

Амберный тип стоп-кодона (TAG) был обнаружен в 20 случаях среди отобранных фаговых клонов. Одной из возможных причин преобладания количества стоп-кодонов амберного типа по сравнению с опаловым, может быть использование в данной работе супрессорного штамма *E. coli* TG1 для амплификации элюатов. Поскольку в таких штаммах TAG может рекодироваться в глутамин, это предотвращает преждевременное завершение трансляции и позволяет синтезировать полноценный белок, экспонируемый на поверхности фага. Тем самым такие клоны сохраняют функциональность в условиях отбора, что может способствовать их положительной селекции и накоплению клонов с амберным типом стоп-кодонов. Кроме того, согласно литературым данным, именно амберный стоп-кодон (TAG) является наиболее часто рекодируемым у бактериофагов по сравнению с опаловым (TGA) (Borges A. et al., 2022; Pfening A., 2023). В отличие от опалового стоп-кодона,

который преимущественно обнаруживался в одной и той же позиции в CDR2, амберный стоп-кодон встречался в различных участках последовательности однодоменных антител: преимущественно в областях FR1 и FR2, однако в трёх случаях он локализовался в участках CDR. Примечательно, что в одной из последовательностей (однодоменное антитело FTER) одновременно присутствовали оба типа стоп-кодонов — и опаловый, и амберный. В приложениях 1 и 2 приведены нуклеотидные и аминокислотные последовательности всех однодоменных антител с указанием и выделением обоих типов стоп-кодонов.

Также по результатам секвенирования последовательностей однодоменных антител мы заметили, что стоп-кодонов было на 21 % больше среди клонов четвёртого раунда. Скорее всего, это говорит о накоплении клонов с дефектами в нуклеотидной последовательности с каждым последующим раундом биопэннинга. Такое накопление может быть связано с амплификационным преимуществом клонов, содержащих преждевременные стоп-кодоны. Клоны, несущие такие мутации, как правило, кодируют укороченные или нефункциональные белки, которые могут быть менее токсичны для клетки-хозяина и легче экспонироваться на поверхности фаговой частицы. Это, в свою очередь, способствует их более эффективной репликации (Sinkjaer A. et. al., 2025; Bakhshinejad B. et al., 2025). Все это может приводить к накоплению клонов, в последовательности однодоменных антител которых имеются стоп-кодоны. Из-за невозможности продукции антител клонами со стоп-кодонами в не супрессорных штаммах *E.coli,* для анализа связывания с антигеном были вязты только клоны, не содержащие стоп-кодонов.

4.3 Анализ эффективности отбора и селекционных потерь вариантов однодоменных антител

Анализ связывания фаговых клонов с тримерами S белка SARS-CoV-2 показал, что из 22 фаговых клонов, имеющих функциональные гены, только

68 % взаимодействовали хотя бы с одним из вариантов (Wuhan, Delta, Omicron). При этом большинство неспецифических клонов было отобрано в ходе четвёртого раунда. Сохранение неспецифических фаговых клонов в библиотеке после раундов биопэннинга встречается и в других работах (Güttler T. et al., 2021; Han Q. et al., 2023). Более того, количество неспецифических клонов резко возрастает после 3-4 раундов (Bakhshinejad B. et al., 2025). В первом и втором раундах биопэннинга селективные условия и высокая конкуренция между фагами способствуют преимущественному отбору специфически связывающихся клонов. Однако с увеличением числа раундов происходит постепенное снижение разнообразия библиотеки и накопление клонов, дефектных по репликации, обладающих преимущественно высокой способностью к амплификации, а не к специфическому связыванию. Особенно активно накапливаются клоны, которые не экспонируют антитело на поверхности, но обладают преимуществом в скорости репликации (Sinkjaer A. et. Al., 2025; Bakhshinejad B. et al., 2025). В исследовании с использованием двух раундов биопэннинга содержание специфических клонов достигло 97 % после второго раунда (Ma H. et al., 2021). Однако этот результат может быть связан с тем, что в качестве антигена-мишени в раундах биопэннинга в работе Ma с соавторами использовался только вариант Wuhan.

Накопление в библиотеке неспецифических клонов, а также клонов со стоп-кодонами, особенно после четвертого раунда ставит вопрос о целесообразности его проведения. В то же время проведение одного или двух раундов биопэннинга значительно ограничивает степень обогащения библиотеки (Tikunova N.V. et al., 2009). На практике это означает, что для отбора высокоспецифичных клонов достаточно проведения не более двух–трёх раундов аффинной селекции.

Для поиска антител с желаемыми характеристиками из библиотеки необходим отбор и анализ максимально возможного разнообразия фаговых клонов. Наличие среди отобранных фаговых клонов неспецифических или

несущих нефункциональные гены приводит к потере части вариантов антител на дальнейших этапах. В своей работе мы наблюдали, что каждый стандартный этап фагового дисплея приводил к утрате некоторых вариантов однодоменных антител (рисунок 31). Из 54 фаговых клонов 22 имели функциональные гены, среди которых специфическими были только 15 вариантов. В конечном итоге лишь у четырёх вариантов однодоменных антител был достигнут достаточный уровень синтеза для проведения иммунохимического анализа.

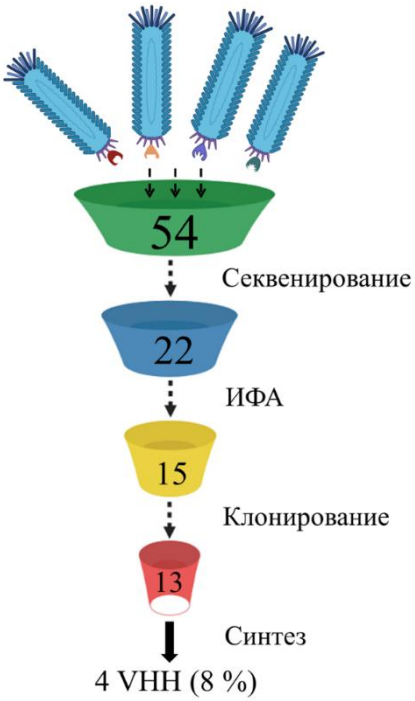


Рисунок 31 – Потеря разнообразия вариантов однодоменных антител при стандартных процедурах фагового дисплея

Несмотря на ограничения, связанные с небольшим числом отобранных фаговых клонов, нами были идентифицированы варианты, обладающие не только перекрёстной реактивностью в отношении панели поверхностных S белков, но и способные ингибировать взаимодействие S белка с ACE2 или нейтрализовать различные штаммы SARS-CoV-2.

4.4 Сравнительный анализ данных ингибирования взаимодействия ACE2 с S белком и вируснейтрализации однодоменными антителами

Сравнение результатов ингибирования взаимодействия ACE2 с S белком однодоменными антителами и вируснейтрализации позволяет оценить в какой степени блокировка связывания вируса с рецептором коррелирует с его нейтрализацией. Однодоменное антитело PRV показало высокую степень ингибирования взаимодействия ACE2 с S белком вариантов Wuhan и Omicron, но не Delta. Полученные значения IC_{50} при вируснейтрализации показали схожую картину: PRV эффективно нейтрализовало штаммы Wuhan и Omicron, но не Delta. Возможно, в случае данного наноантитела механизмом вируснейтралзации является ингибирование взаимодействия между вирусом и рецептором ACE2.

Несколько иная картина наблюдалась для антитела KWL. Оно ингибировало связывание ACE2 с вариантами Wuhan и Delta, но не с Omicron, тогда как значения IC_{50} для этих вариантов были сопоставимыми (5,6 мкг/мл для Wuhan, 4,6 мкг/мл для Delta и 6,5 мкг/мл для Omicron). Известно, что при взаимодействии ACE2 с участком RBM варианта Omicron изменяется характер взаимодействия (стерические изменения) (Cerutti G. et. al., 2022). Возможно, это однодоменное антитело из-за изменённой конфигурации контакта не в меньшей степени способно ингибировать взаимодействие RBD (Omicron)-ACE2, однако сохраняет вируснейтрализующую активность за счет сохранения связывания с RBD. Этот результат согласуется с данными других авторов, так однодоменное антитело 3-2A2-4 проявило широкую и высокую нейтрализующую активность, в том числе против варианта Omicron, несмотря на слабую конкуренцию с ACE2 (Li M. et al., 2022).

Карта гипотетического распознавания эпитопов участка RBM S белка вариантов SARS-CoV-2 (Wuhan, Delta, Omicron) для трёх однодоменных антител, построенная на основании результатов их ингибирующей и вируснейтрализующей активности, представлена на рисунке 32. Более подробные карты, включающие пять вариантов SARS-CoV-2, с областью

гипотетического эпитопного распознавания антитела iB20, приведена в приложении 7. По всей видимости, эпитоп этого антитела является консервативным, практически для всех исследованных вариантов.

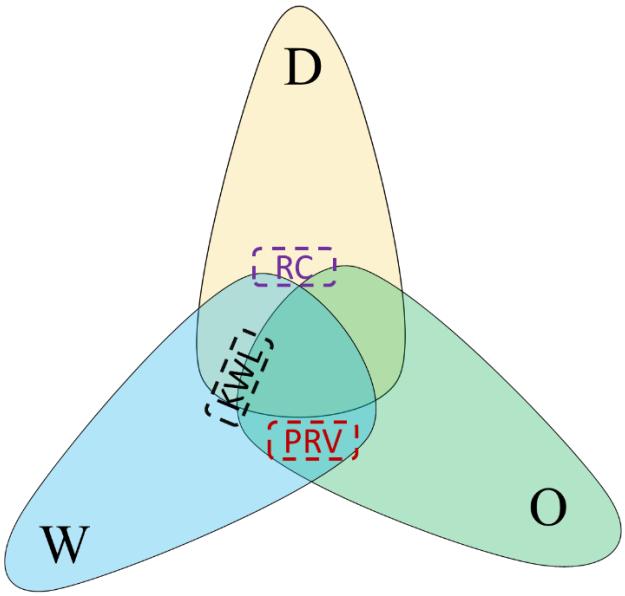


Рисунок 32 – Области эпитопного распознования однодоменных антител для RBD вариантов Wuhan (W), Delta (D), Omicron (O). Однодоменное антитело PRV связывается с эпитопом, структура которого близка для Wuhan и Omicron, но изменяется у Delta. KWL взаимодействует с эпитопом имеющим общую структуру у Wuhan, Delta и Omicron. Однодоменное антитело RC распознаёт эпитоп обратносимметричный эпитопу антитела PRV. Однодоменное антитело SKP не показано на схеме из-за вероятного сходства эпитопного распознавания сантителом KWL.

Говоря про частичное расхождения результатов вируснейтрализации и блокирования взаимодействия S белка с ACE2, нельзя исключить существование альтернативных механизмов вирусной нейтрализации. Некоторые однодоменные антитела могут стабилизировать S белок в неактивном состоянии, предотвращая его переход в конформацию, необходимую для связывания с рецептором. В этом случае они могут не блокировать взаимодействие ACE2-RBD в статическом тесте ИФА, но при этом эффективно препятствовать инфицированию в условиях вирусной нейтрализации. Также нельзя исключить вариант с использованием рекомбинантного S белка в эксперименте конкурентного ИФА, в отличие от нативного S белка, представленного на поверхности вируса. Рекомбинантный

белок может отличаться по уровню гликозилирования, что, в свою очередь, влияет на доступность эпитопов и характер взаимодействия с антителами (Tian Y. et. al., 2021).

При анализе результатов вируснейтрализации наблюдается различие в значениях IC_{50} между однодоменными антителами и антителом iB20. Значение IC_{50} для антитела iB20 не превышало 0,4 мкг/мл для штамма Omicron, а для штаммов Wuhan и Delta было ещё ниже. Однодоменные антитела при взаимодействии с указанными штаммами демонстрировали значительно меньшую нейтрализующую активность (минимум 2,3 мкг/мл). Данный факт может быть связан с тем, что бивалентное связывание антитела iB20 позволяет ему одновременно взаимодействовать с несколькими RBD-доменами спайкового белка. Это может привести к формированию более прочного комплекса и высокой авидности по сравнению с моновалентным связыванием однодоменных антител. Это так же может обеспечивать связывание вирусных частиц в виде нерастворимых комплексов, предотвращая их проникновение в клетки. Полученные результаты сопоставимы с данными других авторов, согласно которым нейтрализующая активность двухвалентных IgG значительно выше, чем у их моновалентных Fab-фрагментов (Yan R. et al., 2021). Перевод однодоменных антител в мультивалентные формы позволяет достичь более эффективной вируснейтрализации (Koenig P. et al., 2021), что открывает перспективы для дальнейших экспериментов по созданию мультивалентных конструкций на основе полученных VHH.

4.5 Сравнительный анализ теоретических расчетов с экспериментальными данными по взаимодейсвию однодоменных антител

В работе были построены модели взаимодействия четырёх однодоменных антител — PRV, KWL, SKP и RC — с RBD SARS-CoV-2 вариантов Wuhan, Delta и Omicron, а также рассчитаны энергетические параметры этих комплексов (см. таблицу 7 в разделе "Результаты"). Сравнение

экспериментальных данных - способности однодоменных антител конкурировать с ACE2 за взаимодействие с RBD и их вируснейтрализующей активности - с расчётными значениями свободной энергии связывания позволило наглядно оценить взаимосвязь между теоретическими и экспериментальными результатами, а также проанализировать функциональные свойства однодоменных антител в контексте совокупных данных, полученных в ходе всей работы. Для визуального сравнения результатов трёх экспериментов были построены диаграммы с двойной шкалой (рисунок 33). Такой подход позволил выявить определённые корреляции между результатами, полученными в трёх независимых экспериментах.

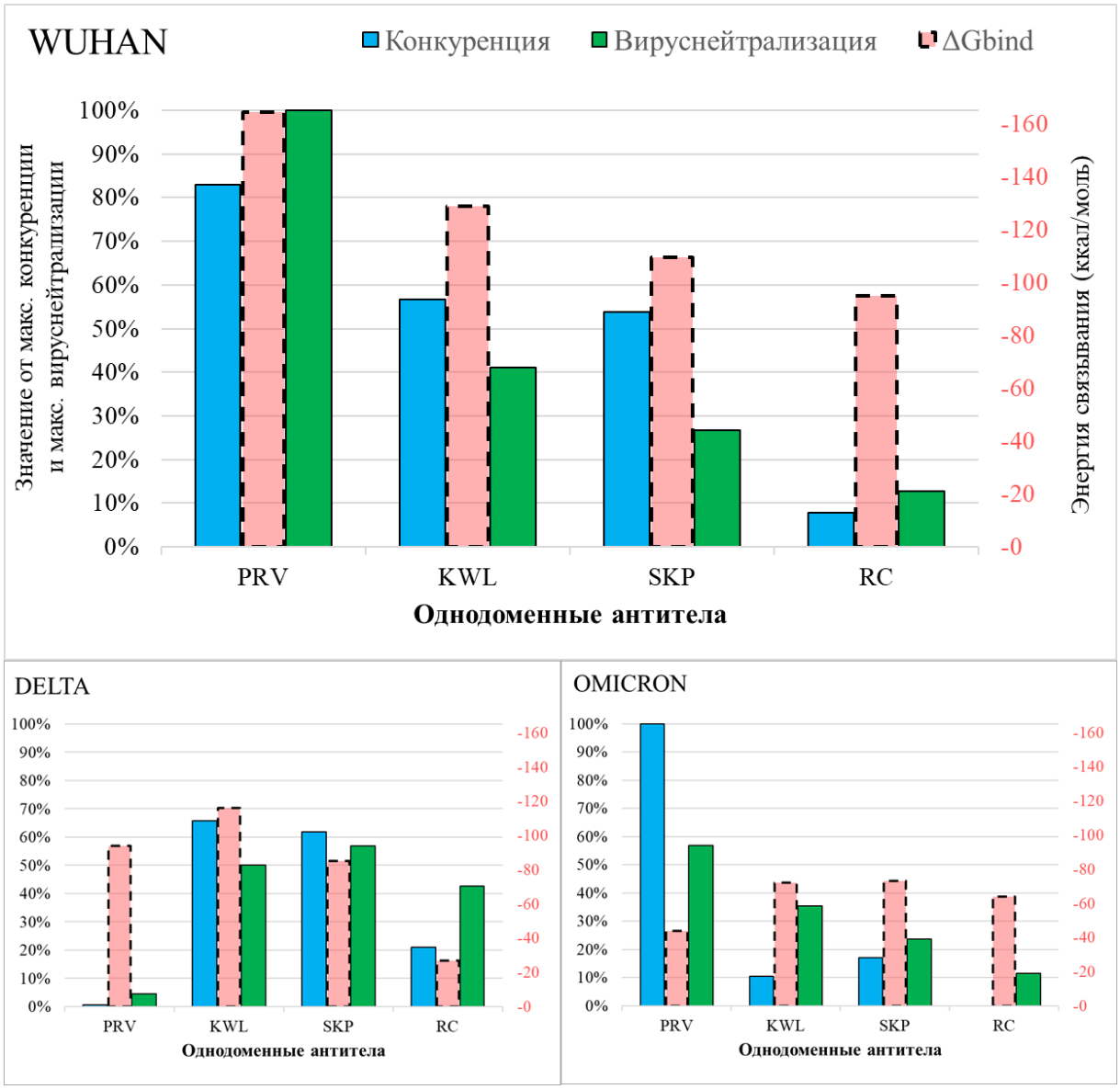


Рисунок 33 – Сравнение результатов трёх типов анализа для однодоменных антител, направленных против RBD вариантов Wuhan, Delta, Omicron. По левой оси отображены значения конкурентного ингибирования (синие колонки) и вируснейтрализации (зелёные колонки), приведённые к единой относительной шкале от 0 до 100%. За 100% в каждом случае принимались максимальные наблюдаемые значения, полученных в ходе эксперимента: для ингибирования – 76% (PRV–RBD Omicron), для вируснейтрализации – значение IC_{50} = 2,30 мкг/мл (PRV–SARS-CoV-2 штамм Wuhan); остальные значения рассчитывались пропорционально. Свободная энергия связывания (ΔG_{bind}), полученная в результате теоретического моделирования (полупрозрачные красные колонки), отображена по правой оси без нормализации; наиболее отрицательное значение, соответствующее термодинамически выгодному взаимодействию (–164,3 ккал/моль для комплекса PRV–RBD Wuhan), было размещено на уровне, соответствующем 100% значению на основной шкале, что позволило визуально соотнести распределение энергетических и экспериментальных данных.

Сравнение результатов теоретических расчетов с экспериментальными данными взаимодействия однодоменных антител с вирусными антигенами вариантов Wuhan, Delta и Omicron демонстрирует определенную корреляцию между полученными значениями. Для однодоменных антител PRV, KWL и SKP наблюдается высокая способность ингибировать взаимодействие ACE2-S белок и высокое связывание по результатам молекулярного моделирования с RBD Wuhan и Delta. Эти антитела, вероятнее всего, связываются в пределах рецептор-связывающего мотива (RBM) — ключевой области RBD, где расположен сайт связывания ACE2 с этими вариантами. Такое расположение эпитопа объясняет и хорошую вируснейтрализующую активность за счет физического препятствования присоединения ACE2. В случае варианта RBD Omicron для однодоменных антител KWL, SKP и RC наблюдается повышение значения энергии ΔG_{bind} по сравнению с другими вариантами, что, в целом, соответствовало снижению эффективности антител в экспериментальных тестах. Высокие значения энергии связывания ΔG_{bind} (наименее стабильные комплексы) для всех трёх вариантов RBD наблюдалось у однодоменного антитела RC, что соответствовало самым низким среди всех исследуемых однодоменных антител значениям ингибирования.

Небольшое отклонение значений от описанной картины наблюдается для PRV в случае взаимодействии с антигеном Delta. Несмотря на то, что вируснейтрализующая и ингибирующая активность PRV в случае варианта Delta отсутствовала, энергия связывания указывала на прочное взаимодействие PRV с RBD (ΔG_{bind} = 94,83 ккал/моль). Это расхождение, вероятно, связано с особенностями моделирования, в котором оценка энергии связывания проводилась для изолированного RBD домена, не учитывающего тримерную организацию S белка и его конформационную подвижность. В нативном тримерном комплексе эпитоп, распознаваемый PRV, может быть частично экранирован соседними доменами или гликанами, что ограничивает доступ наноантитела к целевому участку и препятствует эффективному связыванию в условиях эксперимента. В случае взаимодействия PRV с

вариантом Omicron наблюдается обратная картина: при высокой вируснейтрализующей активности энергия связывания характеризуется меньшей прочностью взаимодействия. Поскольку конкурентное ингибирование указывает на связывание однодоменного антитела непосредственно с рецепторным интерфейсом, такие расхождения, вероятно, обусловлены ограничениями теоретического моделирования. При расчёте свободной энергии связывания могли не учитываться факторы, влияющие на стабильность комплекса в физиологических условиях – наличие гликанов, ионов, молекул воды, а также динамика взаимодействия. Более точную природу наблюдаемых различий могло бы прояснить определение механизмов взаимодействия.

4.6 Влияние структуры и доменной архитектуры на эпитоп-связывание однодоменных антител

Известно, что RBD S белка является областью с высокой аминокислотной изменчивостью (Koch K. et al., 2017). Идентичность последовательностей RBD вариантов Wuhan и Delta составляет 99 %, тогда как между Wuhan и Omicron — 92 % (Shitaoka K. et al., 2023). Большая часть этой изменчивости сосредоточена в первом эпитопе RBD, который существенно перекрывает интерфейс связывания с ACE2. Структурные модели взаимодействия четырёх однодоменных антител (PRV, KWL, SKP, RC) с RBD вариантов Wuhan, Delta и Omicron показали, что они связываются с различными участками RBD.

