

УДК 612.017.1616-097

# Получение нейтрализующих наноантител к стеблевому домену гемагглютинаина вируса гриппа типа А

Д. В. Воронина\*, Д. В. Щепляков, И. Б. Есмагамбетов, А. А. Деркаев, О. Попова,  
Д. Н. Щербинин

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098 Россия

\*E-mail: daryavoronin2009@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.06.2021

Принята к печати 05.08.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11495

**РЕФЕРАТ** Вирус гриппа ежегодно уносит порядка 650 000 жизней. В условиях прогрессирующей резистентности к противовирусным препаратам и сниженной эффективности вакцинации среди определенных групп населения возникает необходимость в новых подходах к терапии гриппозной инфекции. Представленная работа посвящена получению однодоменных антител (наноантител) к высококонсервативному стержневому домену гемагглютинаина вируса гриппа типа А при помощи технологии фагового дисплея. В результате были отобраны два высокоаффинных клона наноантител, показавшие 100% нейтрализующую активность *in vivo* при заражении мышей летальными дозами вируса гриппа штаммов H1N1 и H5N2. Полученные данные указывают на возможность создания высокоэффективных препаратов на основе однодоменных антител для терапии гриппозной инфекции.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** наноантитела, VHN, фаговый дисплей, вирус гриппа.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** HA – гемагглютинин; CD – стеблевой (стержневой) домен HA; HcAb – тяжелоцепочечные антитела представителей семейства Camelidae; VHN – вариабельный домен HcAb; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ИФА – иммуноферментный анализ; EC<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация; SPR – поверхностный плазмонный резонанс; LD<sub>50</sub> – полуметальная доза; mAb – моноклональные антитела.

## ВВЕДЕНИЕ

Грипп остается серьезной проблемой мирового здравоохранения, несмотря на доступность ежегодно обновляющихся вакцин и разработанные этиопатогенетические подходы к терапии этого инфекционного заболевания. Основным способом контроля гриппозной инфекции на сегодняшний день остается вакцинация. Специфическую профилактику дополняют противовирусные препараты, действующие как на сезонные, так и на пандемические штаммы вируса гриппа. Однако, принимая во внимание возрастающую лекарственную резистентность, сниженную эффективность вакцинации у определенных групп населения и короткое терапевтическое окно имеющихся противовирусных лекарственных средств, остро встает необходимость в препаратах нового типа для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Эффективной стратегией в терапии гриппозной инфекции может быть получение антител, спе-

цифичных к высококонсервативным участкам вирусных белков. Гемагглютинин (HA) – один из главных белков оболочки вируса гриппа, находится на поверхности вириона в виде тримера, мономеры которого состоят из двух субъединиц: HA1 и HA2. Пространственно в HA выделяют апикальный глобулярный домен, включающий центральную часть субъединицы HA1, и дистальный стеблевой (стержневой) домен (CD), который сформирован субъединицей HA2, а также N- и C-концевыми участками субъединицы HA1 [1]. Подавляющее большинство антител в организме направлено на высокоиммуногенный участок вокруг рецепторсвязывающего сайта, расположенного в глобулярном домене, обеспечивая тем самым нейтрализацию вируса и оказывая одновременно с этим иммуноселективный прессинг, приводящий к возникновению эскейп-мутантов [2]. Такие антитела почти всегда штаммо- или подтип-специфичны. CD, напротив, менее иммуногенен, однако антитела к нему зачастую распознают несколько

подтипов НА за счет высококонсервативной последовательности [2]. Таким образом, разработка антител к СД считается перспективным направлением в создании новых противовирусных препаратов.

Известные на данный момент мАт к СД обладают различным спектром реактивности: от связывания с подтипами НА внутри одной филогенетической группы [3–10] до распознавания НА среди обеих групп [11–21] и даже перекрестной активности между НА типа А и В [22]. Большинство этих антител узнают консервативные конформационные эпитопы в СД. Наряду с каноническими антителами, получены и однодоменные антитела (наноантитела, VHH) к СД [23, 24]. Все описанные наноантитела обладают перекрестной реактивностью и нейтрализуют вирусы внутри одной филогенетической группы НА или в результате создания мультиспецифичных конструкций приобретают способность нейтрализовать вирусы гриппа как типа А, так и типа В.

VHH – это вариабельный домен «тяжелоцепочечных» иммуноглобулинов, HcAb, обнаруженных у представителей семейства Camelidae [25]. Несмотря на свой небольшой размер (12–15 кДа), VHH не уступают в аффинности и специфичности каноническим антителам. Благодаря уникальной стабильности в широком диапазоне температур, в присутствии различных детергентов, а также устойчивости к протеолитическому расщеплению, однодоменные антитела можно доставлять в организм перорально или ингаляционно [26, 27]. Наноантитела нашли применение в терапии онкологических, гематологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний, некоторые препараты проходят клинические испытания или одобрены к применению в европейских странах и США [28, 29].

