

УДК 571.27

DOI: 10.14427/jipai.2024.4.38

Получение широко нейтрализующего однодоменного антитела к стеблевому домену гемагглютинаина Н3 и изучение механизма его противовирусной активности

Д.В. Воронина, В.Ю. Кан, И.А. Алексеева, Е.И. Рябова, О. Попова, И.А. Фаворская, И.Б. Есмагамбетов, О.В. Зубкова, Д.В. Щебляков, Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почётного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Developing a broadly neutralizing single-domain antibody to the stem domain of hemagglutinin H3 and examining the mechanism of its antiviral activity

D.V. Voronina, V.Yu. Kan, I.A. Alekseeva, E.I. Ryabova, O. Popova, I.A. Favorskaya, I.B. Esmagambetov, O.V. Zubkova, D.V. Shcheblyakov, D.Yu. Logunov, A.L. Gintsburg
N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russia

Аннотация

В настоящее время актуальной задачей является разработка терапевтических средств широкого спектра действия для борьбы с гриппом. Перспективным кандидатом на роль универсального противовирусного препарата являются однодоменные антитела (одАт). Целью нашей работы являлось получение нейтрализующих одАт широкого спектра, связывающихся с консервативными эпитопами гемагглютинаина (ГА) подтипа Н3 и характеристика их противовирусной активности *in vitro* и *in vivo*. С помощью технологии фагового дисплея были изолированы три нейтрализующих одАт, активные в отношении широкого спектра ГА подтипа Н3 и продемонстрировавшие 100% протективность *in vivo*. На основе данных антител были получены химерные белки с Fc-фрагментом человеческого IgG1 – одАт-Fc. Слияние одАт с Fc увеличило и расширило спектр их противовирусной активности. Наиболее перспективное антитело p2.H5-Fc эффективно нейтрализовало различные штаммы вируса гриппа Н3N2 и вирус Н7N2. Определён механизм действия p2.H5-Fc – препятствие слиянию вирусной и эндосомальной мембран, посредством блокировки конформационных изменений в ГА.

Ключевые слова

Однодоменные антитела, грипп, гемагглютинин, фаговый дисплей.

Введение

Ежегодно вирусы гриппа типа А (ВГА) и В приводят к возникновению сезонных эпидемий, которые уносят жизни от 290 000 до 650 000 че-

Summary

The development of universal therapeutic agents for combating influenza is a vital task. Single-domain antibodies (sdAb) represent a promising candidate for the role of a universal antiviral drug. Our objective was to obtain broad-spectrum neutralizing sdAbs binding to conservative hemagglutinin (HA) epitopes of the H3 subtype and to describe their antiviral activity both *in vitro* and *in vivo*. Using phage display technology, we isolated three neutralizing sdAbs active against a diverse range of H3 subtype HA and providing 100% protectiveness *in vivo*. These antibodies were fused with the Fc region of human IgG1 to generate chimeric sdAb-Fc proteins. This fusion enhanced and broadened the spectrum of antiviral activity of the sdAbs. The most promising antibody p2.H5-Fc effectively neutralized various strains of the H3N2 influenza virus and the H7N2 virus. The mechanism of action of p2.H5-Fc has been discovered – it hinders the fusion of viral and endosomal membranes by preventing conformational changes in HA.

Keywords

Single-domain antibodies, influenza, hemagglutinin, phage display.

людей в результате респираторных осложнений. Способность ВГА пересекать межвидовой барьер и вызывать пандемии представляет опасность для общественного здравоохранения. Основным

методом контроля инфекции, вызванной ВГА, является вакцинопрофилактика, однако ежегодное прогнозирование штаммового состава вакцины по-прежнему остаётся сложной задачей; несоответствие вакцинного и циркулирующего штамма ВГА приводит к снижению эффективности вакцинации [1]. В связи с этим актуальной задачей является разработка универсальных средств, как профилактических, так и терапевтических, для борьбы с гриппом. Возможным универсальным противовирусным препаратом могут служить моноклональные антитела (мАт).

Уровень нейтрализующих антител к основному поверхностному гликопротеину ВГА, гемагглютинину (ГА), коррелирует с защитой от гриппа [2]. На сегодняшний день существует 19 подтипов ГА, разделённых на две антигенно отличные группы [3,4]. Молекула ГА состоит из двух субъединиц – HA1 и HA2, которые структурно формируют два домена – глобулярный и стеблевой (СД). СД характеризуется высокой консервативностью, по причине чего СД-специфические мАт обладают широким спектром реактивности [5]. Однако в ответ на инфекцию или вакцинацию антитела к нему формируются в незначительном количестве. Данный факт может быть обусловлен труднодоступным расположением СД в структуре ГА на поверхности вириона для связывания классическими антителами. В данном контексте однодоменные антитела имеют явные преимущества перед классическими мАт.

Однодоменные антитела (наноантитела, одАт) представляют собой вариабельный фрагмент тяжёлоцепочечных антител IgG (HcAb), впервые обнаруженных в 1993 году в сыворотке крови одногорбого верблюда (*Camelus dromedarius*) [6]. Ключевой особенностью, по которой HcAb отличаются от классических иммуноглобулинов, является отсутствие у HcAb лёгких цепей и константного домена CH1 тяжёлой цепи. Таким образом, антигенсвязывающий фрагмент HcAb сформирован только одним доменом (VHH), который соответствует наноантителу.

Структурно и функционально одАт эквивалентно антигенсвязывающему Fab-фрагменту классических IgG. Несмотря на то, что паратоп одАт включает всего три CDR (участок, определяющий комплементарность), наноантитела не уступают классическим по силе взаимодействия с антигеном [7]. Достаточную площадь антигенсвязывающей поверхности одАт обеспечивает удлинённый CDR3 участок VHH, который также обладает большим аминокислотным и структурным разнообразием в сравнении с CDR3 вари-

бельного фрагмента тяжёлой цепи классических IgG. Благодаря этим особенностям формируется уникальная архитектура паратопа одАт, которая позволяет наноантителам распознавать труднодоступные для классических мАт эпитопы [8]. Данное преимущество одАт сделало их привлекательным объектом исследования в качестве препаратов для терапии вирусных инфекций, в том числе гриппа.