Анализ базы данных по структурам белков – PDB выявил наличие однодоменного антитела W25 (Valenzuela N.G. et al., 2021) с аминокислотной последовательностью, на 99 % идентичной последовательности однодоменного антитела PRV, полученного в работе. Сравнение показало расхождение всего в двух аминокислотах, расположенных в позициях 1 и 2 белка. Интересно, что однодоменное антитело W25 продемонстрировало схожие с PRV результаты вируснейтрализации: оба наноантитела

нейтрализовали SARS-CoV-2 штаммов Wuhan и Omicron (Valenzuela N.G. et al., 2021; Modhiran N. et al., 2023). В то же время результаты молекулярного докинга (для PRV) и криоэлектронной микроскопии (для W25) комплексов наноантитело–RBD S белка вариантов Wuhan и Omicron показали, что эти два наноантитела связываются с разными участками RBD. PRV связывается с интерфейсом взаимодействия ACE2, что подтверждается результатами конкурентного ИФА. W25 связывается с RBD в положении, не препятствующем непосредственному связыванию ACE2 (Modhiran N. et al., 2023). Анализ показал, что большинство мутаций варианта Omicron в RBD находятся вне области связывания W25, что объясняет сохранение его эффективности против этого варианта. Его вируснейтрализующая активность, вероятно, связана с тем, что наноантитело фиксирует RBD в положении «вниз», препятствуя раскрытию и активации белка. Также не исключается, что данное антитело мешает конформационным переходам, необходимым для слияния вируса с клеткой. У однодоменного антитела PRV, которое ингибировало связывание S белка варианта Omicron, высокая нейтрализующая активность, возможно, объясняется механизмом прямого блокирования взаимодействия S белка с рецептором ACE2. Мы предполагаем, что такая разница может быть связана с наличием Fc-фрагмента у W25 и его отсутствием у PRV. Fc-участок у W25 мог сделать молекулу наноантитела более громоздкой и повлиять на его ориентацию при связывании, ограничив степень свободы и заставив его «садиться» на антиген под определённым углом. В результате, даже при одинаковых CDR-петлях, угол взаимодействия с RBD мог отличаться, и в одном случае CDR затрагивал интерфейс взаимодействия ACE2, а в другом — нет. Также нельзя исключить важную роль начальных аминокислот в последовательности наноантител при связывании с антигеном. Структурные исследования однодоменных антител показывают, что некоторые аминокислоты из каркасных участков, включая позиции 1–2, могут участвовать во взаимодействии с антигеном и формировании паротопа (Mitchell L. et al., 2018). Отсутствие лёгких цепей у

однодоменных антител приводит к уменьшению общей площади взаимодействия, что может компенсироваться вовлечением дополнительных аминокислот, расположенных вне традиционных петель связывания.

Однодоменное антитело KWL, согласно нашей модели, связывается с контактной областью интерфейса RBD–ACE2 (рисунок 34а).

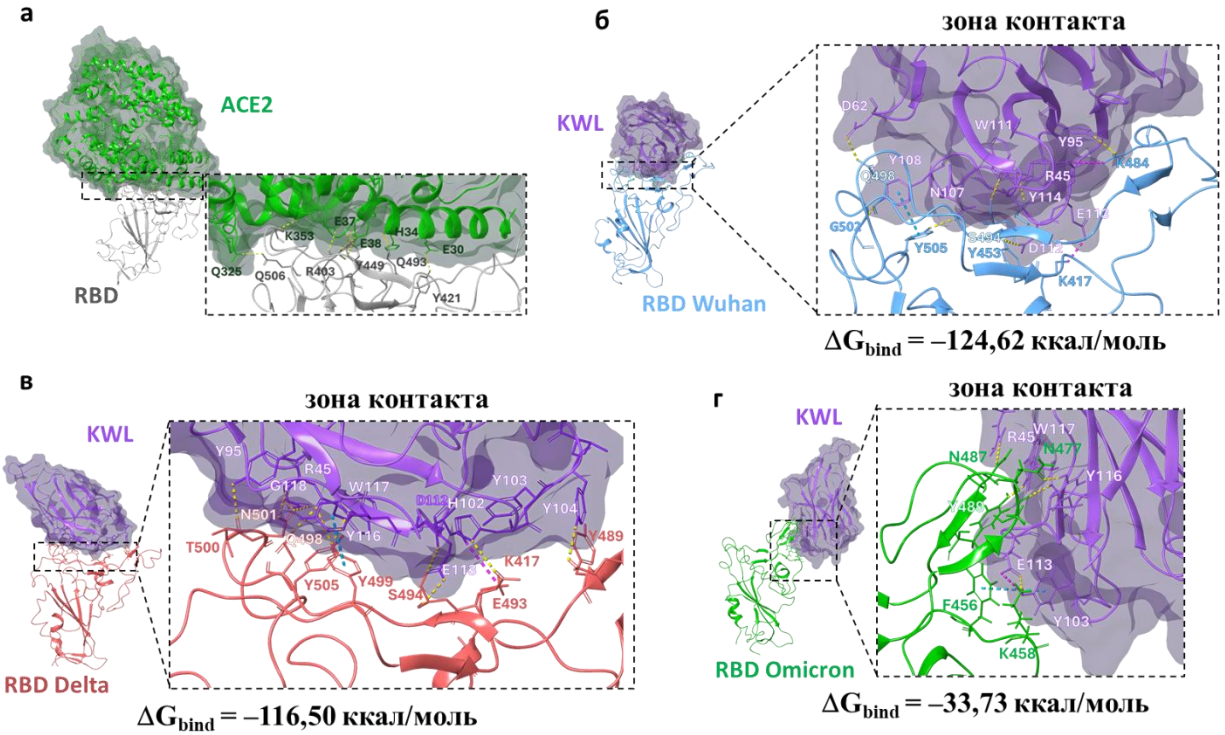


Рисунок 34 – Расположение однодоменного антитела KWL в области связывания RBD с ACE2 согласно теоретической модели: а – визуализация комплекса ACE2-RBD (PDB ID 6VW1 (Shang J., et al., 2020); б – статистически значимый комплекс KWL-RBD-Wuhan; в – статистически значимый комплекс KWL-RBD-Delta; г – статистически значимый комплекс KWL-RBD-Omicron, полученные в результате процедуры кластеризации последних 100 нс МД симуляции. На панели (а) ACE2 показан зелёным цветом, на панелях (б), (в) и (г) наноантитело KWL показано фиолетовым, RBD Wuhan — синим, RBD Delta — красным, а RBD Omicron — зелёным. Водородные связи показаны желтым цветом, солевые мостики – пурпурным, π-π стекинг взаимодействия голубым.

В случае взаимодействия KWL с RBD вариантов Wuhan и Delta антитело почти полностью покрывает связывающую поверхность (рисунок 34б, в). Аминокислотные остатки CDR-петель KWL формируют межмолекулярные контакты с аминокислотами трёх ключевых контактных зон рецептора (Shang

J. et al., 2020; Yan R. et al., 2020). Однако при связывании с RBD варианта Omicron пространственная ориентация KWL существенно отличается: гипервариабельные петли антитела взаимодействуют лишь с одной из трёх контактных зон (рисунок 34г), что может объяснять снижение конкурентоспособности с ACE2. Подобные наблюдения описаны в работе Li M. et al. (2022), где анализируются структурные особенности и их влияние на свойства трёх однодоменных антител — 1-2C7, Nb70 и 3-2A2-4. Наноантитело Nb70 эффективно связывалось с RBD вариантами Wuhan и Delta, но полностью теряло активность против Omicron. Авторы предполагают, что его эпитоп включает участки, подверженные мутациям в Omicron, что приводит к потере способности к эффективному связыванию.

Заключение

Однодоменные антитела (наноантитела, VHH) — вариабельные участки особых неканонических антител верблюдовых (*Camelidae*), состоящих только из тяжёлых цепей (Hamers-Casterman C. et al., 1993). Своё название они получили за способность связываться с антигеном без участия константной области, функционируя как самостоятельные антигенсвязывающие молекулы. Помимо своих маленьких размеров (~15 кДа) (Тиллиб С.В., 2020), они обладают рядом уникальных свойств — высокой растворимостью, устойчивостью к экстремальным значениям pH и термостабильностью (Muyldermans S., 2021). Небольшой размер обеспечивает им возможность проникновения к конформационным эпитопам антигенов, недоступным для полноразмерных иммуноглобулинов. Это свойство особенно ценно при борьбе с SARS-CoV-2, поскольку поверхностный S белок этого вируса богат гликозилированными участками. Начало пандемии COVID-19, вызванной этим вирусом, послужило импульсом к бурному развитию исследований, направленных на получение однодоменных антител к SARS-CoV-2 (Xu J., et al., 2021; Hanke L. et al., 2022; Yang Y., et al., 2024). Несмотря на успешные примеры получения таких антител, в условиях быстро эволюционирующих инфекций появление новых вариантов вируса часто приводит к снижению эффективности ранее отобранных молекул (VanBlargan L., et al., 2022; Moulana A., et al., 2023). Потенциальным решением этой проблемы является поиск однодоменных антител, обладающих перекрёстной реактивностью к различным вариантам SARS-CoV-2.

В данной работе была поставлена цель — получить однодоменные антитела, способные нейтрализовать спектр вариантов SARS-CoV-2. Доминирующим подходом к их получению остаётся фаговый дисплей (Arbabi-Ghahroudi M., 2022), который позволяет осуществлять селекцию клонов с заданной специфичностью и аффинностью. Эффективность селекции во многом определяется условиями биопэннинга — выбором антигенов, способом и последовательностью их применения, а также числом раундов.

Для получения однодоменных антител, нейтрализующих гетерологичные варианты вируса, большинство исследователей используют повторную иммунизацию животного новыми вариантами вируса с последующим созданием новых библиотек (Aksu M. et al., 2024; Solodkov P. et al., 2024). Однако такой подход может не поспевать за скоростью эволюции вируса. В нашей работе мы предлагаем и реализуем альтернативный подход — использование в раундах биопэннинга гетерологичных антигенов в порядке их возникновения (Wuhan → Beta → Delta → Omicron), что является попыткой имитации эволюцию вируса *in vitro*. Такой подход позволяет использовать фаговую библиотеку, созданную на основе иммунного репертуара животного, иммунизированного только одним вариантом антигена, и избежать повторных иммунизаций и трудоёмкого создания новых библиотек. В рамках данной стратегии нами была использована фаговая библиотека, полученная на основе иммунного репертуара ламы, иммунизированной рекомбинантным RBD варианта Wuhan. Для раундов биопэннинга последовательно использовали рекомбинантные RBD вариантов Wuhan, Beta, Delta и S белок варианта Omicron. После четырёх раундов аффинной селекции из фаговой библиотеки было отобрано 54 фаговых клона: 30 – после третьего раунда биопэннинга и 24 – после четвёртого. Отбор фаговых клонов отдельно после третьего и четвертого раундов был обусловлен желанием оценить влияние четвёртого раунда на эффективность селекции и характеристики отбираемых антител.

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей отобранных клонов выявил наличие стоп-кодонов амберного и опалового типов в 32 из 54 фаговых клонов, причём доля таких клонов была на 21 % выше среди клонов, отобранных после четвёртого раунда.

Из-за невозможности продукции полноразмерных однодоменных антител клонами со стоп-кодонами в несупрессорных штаммах *E. coli*, для дальнейших работ были отобраны только клоны, не содержащие стоп-кодонов. Всего 22 фаговых клона были протестированы на специфичность связывания с S белками трёх вариантов (Wuhan, Delta,

Omicron), и 68 % из них проявили специфическое взаимодействие хотя бы с одним из вариантов. Было отмечено, что большинство неспецифичных клонов были отобраны после четвёртого раунда.

Нуклеотидные последовательности специфических однодоменных антител были клонированы в составе вектора pET_21a с последующей трансформацией штамма *E. coli* BL21(DE3). Достаточный для иммунохимических анализов выход рекомбинантных белков удалось достичь для четырёх продуцентов однодоменных антител. Таким образом, из 54 фаговых клонов, отобранных после аффинной селекции, до стадии белкового синтеза дошли только 4. Этот результат подчёркивает, что на каждом этапе выполнения фагового дисплея от секвенирования нуклеотидных последовательностей до стадии синтеза целевых белков происходит постепенное снижение общего разнообразия вариантов.

Синтезированные однодоменные антитела (PRV, KWL, SKP, RC) были протестированы на способность ингибировать связывание ACE2 с тримерами S белка трёх вариантов SARS-CoV-2 — Wuhan, Delta и Omicron, а также на вируснейтрализующую активность против пяти штаммов: Wuhan, Delta, Omicron, XBB.1.5 и JN.1. Все антитела продемонстрировали способность к ингибированию взаимодействия ACE2 с S белком или к вируснейтрализации, однако степень активности различалась.

Сравнение результатов ингибирования взаимодействия ACE2 с S белком и вируснейтрализующей активности позволило оценить, в какой степени блокировка связывания вируса с рецептором коррелирует с его фактической нейтрализацией.

Для установления более точной природы наблюдаемых различий и прояснения механизмов взаимодействия были предприняты попытки построения моделей четырёх вариантов однодоменных антител — PRV, KWL, SKP и RC — в комплексе с RBD SARS-CoV-2 вариантов Wuhan, Delta и Omicron. Для этих комплексов также были рассчитаны энергетические параметры взаимодействия (ΔG_{bind}). Сравнение экспериментальных данных, а

именно способности однодоменных антител конкурировать с ACE2 за связывание с RBD и их вируснейтрализующей активности с расчётными значениями свободной энергии связывания, позволило наглядно оценить взаимосвязь между теоретическими и экспериментальными результатами. Так, для комплексов взаимодействия однодоменных антител PRV, KWL и SKP с RBD вариантов Wuhan и Delta, более благоприятные энергетические параметры связывания коррелировали с их эффективным ингибированием взаимодействия ACE2 и высокой вируснейтрализующей активностью. Отмеченные расхождения между расчётными и экспериментальными данными, в частности для антитела PRV, вероятно связаны с ограничениями теоретического моделирования, не учитывающего тримерную организацию S белка, гликозилирование и динамику конформационных переходов. В целом результаты молекулярного моделирования отражали общие тенденции, наблюдаемые в экспериментальных данных.

Таким образом, в результате применения предложенной схемы биопэннинга были получены четыре однодоменных антитела, способных ингибировать взаимодействие S белка с ACE2 и обладающих нейтрализующей активностью в отношении трёх различных вариантов SARS-CoV-2. Результаты молекулярного моделирования в целом подтвердили экспериментальные данные и позволили построить теоретические модели взаимодействия антител с RBD. Полученные данные сопоставимы с результатами других исследователей и подтверждают обоснованность разработанного подхода для поиска однодоменных антител, нейтрализующих SARS-CoV-2.

Выводы

1. Сконструированы интегративные плазмидные векторы pVEAL3_SΔ, pVEAL3_SO, pVEAL2_RBDβ и pVEAL2_RBDΔ, обеспечивающие продукцию рекомбинантного спайкового белка вариантов Delta и Omicron, а также рецептор-связывающего домена вариантов Beta и Delta в клетках линии CHO-K1. Показано, что полученные S белки вариантов Delta (B.1.617.2) и Omicron (B.1.1.529) специфически взаимодействуют с рекомбинантным рецептором ACE2 в значениях $ОП_{450}$ 1,2 и 2,7 соответственно, а RBD вариантов Beta (B.1.351) и Delta (B.1.617.2) в значениях 0,6 и 1,6 соответственно.

2. Установлено, что использованная схема биопэннинга, включающая четыре раунда селекции с использованием RBD вариантов Wuhan-Hu-1, Beta B.1.351, Delta B.1.617.2 и S белка варианта Omicron B.1.1.529 в порядке их появления, позволила отобрать 15 фаговых клонов, продемонстрировавших специфичность к S белку хотя бы одного из вариантов (Wuhan, Delta или Omicron).

3. Сконструированы 11 рекомбинантных плазмид, четыре из которых (pET21a_PRV, pET21a_KWL, pET21a_SKP, pET21a_RC) при трансформации *E.coli* обеспечивали накопление растворимых однодоменных антител в бактериальных клетках. Культивирование полученных штаммов-продуцентов (BL21 pET21a_PRV, BL21 pET21a_KWL, BL21 pET21a_SKP, BL21 pET21a_RC) с последующим выделением и очисткой белков обеспечило выход белка до 30 мг с 1 грамма влажной биомассы продуцента.

4. Показано, что препараты однодоменных антител PRV, KWL и SKP способны ингибировать связывание ACE2 с S белком SARS-CoV-2 вариантов Wuhan-Hu-1, Delta (B.1.617.2), Omicron (B.1.1.529). При этом PRV проявляло более выраженную ингибирующую активность в отношении вариантов Wuhan (61%) и Omicron (76%), тогда как KWL – в отношении вариантов Delta (50%) и Wuhan (43%).

5. Установлено, что наибольшую широту нейтрализующей активности проявило антитело KWL, нейтрализовавшее четыре варианта SARS-CoV-2: Wuhan (IC_{50} = 5,6 мкг/мл), Delta (IC_{50} = 4,6 мкг/мл), Omicron (IC_{50} = 6,5 мкг/мл) и XBB.1.5 (IC_{50} = 40,8 мкг/мл). Наименьший спектр нейтрализуемых вариантов показало однодоменное антитело PRV, нейтрализовавшее только варианты Wuhan (IC_{50} = 2,3 мкг/мл) и Omicron (IC_{50} = 4,0 мкг/мл).

6. При помощи расчетных методов построены модели комплекса однодоменных антител PRV, KWL, SKP, RC с RBD SARS-CoV-2 вариантов Wuhan-Hu-1, Delta (B.1.617.2), Omicron (B.1.1.529). Рассчитаны значения энергии связывания данных комплексов (ΔG_{bind}), варьирующиеся от –27,7 ккал/моль (для комплекса RC-RBD Delta) до –164,3 ккал/моль (для комплекса PRV-RBD Wuhan). Показано, что значение ΔG_{bind} для оптимального расположения PRV в модели комплексе с RBD варианта Wuhan (–164,35 ккал/моль) соответствует его высокой нейтрализующей активности в отношении данного варианта.

Список литературы

1. Горшкова Е.Н., Василенко Е.А., Тиллиб С.В. и др. Однодоменные антитела и биоинженерные препараты на их основе: новые возможности для диагностики и терапии // Медицинская иммунология. – 2016. – Т. 18. – № 6. – С. 505-520.
2. Тиллиб С.В. Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине // Молекулярная биология. – 2020. – Т. 54. – №. 3. – С. 362-373.
3. Abbasian M.H., Mahmanzar M., Rahimian K., et al. Global landscape of SARS-CoV-2 mutations and conserved regions // Journal of Translational Medicine. – 2023. – V. 21. – № 1. – P. 152.
4. Abulrob A., Sprong H., Van Bergen en Henegouwen P., et al. The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: Mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells // Journal of Neurochemistry. – 2005. – V. 95. – P. 1201-1214.
5. Aksu M., Kumar P., Güttler, T., et.al. Nanobodies to multiple spike variants and inhalation of nanobody-containing aerosols neutralize SARS-CoV-2 in cell culture and hamsters // Antivir. Res. – 2024. – V. 221. – P. 105778.
6. Albert S., Arndt C., Feldmann A., et al. A novel nanobody-based target module for retargeting of T lymphocytes to EGFR-expressing cancer cells via the modular UniCAR platform // Oncoimmunology. – 2017. – V. 6. – P. e1287246.
7. Applied Clinical Trials. Alexion's Dual-Binding Nanobody Demonstrates Statistically Significant Improvements in Generalized Myasthenia Gravis. – URL: https://www.appliedclinicaltrialsonline.com/view/alexion-dual-binding-nanobody-demonstrates-statistically-significant-improvements-generalized-myasthenia-gravis (дата обращения 18.01.2026).
8. Arbabi-Ghahroudi M. Camelid Single-Domain Antibodies: Historical Perspective and Future Outlook // Frontiers in immunology. – 2017. – V. 8. – P. 1589.

9. Arbabi-Ghahroudi M. Camelid Single-Domain Antibodies: Promises and Challenges as Lifesaving Treatments // International journal of molecular sciences. – 2022. – V 23. – № 9. – P. 5009.
10. Arbabi-Ghahroudi M., Desmyter A., Wyns L., et al. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies // FEBS letters. – 1997. – V. 414. – P. 521-526.
11. Asaadi Y., Jouneghani F.F., Janani S., et al. A comprehensive comparison between camelid nanobodies and single chain variable fragments // Biomarker Research 9. – 2021. – V. 87. – V. 9. – № 1. – P. 87.
12. Baghban R., Gargari S.L., Rajabibazl M., et al. Camelid-derived heavy-chain nanobody against Clostridium botulinum neurotoxin E in Pichia pastoris // Biotechnology and Applied Biochemistry – 2016. – V. 63. – P. 200-205.
13. Bakhshinejad B., Kjaer A. On the origin of non-specific binders isolated in the selection of phage display peptide libraries // Front. Microbiol. – 2025. – V. 16. – P. 1571679.
14. Beghein E., Gettemans J. Nanobody Technology: A Versatile Toolkit for Microscopic Imaging, Protein-Protein Interaction Analysis, and Protein Function Exploration // Frontiers in Immunology. – 2017. – V. 8. – P. 771.
15. Behdani M., Zeinali S., Karimipour M., et al. Development of VEGFR2-specific Nanobody Pseudomonas exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth // New Biotechnology. – 2013. – V. 30. – P. 205-209.
16. Ben Abderrazek R., Vincke C., Hmila I., et al. Development of Cys38 knock-out and humanized version of NbAahII10 nanobody with improved neutralization of AahII scorpion toxin // Protein Engineering, Design and Selection. – 2011. – V. 24. – P. 727-735.
17. Benmebarek M.R., Karches C.H., Cadilha B.L., et al. Killing Mechanisms of Chimeric Antigen Receptor (CAR) T Cells // International Journal of Molecular Sciences. – 2019. – V. 20. – № 6. P. 1283.
18. Berman H.M. The Protein Data Bank // Nucleic Acids Res. – 2000. – V. 28. – № 1. – P. 235-242.

