

УДК 577.22;578.282

ПОЛУЧЕНИЕ СЕРИИ НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ НАНОТЕЛ К S-БЕЛКУ SARS-CoV-2

© 2023 г. В. А. Жучков^а, С. В. Иванов^а, Ю. Е. Кравченко^а, С. П. Чумаков^{а, *}

^аИнститут биоорганической химии им. академиков М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук,
Москва, 117997 Россия

*e-mail: hathkul@gmail.com

Поступила в редакцию 03.06.2022 г.

После доработки 06.10.2022 г.

Принята к публикации 06.10.2022 г.

Противодействие распространению новых респираторных инфекций и снижение ущерба, наносимого ими обществу, требует разработки способов быстрого создания средств направленной терапии, таких как моноклональные антитела и подобные им структуры. Нанотела — антигенраспознающие фрагменты особых антител Верблюдовых, состоящие из тяжелых цепей, — обладают рядом характеристик, которые делают их применение наиболее удобным. Высокие темпы распространения пандемии COVID-19, вызванной новым коронавирусом — SARS-CoV-2, — указывают на то, что ключевым фактором в разработке средств терапии является быстрота получения высокоэффективных блокирующих антител, а также разнообразие эпитопов, с которыми эти антитела связываются. Мы провели оптимизацию процесса селекции нанотел из генетического материала животных семейства Верблюдовых и получили панель вариантов, обладающих сродством к белку шипа (S-белку) SARS-CoV-2 в нижнем наномолярном и пикомолярном диапазоне и высокой специфичностью связывания. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* были отобраны нанотела, блокирующие взаимодействие между S-белком и клеточным рецептором SARS-CoV-2 — ангиотензинконвертирующим ферментом-2 (ACE2). Эпитопы, с которыми связываются нанотела, располагаются в рецепторсвязывающем домене (RBD) S-белка и слабо перекрываются, поэтому смесь нанотел может сохранять потенциальную терапевтическую эффективность и в отношении новых вариантов S-белка. Смесь нанотел, обладающих компактным размером и высокой стабильностью, может стать основой для создания терапевтического препарата, доставляемого к пораженному органу в виде аэрозоля.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, нанотела, белок шипа, ангиотензинконвертирующий фермент-2, нейтрализующие антитела, моноклональные антитела, иммунотерапия

DOI: 10.31857/S0026898423030230, **EDN:** CIBRDB

Пандемия COVID19, вызванная вирусом SARS-CoV-2, наглядно продемонстрировала, что для эффективного противодействия возникающим новым биологическим угрозам необходимы отработанные пути создания новых вакцин и специфических терапевтических агентов [1]. В контексте противодействия вирусным инфекциям на роль последних лучше всего подходят различные варианты специфических антител [2]. Однако, в отличие от быстрой сертификации и массового применения новых вакцин, терапевтические моноклональные антитела к белкам SARS-CoV-2 не были массово внедрены в медицинскую практику по ряду причин. Среди них — относительно высокая себестоимость производства и результаты исследований, в которых показано, что для достижения терапевтического эффекта такие препараты необходимо применять на ранних стадиях развития заболевания [3]. Дополнительная про-

блема, препятствующая внедрению противовирусных моноклональных антител, — возникновение новых, устойчивых к ним вариантов SARS-CoV-2 с мутациями в поверхностном белке шипа (S), на который и вырабатываются нейтрализующие антитела, в том числе моноклональные [4, 5].

Большинство перечисленных ограничений основано на особенностях структуры моноклональных антител: антигенная специфичность в них определяется участками двух белковых цепей, что усложняет получение подходящих по характеристикам вариантов. Для их производства подходят только эукариотические системы, что сильно влияет на стоимость производства и, следовательно, терапии, а поэтому не подходит для широкого применения. Кроме того, крупный размер молекул иммуноглобулинов ограничивает тканевую проницаемость, что не позволяет эффективно использовать их на ранних стадиях или в каче-

стве профилактического средства. Периодическое появление новых вариантов SARS-CoV-2 дополнительно усугубляет эти ограничения и снижает эффективность терапии с использованием моноклональных антител [4].