В последние десятилетия было изолировано множество наноантител к различным структурным белкам вириона вируса гриппа, как типа А, так и типа В. Среди них особое место занимают одАт широкого спектра, которые являются привлекательными терапевтическими агентами в условиях высокой изменчивости вируса и быстрой сменяемости циркулирующих штаммов. Так, описаны одАт широкого спектра к ГА, нейраминидазе, М2 белку и нуклеопротеину [5]. Механизм противовирусного действия наноантител тесно связан с функцией таргетного белка и соответствующим эпитопом. Также от консервативности аминокислот в составе эпитопа зависит спектр перекрёстной активности антитела: мАт широкого спектра действия связываются с наиболее консервативными аминокислотными остатками.

Цель работы: получение нейтрализующих наноантител к консервативным эпитопам ГА ВГА подтипа H3, изучение их свойств *in vitro* и *in vivo*; а также получение модифицированных Fc-фрагментом одАт, их характеристика в экспериментах *in vitro* и изучение механизма действия одАт-Fc.

Материалы и методы

Клеточные линии: CHO-S (Thermo Fisher Scientific, США), MDCK (Российская коллекция клеточных культур позвоночных, Россия).

Список рекомбинантных ГА и применяемых к ним в тексте аббревиатур (производство Sino Biological, Китай):

- A/California/07/2009(H1N1) – H1 2009;
- A/Aichi/2/1968(H3N2) – H3 Aichi;
- A/Switzerland/9715293/2013(H3N2) – H3 Swiz;
- A/Perth/16/2009(H3N2) – H3 Perth;
- A/Darwin/6/2021(H3N2) – H3 Darwin;
- A/mallard/Ohio/657/2002(H4N6) – H4;
- A/Anhui/1/2013(H7N9) – H7 Anhui;
- A/Jiangxi-Donghu/346/2013(H10N8) – H10.

Вирусы гриппа:

- A/Aichi/2/1968(H3N2) – H3 Aichi (адаптированный к мышам);
- A/Chicken/NJ/294598-12/2004(H7N2) – H7N2 (адаптированный к мышам), совместно с

НЗ Aichi были предоставлены д.б.н. Шмаровым М.М. (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ); – A/Darwin/6/2021(НЗН2) – НЗ Darwin, предоставлен к.б.н. Тимофеевой Т.А. (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского).

Препарат мРНК-ЛНЧ для иммунизации верблюда был предоставлен Гуциным В.А. (Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского) [9].

Иммунизацию животного, получение иммунной библиотеки, селекцию индивидуальных клонов, наработку и очистку одАт осуществляли, как описано ранее [10].

Антитела в формате одАт-Fc получали, как описано [11]. Аналогичным образом получали контрольные одАт-Fc: SD36-Fc и p2.C5-Fc [12,13].

Иммуноферментный анализ (ИФА), в том числе конкурентный ИФА, ИФА с ГА в буферах с различным значением pH, проводили согласно [11,14]. Значения полумаксимальной эффективной концентрации EC_{50} рассчитывали с использованием четырёхпараметрической логистической регрессии.

Реакцию торможения гемагглютинации (РТГА) осуществляли согласно стандартной методике [15].

Реакцию нейтрализации (РН) проводили на клетках MDCK в 96-луночных культуральных планшетах. Серийные разведения антител (в 2-4 повторях) и разведения вирусов (100 ТЦД₅₀/лунку) готовили в среде SFM4MegaVir (HyClone, США) с добавлением 1 мкг/мл трипсина-TPCK (Sigma, США). Смесь вируса и антител инкубировали 1 ч в CO₂-инкубаторе при 37°C. В это время клетки промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ), после чего в лунки к клеткам переносили смесь ВГА и антител. После 72 часов инкубации производили учёт наличия/отсутствия цитопатического действия визуально. Значения полумаксимальной ингибирующей концентрации IC_{50} рассчитывали по методу Рида и Менча [16].

Анализ ингибирования гемолиза и протеазного расщепления проводили согласно [17] и [14], соответственно.

Для эксперимента *in vivo* использовали 6-8-недельных SPF самок мышей линии BALB/c, полученных из научно-производственного подразделения «Питомник лабораторных животных» филиала Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова. Лабораторные животные содержались в соответствии с Директивой 2010/63/EU и рекомендациями FELASA. Эксперимент был одобрен этическим комитетом Национальным исследовательским центром эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России (протокол № 19 от 2022 г.).

Подробная информация содержится в разделе «Результаты и обсуждение».

Статистическую обработку результатов исследования осуществляли в программном обеспечении GraphPad Prism 8. Используемые критерии и тесты указаны в подписях к рисункам.

Дизайн генетических конструкций, построение филогенетического дерева и анализ консервативности аминокислотных последовательностей ГА производили с помощью Geneious Prime 11.0.

Результаты и обсуждение

Получение одАт и изучение их свойств *in vitro* и *in vivo*

Основным механизмом противовирусного действия нейтрализующих антител является ингибирование проникновения вируса в клетку [18]. Интернализация вируса гриппа происходит в результате взаимодействия глобулярного домена ГА с сиаловыми кислотами и последующего слияния вирусной и эндосомальной мембран в поздней эндосоме, которое инициирует стеблевой домен ГА [19]. В связи с этим ГА был выбран нами в качестве мишени для получения нейтрализующих одАт.