19. Bernedo-Navarro R.A., Romão E., Yano T., et al. Structural Basis for the Specific Neutralization of Stx2a with a Camelid Single Domain Antibody Fragment // Toxins. – 2018. – V. 10. – № 3. – P. 108.
20. Bever C.S., Dong J.X., Vasylieva N., et al. VHH antibodies: emerging reagents for the analysis of environmental chemicals // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2016. – V. 408. – № 22. – P. 5985-6002.
21. Bhattacharya M., Chatterjee S., Lee S.S., et al. Therapeutic applications of nanobodies against SARS-CoV-2 and other viral infections: Current update // International Journal of Biological Macromolecules. – 2023. – V. 229. – P. 70-80.
22. Bird R.E., Hardman K.D., Jacobson J.W., et al. Single-chain antigen-binding proteins // Science. – 1988. – V. 242. – № 4885. – P. 423–426.
23. Bobkov V., Zarca A.M., Van Hout. A., et al. Nanobody-Fc constructs targeting chemokine receptor CXCR4 potently inhibit signaling and CXCR4-mediated HIV-entry and induce antibody effector functions // Biochemical Pharmacology. – 2018. – V. 158. – P. 413-424.
24. Borges A.L., Lou Y.C., Sachdeva R., et al. Widespread stop codon recoding in bacteriophages may regulate translation of lytic genes // Nat. Microbiol. – 2022. – V. 7. – № 6. – P. 918-927.
25. Caljon G., Caveliers V., Lahoutte T., et al. Using microdialysis to analyse the passage of monovalent nanobodies through the blood-brain barrier // British Journal of Pharmacology. – 2012. – V. 165. – P. 2341-2353.
26. Campuzano S., Salema V., Moreno-Guzmán M., et al. Disposable amperometric magnetoimmunosensors using nanobodies as biorecognition element. Determination of fibrinogen in plasma // Biosensors and Bioelectronics. – 2014. – V. 52. – P. 255-260.
27. Cardoso F.M., Ibanez L.I., Van den Hoecke S., et al. Single-domain antibodies targeting neuraminidase protect against an H5N1 influenza virus challenge // Journal of virology. – 2014. – V. 88. – № 15. – P. 8278-8296.

28. Cartwright A.N.R, Griggs J., Davis D.M. The immune synapse clears and excludes molecules above a size threshold // Nature Communications. – 2014. – V. 5. – № 1. – P. 5479.
29. Cerutti G., Guo Y., Zhou T., et al. Cryo-EM structure of the SARS-CoV-2 Omicron spike // Cell Rep. – 2022. – V. 38. – № 10. – P. 110428.
30. Chee M.K., Haase S.B. New and Redesigned pRS Plasmid Shuttle Vectors for Genetic Manipulation of Saccharomyces cerevisiae // G3 (Bethesda). – 2012. – V. 2. – № 5. – P. 515-526.
31. ClinicalTrials.gov. An Open-Label Extension Study Assessing the Long-Term Efficacy and Safety of ALX-0061 in Subjects With Rheumatoid Arthritis (NCT02518620). – URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02518620 (дата обращения: 18.01.2025).
32. ClinicalTrials.gov. A six-week efficacy, safety and tolerability study of V565 in Crohn’s disease (NCT02976129). – URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02976129 (дата обращения: 18.01.2025).
33. ClinicalTrials.gov. Evaluation of Sonelokimab for the Treatment of Patients With Active Psoriatic Arthritis (NCT05640245). – URL: https://clinicaltrials.gov/study/NCT05640245 (дата обращения: 18.01.2025).
34. ClinicalTrials.gov. LMN-101 in a Campylobacter Human Challenge Model (NCT04182490). – URL: https://clinicaltrials.gov/study/NCT04182490 (дата обращения: 19.01.2025).
35. ClinicalTrials.gov. Multiple ascending doses (MAD) of anti-a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs-5 (anti-ADAMTS-5) nanobody in participants with knee osteoarthritis (OA) (NCT03583346). – URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03583346 (дата обращения: 18.01.2025).

36. ClinicalTrials.gov. Safety and Efficacy of ALXN1720 in Adults With Generalized Myasthenia Gravis (NCT05556096). – URL: https://clinicaltrials.gov/study/NCT05556096 (дата обращения: 18.01.2025).
37. Cory L., Brooks C.L., Rossotti M.A., Henry K.A. Immunological Functions and Evolutionary Emergence of Heavy-Chain Antibodies // Trends Immunol. – 2018. – V. 39. – № 12. – P. 956-960.
38. Cunha-Santos C., Perdigao P.R.L., Martin F., et al. Inhibition of HIV replication through siRNA carried by CXCR4-targeted chimeric nanobody // Cell. Mol. Life Sci. – 2020. – V. 77. – P. 2859-2870.
39. Danquah W., Meyer-Schwesinger C., Rissiek B., et al. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation // Science Translational Medicine. – 2016. – V. 8. – № 366. – P. 366ra162.
40. De Beer M.A., Giepmans B.N.G. Nanobody-Based Probes for Subcellular Protein Identification and Visualization // Front. Cell. Neurosci. – 2020. – V. 14. – P. 573278.
41. Debie P., Lafont C., Defrise M., et al. Size and affinity kinetics of nanobodies influence targeting and penetration of solid tumours // Journal of Controlled Release. – 2020. – V. 317. – P. 34-42.
42. De Cae S., Van Breedam W., Van Royen T., et al. Ultrapotent SARS coronavirus-neutralizing single-domain antibodies targeting the conserved HR2 region of the spike protein // Nature Communications. – 2025. – V. 16. – P. 60250.
43. Decanniere K., Desmyter A., Lauwereys M., et al. A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: Noncanonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops // Structure. – 1999. – V. 7. – № 4. – P. 361-370.
44. Decanniere K., Muyldermans S., Wyns L. Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: More structures, more canonical classes? // J Mol Biol. – 2000. – V. 300. – № 1. – P. 83-91.

45. De Genst E., Handelberg F., Van Meirhaeghe A., et al. Chemical basis for the affinity maturation of a camel single domain antibody // Journal of Biological Chemistry. – 2004. – V. 279. – № 51. – P. 53593-601.
46. De Genst E., Silence K., Ghahroudi M.A., et al. Strong in vivo maturation compensates for structurally restricted H3 loops in antibody repertoires // Journal of Biological Chemistry. – 2005. – V. 280. – № 14. – P. 14114-21.
47. De Genst E., Saerens D., Muyldermans S., et al. Antibody repertoire development in camelids // Developmental and comparative immunology. – 2006. – V. 30. – P. 187-198.
48. De Genst E., Silence K., Decanniere K., et al., Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2006. – V. 103. – № 12. – P. 4586-4591.
49. D'Huyvetter M., Vos J., Caveliers V., et al. Phase I Trial of 131I-GMIB-Anti-HER2-VHH1, a New Promising Candidate for HER2-Targeted Radionuclide Therapy in Breast Cancer Patients // J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med. – 2021. – V. 62. – P. 1097-1105.
50. De Groof T.W.M., Mashayekhi V., Fan T.S., et al. Nanobody-targeted photodynamic therapy selectively kills viral GPCR-expressing glioblastoma cells // Mol. Pharm. – 2019. – V. 16. – № 7. – P. 3145-3156.
51. De Groof T.W.M., Elder, E.G., Lim, E.Y., et al. Targeting the latent human cytomegalovirus reservoir for T-cell-mediated killing with virus-specific nanobodies // Nat. Commun. – 2021. – V. 12. – № 1. – P. 4436.
52. De Munter S., Van Parys A., Bral, L., et al. Rapid and Effective Generation of Nanobody Based CARs using PCR and Gibson Assembly // Int. J. Mol. Sci. – 2020. – V. 21. – № 3 – P. 883.
53. Desmyter A., Transue T.R., Ghahroudi M.A., et al. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme // Nature Structural & Molecular Biology. – 1996. – V. 3. – № 9. – P. 803-811.

54. Desmyter A., Decanniere K., Muyldermans S., et al. Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody // Journal of Biological Chemistry. – 2001. – V. 276. – P. 26285-26290.
55. Desmyter A., Spinelli S., Payan F., et al. Three camelid VHH domains in complex with porcine pancreatic alpha-amylase. Inhibition and versatility of binding topology // Journal of Biological Chemistry. – 2002. – V. 277. – P. 23645 – 23650.
56. Dietrich M.H., Gabriela M., Reaksudsan, K., et al. Nanobodies against Pfs230 block Plasmodium falciparum transmission // Biochem. J. – 2022. – V. 479. – № 24. – P. 2529–2546.
57. De Vlieger D., Ballegeer M., Rossey I., et al. Single-Domain Antibodies and Their Formatting to Combat Viral Infections // Antibodies. – 2018. – V. 8. – № 1. – P.1.
58. Dmitriev O.Y., Lutsenko S., Muyldermans S. Nanobodies as Probes for Protein Dynamics In Vitro and in Cells // Journal of Biological Chemistry. – 2016. – V. 291. – № 8. – P. 3767-3775.
59. Doerflinger S.Y., Tabatabai J., Schnitzler P., et al. Development of a Nanobody-Based Lateral Flow Immunoassay for Detection of Human Norovirus // mSphere. – 2016. – V. 1. – № 5. – P. e00219-16.
60. Dooley H., Flajnik M.F. Shark immunity bites back: Affinity maturation and memory response in the nurse shark, Ginglymostoma cirratum // European Journal of Immunology. – 2005. – V. 35. – № 3. – P. 936-945
61. Duan H., Ma Z., Xu L., et al. A novel intracellularly expressed NS5B-specific nanobody suppresses bovine viral diarrhea virus replication // Vet. Microbiol. – 2020. – V. 240. – P. 108449.
62. Duan Q., Ai T., Ma Y., et al. Research Progress on the Application of Neutralizing Nanobodies in the Prevention and Treatment of Viral Infections // Microorganisms. – 2025. – V. 13. – № 6. – P. 1352.
63. Duggan S. Caplacizumab: first global approval // Drugs. – 2018. – V. 78. – P. 1639-1642.

64. Dumoulin M., Conrath K., Van Meirhaeghe A., et al. Single-domain antibody fragments with high conformational stability // Protein Science. – 2002. – V. 11. – № 3. – P. 500-515.

65. Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Egorova D.A., et al. Nanobodies are potential therapeutic agents for the Ebola virus infection // Acta Naturae. – 2021. – V. 13. – № 4. – P. 53-63.

66. Ewert S., Cambillau C., Conrath K., et al. Biophysical properties of camelid VHH domains compared to those of human VH3 domains // Biochemistry. – 2002. – V. 41. – № 11. – P. 3628-3636

67. Ezzine A., M'hirsi El Adab S., Bouhaouala-Zahar., et al. Efficient expression of the anti-AahI' scorpion toxin nanobody under a new functional form in a Pichia pastoris system. Biotechnol // Appl. Biochem. – 2012. – V. 59. – №1. – P. 15-21.

68. Fan R., Du J., Park, K.W., et al. Immobilization of Nanobodies with Vapor-Deposited Polymer Encapsulation for Robust Biosensors // ACS Appl. Polym. Mater. – 2021. – V. 3. – № 5. – P. 2561–2567.

69. Farrington G.K., Caram-Salas N., Haqqani A.S., et al. A novel platform for engineering blood-brain barrier-crossing bispecific biologics // FASEB J. – 2014. – V. 28. – № 11. – P. 4764-4778.

70. Fatima A., Wang H., Kang K., et al. of VHH antibodies against dengue virus type 2 NS1 and comparison with monoclonal antibodies for use in immunological diagnosis // PLoS One. – 2014. – V. 9. – № 4. – P. e95263.

71. Fernandes C.F.C, dos Pereira S.S., Luiz M.B., et al. Camelid single-domain antibodies as an alternative to overcome challenges related to the prevention, detection, and control of neglected tropical diseases // Frontiers in Immunology. – 2017. – V. 8. – P. 1-8.

72. Flajnik M.F., Deschacht N., Muyldermans S. A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in Sharks and Camels? // PLOS Biology. – 2011. – V. 9. – №. 8. – P. e1001120

73. Franklin E.C., Lowenstein J., Bigelow B., et al. Heavy chain disease-a new disorder of serum gamma-globulins: report of the first case // The American Journal of Medicine. – 1964. – V. 37. – P. 332-350.
74. Gaiotto T., Ramage W., Ball C., et al. Nanobodies mapped to cross-reactive and divergent epitopes on A(H7N9) influenza hemagglutinin using yeast display // Sci. Rep. – 2021. – V. 11. – №. 1. – P. 3126.
75. Genheden S., Ryde U. The MM/PBSA and MM/GBSA methods to estimate ligand-binding affinities // Expert Opin. Drug Discov. – 2015. – V. 10. – № 5. – P. 449-461.
76. Gelkop S., Sobarzo A., Brangel P., et al. The Development and Validation of a Novel Nanobody-Based Competitive ELISA for the Detection of Foot and Mouth Disease 3ABC Antibodies in Cattle // Front. Vet. Sci. – 2018. – V. 5. – P. 250.
77. Glassman P.M., Walsh L.R., Villa C.H., et al. Molecularly Engineered Nanobodies for Tunable Pharmacokinetics and Drug Delivery // Bioconjug. Chem. – 2020. – V. 31. – №. 4. – P. 1144-1155.
78. Goldman E.R., Anderson G.P., Liu J.L., et al. Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library // Anal. Chem. – 2006. – V. 78. – №. 24. – P. 8245-8255.
79. Gorchakov A.A., Kulemzin S.V., Guselnikov S.V. et al. Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern // Cell Discov. – 2021. – V. 7. – № 1. – P. 96.
80. Govaert J., Pellis M., Deschacht N., et al. Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments // Journal of Biological Chemistry. – 2012. – V. 287. – № 3. – P. 1970-1979.
81. Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks // Nature. – 1995. – V. 374. – № 6518. – P. 168-173.
82. Gu K., Song Z., Zhou C., et al. Development of nanobody-horseradish peroxidase-based sandwich ELISA to detect Salmonella Enteritidis in milk and

in vivo colonization in chicken // J. Nanobiotechnol. – 2022. – V. 20. – № 1. – P. 167.

83. Guo K., Wustoni S., Koklu A., et al. Rapid single-molecule detection of COVID-19 and MERS antigens via nanobody-functionalized organic electrochemical transistors // Nat. Biomed. Eng. – 2021. – V. 5. – № 7. – P. 666–677.
84. Güttler T., Aksu M., Dickmanns A., et.al. Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutation-tolerant nanobodies // EMBO J. – 2021. – V. 40. – № 19. – P. e107985.
85. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains // Nature. – 1993. – V. 363. – № 6428. – P. 446-448.
86. Han Q., Wang S., Wang Z., et al. Nanobodies with cross-neutralizing activity provide prominent therapeutic efficacy in mild and severe COVID-19 rodent models // Virol. Sin. – 2023. – V. 38. – P. 787-800.
87. Hanke L., Das H., Sheward D. J., et al. A Bispecific Monomeric Nanobody Induces Spike Trimer Dimers and Neutralizes SARS-CoV-2 In Vivo // Nature Communications. – 2022. – V. 13 – № 1. – P. 155.
88. Harmsen M.M., De Haard H.J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2007. – V. 77. – № 1. – P. 13-22.
89. Harmsen M.M., Ruuls R.C., Nijman I.J., et al. Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features // Molecular Immunology. – 2000. – V. 37. – № 10. – P. 579-590.
90. Hassanzadeh-Ghassabeh G., Devoogdt N., De Pauw P., et al. Nanobodies and their potential applications // Nanomedicine. – 2013. – V. 8. – № 6. – P. 1013-1026.
91. He L., Tai W., Li J., et al. Enhanced ability of oligomeric nanobodies targeting MERS coronavirus receptor-binding domain // Viruses. – 2019. – V. 11. – № 2. – P. 166.

92. Helma J., Cardoso M.C., Muyldermans S., et al. Nanobodies and recombinant binders in cell biology // J. Cell Biol. – 2015. – V. 209. – № 5. – P. 633–644.
93. Henry K.A., MacKenzie C.R. Antigen recognition by single-domain antibodies: structural latitudes and constraints // mAbs. – 2018. – V. 10. – № 6. – P. 815-826.
94. Henry K.A., Tanha J., Hussack G. Identification of cross-reactive single-domain antibodies against serum albumin using next-generation DNA sequencing // Protein Engineering, Design and Selection. – 2015. – V. 28. – № 10. – P. 379-383.
95. Hmila I., Saerens D., Ben Abderrazek R., et al. A bispecific nanobody to provide full protection against lethal scorpion envenoming // FASEB J. – 2010. – V. 24. – № 9. – P. 3479-3489.
96. Hoefman S., Ottevaere I., Baumeister J., et al. Pre-Clinical Intravenous Serum Pharmacokinetics of Albumin Binding and Non-Half-Life Extended Nanobodies // Antibodies. – 2015. – V. 4. – № 3. – P. 141-156.
97. Holliger P., Hudson P.J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains // Nature Biotechnology. – 2005. – V. 23. – № 9. – P. 1126-1136.
98. Hollifield A.L., Arnall J.R., Moore D.C. Caplacizumab: An anti-von Willebrand factor antibody for the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura // Am J Health Syst Pharm. – 2020. – V. 77. – № 15. – P. 1201-1207.
99. Holt L.J., Herring C., Jespers L.S., et al. Domain antibodies: Proteins for therapy // Trends in Biotechnology. – 2003. – V. 21. – № 11. – P. 484-490.
100. Hoogenboom H.R., de Bruïne A.P., Hufton S.E., et al. Antibody phage display technology and its applications // Immunotechnology. – 1998. – V. 4. – № 1. – P. 1-20.
101. Hu Y., Sun Y., Gu J., et al. Selection of specific nanobodies to develop an immuno-assay detecting Staphylococcus aureus in milk // Food Chem. – 2021. – V. 353. – P. 129481.
102. Huen J., Yan Z., Iwashkiw J., et al. A Novel Single Domain Antibody Targeting FliC Flagellin of Salmonella enterica for Effective Inhibition of Host Cell Invasion // Front. Microbiol. – 2019. – V. 10. – P. 2665.

103. Huet H.A., Growney J.D., Johnson J.A., et al. Multivalent nanobodies targeting death receptor 5 elicit superior tumor cell killing through efficient caspase induction // mAbs. – 2014. – V. 6. – № 6. – P. 1560-1570.

104. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. VMD: Visual molecular dynamics // J. Mol. Graph. – 1996. – V. 14. – № 1. – P. 33-38.

105. Hussack G., Arbabi-Ghahroudi M., Mackenzie C.R., et al. Isolation and characterization of Clostridium difficile toxin-specific single-domain antibodies // Methods in Molecular Biology. – 2012. – V. 911. – P. 211-239.

106. Hussack G., Mackenzie C. R., Tanha J. Characterization of single-domain antibodies with an engineered disulfide bond // Methods in Molecular Biology. – 2012. – V. 911. – P. 417-429.

107. Hussack G., Riazi A., Ryan S., et al. Protease-resistant single-domain antibodies inhibit Campylobacter jejuni motility // Protein Engineering, Design and Selection. – 2014. – V. 27. – № 6. – P. 191-198.

108. Ibanez L.I., De Filette M., Hultberg A., et al. Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection // The Journal of Infectious Diseases. – 2011. – V. 203. – № 8. – P. 1063-1072.

109. Ishiwatari-Ogata C., Kyuuma M., Ogata H., et al. Ozoralizumab, a Humanized Anti-TNFα NANOBODY Compound, Exhibits Efficacy Not Only at the Onset of Arthritis in a Human TNF Transgenic Mouse but Also During Secondary Failure of Administration of an Anti-TNFα IgG // Frontiers in Immunology. – 2022. – V. 13. – P. 853008.

110. Jähnichen S., Blanchetot C., Maussang D., et al. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells // Proc Natl Acad Sci USA. – 2010. – V. 107. – № 47. – P. 20565-70.

111. Jamnani F.R., Rahbarizadeh F., Shokrgozar M.A., et al. T cells expressing VHH-directed oligoclonal chimeric HER2 antigen receptors: Towards tumor-directed oligoclonal T cell therapy // Biochim. Biophys. Acta. – 2014. – V. 1840. – № 1. – P. 378-386.

112. Jin B., Odongo S., Radwanska M., et al. Nanobodies: A Review of Generation, Diagnostics and Therapeutics // International Journal of Molecular Sciences. – 2023. – V. 24. – № 6. – P. 5994.

113. Jittavisutthikul S., Thanongsaksrikul J., Thueng-In K., et al. Humanized-VHH Transbodies That Inhibit HCV Protease and Replication // Viruses. – 2015. – V. 7. – № 4. – P. 2030-2056.

114. Jovcevska I., Muyldermans S. The therapeutic potential of nanobodies // BioDrugs. – 2020. – V. 34. – № 1. – P. 11–26.

115. Jumper J., Evans R., Pritzel A., et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold // Nature. – 2021. – V. 596. – № 7873. – P. 583-589.