В данной работе получен стабилизированный тример СД для сохранения конформационных эпитопов нейтрализующих антител, с помощью технологии фагового дисплея отобраны вируснейтрализующие VHH, специфичные к СД. Выбраны два высокоаффинных клона, показавших 100% нейтрализующую активность *in vivo* в модели летальной инфекции на вирусах гриппа H1N1 и H5N2. Таким образом, установлена возможность получения высокоэффективных препаратов на основе VHH для терапии гриппозной инфекции.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Биоматериалы

В работе использованы высокоочищенные препараты рекомбинантных белков: полноразмерные НА вируса гриппа типа А H3N2 (A/

Switzerland/9715293/2013) (Sino Biological, Китай), H1N1 (A/California/04/2009) (Sino Biological). Эндонуклеазы рестрикции, Т4-ДНК-лигаза и щелочная фосфатаза (FastAP) получены от фирм NEB (США) и Thermo Fisher Scientific (США). Для иммунизации альпака использовали гриппозную трехвалентную инактивированную полимер-субъединичную вакцину Гриппол® плюс («НПО ПЕТРОВАКС ФАРМ», Россия).

### Получение СД НА

Нуклеотидную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности СД вируса гриппа штамма H1N1 (A/Brisbane/59/2007) (НА stem) #4900, приведенной в работе Impagliazzo А. и соавт. [30], синтезировали в ЗАО «Евроген» (Россия), клонировали в плазмиду pShuttle-CMV (Stratagene, США) и получали плазмиду pShuttle-CMV-NAstem. Далее культуру клеток CHO-S (Thermo Fisher Scientific) транзистентно трансфицировали плазмидой pShuttle-CMV-NAstem с использованием системы CHO Gro (Mirus Bio, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки культивировали в колбах Эрленмейера (125 об/мин, 5% CO<sub>2</sub>, 80% влажности, 37°C), спустя 24 ч температуру снижали до 32°C и продолжали культивировать в течение 10 дней. Начиная с 3-го дня добавляли подпитки Cell boosts 7a (2%), 7b (0.2%) (HyClone, США) и 0.5% CHO Bioreactor Feed (Sigma, США) 1 раз в день. По истечении 10 дней культуральную жидкость осветляли центрифугированием при 5000 g. СД НА очищали аффинной хроматографией на системе АКТА start (Cytiva Швеция), используя колонки HisTrap 1 мл (Cytiva) в соответствии с протоколом производителя. Дополнительную очистку и замену буфера на 20 мМ фосфат натрия, 150 мМ натрия хлорид проводили на колонке XK 26/100 (Cytiva), упакованной сорбентом Superdex 200 pg (Cytiva).

### Иммунизация животного

Альпака (*Vicugna pacos*) иммунизировали 5 раз с интервалом 14 дней между первой и второй инъекцией и 10 дней между последующими. При проведении первичной иммунизации животному подкожно вводили препарат, состоящий из вакцины Гриппол® плюс (100 мкг) и полного адъюванта Фрейнда (Sigma), смешиваемых в соотношении 1 : 1 до получения гомогенной суспензии. В последующие четыре инъекции вводили Гриппол® плюс в сочетании с неполным адъювантом Фрейнда (Sigma). До иммунизации и через 7 дней после пятой инъекции у животного отбирали небольшое количество крови (5–10 мл) в качестве контроля для опреде-

ления концентрации специфичных антител. Спустя неделю после последней инъекции 50 мл венозной крови отбирали в стерильный контейнер с антикоагулянтом литий-гепарин. Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови получали по стандартному протоколу путем центрифугирования с раствором фиколла плотностью 1.077 («ПанЭко», Россия).

#### Получение фаговой библиотеки, селекция индивидуальных клонов

Выделение мРНК, ПЦР-амплификацию целевых фрагментов ДНК и конструирование библиотеки проводили по стандартным протоколам [31, 32]. Вариабельные домены тяжелоцепочечных иммуноглобулинов из В-лимфоцитов периферической крови иммунизированного альпака клонировали в фагмидный вектор pHEN1. Используемые в двухстадийной ПЦР специфические праймеры содержали сайты рестрикции SfiI и NotI на 5'- и 3'-конце соответственно. Амплифицированные последовательности VHH клонировали по указанным сайтам рестрикции с помощью эндонуклеаз SfiI, NotI и ДНК-лигазы фага T4. Полученными рекомбинантными плазмидными ДНК методом электропорации трансформировали электрокомпетентные клетки *Escherichia coli* штамм TG1. В результате получили базовую библиотеку наноантител, сложность которой составила  $3 \times 10^6$  индивидуальных клонов.

Фаги, несущие специфичные к СД наноантитела, отобраны с помощью трех раундов селекции (паннинга). В качестве антигена использовали СД HA H1N1 (A/Brisbane/59/2007) в количестве 5 мкг в первом раунде и 1 мкг в двух последующих. Из индивидуальных клонов, отобранных в процессе селекции, выделяли плазмидную ДНК и секвенировали последовательности фрагментов VHH.