Для выделения НЗ-специфичных наноантител двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) иммунизировали препаратом липидных наночастиц с инкапсулированными мРНК (мРНК-ЛНЧ), кодирующими ген ГА A/Darwin/6/2021 (НЗ) (рис. 1А). Титр антител к ГА НЗ в сыворотке крови верблюда после трёхкратной иммунизации мРНК-ЛНЧ составил 1:1 458 000 (рис. 1Б).

Однодоменные антитела изолировали при помощи технологии фагового дисплея. Иммунную библиотеку получали путём клонирования последовательностей одАт из лимфоцитов иммунизированного верблюда в фагмидный вектор. Сложность полученной библиотеки определяли после трансформации рекомбинантных фагмидов в клетки *E. coli* штамма TG1, которая составила $4,1 \times 10^7$ колоний. Специфическую селекцию осуществляли на рекомбинантном полноразмерном ГА НЗ Aichi.

Индивидуальные клоны одАт, связывающихся с ГА НЗ, анализировали с помощью ИФА; клоны с наибольшим значением OP_{450nm} секвенировали по Сэнгеру, в результате чего идентифицировали 20 клонов одАт с уникальными последовательностями CDR3. Далее отобранные одАт экспрессировали в клетках *E. coli* штамма Rosetta (DE3), очищали методом металл-аффинной хроматографии и исследовали их НЗ-специфическую активность в ИФА (табл. 1). В качестве антигенов были выбраны ГА двух штаммов НЗН2,

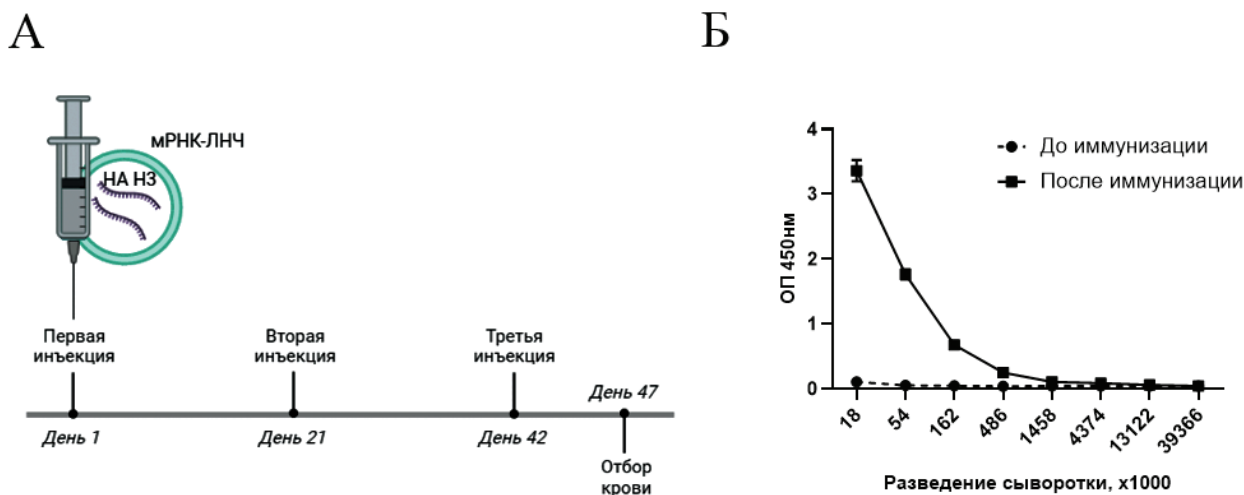


Рис. 1. А – схема иммунизации верблюда. **Б** – уровень антител к ГА Н3 Swiz в сыворотке крови верблюда после 3-й иммунизации

Таблица 1. Результаты исследования активности одАт *in vitro* в ИФА и РН

| одАт | EC ₅₀ , нМ | | Минимальная нейтрализующая концентрация, нМ A/Aichi/2/1968(H3N2) |
|-------|-----------------------|-----------|---|
| | Н3 Aichi | Н3 Darwin | |
| B9 | 6,17 | 13,63 | – |
| G7 | 2,99 | 1,18 | – |
| B6 | 6,99 | 12,01 | – |
| D8 | 147,2 | 28,85 | – |
| A1 | – | 23,84 | не исследовали |
| H5 | 19,47 | 15,39 | – |
| G6 | 20,24 | 2,96 | – |
| D10 | 164,6 | – | не исследовали |
| p2.B7 | – | 1,02 | не исследовали |
| p3.G1 | – | 1,77 | не исследовали |
| p3.B6 | 8,91 | 3,11 | – |
| p3.C1 | 203,2 | 2,01 | 1670 |
| p2.A3 | 261,9 | 26,66 | – |
| p2.A9 | – | 11,72 | не исследовали |
| p3.D1 | 1,29 | 0,84 | 3,27 |
| p3.H1 | 2,61 | 0,86 | 3,27 |
| p2.F7 | – | 0,65 | не исследовали |
| p3.H6 | 1,73 | 0,74 | 3,27 |
| p2.H5 | 8,33 | 0,61 | 1,6 |
| A7 | 1,21 | 0,46 | – |

Примечание: Отсутствие активности отмечено как «–».

циркулировавших в популяции в разные годы: A/Aichi/2/1968(H3N2) и A/Darwin/6/2021(H3N2). Полученные для одАт значения EC₅₀ варьировали от 261,9 нМ до 0,46 нМ. Результаты ИФА показали, что большинство одАт (14 из 20) связываются с ГА обоих штаммов, что может говорить в пользу консервативности узнаваемых ими эпитопов, так

как аминокислотные последовательности ГА Н3 Aichi и Н3 Darwin совпадают всего на 84%.

Затем в РН с вирусом A/Aichi/2/1968(H3N2) исследовали нейтрализующую активность тех наноантител, которые специфически узнавали оба антигена в ИФА (табл. 1). Было показано, что 5 из 14 клонов способны подавлять рост ВГА в куль-

туре клеток, при этом наиболее перспективными нейтрализующими одАт являлись р3.Д1, р3.Н1, р3.Н6 и р2.Н5. Минимальная нейтрализующая концентрация данных клонов – 3,27 нМ для р3.Д1, р3.Н1 и р3.Н6; 1,6 нМ для р2.Н5.