116. Katz H.E. Antigen sensing via nanobody-coated transistors // Nat. Biomed. Eng. – 2021. V. 5. – № 7. – P. 639-640.

117. Keam S.J. Ozoralizumab: First Approval // Drugs. – 2023. – V. 83. – №. 1. – P. 87-92.

118. Khan F.H. Antibodies and Their Applications // Animal Biotechnology. – 2014. – P. 473-90.

119. Kher G., Sabin C., Lun J.H., et al. Direct blockade of the norovirus histo-blood group antigen binding pocket by nanobodies // Journal of Virology. – 2023. – V. 97. – P. e01833-22.

120. Kijanka M.M., van Brussel A.S., van der Wall E., et al. Optical imaging of pre-invasive breast cancer with a combination of VHHs targeting CAIX and HER2 increases contrast and facilitates tumour characterization // EJNMMI Res. – 2016. – V. 6. – № 1. – P. 14.

121. Kim T.Y., Park J.H., Shim H.E., et al. Prolonged half-life of small-sized therapeutic protein using serum albumin-specific protein binder // Journal of Controlled Release. – 2019. – V. 315. – P. 31-39.

122. King M.T., Huh I., Shenai A., et al. Structural basis of VHH-mediated neutralization of the food-borne pathogen Listeria monocytogenes // J. Biol. Chem. – 2018. – V. 293. – № 35. – P. 13626-13635

123. Kirchhofer A., Helma J., Schmidthals K., et al. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies // Nat. Struct. Mol. Biol. – 2010. – V. 17. – № 1. – P. 133-138.

124. Koch K., Kalusche S., Torres J.L., et al. Selection of nanobodies with broad neutralizing potential against primary HIV-1 strains using soluble subtype C gp140 envelope trimers // Scientific reports. – 2017. – V. 7. – № 1. – P. 8390.

125. Koczula K.M., Gallotta, A. Lateral flow assays // Essays Biochem. – 2016. – V. 60. – № 1. – P. 111-120.

126. Koenig P.–A., Das H., Liu H., et al. Structure-guided multivalent nanobodies block SARS-CoV-2 infection and suppress mutational escape // Sci. – 2021. – V. 371. – № 6530. – P. eabe6230.

127. Koklu A., Wustoni S., Guo K., et al. Convection Driven Ultrarapid Protein Detection via Nanobody-Functionalized Organic Electrochemical Transistors // Adv. Mater. – 2022. – V. 34. – № 35. – P. e2202972.

128. Koromyslova A.D., Hansman G.S. Nanobodies targeting norovirus capsid reveal functional epitopes and potential mechanisms of neutralization // PLoS Pathog. – 2017. – V. 13. – № 11. – P. e1006636.

129. Kozakov D., Brenke R., Comeau S.R., et al. PIPER: An FFT-based protein docking program with pairwise potentials // Proteins Struct. Funct. Bioinforma. – 2006. – V. 65. – № 2. – P. 392-406.

130. Kulemzin S.V., Sergeeva M.V., Baranov K.O., et al. VH3-53/66-Class RBD-Specific Human Monoclonal Antibody iB20 Displays Cross-Neutralizing Activity against Emerging SARS-CoV-2 Lineages // Journal of personalized medicine. – 2022. – V. 12. – № 6. – P. 895.

131. Kunz P., Zinner K., Mücke N., et al. The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance // Scientific Reports. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 1-10.

132. Kunz P., Ortale A., Mücke N., et al. Nanobody stability engineering by employing the Δtm shift; A comparison with apparent rate constants of heat-

induced aggregation // Protein Engineering, Design and Selection. – 2019. – V. 32. – № 5. – P. 241-249.

133. Laustsen A.H., Lauridsen L.P., Lomonte B., et al. Pitfalls to avoid when using phage display for snake toxins // Toxicon. – 2017. – V. 126. – P. 79-89.
134. Lecocq Q., De Vlaeminck Y., Hanssens H., et al. Theranostics in immuno-oncology using nanobody derivatives // Theranostics. – 2019. – V. 9. – № 25. – P. 7772-91.
135. Ledsgaard L., Kilstrup M., Karatt-Vellatt A., et al. Basics of Antibody Phage Display Technology // Toxins (Basel). – 2018. – V. 10. – № 6. – P. 236.
136. Li J., Zhu Z. Research and development of next generation of antibody-based therapeutics // Acta Pharmaceutica Sinica B. – 2010. – V. 31. – P. 1198-1207.
137. Li M., Ren Y., Aw Z.Q., et al. Broadly neutralizing and protective nanobodies against SARS-CoV-2 Omicron subvariants BA.1, BA.2, and BA.4/5 and diverse sarbecoviruses // Nat. Commun. – 2022. – V. 13. – № 1. – P. 7957.
138. Li T., Bourgeois J.P., Celli S., et al. Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: Application to brain imaging // FASEB J. – 2012. – V. 26. – P. 3969–3979.
139. Li T., Cai H., Yao H., et al. A synthetic nanobody targeting RBD protects hamsters from SARS-CoV-2 infection // Nat. Commun. – 2021. – V. 12. – P. 4635.
140. Li Z., Pinto Torres J.E., Goossens J., et al. An Unbiased Immunization Strategy Results in the Identification of Enolase as a Potential Marker for Nanobody-Based Detection of Trypanosoma evansi. // Vaccines. – 2020. – V. 8. – № 6. – P. 415.
141. Li Z., Wang Y., Vasylieva N., et al. An Ultrasensitive Bioluminescent Enzyme Immunoassay Based on Nanobody/Nanoluciferase Heptamer Fusion for the Detection of Tetrabromobisphenol A in Sediment. Anal. Chem. 2020, 92, 10083–10090.

142. Liu B., Yang D. Easily Established and Multifunctional Synthetic Nanobody Libraries as Research Tools // Int. J. Mol. Sci. – 2022. – V. 23. – № 3. – P. 1482.
143. Liu Q., Lu Y., Cai C., et al. A broad neutralizing nanobody against SARS-CoV-2 engineered from an approved drug // Cell Death Dis. – 2024. – V. 15. – № 6. – P. 458.
144. Liu X., Tang Z., Duan Z., et al. Nanobody-based enzyme immunoassay for ochratoxin A in cereal with high resistance to matrix interference // Talanta. 2017. – V. 164. – P. 154-158.
145. Liu Y., Huang Y., Zhu X., et al. Evolution of phage display libraries for therapeutic antibody discovery // Antibody Therapeutics. – 2023. – V. 6. – № 3. – P. 117–131.
146. Liu Y., Yi L., Li Y. et al. Characterization of heavy-chain antibody gene repertoires in Bactrian camels // Journal of Genetics and Genomics. – 2023. – V. 50. – № 1. – P. 38-45.
147. Lu C., Wu C., Ghoreishi D. et al. OPLS4: Improving force field accuracy on challenging regimes of chemical space // J. Chem. Theory Comput. – 2021. – V. 17. – № 7. – P. 4291-4300.
148. Lu Z., Liu Z., Li X., et al. Nanobody-Based Bispecific Neutralizer for Shiga Toxin-Producing E. coli // ACS Infect. Dis. – 2022. – V. 8. – № 2. – P. 321-329.
149. Ma H., Zeng W., Meng X., et al. Potent Neutralization of SARS-CoV-2 by Hetero-bivalent Alpaca Nanobodies Targeting the Spike Receptor-Binding Domain // J. Virol. – 2021. – V. 95. – № 10. – P. e02438-20.
150. Ma H, Zhang X, Zheng P, et al. Hetero-bivalent nanobodies provide broad-spectrum protection against SARS-CoV-2 variants of concern including Omicron // Cell Res. – 2022. – V. 32. – № 9. – P. 831-842.
151. Ma L., Zhu M., Li G., et al. Preclinical development of a long-acting trivalent bispecific nanobody targeting IL-5 for the treatment of eosinophilic asthma // Respir. Res. – 2022. – V. 23. – № 1. – P. 316.

152. Maeda R., Fujita J., Konishi Y., et al. A panel of nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants including Omicron // Commun. Biol. – 2022. – V. 5. – P. 669.

153. Maneewannakul K., Maneewannakul S., Ippen-Ihler K. Synthesis of F pilin // J. Bacteriol. – 1993. – V. 175. – № 5. – P. 1384-1391.

154. McInnes I.B., Coates L.C., Mease P.J., et al. Sonelokimab, an IL-17A/IL-17F-inhibiting nanobody for active psoriatic arthritis: a randomized, placebo-controlled phase 2 trial // Nature Medicine. – 2025. – V. 31. – P. 4160–4171.

155. Mei Y., Chen Y, Sivaccumar J.P., et al Research progress and applications of nanobody in human infectious diseases // Front Pharmacol. – 2022. – V. 13. – P. 963978.

156. Mejías M.P., Hiriart Y., Lauché C., et al. Development of Camelid Single Chain Antibodies Against Shiga Toxin Type 2 (Stx2) With Therapeutic Potential Against Hemolytic Uremic Syndrome (HUS) // Sci. Rep. – 2016. – V. 6. – P. 24913.

157. Merkuleva I.A., Shcherbakov D.N., Borgoyakova M.B., et al. Comparative Immunogenicity of the Recombinant receptor-binding Domain of Protein S SARS-CoV-2 Obtained in Prokaryotic and Mammalian Expression Systems // Vaccines. – 2022. – V. 10. – № 1. – P. 96.

158. Mitchell L.S., Colwell L.J. Comparative analysis of nanobody sequence and structure data // Proteins. – 2018. – V. 86. – № 7. – P. 697-706.

159. Model P., Russel M. Filamentous bacteriophage // В кн.: Calendar R. (ред.) The Bacteriophages. Vol. 2. New York: Plenum Press, – 1988. C. 375-456.

160. Modhiran N., Lauer S.M., Amarilla A.A., et al. A nanobody recognizes a unique conserved epitope and potently neutralizes SARS-CoV-2 omicron variants // iScience. 2023. – V. 26. –№ 7. – P. 107085.

161. Monegal A., Ami D., Martinelli C., et al. Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naive library // Protein Eng. Des. Sel. – 2009. – V. 22. –№ 4. – P. 273-280.

162. Morris C.D., Azadnia P., de Val N., et al. Differential Antibody Responses to Conserved HIV-1 Neutralizing Epitopes in the Context of Multivalent Scaffolds and Native-Like gp140 Trimers // mBio. – 2017. – V. 8. – № 1. – P. e00036-17.

163. Moulana A., Dupic T., Phillips A.M., et al. The landscape of antibody binding affinity in SARS-CoV-2 Omicron BA.1 evolution // eLife. – 2023. – V. 12. – P. e83442.

164. Moutel S., Bery N., Bernard V., et al. NaLi-H1: a universal synthetic library of humanized nanobodies providing highly functional antibodies and intrabodies // Elife. – 2016. – V. 5. – P. e16228.

165. Mullard A. FDA approves second BCMA-targeted CAR-T cell therapy // Nat. Rev. Drug Discov. – 2022. – V. 21. –№ 4. – P. 249.

166. Muruganandam A., Tanha J., Narang S., et al. Selection of phage-displayed llama single-domain antibodies that transmigrate across human blood-brain barrier endothelium // FASEB J. – 2002. – V. 16. –№ 2. – P. 240–242.

167. Muyldermans S. Applications of Nanobodies // Annual Review of Animal Biosciences. – 2021. – V. 9. № 21.

168. Muyldermans S.A guide to: Generation and design of nanobodies // The FEBS Journal. – 2021. – V. 288. – P. 2084-2102.

169. Muyldermans S., Atarhouch T., Saldanha J. et al. Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains // Protein Engineering, Design and Selection. – 1994. – V. 7. – № 9. – P. 1129-1135.

170. Muyldermans S., Cambillau C., Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains // Trends in Biochemical Sciences – 2001. – V. 26. – P. 230-235.

171. Muyldermans S. Nanobodies: Natural single-domain antibodies // Annual Review of Animal Biosciences. – 2013. – V. 82. – P. 775-797.

172. Nguyen V.K., Muyldermans S., Hamers R. The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline // Journal of Molecular Biology. – 1998. – V. 275. – № 3. – P. 413-418.

173. Nguyen V.K., Hamers R., Wyns L., et al. Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy–chain antibodies // Molecular Immunology. – 1999. – V. 36. – № 8. – P. 515-524.

174. Nguyen V.K., Hamers R., Wyns L., et al. Camel heavy-chain antibodies: Diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire // The EMBO Journal. – 2000. – V. 19. – № 5. – P. 921-930.

175. Nguyen V.K., Su C., Muyldermans S., et al. Heavy-chain antibodies in Camelidae; a case of evolutionary innovation // Immunogenetics. – 2002. – V. 54. – P. 39-47.

176. Odongo S., Sterckx Y.G., Stijlemans B., et al. An Anti-proteome Nanobody Library Approach Yields a Specific Immunoassay for Trypanosoma congolense Diagnosis Targeting Glycosomal Aldolase // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2016. – V. 10. – № 2. – P. e0004420.

177. Olichon A., Marco A. Preparation of a naïve library of camelid single domain antibodies // Methods Mol Biol. – 2012. – V. 911. – P. 65-78.

178. Oliveira S., van Dongen G.A.M.S., van Walsum M.S., et al. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti–epidermal growth factor receptor nanobody // Mol. Imaging. – 2012. – V. 11. – № 1. – P. 33-46.

179. Padlan E.A. Anatomy of the antibody molecule // Molecular Immunology. – 1994. – V. 31. – № 3. – P. 169-217.

180. Panagides N., Rincon M.Y., Michel S., et al. Evaluation of phage display biopanning strategies for the selection of anti-cell surface receptor antibodies // International Journal of Molecular Sciences. – 2022. – V. 23. – № 15. – P. 8470.

181. Pardon E., Laeremans T., Triest S., et al. A general protocol for the generation of Nanobodies for structural biology // Nature Protocols. – 2014. – V. 9. – № 3. – P. 674-693.

182. Park J., Lindesmith L.C., Olia A.S., et al. Broadly Neutralizing Antibodies Targeting Pandemic GII.4 Variants or Seven GII Genotypes of Human Norovirus // Sci. Transl. Med. – 2025. – V. 17. – № 788. – P. eads8214.

183. Passon M., De Smedt S., Svilenov H.L. Principles of antibodies with ultralong complementarity-determining regions and picobodies // Biotechnol Adv. – 2023. – V. 64. – P. 108120.

184. Pavan M.F., Bok M., Betanzos San Juan R., et al. SARS-CoV-2 specific nanobodies neutralize different variants of concern and reduce virus load in the brain of h-ACE2 transgenic mice // Viruses. – 2024. – V. 16. – № 2. – P. 185.

185. Perez J.M., Renisio J.G., Prompers J.J., et al. Thermal unfolding of a llama antibody fragment: A two-state reversible process // Biochemistry. – 2001. – V. 40. – № 1. – P. 74-83.

186. Pfennig A., Lomsadze A., Borodovsky M. MgCod: Gene prediction in phage genomes with multiple genetic codes // J. Mol. Biol. – 2023. – V. 435. – № 14. – P. 168159.

187. Pillay T.S., Muyldermans S. Application of single-domain antibodies (“nanobodies”) to laboratory diagnosis // Annals of Laboratory Medicine. – 2021. – V. 41. – № 6. – P. 549-558.

188. Pinto J., Odongo S., Lee F., et al. Structural basis for the high specificity of a Trypanosoma congolense immunoassay targeting glycosomal aldolase // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2017. – V. 11. – № 9. – P. e0005932.

189. Pinto Torres J.E., Goossens J., Ding, J., et al. Development of a Nanobody-based lateral flow assay to detect active Trypanosoma congolense infections // Sci. Rep. – 2018. – V. 8. – № 1. – P. 9019.

190. Pothin E., Lesuisse D., Lafaye P. Brain Delivery of Single-Domain Antibodies: A Focus on VHH and VNAR // Pharmaceutics. – 2020. – V. 12. – № 10. – P. 937.

191. Rao D., Mei K., Yan T., et al. Nanomechanical sensor for rapid and ultrasensitive detection of tumor markers in serum using nanobody // Nano Research. – 2021. – V. 15. – № 2. – P. 1003-1012.

192. Rashidian M., Wang L., Edens J.G., et al. Enzyme-Mediated Modification of Single-Domain Antibodies for Imaging Modalities with Different Characteristics // Angewandte Chemie International Edition in English. – 2016. –V. 55. – P. 528-533.

193. Riazi A., Strong P.C., Coleman R., et al. Pentavalent single-domain antibodies reduce Campylobacter jejuni motility and colonization in chickens // PLoS ONE. – 2013. – V. 8.

194. Richard G., Meyers A.J., McLean M.D., et al. In vivo neutralization of α-cobratoxin with high-affinity llama single-domain antibodies (VHHs) and a VHH-Fc antibody // PLoS ONE. – 2013. – V. 8. – № 7. – P. e69495.

195. Rossey I., Gilman M.S., Kabeche S.C., et al. Potent single-domain antibodies that arrest respiratory syncytial virus fusion protein in its prefusion state // Nat. Commun. – 2017. – V. 8. – P. 14158.

196. Rozan C., Cornillon A., Petiard C., et al. Single-domain antibody-based and linker-free bispecific antibodies targeting FcgammaRIII induce potent antitumor activity without recruiting regulatory T cells // Molecular Cancer. – 2013. – V. 12. – P. 1481-1491.

197. Sabir J.S.M, Atef A., El-Domyati F.M., et al. Construction of naïve camelids VHH repertoire in phage display-based library // C R Biol. – 2014. – V. 337. – № 4. – P. 244-249.

198. Sadeghian-Rizi T., Behdani M., Khanahmad H., et al. Generation and Characterization of a Functional Nanobody Against Inflammatory Chemokine CXCL10, as a Novel Strategy for the Treatment of Multiple Sclerosis // CNS Neurol. Disord. Drug Targets. – 2019. – V. 18. – P. 141–148

199. Saerens D., Ghassabeh G.H., Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics // Current Opinion in Pharmacology. – 2008. – V. 8. – № 5. – P. 600-608.

200. Salvador J.P., Vilaplana L., Marco M.P. Nanobody: Outstanding features for diagnostic and therapeutic applications // Analytical and Bioanalytical Chemistry. – 2019. – V. 411. – № 9. – P. 1703-1713.

201. Sarker S.A., Jäkel M., Sultana S., et al. Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: A randomized placebo-controlled trial // Gastroenterology. – 2013. – V. 145. – № 4. – P. 740–748.e8.

202. Shaprova O.N., Shanshin D.V., Kolosova E.A., et al. Pre-Pandemic Cross-Reactive Immunity against SARS-CoV-2 among Siberian Populations // Antibodies (Basel). – 2023. – V. 12. – № 4. – P. 82.

203. Siontorou C.G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy // International Journal of Nanomedicine. – 2013. – V. 8. – P. 4215-27.

204. Shang J., Ye G., Shi K., et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 // Nature. – 2020. – V. 581. – P. 221–224.

205. Shitaoka K., Higashiura A., Kawano Y., et al. Structural basis of spike RBM-specific human antibodies counteracting broad SARS-CoV-2 variants // Commun. Biol. – 2023. – V. 6. – № 1. – P. 395.

206. Sinkjaer A.W., Johansen J.N., Müller T., et al. A comparative analysis of sequence composition in different lots of a phage display peptide library during amplification // Virol. J. – 2025. – V. 22. – P. 24.

207. Soetens E., Ballegeer M., Saelens X. An Inside Job: Applications of Intracellular Single Domain Antibodies // Biomolecules. – 2020. – V. 10. – № 12. – P. 1663.

208. Soleimanizadeh A., Dinter H., Schindowski K. Central Nervous System Delivery of Antibodies and Their Single-Domain Antibodies and Variable Fragment Derivatives with Focus on Intranasal Nose to Brain Administration // Antibodies. – 2021. – V. 10. – № 4. – P. 47.

209. Solodkov P.P., Najakshin A.M., Chikaev N.A., et al. Serial Llama Immunization with Various SARS-CoV-2 RBD Variants Induces Broad Spectrum Virus-Neutralizing Nanobodies // Vaccines. – 2024. – V. 12. – №2. – P. 129.

210. Spinelli S., Desmyter A., Frenken L., et al. Domain swapping of a llama VHH domain builds a crystal-wide beta-sheet structure // FEBS Letters. – 2004. – V. 564. – № 1-2. – P. 35-40.

211. Steeland S., Vandenbroucke R.E., Libert C. Nanobodies as therapeutics: Big opportunities for small antibodies // Drug Discovery. Today. – 2016. – V. 21. – – № 7. P. 1076-1113.

212. Streltsov V., Nuttall S. Do sharks have a new antibody lineage? // Immunology letters. – 2005. – V. 97. – № 97. – P. 159-160.

213. Su Q., Shi W., Huang X., et al. Screening, Expression, and Identification of Nanobody against SARS-CoV-2 Spike Protein // Cells. – 2022. – V. 11. – № 21. – P. 3355.

214. Tarr A.W., Lafaye P., Meredith L., et al. An alpaca nanobody inhibits hepatitis C virus entry and cell-to-cell transmission // Hepatology. – 2013. – V. 58. – № 3. – P. 932-939.

215. Terryn S., Francart A., Lamoral S., et al. Protective effect of different anti-rabies virus VHH constructs against rabies disease in mice // PloS one. – 2014. – V. 9. – № 10. – P. e109367.

216. Thys B., Schotte L., Muyldermans S., et al. In vitro antiviral activity of single domain antibody fragments against poliovirus // Antivir. Res. – 2010. – V. 87. – № 2. – P. 257-264.