#### Экспрессия и очистка наноантител

Для экспрессии кандидатных наноантител рекомбинантную фагмидную ДНК, выделенную из отобранных индивидуальных клонов клеток TG1, трансформировали в *E. coli* штамм BL21. Бактериальные клетки наращивали в течение ночи в жидкой среде при 30°C, осаждали центрифугированием и лизировали BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, США) согласно протоколу производителя. Наноантитела очищали на кобальтовой смоле TALON Superflow (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) с последующим переводом элюированной фракции в фосфатно-солевой буфер. Наличие экспрессии и ее уровень оценивали с использованием электрофореза в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

#### Электрофорез белков

Электрофорез белков проводили в 12% полиакриламидном геле (Bio-Rad, США) в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли. При электрофорезе в денатурирующих невосстанавливающих условиях образцы смешивали с буфером для нанесения проб без 2-меркаптоэтанола и, не нагревая, вносили в лунки геля. В качестве стандарта молекулярных масс использовали Precision Plus Protein™ (Bio-Rad).

#### Имуноферментный анализ

Для измерения антител в сыворотке крови альпака образцы сыворотки добавляли в лунки планшета с иммобилизованными в стандартном 0.05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9.6) рекомбинантными HA или СД (1 мкг/мл), затем обрабатывали поликлональными антителами козы к IgG ламы, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (Bethyl Laboratories, США). Обогащение библиотек оценивали с использованием меченных пероксидазой хрена антител к фагу M13 (Sino Biological). При проведении непрямого анализа с наноантителами использовали вторичные поликлональные HRP-антитела к эпитопу с-мус (Abcam, Великобритания). В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали раствор тетраметилбензидина (ТМБ) (Bio-Rad). Оптическую плотность измеряли на длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific).

#### Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

Аффинность и кинетику взаимодействия наноантител и антигена (СД HA) определяли на четырехканальном оптическом биосенсоре Biacore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Рекомбинантный белок СД (20 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере pH 4.5) ковалентно иммобилизовали на поверхности оптического чипа CM5 с помощью набора Amine Coupling Kit (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Уровень иммобилизации лиганда в рабочем канале оптического биосенсора составил 1800 RU.

Кинетические параметры анализировали путем инъекции пятикратных разведений образцов наноантител в диапазоне концентраций от 267 до 0 нМ через контрольный (без иммобилизованного лиганда) и рабочий каналы в течение 3 мин с постоянной скоростью потока 15 мкл/мин. В качестве рабочего буфера использовали HBS-EP (0.01 М HEPES pH 7.4, 0.15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0.005% Surfactant P20). Время диссоциации после нанесения образцов составляло 10 мин. После каждого измерения проводили регенерацию поверхности чипа с помощью инъекции буфера, содержащего 100 мМ Трис-HCl pH 1.3, в течение 30 с при скорости потока

30 мкл/мин. Все измерения проводили при температуре 25°C не менее 2 раз.

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

### Оценка нейтрализующей способности VHN *in vivo*

Исследования выполняли на 6-недельных самках мышей линии BALB/c массой 18–20 г. Для заражения животных использовали вирусы гриппа A/Duck/mallard/Moscow/4970/2018 (H1N1) и A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), адаптированные к мышам, любезно предоставленные Лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ.

Животных разделяли на группы (опытные и контрольные) по пять особей в каждой и заражали интраназально смесью антител (200 мкг) и вируса (15 LD<sub>50</sub>), предварительно инкубированной в течение 1 ч при 37°C, в объеме 50 мкл/мышь (в случае опытных групп) или вирусом в дозе 15 LD<sub>50</sub> в ФСБ (контрольные группы). За мышами наблюдали в течение 14 дней после инфицирования, ежедневно осматривали и взвешивали. Агонизирующих или потерявших более 25% от изначальной массы животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации. Нейтрализующее действие наноантител оценивали по выживаемости мышей и динамике изменения массы тела.

### Статистический анализ

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программ Microsoft Excel и GraphPad Prism 7.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Стабилизированный тример СД НА

Мы использовали аминокислотную последовательность стабилизированного тримеризующегося СД НА штамма H1N1 (A/Brisbane/59/2007), опубликованную Impagliazzo A. и соавт. [30]. Для повышения уровня экспрессии СД НА последовательность сигнального пептида НА заменили последовательностью сигнального пептида щелочной фосфатазы SEAP. СД НА нарабатывали в клеточной линии CHO-S, способной обеспечивать высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка [33]. Препарат СД оптимальной чистоты получали, используя две стадии очистки: аффинную хроматографию и гель-фильтрацию. Тримеризацию СД подтверж-