Для антител р3.Д1, р3.Н1, р3.Н6 и р2.Н5 была изучена их способность блокировать взаимодействие ГА с сиаловыми кислотами в РТГА. Согласно полученным результатам, данные одАт не обладают активностью в РТГА, что свидетельствует о расположении эпитопов наноантител за пределами рецептор-связывающего сайта. Данные клоны были выбраны для дальнейшего исследования протективных свойств *in vivo*.

Для оценки эффективности одАт р3.Д1, р3.Н1, р3.Н6 и р2.Н5 *in vivo* использовали модель летальной инфекции мышей линии BALB/c (рис. 2). У контрольной группы мышей, получавших ФСБ, наблюдалось стремительное снижение веса, в результате чего все животные пали к 7 дню после инфицирования. В группах, получавших одАт р3.Н1, р3.Н6 или р2.Н5, животные не демонстрировали снижения веса, и выживаемость составила 100%. В группе мышей, получавших р3.Д1, выжило 25% животных, которые, несмотря на значительную потерю в весе (~20%), к концу эксперимента вернулись к изначальной массе тела. Стоит отметить, что различия в выживаемости между контрольной и группой, получавшей р3.Д1, были статистически значимы, что объясняется задержкой в наступлении смертельного исхода. Таким образом, мы продемонстрировали 100% протективность одАт р3.Н1, р3.Н6 и р2.Н5 против летальной инфекции А/Aichi/2/1968(Н3N2). Учитывая эффективность данных наноантител *in vivo*, именно их выбрали для дальнейшего исследования.

Получение химерных белков одАт с Fc-фрагментом и изучение их свойств *in vitro*

С целью повысить противовирусную активность одАт исследователи применяют различные стратегии для увеличения валентности и, соответственно, avidности антител [20]. В данной работе мы модифицировали наноантитела Fc-фрагментом IgG1 человека. Слияние одАт с Fc не только приводит к димеризации химерной молекулы и, соответственно, получению бивалентного антитела, но также позволяет наноантителу взаимодействовать с Fc-рецепторами и белками системы комплемента. С помощью ПЦР были получены плазмидные конструкции на основе экспрессионного вектора для эукариотических клеток, несущие последовательности одАт, слитых с Fc – р3.Н1-Fc, р3.Н6-Fc и р2.Н5-Fc. Соответствующие антитела экспрессировали в клетках CHO-S и очищали методом аффинной хроматографии. Способность одАт-Fc к специфическому связыванию с ГА Н3 и нейтрализации Н3N2 определяли в ИФА и РН, соответственно (табл. 2). Значения EC_{50} антител в формате одАт-Fc снижались от 3,5 до 6,3 раз в отношении ГА Н3 Aichi или Н3 Darwin. Изменение нейтрализующих свойств после модификации Fc выразалось в снижении IC_{50} от 2,3 раз (для р3.Н6-Fc) до 9,7 раз (для р3.Н1-Fc). Полученные нами результаты согласуются с опубликованными ранее данными, посвящёнными химерным белкам одАт-Fc [11,14].

Высокая скорость изменчивости ВГА, особенно вирусов Н3N2, приводит к быстрому ускользанию вируса от нейтрализующего действия антител, что, наряду с угрозой возникно-

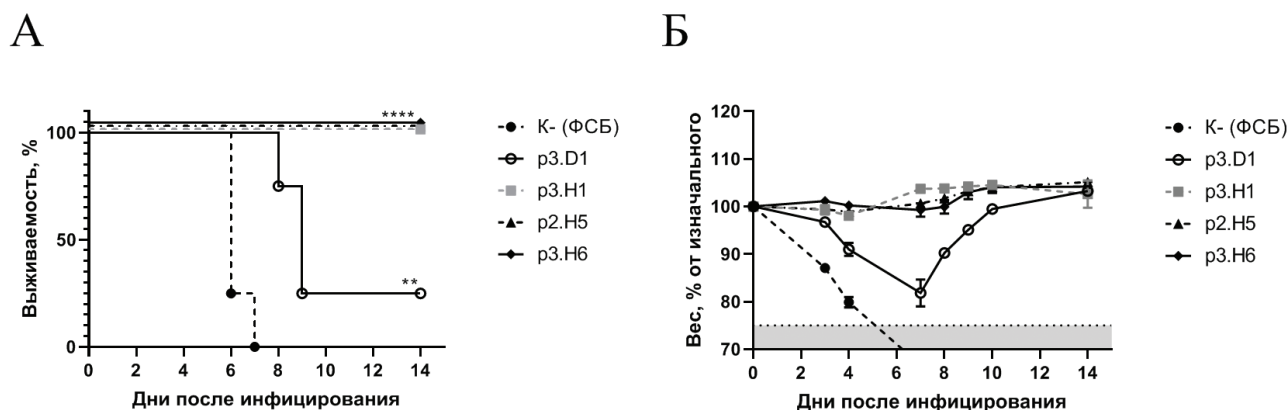


Рис. 2. Динамика выживаемости (А) и массы тела (Б) мышей после местного профилактического введения одАт (1 мг/кг и.н. за 1 час до инфицирования) и последующего заражения А/Aichi/2/1968(Н3N2) в дозе 5 ЛД₅₀. Контрольная группа получала ФСБ

Различия между выживаемостью в опытных и контрольной группах рассчитывали с использованием логрангового метода Мантель-Кокс (**** – $p < 0,0001$; ** – $p = 0,0058$). Результаты изменения массы тела представлены как средние значения \pm SEM.