217. Tian Y., Parsons L.M., Jankowska E. et al. Site-Specific Glycosylation Patterns of the SARS-CoV-2 Spike Protein Derived From Recombinant Protein and Viral WA1 and D614G Strains // Front. Chem. – 2021. – V. 9. – P. 767448.

218. Tikunova N.V., Morozova V.V. Phage display on the base of filamentous bacteriophages: Application for recombinant antibodies selection // Acta Naturae. – 2009. – V. 1. – № 3. – P. 20–28.

219. Tu Z., Chen Q., Li Y., et al. Identification and characterization of species-specific nanobodies for the detection of Listeria monocytogenes in milk // Anal. Biochem. – 2016. – V. 493. – P. 1–7.

220. Tu Z., Huang X., Fu J., et al. Landscape of variable domain of heavy-chain-only antibody repertoire from alpaca // Immunology. – 2020. – V. 161. – № 1. – P. 53-65.

221. Valenzuela Nieto G, Jara R, Watterson D, et al. Potent neutralization of clinical isolates of SARS-CoV-2 D614 and G614 variants by a monomeric, sub-nanomolar affinity nanobody // Sci Rep. – 2021. – V. 11. – № 1. – P. 3318.

222. Van Audenhove I., Gettemans J., Hussack G., et al. Nanobodies as Versatile Tools to Understand, Diagnose, Visualize and Treat Cancer // EBioMedicine. – 2016. – V. 8. – P. 40-48.

223. VanBlargan L.A., Errico J.M., Halfmann P.J., et al. An infectious SARS-CoV-2 B.1.1.529 Omicron virus escapes neutralization by therapeutic monoclonal antibodies // Nat. Med. – 2022. – V. 3. – № 28. – P. 490–495.

224. Van der Linden R., de Geus B., Stok W., et al. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama // Journal of Immunological Methods. – 2000. – V. 240. – P. 185-195.

225. Van der Vaart J.M. Expression of VHH Antibody Fragments in Saccharomyces cerevisiae // Methods Mol Biol. – 2002. – V. 178 – P. 359-66.

226. Van Faassen H., Ryan S., Henry K.A., et al. Serum albumin-binding VHHs with variable pH sensitivities enable tailored half-life extension of biologics // FASEB J. – 2020. – № 6. – V. 34. – P. 8155-8171.

227. Van Faassen H., Jo D.H., Ryan S., et al. Incorporation of a Novel CD16-Specific Single-Domain Antibody into Multispecific Natural Killer Cell Engagers with Potent ADCC // Molecular Pharmaceutics. – 2021. – V. 18. – P. 2375-2384.

228. Vincke C., Loris R., Saerens D., et al. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – V. 284. – № 5. – P. 3273-3284.

229. Vu K.B., Ghahroudi M.A., Wyns L., et al. Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies // Molecular Immunology. – 1997. – V. 34. № 16–17. – P. 1121-1131.

230. Wahner-Roedler D.L., Kyle R.A. Mu-heavy chain disease: presentation as a benign monoclonal gammopathy // American Journal of Hematology. – 1992. – V. 40. – № 1. – P. 56-60.

231. Wang J., Kang G., Yuan H., et al. Research Progress and Applications of Multivalent, Multispecific and Modified Nanobodies for Disease Treatment // Front. Immunol. – 2021. – V. 12. – P. 838082.

232. Wang W., Gu G., Yin R., et al. A Nanobody-Based Immunoassay for Detection of Ustilaginoidins in Rice Samples // Toxins (Basel). – 2022. –V. 14. № 10. – P. 659.

233. Wang Y., Li X., Chen X., et al. Expression of antibody fragments in Saccharomyces cerevisiae strains evolved for enhanced protein secretion // Microbial Cell Factories. – 2021. – V. 20. – № 1. – P. 134.

234. Wang Y., Mei Y., Ao Z., et al. A broad-spectrum nanobody targeting the C-terminus of the hepatitis B surface antigen for chronic hepatitis B infection therapy // Antivir. Res. – 2022. – V. 199. – P. 105265.

235. Ward E.S., Güssow D., Griffiths A.D., et al. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli // Nature. – 1989. – V. 341. – № 6242. – P. 544-546.

236. Watanabe A., McCarthy K.R., Kuraoka M., et al. Antibodies to a Conserved Influenza Head Interface Epitope Protect by an IgG Subtype-Dependent Mechanism // Cell. – 2019. – V. 177. – № 5. – P. 1124–1135.e16.

237. Webster C.I., Caram-Salas N., Haqqani A.S., et al. Brain penetration, target engagement, and disposition of the blood-brain barrier-crossing bispecific antibody antagonist of metabotropic glutamate receptor type 1 // FASEB J. – 2016. – V. 30. – № 5. – P. 1927-1940.

238. Weiss R.A., Verrips C.T. Nanobodies that Neutralize HIV // Vaccines. – 2019. – V. 7. – № 3. – P. 77.

239. Wesolowski J., Alzogaray V., Reyelt J., et al. Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity // Medical Microbiology and Immunology. – 2009. – V. 198. – № 3. – P. 157-174.

240. Wilton E.E., Opyr M.P., Kailasam S., et al. SdAb-DB: the single domain antibody database // ACS Synthetic Biology. – 2018. – V. 7. – № 11. – P. 2480-2484.

241. Wood T.C., Pearson W.R. Evolution of protein sequences and structures // J Mol Biol. – 1999. – V. 291. – № 4. – P. 977–995.

242. Woolven B.P., Frenken L., van der Logt P., et al. The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy–chain antibody formation // Immunogenetics. – 1999. – V. 50. – № 1-2. – P. 98-101.

243. Xiang Y., Nambulli S., Xiao Z., et al. Versatile and multivalent nanobodies efficiently neutralize SARS-CoV-2 // Science. – 2020. – V. 370. – № 6523. – P. 1479-1484.

244. Xu J., Xu K., Jung S., et al. Nanobodies from camelid mice and llamas neutralize SARS-CoV-2 variants // Nature. – 2021. – V. 595. – P. 278–282.

245. Yan J., Li G., Hu Y., et al. Construction of a synthetic phage-displayed Nanobody library with CDR3 regions randomized by trinucleotide cassettes for diagnostic applications // J Transl Med. – 2014. – V. 12. – P. 343.

246. Yan J., Wang P., Zhu M., et al. Characterization and applications of Nanobodies against human procalcitonin selected from a novel naive Nanobody phage display library // J. Nanobiotechnol. – 2015. – V. 13. – P. 33.

247. Yan R., Wang R., Ju B., et al. Structural basis for bivalent binding and inhibition of SARS-CoV-2 by neutralizing antibodies // Signal Transduct. Target. Ther. – 2021. – V. 6. – № 1. – P. 195.

248. Yan R., Zhang Y., Li, Y., et al. Structural basis for the recognition of SARS-CoV-2 by full-length human ACE2 // Science. – 2020. – V. 367. – № 6485. – P. 1444-1448.

249. Yang E.Y., Shah K. Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics // Frontiers in Oncology. – 2020. – V. 10. – P. 1182.

250. Yang Y., Li F., Du L. Therapeutic nanobodies against SARS-CoV-2 and other pathogenic human coronaviruses // J. Nanobiotechnol. – 2024. – V. 22. – № 304.

251. Yu Y.J., Zhang Y., Kenrick M., et al. Boosting brain uptake of a therapeutic antibody by reducing its affinity for a transcytosis target // Sci. Transl. Med. – 2011. – V. 3. – № 84. – P. 84ra44.

252. Yu S., Li Z., Li J., et al. Generation of Dual functional Nanobody-Nanoluciferase Fusion and its potential in Bioluminescence Enzyme Immunoassay for trace Glypican-3 in Serum // Sens. Actuators. B Chem. – 2021. – V. 336. – P. 129717.

253. Zavrtanik U., Lukan J., Loris R., et al. Structural Basis of Epitope Recognition by Heavy-Chain Camelid Antibodies // J. Mol. Biol. – 2018. – V. 430. – № 21. – P. 4369-4386.

254. Zhang B., Gorman J., Kwon Y.D., et al. Bispecific antibody CAP256.J3LS targets V2-apex and CD4-binding sites with high breadth and potency //– DOI: 10.1080/19420862.2023.2165390.

255. Zhang F., Wei H., Wang X., et al. Structural basis of a novel PD-L1 nanobody for immune checkpoint blockade // Cell Discov. – 2017. – V. 3. – № 1. – P. 17004.

256. Zhang W., Lin M., Yan Q., et al. An intracellular nanobody targeting T4SS effector inhibits Ehrlichia infection. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. – 2021. – V. 118. – № 18. – P. e2024102118.

257. Zhang W.T.; Liu T.T.; Wu M., et al. Development of a nanobody-based immunoassay for the sensitive detection of fibrinogen-like protein 1. Acta Pharmacol. Sin. 2021, 42, 1921–1929.

258. Zhao Y., Wang Y., Su W., et al. Construction of Synthetic Nanobody Library in Mammalian Cells by dsDNA-Based Strategies // Chembiochem: a European journal of chemical biology. – 2021. – V. 22. – № 20. – P. 2957-2965.

259. Zhao W.H., Liu J., Wang B.Y., et al. A phase 1, open-label study of LCAR-B38M, a chimeric antigen receptor T cell therapy directed against B cell maturation antigen, in patients with relapsed or refractory multiple myeloma. // J. Hematol. Oncol. – 2018. – V. 11. – № 1. – P. 141.

260. Zhao W.H., Wang B.Y., Chen L.J., et al. Four-year follow-up of LCAR-B38M in relapsed or refractory multiple myeloma: A phase 1, single-arm, open-label, multicenter study in China (LEGEND-2). // J. Hematol. Oncol. – 2022. – V. 15. – № 1. – P 86.

261. Zhou T., Chen L., Gorman J., et al. Structural basis for llama nanobody recognition and neutralization of HIV-1 at the CD4-binding site // Structure. – 2022. – V. 30. – P. 862–875.

262. Zimmermann I., Egloff P., Hutter C.A.J., et al. Generation of synthetic nanobodies against delicate proteins // Nature Protocols. – 2020. – V. 15. – № 5. – P. 1707-1741.

Благодарности

Выражаю искреннюю благодарность своему научному руководителю, кандидату биологических наук Щербакову Дмитрию Николаевичу за ценные научные идеи, постоянное внимание к ходу работы, конструктивные обсуждения, поддержку и помощь на всех этапах подготовки диссертации. Особую признательность выражаю кандидиату биологических наук Волковой Наталье Вячеславовне за всестороннюю поддержку, помощь в освоении методик, редактировании текста и за ценные советы, оказанные в ходе выполнения исследования.

Искренне благодарю к.б.н. Ю. А. Меркульеву, к.х.н. А. А. Исаеву, В.С. Несмеянову за помощь в получении рекомбинантных белков и возможность их использования в ходе работы, а также кандидатов биологических наук С. В. Беленькую, А. В. Зыбкину, Д. В. Шаньшина за помощь в освоении методик и за практические советы в процессе выполнения экспериментов. Также выражаю благодарность В. Н. Никитину, Е. Д. Мордвиновой, С. И. Гайворонскому, А. Е. Белоусовой, Н. В. Моисеевой за моральную поддержку и готовность прийти на помощь в процессе подготовки диссертации.

Благодарю сотрудников ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, участвовавших в научных семинарах при рассмотрении диссертации, за ценные советы и рекомендации, способствовавшие улучшению данной работы, а также выражаю особую благодарность А. В. Зайковской, сотруднику отдела коллекции микроорганизмов, за помощь в проведении экспериментов с наивным вирусом.

Искренне признателен сотрудникам Института молекулярной и клеточной биологии СО РАН — А. В. Таранину, Л. В. Мечетиной, А. М. Наякшину и Н. А. Чикаеву за предоставленную фаговую библиотеку, а также А. А. Ильичеву и Л. И. Карпенко за содействие в получении данной библиотеки на начальном этапе работы. Особую благодарность хотел бы выразить д.б.н. А. А. Ильичеву за внимательный анализ текста диссертации,

конструктивные замечания и профессиональные советы, которые способствовали существенному повышению качества работы.

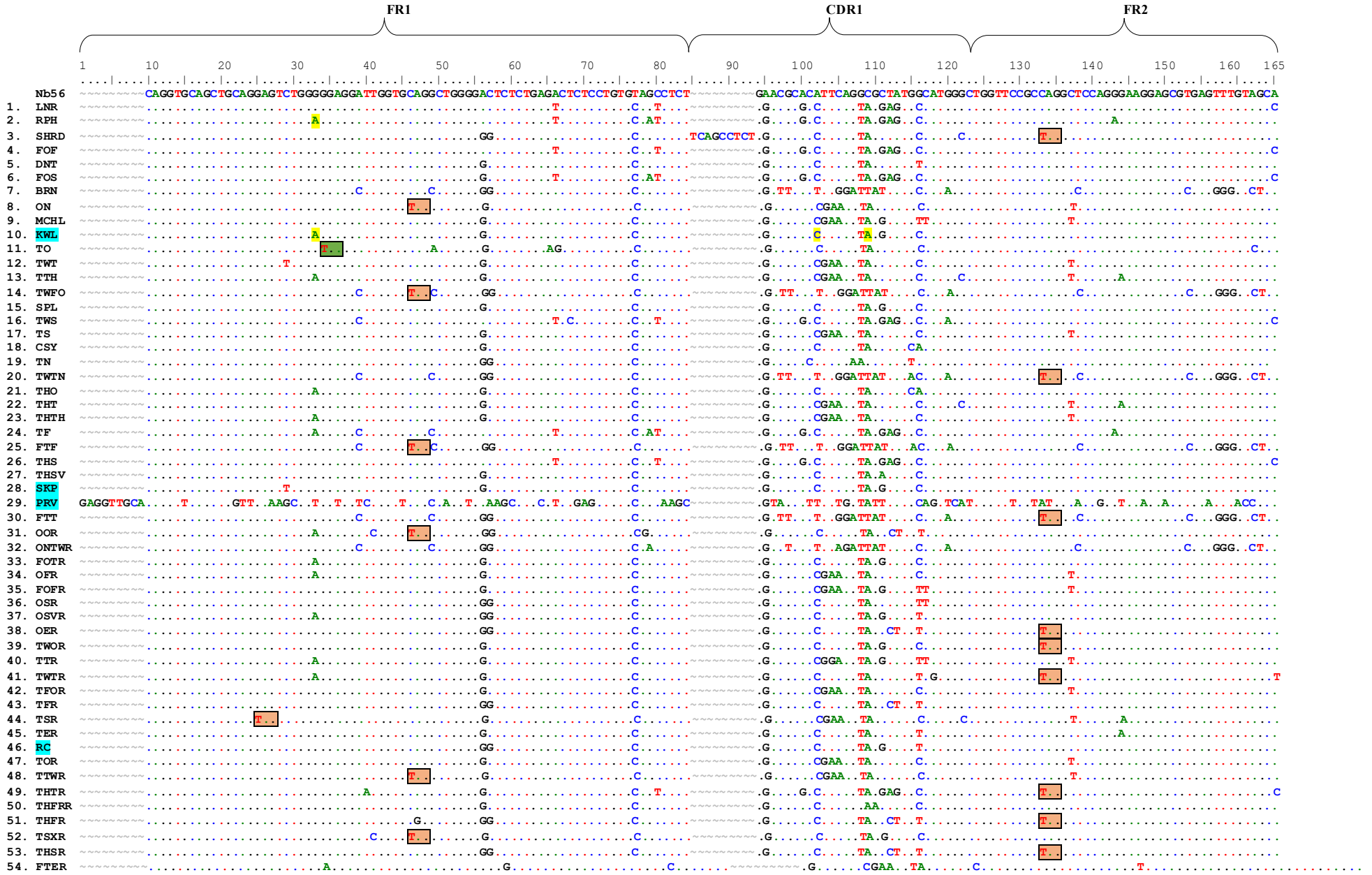
Отдельную благодарность выражаю Ариповой Озоде Салахиддиновне за предоставленную возможность использовать программное обеспечение, значительно упростившее процесс подготовки материалов диссертации.

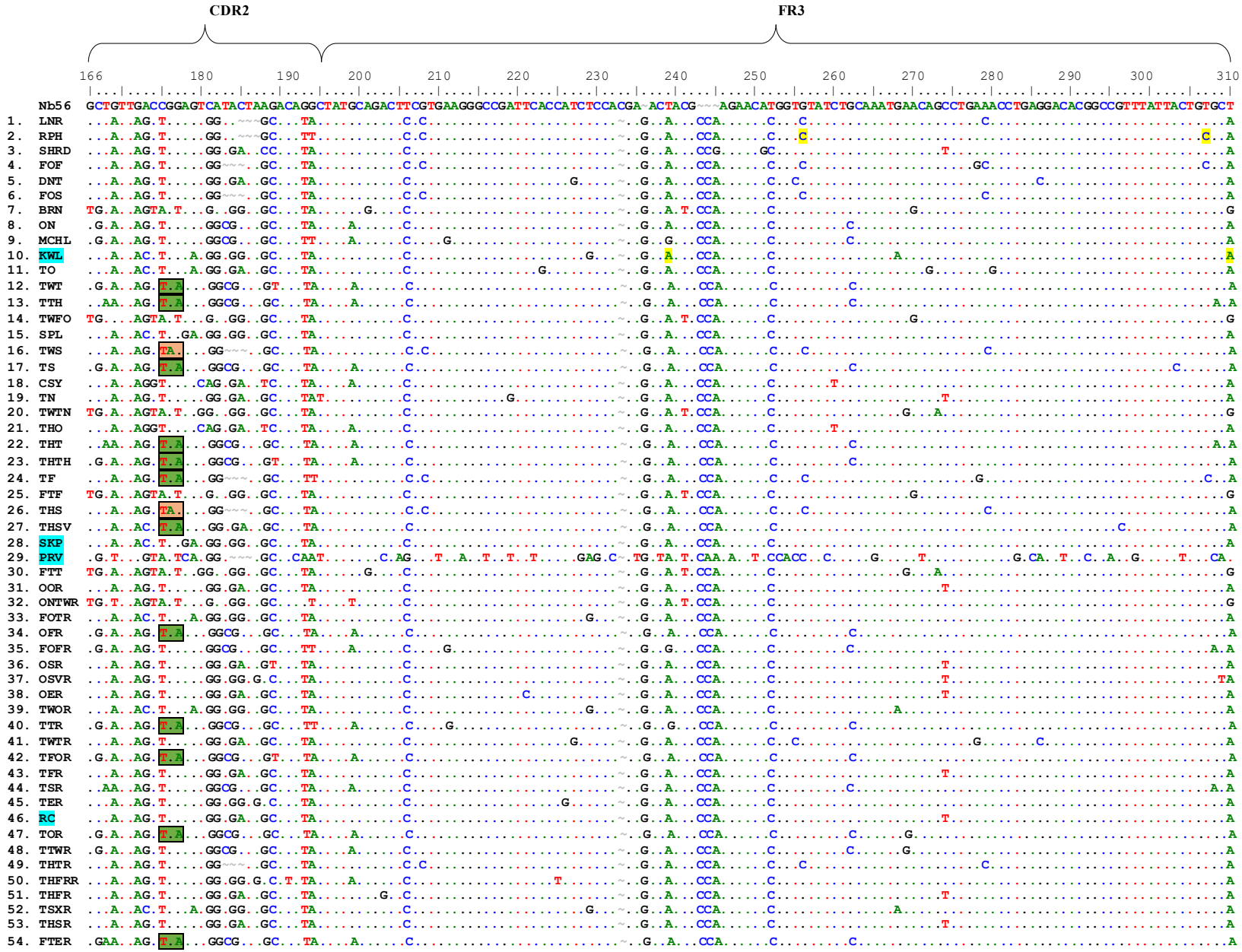
ПРИЛОЖЕНИЯ

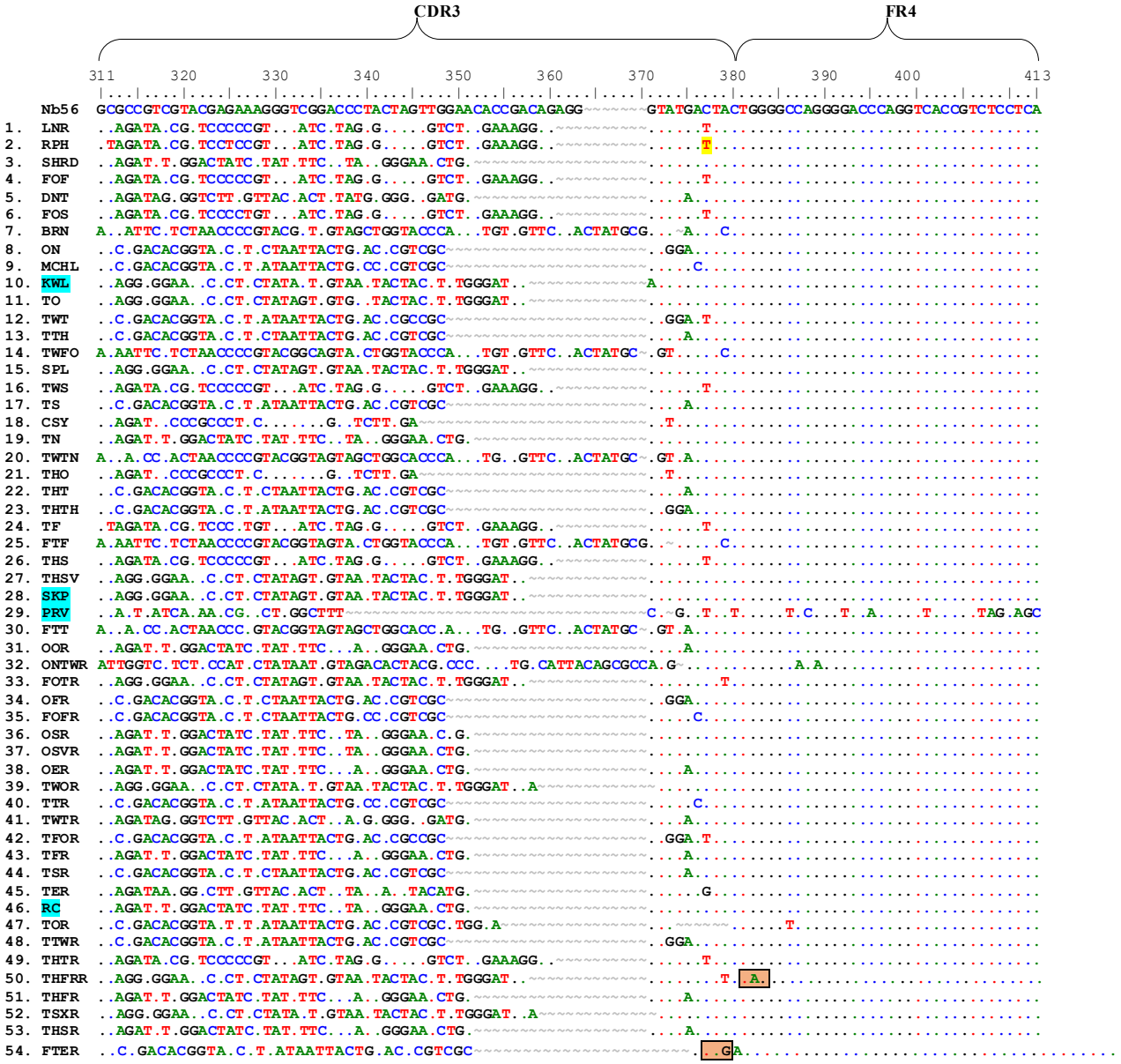
Приложение 1. Нуклеотидные последовательности отобранных однодоменных антител

В качестве референсной последовательности для выравнивания выбрано последовательность однодоменного антитела Nb56 (Xu J., et al., 2021).