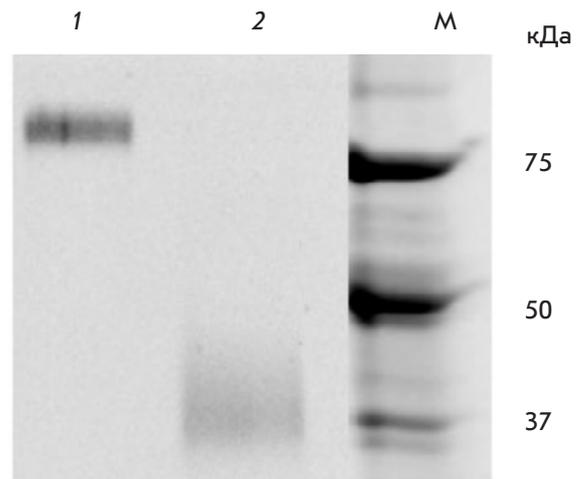


Рис. 1. Электрофоретический анализ СД в 12% полиакриламидном геле. 1 – неденатурирующие невосстанавливающие условия; 2 – денатурирующие восстанавливающие условия

дали методом электрофореза в восстанавливающих денатурирующих (для визуализации мономерной структуры, молекулярная масса 37 кДа) и невосстанавливающих неденатурирующих условиях (для визуализации тримеризованной конструкции, молекулярная масса около 110 кДа) (рис. 1).

### Получение наноантител, специфичных к СД НА

Панель наноантител к СД НА получали путем иммунизации альпака *V. pacos* по схеме, представленной на рис. 2А. На 7-й день после последней инъекции у животного отбирали 50 мл крови, отделяли мононуклеарную фракцию, из которой выделяли суммарную РНК для приготовления иммунной библиотеки, а также отбирали сыворотку для оценки индукции гуморального иммунного ответа. Уровень сывороточных антител альпака был определен как для СД НА, так и для рекомбинантных НА (рис. 2Б). Титр антител к СД НА составил 1 : 12500. Выявлен высокий титр антител к НА H1 (A/California/04/2009) и H3 (A/Switzerland/9715293/2013): 1 : 204800 и 1 : 409600 соответственно. Эти результаты свидетельствуют о формировании выраженного гуморального ответа после пяти циклов иммунизации альпака гриппозной вакциной как к полноразмерным НА, так и непосредственно к СД.

Конструирование библиотеки наноантител и последующую селекцию методом фагового дисплея проводили как описано ранее [34]. Размер библиотеки составил  $3 \times 10^6$  индивидуальных клонов. Все 30 колоний, случайным образом выбранных и проанализированных в ПЦР на наличие гена фрагмен-



Параметры кинетики взаимодействия VHH и СД, определенные методом SPR

Клон	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	$R_{max}$ (RU)	$K_a$ (1/M)	$K_d$ (M)	Chi <sup>2</sup>
2F2	$3.95 \times 10^5$	$6.17 \times 10^{-3}$	51.7	$6.38 \times 10^7$	$1.57 \times 10^{-8}$	1.53
H1.2	$9.87 \times 10^5$	$3.6 \times 10^{-4}$	139	$2.74 \times 10^9$	$3.65 \times 10^{-10}$	1.59
G2.3	$3.68 \times 10^5$	$2.04 \times 10^{-4}$	154	$1.8 \times 10^9$	$5.54 \times 10^{-10}$	1.39

граммном обеспечении BIAEvaluation. Полученные результаты приведены в *таблице*.