Как минимум, часть перечисленных ограничений можно преодолеть путем применения антител альтернативной структуры, например фрагментов особых антител, характерных для представителей семейства Верблюдовых и состоящих из гомодимера тяжелых цепей, — нанотел [6]. За счет того, что антигенная специфичность таких антител определяется последовательностями, расположенными на одной полипептидной цепи, селекция высокоэффективных вариантов из библиотек технически проще и производится быстрее. Кроме того, нанотела могут быть синтезированы в прокариотических экспрессионных системах и, в отличие от фрагментов моноклональных антител, для повышения их стабильности и растворимости не требуется дополнительная модификация [7]. Малый размер нанотел обеспечивает им лучшую тканевую проницаемость, а высокая стабильность структуры облегчает их использование не только как препарата для инъекций, но и для местного или аэрозольного применения.

Скорость и эффективность отбора подходящих последовательностей однодоменных антител определяется рядом параметров: иммуногенностью целевого белка в организме животного, выбранной методикой проведения селекции и системами тестирования кандидатных вариантов. Поверхностный белок шипа (spike, S) SARS-CoV-2 распознает клеточный рецептор — ангиотензин-конвертирующий фермент-2 (ACE2), — связывается с ним и тем самым обеспечивает проникновение вируса в клетку. Важно заметить, что этот гликопротеин SARS-CoV-2 обладает высокой гомологией с соответствующим белком другого вируса семейства *Coronaviridae*, — коронавируса ближневосточного респираторного синдрома, MERS-CoV [8]. Этот вирус попал в человеческую популяцию от животных семейства Верблюдовые, преодолев межвидовой барьер. На основании этого логично предположить высокую иммуногенность белков этого типа в организмах лам и альпак.

Увеличить долю последовательностей, обладающих терапевтическим потенциалом в итоговой библиотеке антител можно следующими способами: 1) за счет обогащения исходных В-клеточных популяций [9] фракциями, несущими распознающие целевой белок рецепторами; 2) применением на стадии отбора фрагмента S-белка, ответственного за взаимодействие с клеточным рецептором, — рецепторсвязывающего домена (RBD); 3) использованием рекомбинантного лиганда для выделения последовательностей нанотел, конкурирующих с ним за общий сайт связывания. Ре-

зультатом таких действий должно стать получение высокообогащенной библиотеки, содержащей множество вариантов последовательностей нанотел, обладающих высоким сродством к мишени, специфичностью взаимодействия и способностью блокировать связывание S-белка и ACE2. Антитела, отобранные из такой библиотеки, могут применяться либо в виде монотерапевтического средства, нацеленного на конкретный вариант S-белка, либо в виде коктейля, обладающего более широким действием за счет множества распознаваемых эпитопов.

Целью данной работы было проведение оптимизации условий получения библиотек последовательностей нанотел и последующей селекции вариантов, обладающих потенциальной терапевтической эффективностью, а также конструирование панели блокирующих нанотел к S-белку SARS-CoV-2 и тестирование их активности в условиях *in vitro* и *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток. Используемые в работе линии клеток HEK-293 и HEK-293T (культуры трансформированных клеток человека), а также H1299 (немелкоклеточный рак легкого) были получены из Американской коллекции типовых клеточных культур (ATCC, США). Их культивировали в атмосфере с 5% CO₂ при 37°C в среде DMEM-F12 (“PAA”, Австрия) с добавлением 10%-ной эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FSB; “Gibco”, США), 2 mM аланил-глутамин (“ПанЭко”, Россия), 20 mM HEPES, 100 мкг/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“ПанЭко”).

Выделение РНК, обратная транскрипция и количественная ПЦР. Выделение РНК из клеток проводили на колонках с использованием набора RNeasy Mini kit (“Qiagen”, США) или в препаративных количествах с применением реагента ExtractRNA (“Евроген”, Россия) в соответствии с рекомендациями производителей.

Очищенную РНК использовали для синтеза кДНК при помощи ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis Kit (“NEB”, США). Реакционная смесь содержала 500 нг РНК и компоненты вышеприведенного набора с использованием праймера d(T)₂₃. Для получения целевой кДНК использовали специфичный праймер CH2_IgG_sp rev (5'-GGTACGTGCTGTTGAAGTGTCC-3'), инкубировали смесь в течение 1 ч при 42°C, затем 5 мин при 80°C.

Получение генетических конструкций для экспрессии ACE2, эктодоменов S-белка и RBD. кДНК, полученную из клеток линии H1299, амплифицировали с использованием высокоточной полимеразы Tersus (“Евроген”) и праймеров: ACE2_XbaI_dir

(5'-TATATCTAGAGCCACCATGTCAAGCTCTTCCTGGCTC-3') и ACE2 8His SalI_rev (5'-CTCTCTCTGTCGACTTATCAATGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGGAAACAGGGGGCTGGTTAGGAG-3') либо ACE2_SalI_rev (5'-ATATGTTCGACCTAAAGGAGGTCTGAACATCATCAGTG-3'). Ампликоны разделяли электрофорезом в 1%-ном агарозном геле, очищали методом твердофазной экстракции и, используя лигазу T4 ("Евроген"), клонировали по сайтам рестрикции XbaI и SalI ("NEB") в лентивирусный экспрессионный вектор pLCMV-PL4-puro.