Обозначения: «.» – нуклеотид, идентичный соответствующему нуклеотиду референса; «~» – в референсной последовательности указывает на вставку, в анализируемых последовательностях на делецию. В целях визуального различения каждый тип нуклеотида выделен своим цветом: A — зеленым, T — красным, G — черным, C — синим. Фигурными скобками над референсной последовательностью обозначены структурные участки однодоменных антител: FR1–FR4 (framework regions 1–4) — каркасные участки; CDR1–CDR3 (complementarity-determining regions 1–3) — комплементарно-определяющие регионы (гипервариабельные участки). В анализируемых последовательностях цветовое выделение используется для обозначения стоп-кодонов: три нуклеотида, соответствующие стоп-кодону амберного типа (TAG), выделены коричневым цветом, а стоп-кодон опалового типа (TGA) — зелёным. Жёлтым цветом в последовательностях RPH и LNR выделены синонимичные нуклеотидные замены, не приводящие к изменению аминокислотного состава. Голубым цветом в названиях выделены однодоменные антитела, синтезированные и охарактеризованные по их ингибирующей и вируснейтрализующей активности.


FR1
CDR1
FR2
1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 165
Nb56 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGGAGGATTGGTGCAGGCTGGGGACTCTCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCTCT GAACGCACATTCAGGCGCTATGGCATGGGCTGGTTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGAGCGTGAGTTTGTAGCA
1. LNR
2. RPH
3. SHRD
4. FOF
5. DNT
6. FOS
7. BRN
8. ON
9. MCHL
10. KWL
11. TO
12. TWT
13. TTH
14. TWFO
15. SPL
16. TWS
17. TS
18. CSY
19. TN
20. TWTN
21. THO
22. THT
23. THTH
24. TF
25. FTF
26. THS
27. THSV
28. SKP
29. PRV GAGGTTGCA T GTT AAGC T T TC T C A T AAGC C T GAG C AAGC GTA TT TG TATT CAG TCAT T TAT A G T A A A ACC
30. FTT
31. OOR
32. ONTWR
33. FOTR
34. OFR
35. FOFR
36. OSR
37. OSVR
38. OER
39. TWOR
40. TTR
41. TWTR
42. TFOR
43. TFR
44. TSR
45. TER
46. RC
47. TOR
48. TTWR
49. THTR
50. THFRR
51. THFR
52. TSXR
53. THSR
54. FTER


CDR2
FR3
166 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310
Nb56 GCTGTTGACCGGAGTCATACTAAGACAGGCTATGCAGACTTCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCACGA-ACTACG~~AGAACATGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAAACCTGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCT
1. LNR
2. RPH
3. SHRD
4. FOF
5. DNT
6. FOS
7. BRN
8. ON
9. MCHL
10. KWL
11. TO
12. TWT
13. TTH
14. TWFO
15. SPL
16. TWS
17. TS
18. CSY
19. TN
20. TWTN
21. THO
22. THT
23. THTH
24. TF
25. FTF
26. THS
27. THSV
28. SKP
29. PRV
30. FTT
31. OOR
32. ONTWR
33. FOTR
34. OFR
35. FOFR
36. OSR
37. OSVR
38. OER
39. TWOR
40. TTR
41. TWTR
42. TFOR
43. TFR
44. TSR
45. TER
46. RC
47. TOR
48. TTWR
49. THTR
50. THFRR
51. THFR
52. TSXR
53. THSR
54. FTER


CDR3
FR4
311 320 330 340 350 360 370 380 390 400 413
Nb56 GCGCCGTCGTACGAGAAAGGGTCGGACCCTACTAGTTGGAACACCGACAGAGG~~~~~~~GTATGACTACTGGGGCCAGGGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCA
1. LNR ..AGATA.CG.TCCCCCGT...ATC.TAG.G.....GTCT..GAAAGG..~~~~~~~~~~.....T.....
2. RPH .TAGATA.CG.TCCTCCGT...ATC.TAG.G.....GTCT..GAAAGG..~~~~~~~~~~.....T.....
3. SHRD ..AGAT.T.GGACTATC.TAT.TTC..TA..GGGAA.CTG.~~~~~~~~~~

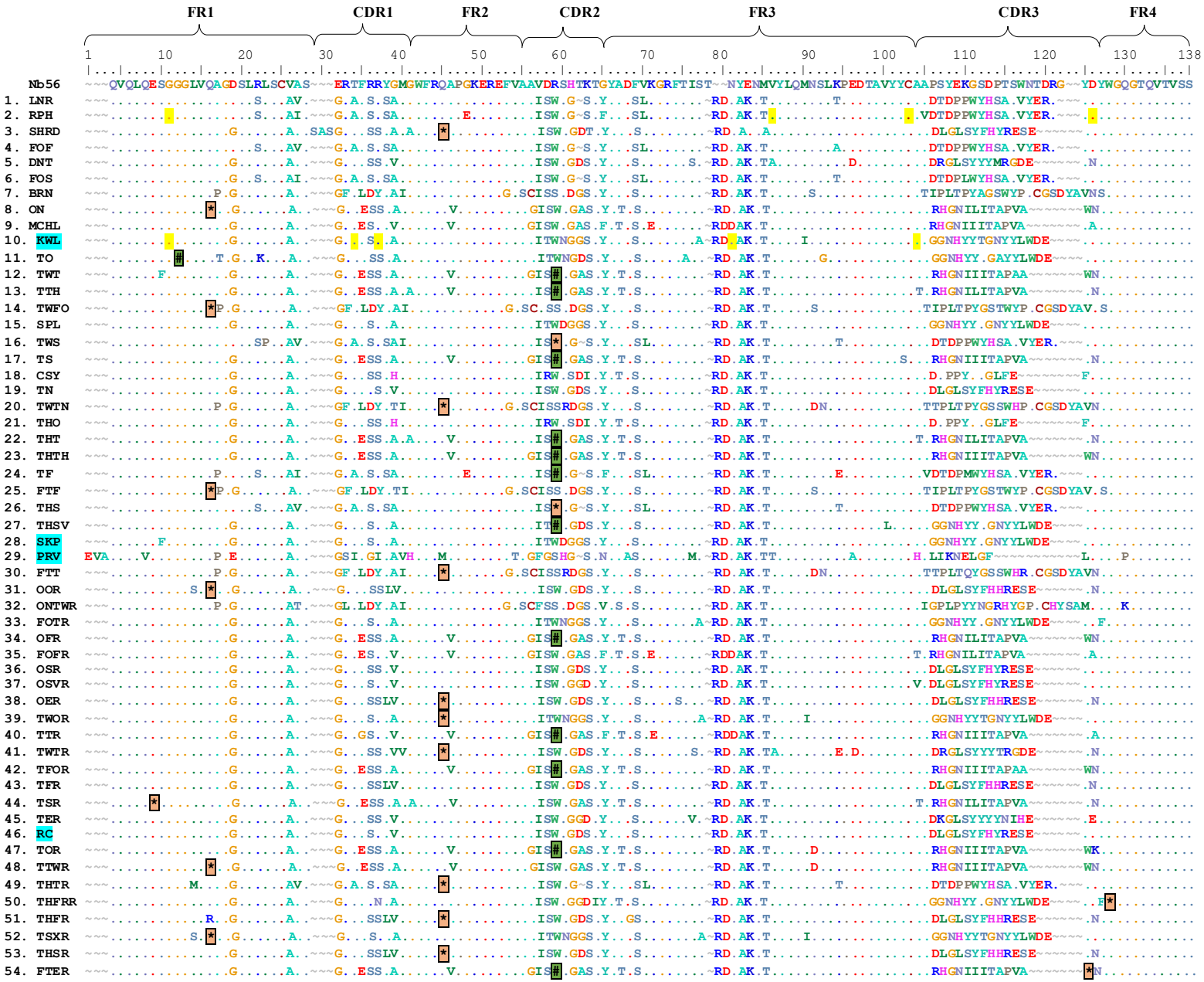
Приложение 2. Аминокислотные последовательности отобранных однодоменных антител

Аминокислотные последовательности выравнены относительно референсной последовательности однодоменного антитела Nb56 (Xu J., et al., 2021).

Обозначения: «.» – аминокислота, идентичная соответствующей аминокислоте референса; «~» – в референсной последовательности указывает на вставку, в анализируемых последовательностях на делецию. * – стоп-кодон амберного типа (UAG), # – стоп-кодон опалового типа (UGA). Стоп-кодоны дополнительно выделены цветом (стоп-кодон амберного типа выделен коричневым, стоп-кодон опалового типа зеленым). Фигурными скобками над референсной последовательностью обозначены структурные участки однодоменных антител: FR1–FR4 (framework regions 1–4) — каркасные участки; CDR1–CDR3 (complementarity-determining regions 1–3) — комплементарно-определяющие регионы (гипервариабельные участки).

Буквенные обозначения аминокислот соответствуют общепринятым однобуквенным сокращениям IUPAC:
A – Аланин, R – Аргинин, N – Аспарагин, D – Аспарагиновая кислота, C – Цистеин, E – Глутаминовая кислота, Q – Глутамин, G – Глицин, H – Гистидин, I – Изолейцин, L – Лейцин, K – Лизин, M – Метионин, F – Фенилаланин, P – Пролин, S – Серин, T – Треонин, W – Триптофан, Y – Тирозин, V – Валин, B – Аспарагин или аспарагиновая кислота, Z – Глутамин или глутаминовая кислота.

Жёлтым цветом в аминокислотных последовательностях RPH и LNR выделены аминокислотные остатки, которые не изменились в результате синонимичных нуклеотидных замен. Голубым цветом в названиях выделены однодоменные антитела, синтезированные и охарактеризованные по их ингибирующей и вируснейтрализующей активности.


FR1
CDR1
FR2
CDR2
FR3
CDR3
FR4
1 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 138
Nb56 ~~~QVQLQESGGGLVQAGDSLRLSCVAS~~~ERTFRRYGMGWFRQAPGKEREFVAAVDRSHTKTGYADFVKGRFTIST~~NYENMVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAPSYEKGSDPTSWNTDRG~~YDYWGQGTQVTVSS
1. LNR
2. RPH
3. SHRD
4. FOF
5. DNT
6. FOS
7. BRN
8. ON
9. MCHL
10. KWL
11. TO
12. TWT
13. TTH
14. TWFO
15. SPL
16. TWS
17. TS
18. CSY
19. TN
20. TWTN
21. THO
22. THT
23. THTH
24. TF
25. FTF
26. THS
27. THSV
28. SKP
29. PRV
30. FTT
31. OOR
32. ONTWR
33. FOTR
34. OFR
35. FOFR
36. OSR
37. OSVR
38. OER
39. TWOR
40. TTR
41. TWTR
42. TFOR
43. TFR
44. TSR
45. TER
46. RC
47. TOR
48. TTWR
49. THTR
50. THFRR
51. THFR
52. TSXR
53. THSR
54. FTER

Приложение 3. Результаты молекулярного моделирования и прогнозирования геометрических параметров однодоменных антител

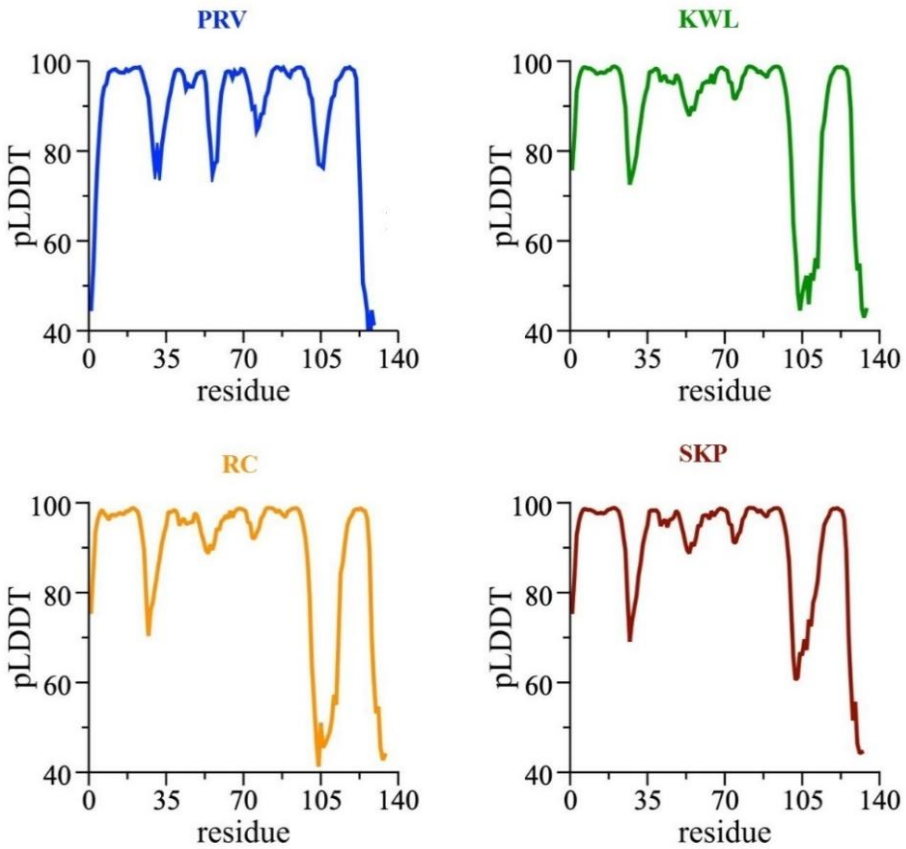


Рисунок 3.1 – Изменение значений pLDDT для моделей антител PRV, KWL, SKP и RC. pLDDT – предсказанный локальный тест различий расстояний; residue – аминокислотные остатки

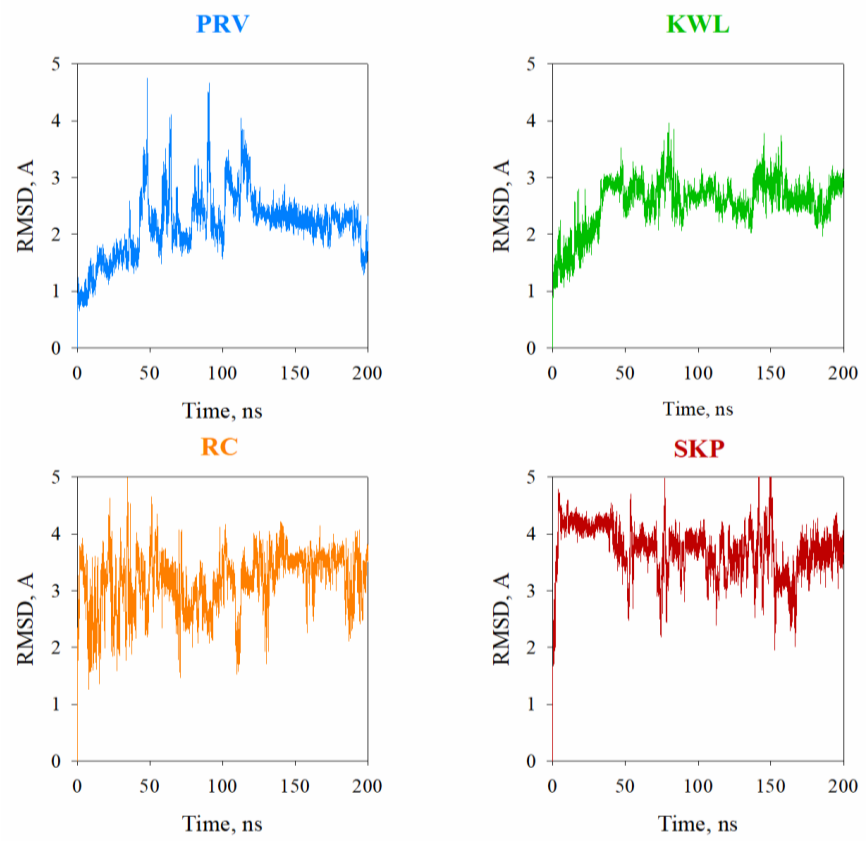


Рисунок 3.2 – Изменение значений RMSD антител в течение 200 нс МД симуляций

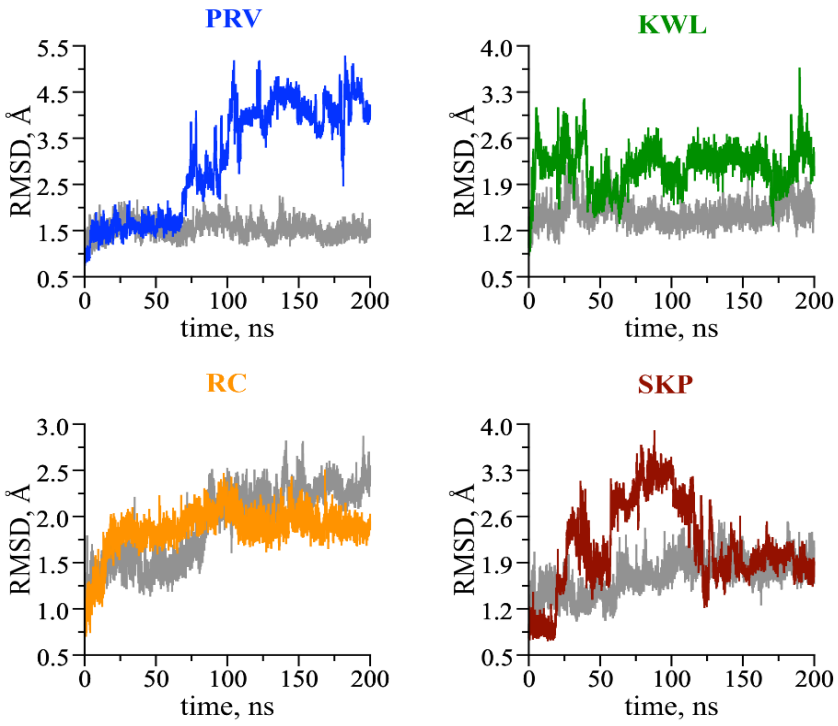


Рисунок 3.3 – Изменение RMSD атомов основной цепи комплексов наноантитело-RBD Wuhan

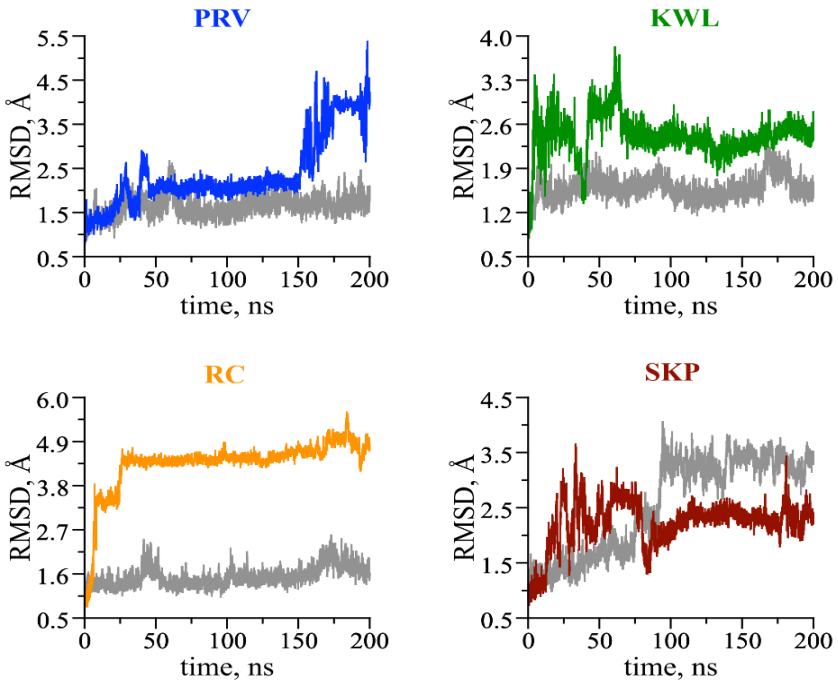


Рисунок 3.4 – Изменение RMSD атомов основной цепи комплексов наноантитело-RBD Delta