**Нейтрализация в экспериментах *in vivo***

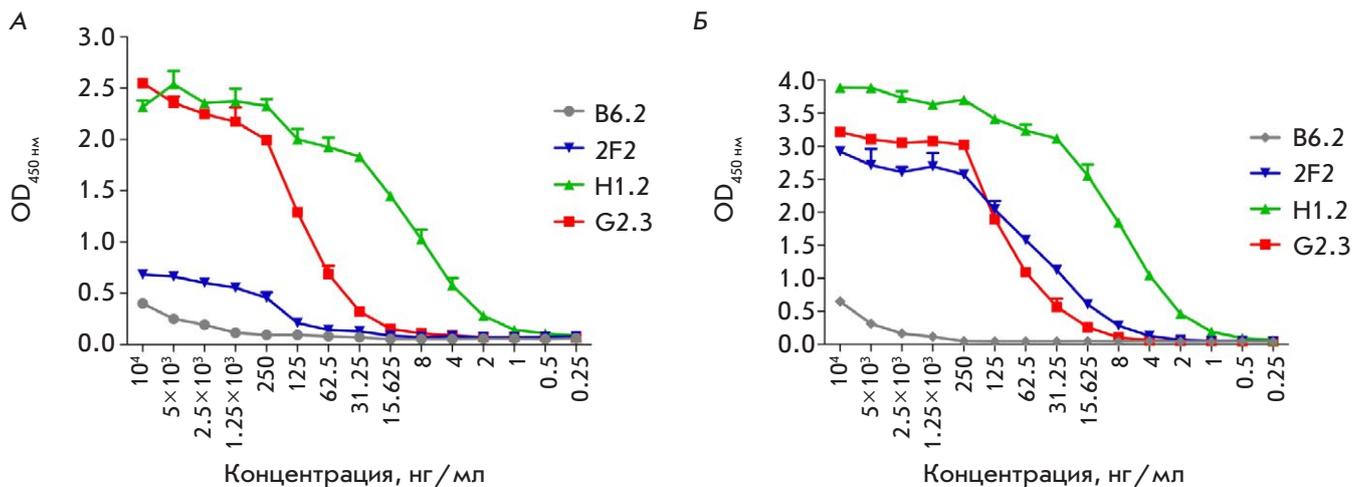
Нейтрализующие свойства наноантител исследовали на адаптированном к мышам вирусе гриппа H1N1 (A/Duck/mallard/Moscow/4970/2018). С этой целью мышей интраназально заражали высокими летальными дозами ( $15 LD_{50}$ ) указанного вирулентного штамма вируса гриппа H1N1, предварительно инкубированного с VHH H1.2 или G2.3. Выживаемость животных в опытных группах составила 100% при 100% гибели мышей контрольной группы (*рис. 5А*), что говорит об эффективной нейтрализации вируса H1N1 обоими наноантителами. Нейтрализующие свойства антител *in vivo* дополнительно подтверждаются незначительным снижением массы тела мышей и быстрым ее восстановлением в опытных группах по сравнению с контрольной (*рис. 5Б*).

Исследование *in vivo* нейтрализации вируса гриппа штамма H5N2 (A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84) проводили аналогично нейтрализации с вирусом H1N1. Полученные данные свидетельствуют о 100% нейтрализующей активности наноантител в отношении вируса H5N2 (*рис. 6*).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Преимущества наноантител перед каноническими мАт делают их привлекательной платформой для разработки терапевтических средств, в том числе противовирусных. Благодаря уникальной структуре варибельного домена, VHH могут взаимодействовать с труднодоступными эпитопами, характерными для поверхности вирусов [35, 36]. Меньший размер футпринта (отпечатка) VHH по сравнению с каноническими мАт, которые связываются с более крупными и плоскими эпитопами, может задать более высокий генетический барьер для возникновения эскейп-мутаций. Кроме того, высокая стабильность и растворимость наноантител крайне важны при создании эффективной лекарственной формы для доставки непосредственно в очаг инфекции – легкие.

Большинство мАт, способных нейтрализовать вирусы гриппа разных подтипов, узнают консервативные конформационные эпитопы в СД НА, однако при природной инфекции или иммунизации полноразмерным НА они труднодоступны, вследствие экспонирования преимущественно варибельных эпитопов глобулярного домена НА. Таким образом, необходимо получить СД в оптимальной стабилизированной конформации с сохранением эпитопов



**Рис. 4.** Результаты титрования отобранных клонов VHH в ИФА на СД НА (А) и на полноразмерном НА вируса гриппа H1N1 (A/California/04/2009) (Б)

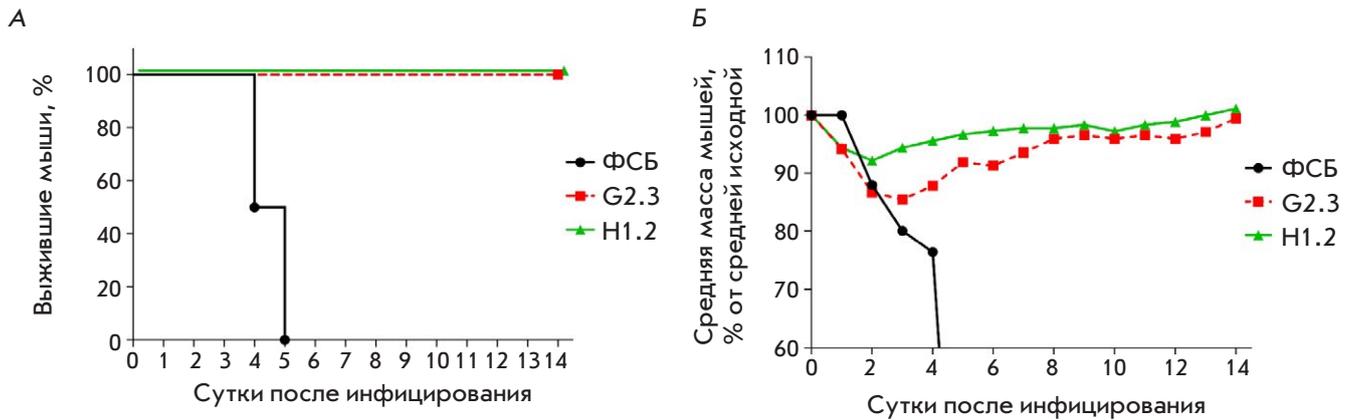


Рис. 5. Динамика выживаемости (А) и массы тела (Б) мышей после интраназального заражения Н1Н1 (А/Duck/mallard/Moscow/4970/2018) в дозе 15 LD<sub>50</sub>, смешанного с VHH. Различия между выживаемостью в опытных и контрольной группах статистически значимы ( $p < 0.0005$ )