вения новых пандемических штаммов ВГА, влечёт за собой необходимость получения антител, обладающих широким спектром нейтрализующей активности. В связи с этим мы проанализировали спектр реактивности мономеров одАт и одАт-Fc с помощью ИФА, а также РН (табл. 2 и рис. 3). Результаты ИФА показали, что все отобранные одАт (р3.Н1, р3.Н6 и р2.Н5) связываются с ГА, принадлежащими штаммам Н3N2, выделенным в разные годы. Примечательно,

что модификация Fc-фрагментом привела к появлению у антител способности связываться с ГА подтипа Н4, несмотря на низкую степень идентичности в последовательности Н4 и Н3 – от 57,3 до 66,4% (рис. 3В). Наиболее перспективным оказалось антитело р2.Н5-Fc: слияние с Fc позволило данному антителу узнавать и эффективно нейтрализовать ВГА с ГА подтипа Н7, сходство которых с ГА Н3 и Н4 не превышает 50% (рис. 3В). В то же время отсутствие

Таблица 2. Спектр связывающей и нейтрализующей активности одАт и соответствующих одАт-Fc

| Антитело | | EC ₅₀ , нМ | | | | | | IC ₅₀ , нМ | | | | |
|--------------------------|----------|-----------------------|-------|------|-------|--------|------|-----------------------|-----|-------|--------|------|
| | | H1 | H3 | H3 | H3 | H3 | H4 | H7 | H10 | H3 | H3 | H7N2 |
| | | 2009 | Aichi | Swiz | Perth | Darwin | | Anhui | | Aichi | Darwin | |
| Мономер одАт | р3.Н1 | – | 2,61 | 1,36 | 0,67 | 0,86 | – | – | – | 1,55 | 7,41 | – |
| | р3.Н6 | – | 1,73 | 1,51 | 1,88 | 0,74 | – | – | – | 1,55 | 7,41 | – |
| | р2.Н5 | – | 8,33 | 1,67 | 3,87 | 0,61 | – | – | – | 1,55 | 7,41 | – |
| Fc-модифицированное одАт | р3.Н1-Fc | – | 0,61 | 0,27 | 0,62 | 0,15 | 0,25 | – | – | 0,16 | 2,02 | – |
| | р3.Н6-Fc | – | 0,28 | 0,55 | 0,28 | 0,17 | 0,25 | – | – | 0,67 | 0,38 | – |
| | р2.Н5-Fc | – | 2,37 | 0,31 | 0,27 | 0,097 | 0,27 | 0,43 | – | 0,2 | 0,44 | 2,31 |

Примечание: отсутствие связывания или нейтрализации отмечено «–».

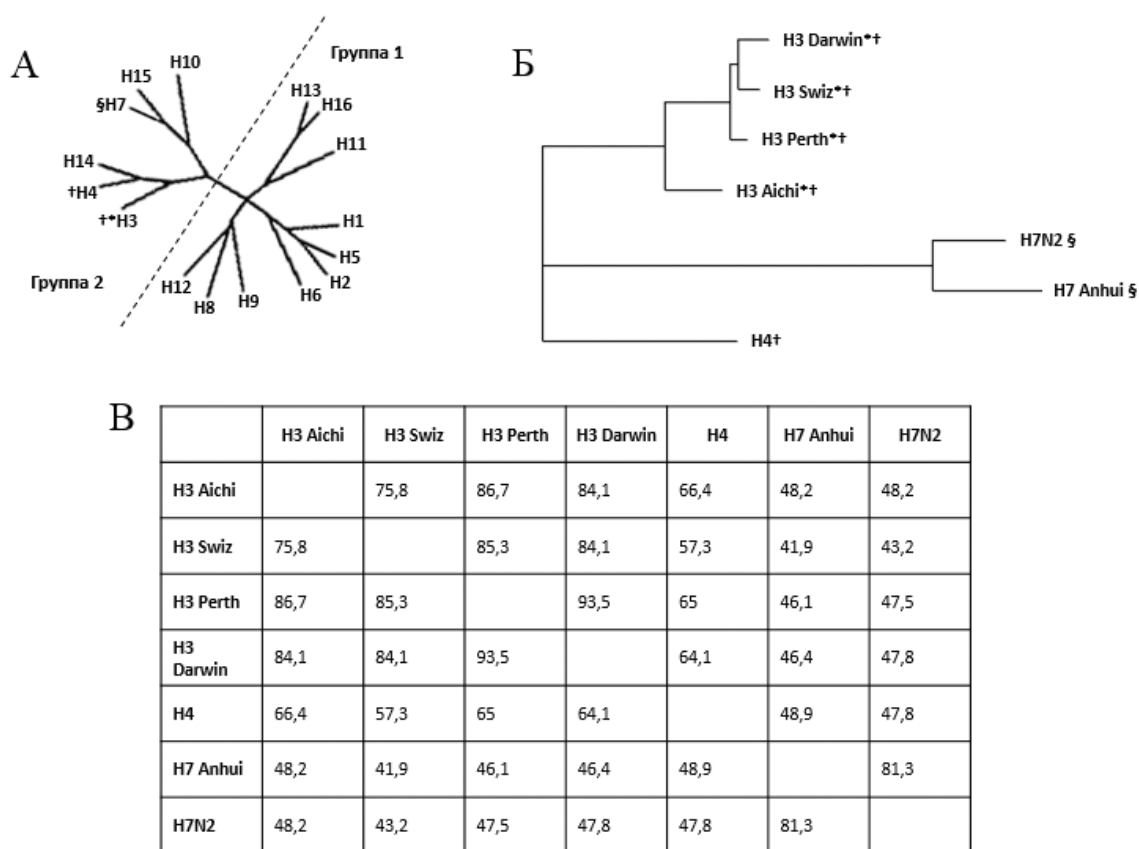


Рис. 3. Анализ спектра реактивности одАт и одАт-Fc: филогенетическое дерево известных подтипов ГА ВГА (А) и ГА, с которыми взаимодействуют полученные в работе антитела (Б)

* – ГА, которые узнают одАт р3.Н1, р3.Н6 и р2.Н5; † – ГА, узнаваемые одАт-Fc; § – ГА, узнаваемые только р2.Н5-Fc. В – сравнение аминокислотных последовательностей ГА, с которыми взаимодействуют полученные в работе антитела; идентичность выражена в %.