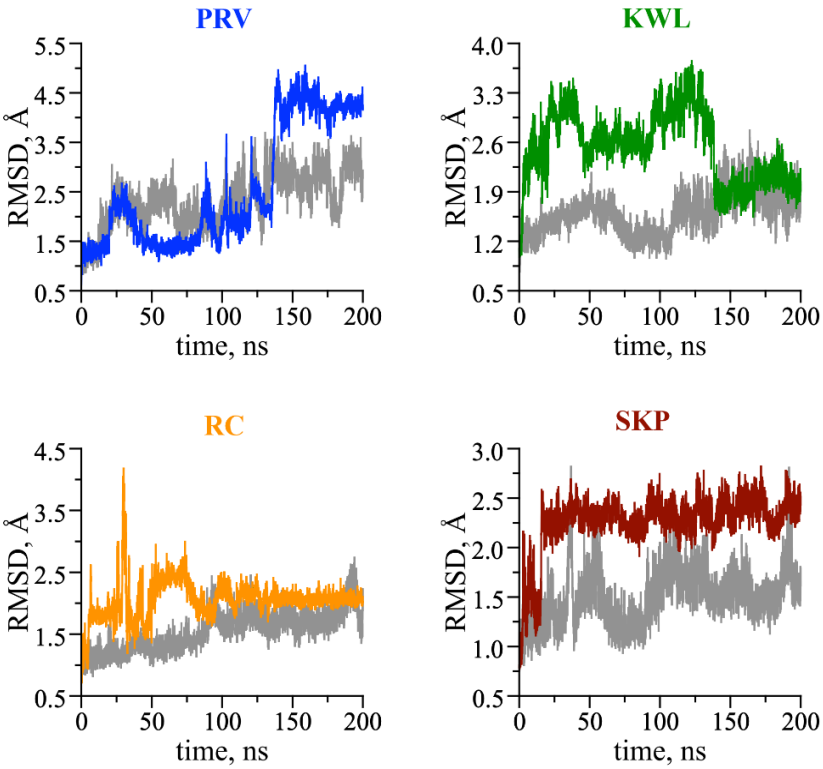


Рисунок 3.5 – Изменение RMSD атомов основной цепи комплексов наноантитело-RBD Omicron

Приложение 4. Результаты молекулярного (белок-белкового) докинга однодоменных антител PRV, KWL, SKP, RC с RBD вариантов Wuhan, Delta, Omicron

Таблица 4.1 – Результаты молекулярного (белок-белкового) докинга однодоменных антител PRV и KWL к RBD SARS-CoV-2 варианта Wuhan. Зеленым цветом выделены оптимальные докинг позиции

Комплекс PRV – RBD Wuhan						Комплекс KWL – RBD Wuhan					
№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score
1	–229,884	–109,89	**16**	–193,747	–105,477	**1**	–256,982	–320,671	**16**	–253,273	–26,051
2	–181,017	–12,54	**17**	–183,792	–111,689	**2**	–271,190	–174,106	**17**	–246,696	–277,052
3	–187,918	–44,70	**18**	–207,778	–51,144	**3**	–225,549	–314,338	**18**	–254,664	–209,550
4	–177,815	–99,52	**19**	–181,025	–18,929	**4**	–225,202	–194,279	**19**	–264,917	–102,899
5	–180,443	–21,54	**20**	–184,201	–27,799	**5**	–257,276	–213,418	**20**	–237,216	–311,105
6	–194,014	–52,70	**21**	–193,597	17,472	**6**	–242,716	–96,360	**21**	–237,832	–90,411
7	–176,577	–53,07	**22**	–196,812	–47,319	**7**	–247,856	–103,162	**22**	–246,167	–82,430
8	–188,901	–99,73	**23**	–189,365	–51,146	**8**	–245,332	–170,077	**23**	–248,607	–194,509
9	–178,468	–109,39	**24**	–177,689	33,774	**9**	–229,538	–271,519	**24**	–233,773	–213,929
10	–176,499	41,95	**25**	–215,950	–52,270	**10**	–234,642	–171,288	**25**	–230,874	–184,237
11	–210,874	–27,76	**26**	–181,521	–105,605	**11**	–225,720	–203,439	**26**	–227,334	–164,607
12	–197,657	–89,90	**27**	–180,713	–137,711	**12**	–242,669	–238,431	**27**	–236,139	–59,570
13	–184,433	–47,51	**28**	–176,983	–133,012	**13**	–247,680	–181,264	**28**	–228,125	–185,360
14	–194,932	45,53	**29**	–178,380	–42,814	**14**	–233,602	–284,089	**29**	–225,893	–158,339
15	–182,628	–115,03	**30**	–177,627	21,200	**15**	–255,068	–300,755	**30**	–235,461	–93,638

Таблица 4.2 – Результаты молекулярного (белок-белкового) докинга однодоменных антител SKP и RC к RBD SARS-CoV-2 варианта Wuhan. Зеленым цветом выделены оптимальные докинг позиции

Комплекс SKP – RBD Wuhan						**Комплекс RC – RBD Wuhan**					
№	**PIPER pose energy**	**PIPER pose score**	**№**	**PIPER pose energy**	**PIPER pose score**	**№**	**PIPER pose energy**	**PIPER pose score**	**№**	**PIPER pose energy**	**PIPER pose score**
1	–244,116	–94,160	**16**	–253,460	44,176	**1**	–282,293	–269,714	**16**	–219,918	–351,530
2	–233,419	–229,57	**17**	–240,787	–285,386	**2**	–251,522	12,494	**17**	–237,517	–176,948
3	–236,175	–153,17	**18**	–235,146	–249,445	**3**	–220,264	–315,427	**18**	–222,214	–181,476
4	–275,511	–258,85	**19**	–238,896	–148,361	**4**	–224,119	–131,245	**19**	–221,078	–249,426
5	–252,185	–212,75	**20**	–257,043	–7,954	**5**	–262,423	–119,536	**20**	–221,066	–258,546
6	–255,739	–329,15	**21**	–250,805	–264,743	**6**	–256,872	–192,034	**21**	–230,995	–183,313
7	–250,809	–297,56	**22**	–258,143	–61,650	**7**	–235,897	–208,040	**22**	–239,088	–268,477
8	–286,425	–57,63	**23**	–257,900	–251,362	**8**	–243,074	–348,682	**23**	–240,601	–178,105
9	–251,624	–140,63	**24**	–242,771	–163,296	**9**	–222,703	–212,996	**24**	–236,711	–193,465
10	–238,102	–183,28	**25**	–235,574	–172,417	**10**	–243,347	–246,143	**25**	–241,188	–54,150
11	–233,991	–120,01	**26**	–235,955	–272,983	**11**	–265,499	–241,249	**26**	–237,133	–240,632
12	–234,883	–115,43	**27**	–240,348	–265,381	**12**	–247,345	–224,404	**27**	–222,151	–320,356
13	–234,563	–163,16	**28**	–241,349	–211,432	**13**	–243,967	–412,289	**28**	–235,196	–285,775
14	–252,671	–316,94	**29**	–232,507	20,000	**14**	–262,661	–263,916	**29**	–230,983	–355,977
15	–244,895	–168,04	**30**	–238,914	–255,816	**15**	–229,709	–299,675	**30**	–229,551	–215,736

Таблица 4.3 – Результаты молекулярного (белок-белкового) докинга однодоменных антител PRV и KWL к RBD SARS-CoV-2 варианта Delta. Зеленым цветом выделены оптимальные докинг позиции

Комплекс PRV – RBD Delta						Комплекс KWL – RBD Delta					
№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score
1	–181,558	–59,389	**16**	–178,305	–124,750	**1**	–247,590	–212,789	**16**	–253,565	–144,727
2	–176,231	–59,183	**17**	–189,753	–106,582	**2**	–249,381	–203,977	**17**	–251,982	–182,399
3	–182,575	–83,344	**18**	–182,305	–66,181	**3**	–235,005	–212,049	**18**	–267,098	–153,982
4	–177,776	–169,92	**19**	–201,699	–28,285	**4**	–253,550	–131,182	**19**	–250,350	–142,015
5	–176,331	18,067	**20**	–175,315	–3,012	**5**	–251,837	–356,623	**20**	–234,899	–166,043
6	–177,186	46,034	**21**	–191,691	105,237	**6**	–234,887	–207,235	**21**	–256,229	–161,596
7	–216,161	–29,907	**22**	–176,791	79,829	**7**	–239,710	–316,064	**22**	–245,259	–197,610
8	–191,332	–67,618	**23**	–198,351	–47,990	**8**	–255,848	–282,212	**23**	–254,321	–139,175
9	–184,414	–14,388	**24**	–175,851	13,064	**9**	–233,705	–117,089	**24**	–239,791	–291,003
10	–175,633	–80,310	**25**	–189,975	–134,828	**10**	–239,570	–89,620	**25**	–239,976	–315,848
11	–175,701	–30,294	**26**	–192,699	–82,296	**11**	–234,520	–218,802	**26**	–233,393	–100,480
12	–198,354	–13,587	**27**	–189,350	–47,413	**12**	–247,605	–91,290	**27**	–234,223	–223,748
13	–183,794	7,685	**28**	–189,828	76,959	**13**	–237,184	–139,115	**28**	–237,535	–119,812
14	–191,060	–28,865	**29**	–175,424	–73,433	**14**	–236,062	–184,659	**29**	–242,757	–143,316
15	–197,387	4,125	**30**	–177,553	–7,684	**15**	–235,468	–135,009	**30**	–236,608	–232,362

Таблица 4.4 – Результаты молекулярного (белок-белкового) докинга однодоменных антител SKP и RC к RBD SARS-CoV-2 варианта Delta. Зеленым цветом выделены оптимальные докинг позиции

Комплекс SKP – RBD Delta						Комплекс RC – RBD Delta					
№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score
1	–238,034	–245,15	**16**	–239,710	–184,960	**1**	–240,033	–174,544	**16**	–231,090	–275,319
2	–242,576	–187,54	**17**	–257,248	–297,185	**2**	–264,780	–52,077	**17**	–223,024	–140,895
3	–284,859	–284,94	**18**	–251,663	–153,258	**3**	–227,653	–234,195	**18**	–246,577	–271,299
4	–277,558	–264,79	**19**	–257,602	–332,061	**4**	–223,585	–291,730	**19**	–223,406	–303,799
5	–244,661	–128,91	**20**	–290,515	–139,904	**5**	–231,885	–276,749	**20**	–236,681	–248,909
6	–270,362	–123,15	**21**	–235,065	–177,099	**6**	–244,491	–329,648	**21**	–250,762	–308,922
7	–256,429	–187,69	**22**	–241,318	–255,871	**7**	–222,948	–245,625	**22**	–249,130	–265,613
8	–247,280	–30,292	**23**	–262,851	–205,516	**8**	–226,717	–235,810	**23**	–222,053	–231,363
9	–244,166	–38,620	**24**	–234,501	–244,747	**9**	–247,286	–259,598	**24**	–228,252	–140,239
10	–298,998	–68,704	**25**	–244,284	–81,937	**10**	–224,276	–315,506	**25**	–225,722	–284,637
11	–253,753	–267,50	**26**	–246,542	–157,895	**11**	–234,203	–222,355	**26**	–219,493	–207,319
12	–235,030	–92,577	**27**	–273,247	–242,902	**12**	–224,429	–202,324	**27**	–218,298	–253,299
13	–234,345	–95,672	**28**	–246,101	–145,734	**13**	–220,346	–210,577	**28**	–221,922	–185,361
14	–252,374	–83,492	**29**	–245,632	–93,336	**14**	–221,233	–95,720	**29**	–225,202	–256,724
15	–243,067	–246,81	**30**	–236,162	–81,339	**15**	–237,195	–290,003	**30**	–228,047	–116,110

Таблица 4.5 – Результаты молекулярного (белок-белкового) докинга однодоменных антител PRV и KWL к RBD SARS-CoV-2 варианта Omicron. Зеленым цветом выделены оптимальные докинг позиции

Комплекс PRV – RBD Omicron						Комплекс KWL – RBD Omicron					
№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score
1	–187,990	–121,44	**16**	–174,988	–40,365	**1**	–246,031	–185,632	**16**	–237,311	–105,554
2	–185,019	–80,012	**17**	–177,355	–25,487	**2**	–262,594	–181,089	**17**	–268,121	–212,361
3	–188,879	–28,813	**18**	–184,436	–116,461	**3**	–234,343	–223,673	**18**	–238,782	–173,026
4	–195,937	–93,444	**19**	–198,292	–85,225	**4**	–238,565	–222,930	**19**	–233,824	–133,731
5	–201,453	–1,132	**20**	–178,623	15,969	**5**	–235,022	–194,563	**20**	–240,716	–234,570
6	–184,991	20,344	**21**	–174,417	33,016	**6**	–254,946	–294,272	**21**	–250,876	–209,840
7	–174,127	–42,739	**22**	–182,137	–76,870	**7**	–265,537	–348,900	**22**	–264,338	–318,470
8	–178,776	–32,465	**23**	–175,043	96,351	**8**	–238,285	–217,087	**23**	–242,679	–72,754
9	–187,278	–54,625	**24**	–181,323	–43,953	**9**	–230,050	–219,127	**24**	–250,443	–32,719
10	–182,189	30,720	**25**	–188,331	–98,848	**10**	–248,783	–194,216	**25**	–241,542	–189,072
11	–188,903	–89,781	**26**	–174,446	–68,291	**11**	–265,662	–183,655	**26**	–251,287	–167,089
12	–187,630	0,004	**27**	–176,291	–61,932	**12**	–255,378	–143,318	**27**	–239,006	–125,299
13	–189,826	–63,808	**28**	–176,392	96,067	**13**	–232,538	–160,166	**28**	–253,614	–198,956
14	–181,097	–37,726	**29**	–174,417	–10,499	**14**	–233,718	–241,470	**29**	–253,578	–169,203
15	–186,546	–29,494	**30**	–174,338	13,333	**15**	–234,014	–110,889	**30**	–235,241	–207,114

Таблица 4.6 – Результаты молекулярного (белок-белкового) докинга антител SKP и RC к RBD SARS-CoV-2 варианта Omicron. Зеленым цветом выделены оптимальные докинг позиции

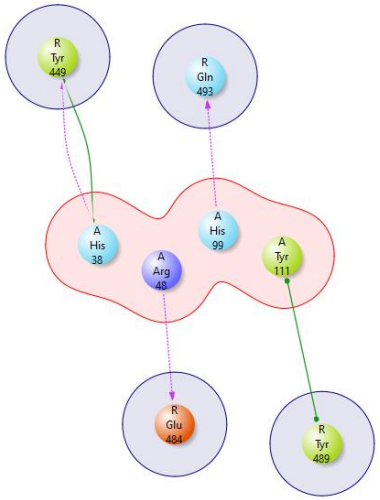
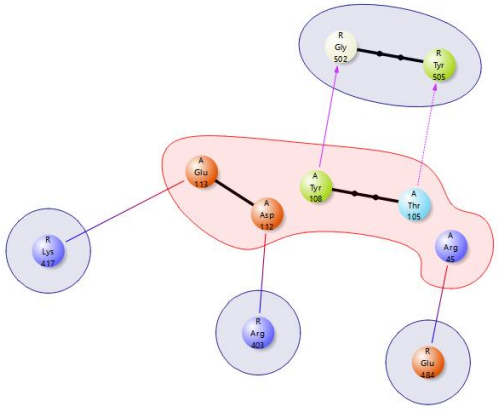
Комплекс SKP – RBD Omicron						Комплекс RC – RBD Omicron					
№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score	№	PIPER pose energy	PIPER pose score
1	–281,144	–321,07	**16**	–272,220	–159,729	**1**	–291,383	–317,218	**16**	–260,085	–309,153
2	–281,075	–218,27	**17**	–278,215	–197,693	**2**	–229,777	–324,709	**17**	–233,090	–262,599
3	–257,643	–188,30	**18**	–267,876	–118,941	**3**	–233,948	–270,825	**18**	–242,841	–218,038
4	–246,513	–170,31	**19**	–289,993	–177,601	**4**	–243,192	–179,744	**19**	–226,666	–239,744
5	–270,859	–283,47	**20**	–257,042	–81,740	**5**	–270,857	–186,975	**20**	–244,401	–88,511
6	–252,489	–217,92	**21**	–253,452	–69,467	**6**	–279,368	–249,264	**21**	–230,361	–167,071
7	–269,457	–232,43	**22**	–275,097	–97,993	**7**	–230,410	–245,851	**22**	–226,100	–309,609
8	–239,038	58,80	**23**	–259,405	–171,615	**8**	–238,726	–103,484	**23**	–251,018	–121,564
9	–268,465	–160,32	**24**	–261,824	–232,781	**9**	–240,516	–308,046	**24**	–229,121	–263,172
10	–268,668	–199,77	**25**	–248,635	–237,685	**10**	–259,683	–218,898	**25**	–248,315	–146,745
11	–244,519	–69,23	**26**	–246,318	–239,586	**11**	–253,185	–242,072	**26**	–246,548	–205,098
12	–236,879	71,60	**27**	–246,555	–39,916	**12**	–228,152	–156,795	**27**	–239,214	–249,995
13	–260,559	–211,66	**28**	–268,048	–117,967	**13**	–225,974	–299,014	**28**	–227,957	–101,281
14	–238,030	–291,11	**29**	–240,018	–113,498	**14**	–235,549	–29,084	**29**	–234,655	–202,137
15	–257,319	–87,94	**30**	–244,190	–151,879	**15**	–234,568	–275,392	**30**	–225,407	–215,762

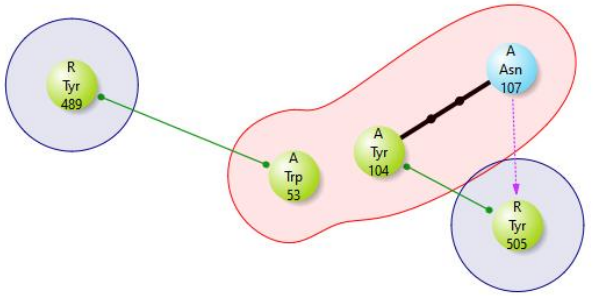
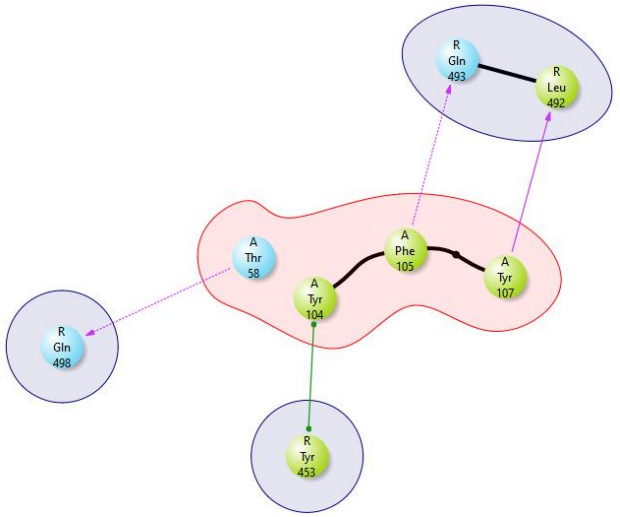
Таблица 4.7 – Анализ докинг-позиций KWL-RBD Delta

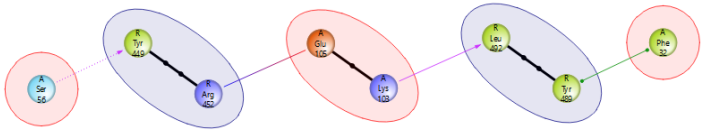
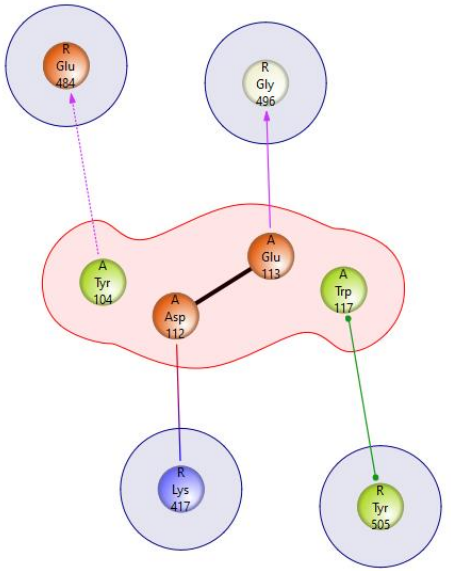
Зеленым цветом выделены оптимальные докинг позиции.