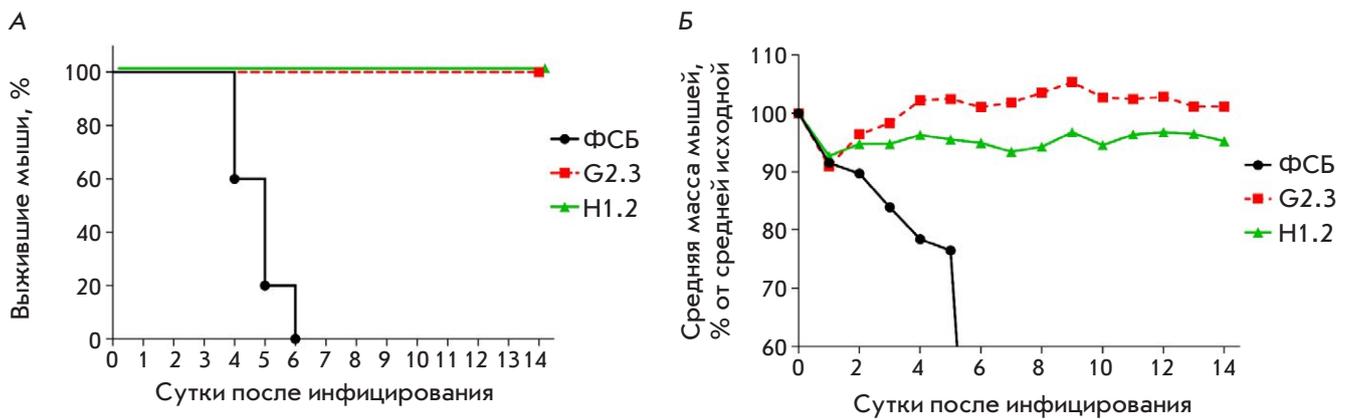


Рис. 6. Динамика выживаемости (А) и массы тела (Б) мышей после интраназального заражения Н5Н2 (А/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84) в дозе 15 LD<sub>50</sub>, смешанного с VHH. Различия между выживаемостью в опытных и контрольной группах статистически значимы ( $p < 0.0002$ )

нейтрализующих мАт. В работе Impagliazzo A. и соавт. [30] сделано несколько вариантов стабилизированного тримера СД НА, из которых #4900 способен индуцировать выработку антител и обеспечивать защиту мышей против различных подтипов вируса гриппа А. На основании последовательности СД #4900 нами получен препарат, тримеризованная структура которого подтверждена с помощью электрофореза, использованный для селекции высокоаффинных антител, способных защищать мышей от инфекции, вызываемой различными подтипами вируса гриппа А.

Нами получены наноантитела, специфичные к СД НА, потенциально узнающие консервативные конформационные эпитопы и обладающие нейтрализующей активностью в отношении разных подтипов вируса гриппа А. В ходе селекции отобраны четыре индивидуальных клона (В6.2, 2F2, Н1.2 и G2.3),

охарактеризованные по уровню специфической активности в отношении СД и полноразмерного НА подтипов Н1 и Н3 в непрямом ИФА, аффинности в SPR-анализе и нейтрализации *in vivo*.

Результаты ИФА показали, что с наибольшей интенсивностью с СД и полноразмерным НА Н1 реагируют клоны Н1.2 и G2.3. Сравнимый сигнал наблюдался при взаимодействии клона 2F2 и НА Н1, однако на СД он был ниже, чем у Н1.2 и G2.3. Клон В6.2 даже в высоких концентрациях слабо реагировал с указанными антигенами (рис. 4). На этом этапе клон В6.2, показавший самый низкий титр в ИФА и, предположительно, обладающий наименьшей аффинностью, исключили из дальнейшей работы. По данным ИФА, отобранные нами клоны не связываются с НА Н3, тем не менее, многие существующие мАт широкого спектра нейтрализуют НА только внутри одной филогенетической группы.

Помимо эволюционного родства, эти группы объединяют общие консервативные эпитопы кросс-нейтрализующих антител в гидрофобном кармане СД [4]. Связывающие этот антигенный сайт мАт преимущественно нейтрализуют НА одной группы и либо не нейтрализуют подтипы другой, либо делают это с меньшей эффективностью.