Для получения последовательности тримеризирующегося эктодомена S-белка и его RBD использовали плазмиды pCAGGS-Spike и pCAGGS-RBD соответственно [10]. Последовательность, кодирующую эктодомен S-белка, амплифицировали с праймерами: S_CO_BsmBI_AGCT_dir (5'-AGAGAGC-

GTCTCAAGCTTAGGCCACCATGTTCGTGTTTC-3') и S_CO_XbaI_rev (5'-AGAGAGTCTAGATTAGTGATGATGATGATGATGTCCCAAGAAGGTCGACAG-3'); а последовательность, кодирующую RBD, — с праймерами S_CO_BsmBI_AGCT_dir и RBD_CO_XbaI_rev (5'-AGAGAGCGTCTCAAGCTTAGGCCACCATGTTCGTGTTTC-3'). Полученные конструкции клонировали в вектор pSI-PL1-10His-puro по сайтам HindIII и XbaI.

Получение упаковочной плазмиды pMD2-S. Для конструирования плазмиды, кодирующей последовательность полноразмерного S-белка, использовали кДНК генома вируса SARS-CoV-2. Фрагменты последовательности, кодирующей S-белок, амплифицировали и соединяли при помощи ПЦР с амплификацией перекрывающихся участков (OE-PCR) с праймерами:

SC2_S_dir (5'-GAACAATGTTTGTCTTTCTTGTCTTTATTGCC-3'),
 SC2_S_dir2 (5'-CCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATC-3'),
 SC2_S_rev (5'-TTATGTGTAATGTAATTTGACTCCTT TGAGC-3'),
 SC2_S_RT (5'-GTAGCATCCTTGATTTACCTTGCTTC-3'),
 SC2_RBD_D1 (5'-AAATCGCTCCAGGGCAA- ACT-3'),
 SC2_RBD_D6 (5'-TGCACTTGACCCTCTCTCAG-3'),
 SC2_RBD_R1 (5'-TGTGGATCACGGACAGCATC-3'),
 SC2_RBD_R6 (5'-ACACCTGTGCCTGTAAACCA-3'),
 SC2_Sm_D1 (5'-CACCAGCAACTGTTTGTGGAC-3'),
 SC2_Sm_R1 (5'-GCACCAAAGGTCCAACCAGA-3') и
 SC2_St_D1 (5'-ACGGCCTTACTGTTTTGCCA-3') — и клонировали в вектор pMD2-G по сайту рестрикции EcoRI.

Получение клеточных линий, гиперэкспрессирующих ACE2, и линий-продуцентов рекомбинантных белков. Плазмиды pSI-S-puro и pSI-RBD-puro использовали для химической трансфекции клеток линии HEK-293T. Трансфекцию проводили по протоколу, адаптированному из опубликованной ранее работы [11], в среде Opti-MEM ("Gibco", США). Через 24 ч среду меняли на свежую с добавлением 1 мкг/мл пурамицина и продолжали культивирование до получения устойчивой к селективному антибиотику культуры.

Плазмиды pLCMV-ACE2-puro и pLCMV-ACE2-His-puro использовали для лентивирусной трансдукции клеток HEK-293 и HEK-293T. Для приготовления препарата лентивируса 1×10^6 клеток HEK-293T высевали на культуральную чашку диаметром 10 см. На следующий день плазмиду pLCMV-ACE2-puro или pLCMV-ACE2-His-puro смешивали в весовом соотношении 5 : 3 : 2 (суммарная масса — 20 мкг) с упаковывающими плазмидами psPAX2 (#12260 Addgene plasmid; <http://n2t.net/addgene:12260>; RRID:Addgene_12260) и pMD2.G (#1225912259 Addgene plasmid; <http://n2t.net/addgene:12259>; RRID:Addgene_12259) (обе плазми-

ды были любезно предоставлены Didier Trono). Через сутки среду заменяли на бессывороточную — DMEM-F12 — с добавлением Serum replacement solution и Lipid mixture ("Peprotech", США) и 4 мМ кофеина ("Sigma-Aldrich", США). Через 48 ч обогащенную вирусом среду собирали, фильтровали, добавляли полибрен ("Sigma-Aldrich") до концентрации 10 мкг/мл и использовали для заражения клеток линии HEK-293T либо HEK-293, высаженных на чашку диаметром 10 см в количестве 5×10^5 клеток. Через сутки среду заменяли на обычную. Через 72 ч после заражения в среду добавляли пурамицин ("Sigma-Aldrich") до концентрации 1 мкг/мл и продолжали культивировать в течение 10 сут.