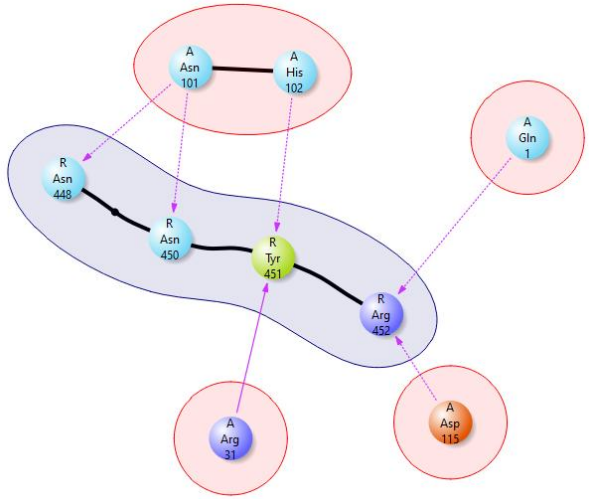
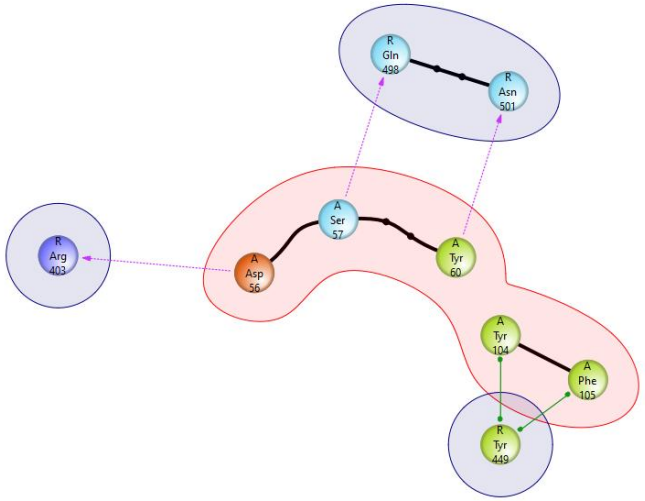
Номер докинг-позиции	**RMSD**	**Контактные а.о.**		**Количество межмолекулярных взаимодействий**				**PIPER energy**	**PIPER score**
		антитело	**антиген**	**Водородные связи**	**Солевые мостики**	**π-π стекинг**	**Ван-дер-ваальсовые (clash) взаимодействия**		
3	1,802	18	24	4	2	0	146	–235,005	–212,049
4	1,801	18	27	4	2	4	126	–253,550	–131,182
5	1,801	16	23	2	2	2	222	–251,837	–356,623
9	1,802	16	25	2	0	2	130	–233,705	–117,089
20	1,803	16	35	4	0	0	144	–234,899	–166,043
28	1,802	19	26	2	0	0	150	–237,535	–119,812
30	1,802	11	19	2	0	2	108	–236,608	–232,362

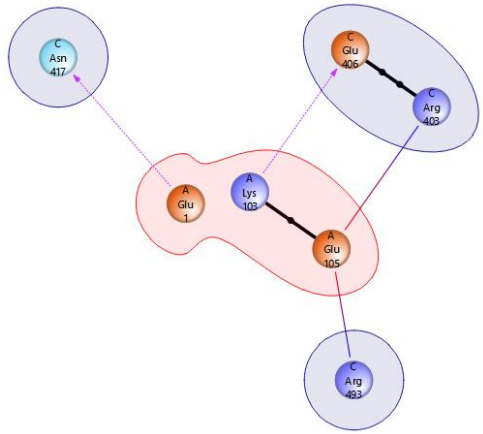
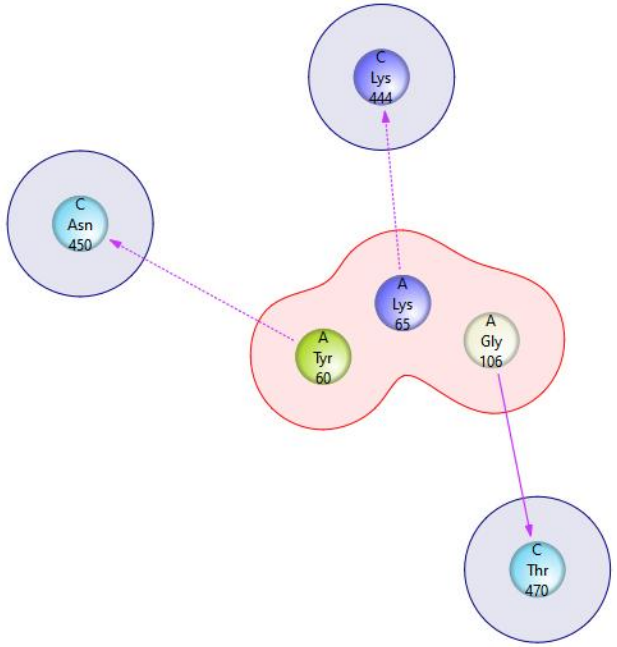
Приложение 5. Результаты молекулярного моделирования и прогнозирования геометрических параметров однодоменных антител

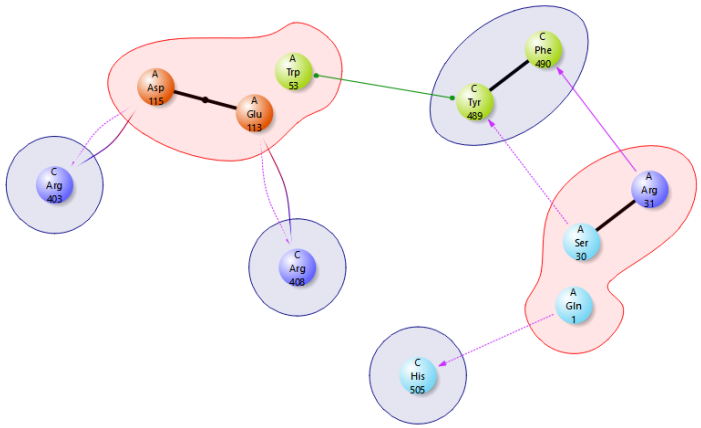
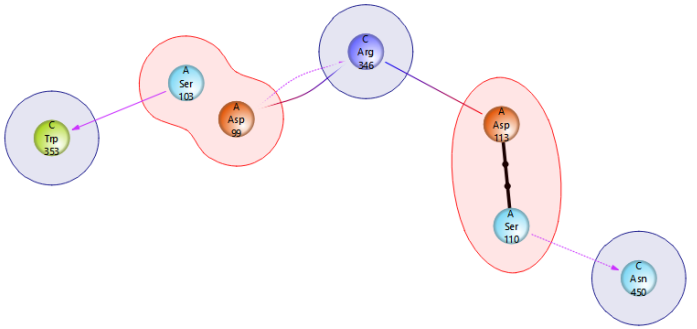
Комплекс	Позиция	PIPER pose energy	Контактные а.о.		Тип взаимодействия	
			Антиген Цепь A	Антитело Цепь R		
PRV – RBD Wuhan	18	–207,778	H99 R48 H38	Q493 E484 Y449	Водородная связь	
			Y111 H38	Y489 Y449	π-π стекинг	
KWL – RBD Wuhan	7	–247,856	Y108 T105	G502 Y505	Водородная связь	
			E113 D112 R45	K417 R403 E484	Солевой мостик	

Комплекс	**Позиция**	**PIPER pose energy**	**Контактные а.о.**		**Тип взаимодействия**	
			Антиген Цепь A	**Антитело Цепь R**		
SKP – RBD Wuhan	20	–257,043	N107	Y505	Водородная связь	
			Y104 W53	Y505 Y489	π-π стекинг	
RC – RBD Wuhan	11	–265,499	Y107 F105 T58	L492 Q493 Q498	Водородная связь	
			Y104	Y453	π-π стекинг	

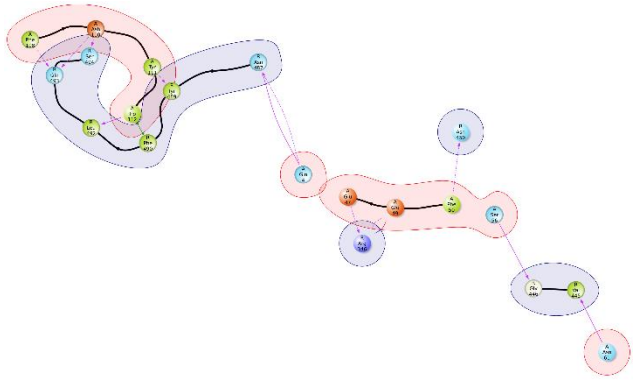
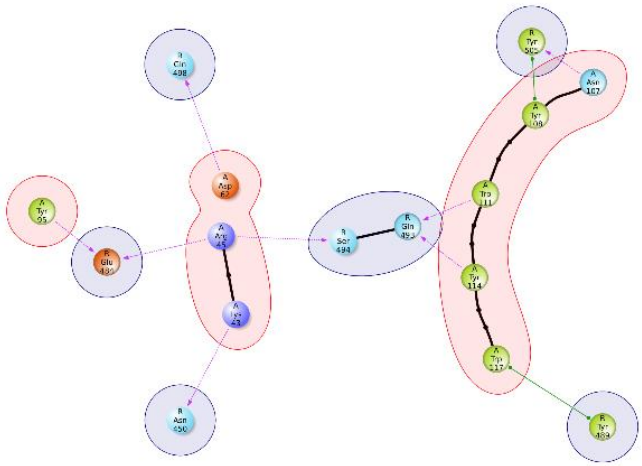
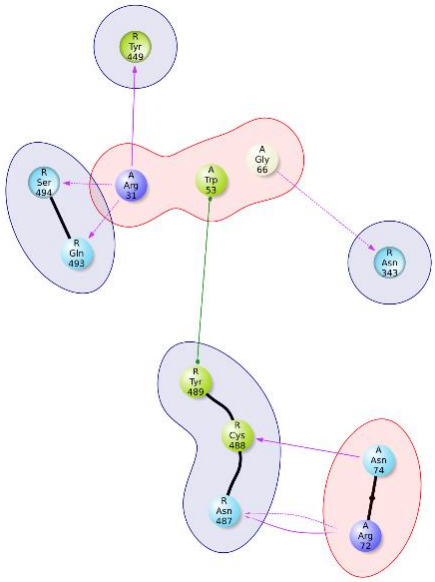
Комплекс	Позиция	PIPER pose energy	Контактные а.о.		Тип взаимодействия	
			Антиген Цепь A	Антитело Цепь R		
PRV – RBD Delta	8	–191,332	K103 S56 F32	L492 Y449 Y489	Водородная связь	
			E105	R452	π-π стекинг	
KWL – RBD Delta	4	–253,550	E113 Y104	G496 E484	Водородная связь	
			W117	Y505	π-π стекинг	
			D112	K417	Солевой мостик	

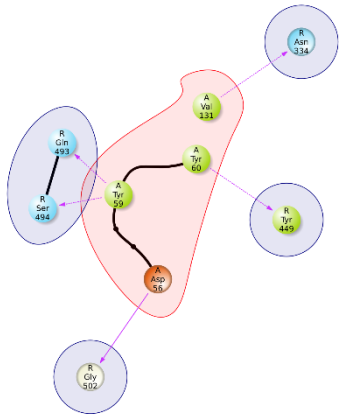
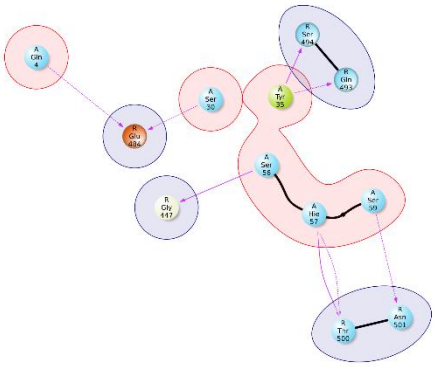
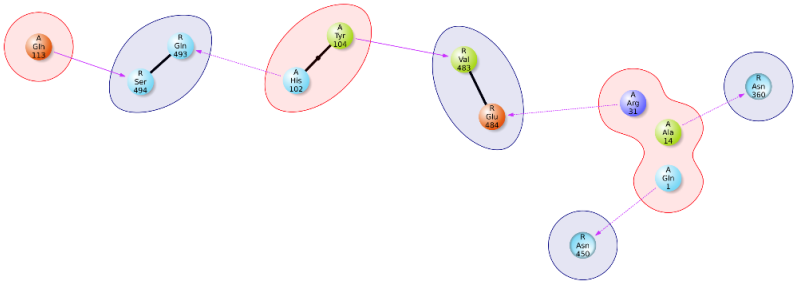
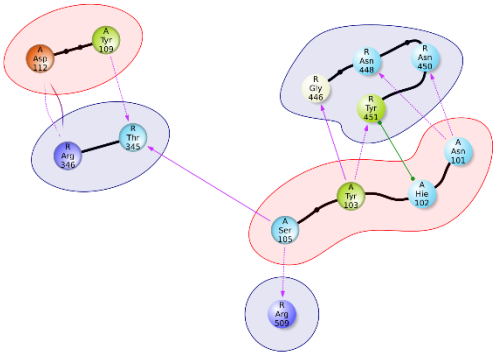
Комплекс	Позиция	PIPER pose energy	Контактные а.о.		Тип взаимодействия	
			Антиген Цепь A	Антитело Цепь R		
SKP – RBD Delta	30	–236,162	D115 H102 N101 N101 R31 Q1	R452 Y451 N450 N448 Y451 R452	Водородная связь	
RC – RBD Delta	24	–228,252	Y60 S57 D56	N501 Q498 R403	Водородная связь	
			F105 Y104	Y449 Y449	π-π стекинг	

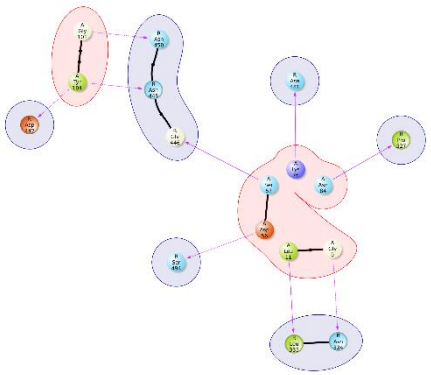
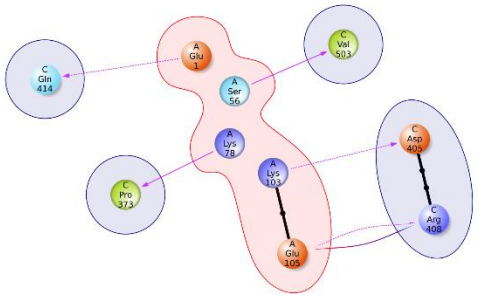
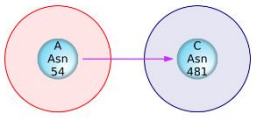
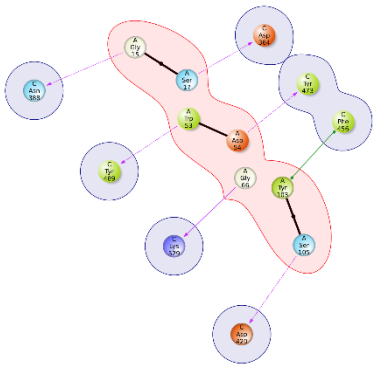
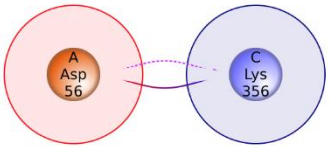
Комплекс	Позиция	PIPER pose energy	Контактные а.о.		Тип взаимодействия	
			Антиген Цепь A	Антитело Цепь R		
PRV – RBD Omicron	24	–181,323	K103 E1	E406 N417	Водородная связь	
			E105 E105	R403 R493	Солевой мостик	
KWL – RBD Omicron	28	–253,614	G106 K65 Y60	T470 K444 N450	Водородная связь	

Комплекс	Позиция	PIPER pose energy	Контактные а.о.		Тип взаимодействия	
			Антиген Цепь A	Антитело Цепь R		
SKP – RBD Omicron	23	–259,405	D115 E113 R31 S30	R403 R408 F490 Y489	Водородная связь	
			W53	Y489	π-π стекинг	
RC – RBD Omicron	21	–230,361	S110 S103 D99	N450 W353 R346	Водородная связь	
			D113	R346	Солевой мостик	

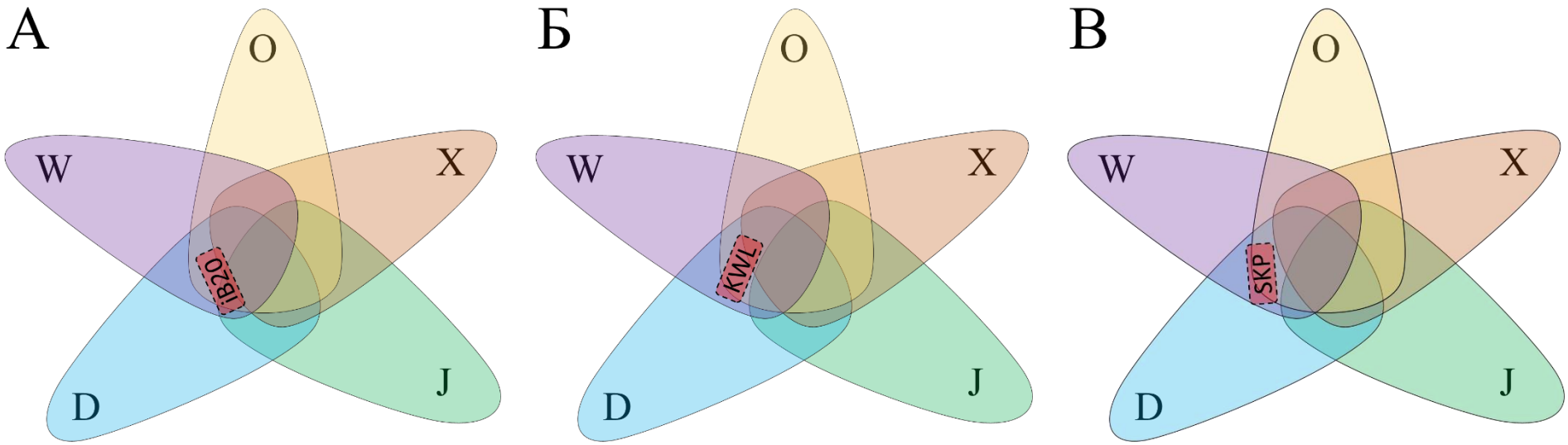
Приложение 6. Анализ межмолекулярных взаимодейсвий аминокислотных остатков антител с RBD

Комплекс	Диаграмма	ΔG_{bind}
PRV-RBD Wuhan		–164,35
KWL-RBD Wuhan		–128,61
SKP-RBD Wuhan		–109,57

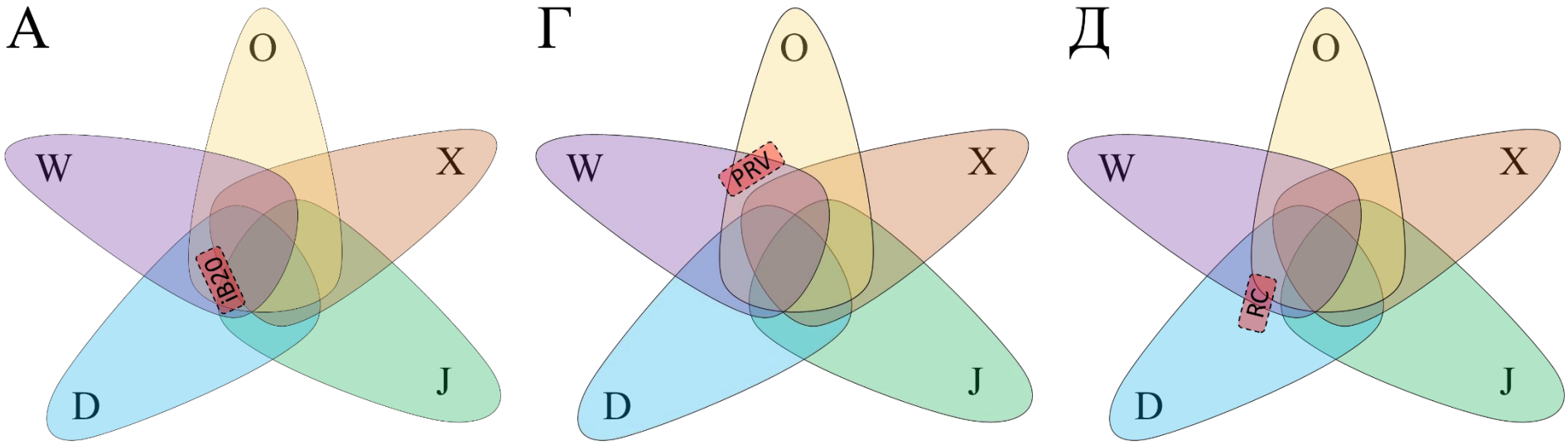
Комплекс	Диаграмма	ΔG_{bind}
RC-RBD Wuhan		–94,72
PRV-RBD Delta		–94,83
KWL-RBD Delta		–116,50
SKP-RBD Delta		–85,28

Комплекс	Диаграмма	ΔG_{bind}
RC-RBD Delta		–27,71
PRV-RBD Omicron		–44,56
KWL-RBD Omicron		–72,88
SKP-RBD Omicron		–73,42
RC-RBD Omicron		–64,95

Приложение 7. Области эпитопного распознования для пространства взаимодействия RBM S белка SARS-CoV-2 вариантов Wuhan, Delta, Omicron, XBB1.5, JN.1 с антителами



Панель А — область гипотетического эпитопного распознавания антитела iB20; Б — однодоменное антитело KWL имеет схожие эпитопы распознования; В — область гипотетического эпитопного распознавания однодоменного антитела SKP. Обозначения во всех панельях: W – Wuhan, D – Delta, O – Omicron, X – XBB, J – JN.1.



Панель А — область гипотетического эпитопного распознавания антитела iB20; Г — область гипотетического эпитопного распознавания однодоменного антитела PRV; Д — область гипотетического эпитопного распознавания однодоменного антитела RC. Обозначения во всех панельях: W – Wuhan, D – Delta, O – Omicron, X – XBB, J – JN.1.