взаимодействия как мономеров наноантител, так и Fc-химер с ГА подтипа Н1 говорит о том, что спектр активности полученных антител распространяется в пределах филогенетической группы 2 (рис. 3А). В совокупности полученные данные свидетельствуют о расширении спектра действия в результате увеличения валентности одАт. Ранее на примере одАт к ГА ВГА и gp120 ВИЧ было показано, что благодаря димеризации расширился спектр противовирусной активности указанных наноантител; данное явление авторы связывают с увеличением аффинности одАт вследствие модификации [21,22].

Из полученных в работе антител, р2.Н5-Fc продемонстрировало наибольший спектр нейтрализующей активности, поэтому далее изучали механизм действия данного антитела.

Механизм противовирусного действия р2.Н5-Fc

Широкий спектр нейтрализующей активности р2.Н5-Fc указывает на консервативность узнаваемого им эпитопа, а от расположения эпитопа в той или иной функциональной части белка зависит и механизм действия антитела.

Молекула ГА имеет ряд высококонсервативных областей, как в глобулярном, так и в стеблевом домене, консервативность которых связана с витальностью выполняемой ими функции. Так, сравнительно высокой стабильностью аминокислотного состава обладает рецептор-связывающий сайт, расположенный в глобуле ГА, поскольку он обеспечивает взаимодействие ГА с сиаловыми кислотами клетки-мишени. Соответственно, механизм действия антител, направленных против данной области, будет заключаться в препятствии связыванию ГА и рецептора. Из чего следует, что такие антитела должны обладать активностью в РТГА. Однако р2.Н5 не блокировал агглютинацию эритроцитов, следовательно, его эпитоп расположен за пределами рецептор-связывающего сайта.

В структуре стеблевого домена наибольшей консервативностью обладают аминокислоты, ответственные за конформационные изменения ГА при снижении рН в поздней эндосоме, включая пептид слияния. Функция данных аминокислотных остатков консервативна среди вирусов гриппа А и В; показано, что противовирусное действие мАт, связывающихся с этой областью, обусловлено блокированием конформационных изменений ГА и, как следствие, ингибированием слияния мембран.

Отсутствие активности в РТГА может быть свидетельством расположения эпитопа р2.Н5-Fc

в СД ГА. Для проверки данной гипотезы проводили конкурентный ИФА с контрольным одАт-Fc, в качестве которого брали описанное ранее антитело SD36-Fc [12]. Исходя из данных рентгеноструктурного анализа, эпитоп SD36-Fc располагается в области А-спирали СД ГА. Результаты конкурентного ИФА показали, что VHH р2.Н5 конкурирует за связывание с SD36-Fc, а также с р3.Н1-Fc и р3.Н6-Fc (рис. 4А). Полученные данные говорят о том, что р2.Н5 имеет перекрывающийся с SD36-Fc эпитоп, расположенный в СД ГА.

Также с целью оценить связывание р2.Н5-Fc с НА, претерпевающим конформационные изменения под действием снижения рН, в ИФА имитировали процесс, приводящий к слиянию мембран. Согласно полученным данным, при изменении рН связывающая активность р2.Н5-Fc значительно снижается (рис. 4Б). Указанные результаты могут косвенно свидетельствовать о схожем механизме действия р2.Н5-Fc и других СД-специфичных мАт, заключающийся в блокировании изменения конформации ГА, которое опосредует слияние мембран [23].

Для обеспечения успешного слияния вирусной и эндосомальной мембран молекула ГА должна: 1) подвергнуться расщеплению сериновыми протеазами; 2) перестроить конформацию под влиянием снижения рН в поздней эндосоме. Мы исследовали влияние антитела р2.Н5-Fc изолированно на указанные стадии процесса слияния мембран. Результаты анализа способности р2.Н5-Fc ингибировать протеолитическое расщепление ГА показали, что р2.Н5-Fc, так же, как и контрольное антитело SD36-Fc, не могли предотвратить протеазное расщепление ГА (рис. 5А). Далее изучали возможность блокирования конформационных изменений ГА под действием буфера с низким значением рН с помощью анализа ингибирования гемолиза. Согласно представленным на рис. 5Б данным, р2.Н5-Fc дозозависимо подавлял гемолиз; минимальная концентрация антитела, обеспечивающая полное ингибирование фузии, составила 62,5 нМ. В совокупности эти результаты показывают, что механизм противовирусного действия р2.Н5-Fc заключается в предотвращении конформационных изменений ГА, которые приводят к слиянию мембран.

Заключение

Таким образом, в результате иммунизации верблюда мРНК-ЛНЧ была получена иммунная библиотека, из которой при помощи технологии