Значения  $K_d$  коррелируют со значениями, полученными в непрямом ИФА: самые низкие константы диссоциации (наномолярный диапазон) характерны для антител H1.2 и G2.3. Несмотря на сопоставимую с этими клоном EC<sub>50</sub> в ИФА на H1N1, клон 2F2 показал существенно более низкую специфическую активность и аффинность на СД. На основании проведенных *in vitro* экспериментов для характеристики антител *in vivo* были отобраны клоны H1.2 и G2.3, обладающие наибольшей аффинностью ( $K_d$   $3.65 \times 10^{-10}$  и  $5.54 \times 10^{-10}$  М соответственно).

Проверка нейтрализующих свойств наноантител H1.2 и G2.3 против летальной дозы адаптированного к мышам вируса гриппа H1N1 (A/Duck/mallard/Moscow/4970/2018) показала 100% защиту мышей.

Основываясь на филогенетической близости вирусов с НА подтипов H1 и H5 и консервативности аминокислотной последовательности СД, предположили, что отобранные антитела могут связываться и нейтрализовать *in vivo* штаммы вируса гриппа с НА подтипа H5 [37]. Для эксперимента на животных выбран адаптированный вирус гриппа H5N2 (A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84). Предварительно последовательности СД НА вирусов гриппа, использованных в экспериментах на животных, анализировали в программном обеспечении Geneious Prime. Степень гомологии этих последовательностей составила 83%. Показано, что оба наноантитела, H1.2 и G2.3, обладают 100% нейтрализующей активностью и в отношении вируса гриппа с НА подтипа H5. Такие результаты могут быть обусловлены высокой степенью гомологии между СД НА выбранных штаммов и, как следствие, сохранением сайтов связывания VNN G2.3 и H1.2.

Полученные нами новые однодоменные антитела с крайне высокой аффинностью связываются

и эффективно нейтрализуют вирусы с НА подтипов H1 и H5, однако возможно дальнейшее увеличение связывающей и нейтрализующей способности VNN путем создания бивалентных или биспецифических конструкций с Fc-фрагментом. Таким образом, аффинность повышается за счет увеличения авидности и добавляются эффекторные функции, такие, как антителозависимая клеточная цитотоксичность, антителозависимый фагоцитоз и опосредованная антителом комплементзависимая цитотоксичность, критически важные для терминации гриппозной инфекции.

Антитела, способные нейтрализовать НА, относящиеся к первой филогенетической группе, имеют высокую значимость, так как в эту группу входят также вирусы с пандемическим потенциалом. Полученные нами VNN показали нейтрализующую активность в отношении вирусов, несущих НА подтипов H1 и H5. Наличие или отсутствие нейтрализующей активности в отношении других штаммов вируса гриппа станет предметом дальнейшего изучения.

## ВЫВОДЫ

Нами получен стабилизированный тример СД НА H1 (A/Brisbane/59/2007), содержащий конформационные эпитопы мАт, обладающих широким спектром нейтрализующей активности.

Идентифицированные нами новые наноантитела H1.2 и G2.3 специфически связываются с СД с константами диссоциации, превосходящими многие известные мономерные VNN, а также эффективно нейтрализуют вирусы гриппа H1N1 и H5N2, относящиеся к первой филогенетической группе НА. Получены конструкции указанных антител с Fc-фрагментом, которые будут использованы для изучения протективности в отношении различных штаммов вирусов гриппа типа А *in vivo*. ●

*Исследование выполнено в рамках  
Государственного задания Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
№ 121031800132-4.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gamblin S.J., Skehel J.J. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 37. P. 28403–28409.
- Krammer F., Palese P. // Nat. Rev. Drug Discov. 2015. V. 14. № 3. P. 167–182.
- Ekiert D.C., Friesen R.H.E., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H.J., Brandenburg B., et al. // Science. 2011. V. 333. № 6044. P. 843–850.
- Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L.M., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., Cinatl J., et al. // PLoS One. 2008. V. 3. № 12. P. e3942.
- Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L.M., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. № 3. P. 265–273.
- Wyrzucki A., Dreyfus C., Kohler I., Steck M., Wilson I.A., Hangartner L. // J. Virol. 2014. V. 88. № 12. P. 7083–7092.
- Corti D., Suguitan A.L., Pinna D., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B.M., Vanzetta F., Santos C., Luke C.J., Torres-Velez F.J., Temperton N.J., et al. // J. Clin. Invest. 2010. V. 120. № 5. P. 1663–1673.