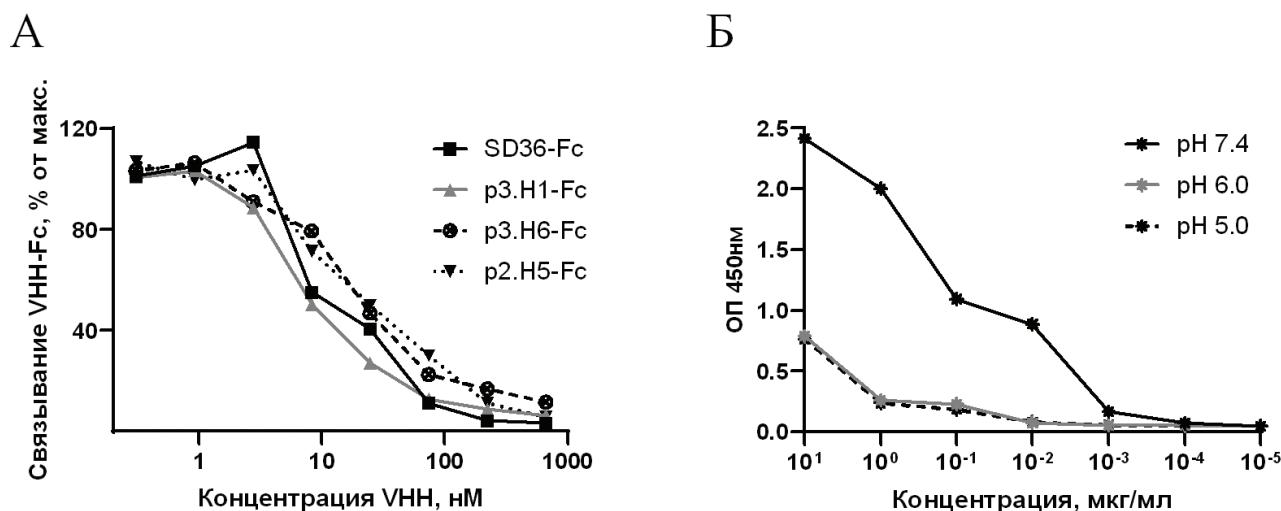


Рис. 4. А – результаты конкурентного ИФА мономера р2.Н5 с VHH-Fc. Б – ИФА с ГА Н3 Aichi, обработанным трипсином-TRPK и буферами с различными рН (цитратный буфер с рН 7.4, 6.0 и 5.0)

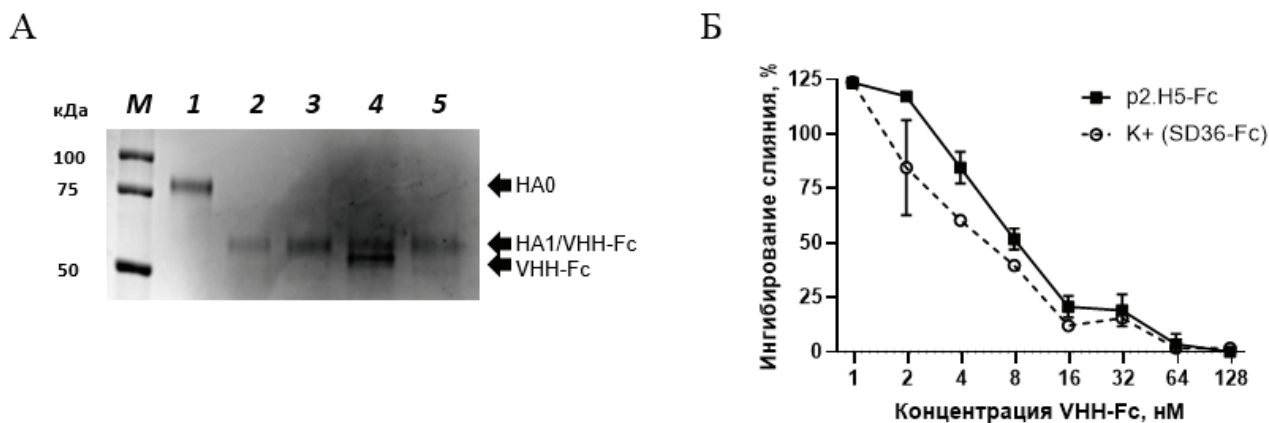


Рис. 5. Исследование влияния р2.Н5-Fc на процесс слияния мембран

А – анализ ингибирования протеазного расщепления ГА: 1 – ГА Н3 (~75-77 кДа) в восстановительных условиях; 2 – продукт расщепления ГА Н3: HA1 (~55 кДа), полоса HA2 не показана; 3 – ГА Н3, предварительно инкубированный с р2.Н5-Fc; 4 – ГА Н3, предварительно инкубированный с контрольным антителом SD36-Fc; 5 – ГА Н3, предварительно инкубированный с р2.С5-Fc (нерелевантное одАт-Fc к S-белку вируса SARS-CoV-2). Б – анализ ингибирования гемолиза, отражающий процесс конформационных изменений ГА под действием низкого рН и последующей фузии мембран

фагового дисплея изолировали одАт, специфичные к ГА ВГА подтипа Н3. Полученные наноантитела были охарактеризованы в ИФА и РН. Профилактическую эффективность нейтрализующих одАт исследовали *in vivo*, в результате чего отобрали три клон, показавших 100% протективность: р3.Н1, р3.Н6 и р2.Н5. Данные наноантитела модифицировали Fc-фрагментом IgG1 человека для улучшения противовирусных свойств и получили химерные белки (одАт-Fc): р3.Н1-Fc, р3.Н6-Fc и р2.Н5-Fc. Связанная с модификацией димеризация антител не только привела к снижению значений EC₅₀ и IC₅₀ одАт-Fc, но и расширила спектр штаммов, с которыми взаимодействуют антитела. Так, наиболее зна-

чительное изменение спектра было характерно для р2.Н5-Fc: помимо ГА подтипа Н3, антитело связывалось в ИФА с ГА подтипов Н4 и Н7, а с помощью РН показана нейтрализующая активность р2.Н5-Fc в отношении вируса Н7Н2. Далее, были продемонстрированы данные, указывающие на расположение эпитопа р2.Н5-Fc в СД ГА, и определён механизм противовирусного действия одАт-Fc, заключающийся в предотвращении слияния мембран.

Подводя итог вышесказанному, антитело широкого спектра действия р2.Н5-Fc представляет перспективным кандидатом для дальнейших исследований и разработки терапевтического препарата на основе мАт.

Литература

1. Yamayoshi S, Kawaoka Y. Current and future influenza vaccines. *Nat Med.* 2019;25(2):212-220. doi:10.1038/s41591-018-0340-z.
2. Skehel JJ, Wiley DC. Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000;69(1):531-569. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.531.
3. Karakus U, Mena I, Kottur J, et al. H19 influenza A virus exhibits species-specific MHC class II receptor usage. *Cell Host Microbe.* 2024;32(7):1089-1102.e10. doi:10.1016/j.chom.2024.05.018.
4. Fereidouni S, Starick E, Karamendin K, et al. Genetic characterization of a new candidate hemagglutinin subtype of influenza A viruses. *Emerg Microbes Infect.* 2023;12(2). doi:10.1080/22221751.2023.2225645.
5. Yep AT, Takeuchi Y, Engelhardt OG, et al. Broad reactivity single domain antibodies against influenza virus and their applications to vaccine potency testing and immunotherapy. *Biomolecules.* 2021;11(3):1-23. doi:10.3390/biom11030407.
6. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature.* 1993;363(6428):446-448. doi:10.1038/363446a0.
7. Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci.* 2001;26(4):230-235. doi:10.1016/S0968-0004(01)01790-X.
8. 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;103(12):4586-4591. doi:10.1073/pnas.0505379103.
9. Mazunina EP, Gushchin VA, Kleymenov DA, et al. Trivalent mRNA vaccine-candidate against seasonal flu with cross-specific humoral immune response. *Front Immunol.* 2024;15. doi:10.3389/fimmu.2024.1381508.
10. Favorskaya IA, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Immunol.* 2022;13. doi:10.3389/fimmu.2022.822159.
11. Shcheblyakov DV, Voronina DV, Favorskaya IA, et al. Broadly Reactive Nanobody Targeting the H3 Hemagglutinin of the Influenza A Virus. *Acta Naturae.* 2024;16(1):101-110. doi:10.32607/actanaturae.27374.
12. Laursen NS, Friesen RHE, Zhu X, et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science* (1979). 2018;362(6414):598-602. doi:10.1126/science.aag0620.
13. Sluchanko NN, Shcheblyakov DV, Varfolomeeva LA, et al. Structural Basis for Evasion of New SARS-CoV-2 Variants from the Potent Virus-Neutralizing Nanobody Targeting the S-Protein Receptor-Binding Domain. *Biochemistry (Moscow).* 2024;89(7):1260-1272. doi:10.1134/S0006297924070083.
14. Voronina DV, Shcheblyakov DV, Favorskaya IA, et al. Cross-Reactive Fc-Fused Single-Domain Antibodies to Hemagglutinin Stem Region Protect Mice from Group 1 Influenza A Virus Infection. *Viruses.* 2022;14(11). doi:10.3390/v14112485.
15. Kaverin NV, Rudneva IA, Govorkova EA, et al. Epitope Mapping of the Hemagglutinin Molecule of a Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus by Using Monoclonal Antibodies. *J Virol.* 2007;81(23):12911-12917. doi:10.1128/JVI.01522-07.
16. Reed LJ, Muench H. A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *Am J Epidemiol.* 1938;27(3):493-497.
17. Du R, Cheng H, Cui Q, et al. Identification of a novel inhibitor targeting influenza A virus group 2 hemagglutinins. *Antiviral Res.* 2021;186:105013. doi:10.1016/j.antiviral.2021.105013.
18. Wu NC, Wilson IA. Influenza Hemagglutinin Structures and Antibody Recognition. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2020;10(8):a038778. doi:10.1101/cshperspect.a038778.
19. Wu NC, Wilson IA. Structural Biology of Influenza Hemagglutinin: An Amaranthine Adventure. *Viruses.* 2020;12(9):1053. doi:10.3390/v12091053.
20. Saerens D, Ghassabeh G, Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(5):600-608. doi:10.1016/j.coph.2008.07.006.
21. Hufton SE, Risley P, Ball CR, et al. The breadth of cross sub-type neutralisation activity of a single domain antibody to influenza hemagglutinin can be increased by antibody valency. *PLoS One.* 2014;9(8). doi:10.1371/journal.pone.0103294.
22. Matz J, Kessler P, Bouchet J, et al. Straightforward Selection of Broadly Neutralizing Single-Domain Antibodies Targeting the Conserved CD4 and Coreceptor Binding Sites of HIV-1 gp120. *J Virol.* 2013;87(2):1137-1149. doi:10.1128/JVI.00461-12.
23. Sui J, Hwang WC, Perez S, et al. Structural and functional bases for broad-spectrum neutralization of avian and human influenza A viruses. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(3):265-273. doi:10.1038/nsmb.1566.

Сведения об авторах

Воронина Дарья Владимировна – м.н.с. лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. orcid: 0000-0001-6629-744X.
Кан Владислав Юрьевич – лаб.-исслед. лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. ORCID: 0000-0002-0577-1846.
Алексеева Ирина Александровна – м.н.с. лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.
Рябова Екатерина Игоревна – м.н.с. лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. ORCID: 0000-0002-2687-5185.
Попова Ольга – м.н.с. лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. ORCID: 0000-0003-3248-1227.
Фаворская Ирина Алексеевна – н.с. лаб. клеточной микробиологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. ORCID: 0000-0003-0639-8390.
Есмагамбетов Ильяс Булатович – к.б.н., в.н.с., зав. лаб. стромальной регуляции иммунитета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. ORCID: 0000-0002-2063-2449.
Зубкова Ольга Вадимовна – к.б.н., в.н.с. лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. ORCID: 0000-0001-7893-8419.
Щебляков Дмитрий Викторович – к.б.н., в.н.с., зав. лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. ORCID: 0000-0002-1289-3411.
Логунов Денис Юрьевич – д.б.н., академик РАН, зам. директора по научной работе ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. ORCID: 0000-0003-4035-6581.
Гинцбург Александр Леонидович – д.б.н., академик РАН, профессор, директор ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. ORCID: 0000-0003-1769-5059.

Поступила 26.08.2024.

Статья принимает участие в Ермолевском конкурсе научных публикаций