8. de Marco D., Clementi N., Mancini N., Solforosi L., Moreno G.J., Sun X., Tumpey T.M., Gubareva L.V., Mishin V., Clementi M., et al. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 4. P. 1–9.
9. Kashyap A.K., Steel J., Rubrum A., Estelles A., Briante R., Ilyushina N.A., Xu L., Swale R.E., Faynboym A.M., Foreman P.K., et al. // *PLoS Pathog.* 2010. V. 6. № 7. P. 1–7.
10. Friesen R.H.E., Lee P.S., Stoop E.J.M., Hoffman R.M.B., Ekiert D.C., Bhabha G., Yu W., Juraszek J., Koudstaal W., Jongeneelen M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 1. P. 445–450.
11. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., et al. // *Science*. 2011. V. 333. № 6044. P. 850–856.
12. Nakamura G., Chai N., Park S., Chiang N., Lin Z., Chiu H., Fong R., Yan D., Kim J., Zhang J., et al. // *Cell Host Microbe*. 2013. V. 14. № 1. P. 93–103.
13. Wu Y., Cho M., Shore D., Song M., Choi J., Jiang T., Deng Y.Q., Bourgeois M., Almlı L., Yang H., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7708.
14. Tharakaraman K., Subramanian V., Viswanathan K., Sloan S., Yen H.L., Barnard D.L., Leung Y.H., Szretter K.J., Koch T.J., Delaney J.C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 35. P. 10890–10895.
15. Wyrzucki A., Bianchi M., Kohler I., Steck M., Hangartner L. // *J. Virol.* 2015. V. 89. № 6. P. 3136–3144.
16. Hu W., Chen A., Miao Y., Xia S., Ling Z., Xu K., Wang T., Xu Y., Cui J., Wu H., et al. // *Virology*. 2013. V. 435. № 2. P. 320–328.
17. Li G.M., Chiu C., Wrammert J., McCausland M., Andrews S.F., Zheng N.Y., Lee J.H., Huang M., Qu X., Edupuganti S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 23. P. 9047–9052.
18. Henry Dunand C.J., Leon P.E., Kaur K., Tan G.S., Zheng N.Y., Andrews S., Huang M., Qu X., Huang Y., Salgado-Ferrer M., et al. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 3. P. 1255–1268.
19. Clementi N., de Marco D., Mancini N., Solforosi L., Moreno G.J., Gubareva L.V., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 12. P. e28001.
20. Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J., Neu U., McAuliffe J.M., Benjamin E., Wachter-Rosati L., Palmer-Hill F.J., Yuan A.Q., Walker P.A., et al. // *Cell*. 2016. V. 166. № 3. P. 596–608.
21. Joyce M.G., Wheatley A.K., Thomas P.V., Chuang G.Y., Soto C., Bailer R.T., Druz A., Georgiev I.S., Gillespie R.A., Kanekiyo M., et al. // *Cell*. 2016. V. 166. № 3. P. 609–623.
22. Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijggeest D., Khayat R., Ekiert D.C., Lee J.H., Metlagel Z., Bujny M.V., Jongeneelen M., et al. // *Science*. 2012. V. 337. № 6100. P. 1343–1348.
23. Laursen N.S., Friesen R.H.E., Zhu X., Jongeneelen M., Blokland S., Vermond J., van Eijgen A., Tang C., van Diepen H., Obmolova G., et al. // *Science*. 2018. V. 362. № 6414. P. 598–602.
24. Gaiotto T., Hufton S.E. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 10. P. 1–27.
25. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. // *Nature*. 1993. V. 363. № 6428. P. 446–448.
26. Harmsen M.M., van Solt C.B., van Zijderveld-Van Bommel A.M., Niewold T.A., van Zijderveld F.G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. № 3. P. 544–551.
27. van Heeke G., Allosery K., De Brabandere V., De Smedt T., Detalle L., de Fougerolles A. // *Pharmacol. Ther.* 2017. V. 169. P. 47–56.
28. Arbabi-Ghahroudi M. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 1589.
29. Jovčevska I., Muyldermans S. // *BioDrugs*. 2020. V. 34. № 1. P. 11–26.
30. Impagliazzo A., Milder F., Kuipers H., Wagner M.V., Zhu X., Hoffman R.M., van Meersbergen R., Huizingh J., Wannigen P., Verspuij J., et al. // *Science*. 2015. V. 349. № 6254. P. 1301–1306.
31. Arbabi Ghahroudi M., Desmyter A., Wyns L., Hamers R., Muyldermans S. // *FEBS Lett.* 1997. V. 414. № 3. P. 521–526.
32. Ledsgaard L., Kilstrup M., Karatt-Vellatt A., McCafferty J., Laustsen A.H. // *Toxins (Basel)*. 2018. V. 10. № 6. P. 236.
33. Fischer S., Handrick R., Otte K. // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. № 8. P. 1878–1896.
34. Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Ugriumova G.A., Solovyev A.I., Esmagambetov I.B., Tukhvatulin A.I., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Shcheblyakov D.V., et al. // *Toxins (Basel)*. 2019. V. 11. № 8. P. 464.
35. De Genst E., Silence K., Decanniere K., Conrath K., Loris R., Kinne J., Muyldermans S., Wyns L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 12. P. 4586–4591.
36. Stijlemans B., Conrath K., Cortez-Retamozo V., van Xong H., Wyns L., Senter P., Revets H., De Baetselier P., Muyldermans S., Magez S. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 2. P. 1256–1261.
37. Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., Suzuki Y., Tateno Y., Nakajima K. // *Virology*. 1991. V. 182. № 2. P. 475–485.