Наработка, выделение и очистка рекомбинантных белков. Для наработки рекомбинантных растворимых фрагментов S-белка (тримера эктодомена и RBD) и ACE2 клетки высевали на 6 культуральных чашек диаметром 15 см (в расчете 2.5×10^7 клеток/чашка) со средой DMEM-F12, в которую добавляли Serum replacement solution и Lipid mixture, и культивировали в стандартных условиях. Культуральную жидкость, содержащую

целевой белок, собирали через каждые четверо суток в течение 16 дней. После сбора из культуральной жидкости либо немедленно выделяли целевой белок, либо хранили ее при 4°C для объединения со следующей партией. Очистку рекомбинантных белков проводили с использованием HIS Mag Sepharose Excel (“Cytiva”, США) по протоколу производителя. После очистки образцы переводили в фосфатно-солевой буфер (PBS) на колонках PD-10 (“Cytiva”). Концентрацию белка измеряли на спектрофотометре Nanodrop OneC (“Thermo Fisher Scientific”, США) при длине волны 280 нм (OD_{280}). Качество препаратов оценивали по результатам электрофореза в полиакриламидном геле (10%-ный ПААГ в присутствии SDS) с окрашиванием Coomassie Blue G-250 по стандартному протоколу.

Постановка количественной ПЦР. Экспрессию ACE2 в клетках HEK-293-ACE2 и HEK-293T-ACE2 оценивали методом количественной ПЦР с использованием полимеразы HS-Taq (“Евроген”) и праймеров ACE2_qPCR_d1 (5'-GGGATCA-GAGATCGGAAGAAGAAA-3') и ACE2_qPCR_r1 (5'-GGAGGTCTGAACATCATCAGTG-3') (“ДНК-синтез”, Россия). Праймеры подбирали с использованием Primer-BLAST (NIH NCBI, США). Для анализа вторичной структуры праймеров использовали OligoAnalyzer Tool (IDT, США). Все эксперименты проводили в 6 независимых повторах. Представленность в образцах целевых транскриптов сравнивали с использованием метода порогового цикла (C_T). В качестве внутреннего контроля при проведении количественной ПЦР использовали уровень экспрессии гена *GAPDH*, относительно которого нормализовали показатели экспрессии целевых генов (ΔC_T). Изменения уровня экспрессии гена *ACE2* в образцах рассчитывали по формуле $2^{-\Delta C_{Te} - \Delta C_{Tk}}$, где ΔC_{Te} и ΔC_{Tk} — разницы значений пороговых циклов для *ACE2* и *GAPDH* соответственно [12, 13]. ПЦР проводили на приборе MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (“Bio-Rad”, США).

Иммунизация животных и получение генетического материала. В работе использовали животных семейства Верблюдовые — *Vicugna pacos* (альпаки). Для первичной иммунизации использовали гомотенную суспензию, содержащую внеклеточную часть тримера S-белка или полный RBD в концентрации 600 мкг в 500 мкл PBS и 500 мкл полного адьюванта Фрейнда (“Pierce”, США). Для бустирования использовали 400 мкг того же рекомбинантного белка в 500 мкл PBS, в смеси с 500 мкл неполного адьюванта Фрейнда. Всего было проведено три бустирования с интервалом в две недели; антигены вводили подкожно и внутримышечно в бедро животного. При каждой иммунизации у животных брали по 10 мл венозной крови, отделяли сыворотку и хранили при темпе-

ратуре 4°C для последующего определения сывороточной концентрации антител к S-белку.

Забор крови для выделения генетического материала проводили через 5 суток после третьего бустирования. Фракции мононуклеарных клеток периферической крови получали из 100 мл свежесобранной крови центрифугированием в фиколе плотностью 1.077 г/см³ (“ПанЭко”) согласно стандартному протоколу.

Предварительный отбор В-лимфоцитов. Препарат тримерного эктодомена S-белка конъюгировали с NHS-LC-biotin (“Covachem”, США) по стандартному протоколу. Биотинилированный препарат использовали для магнитной сепарации В-лимфоцитов при помощи EasySep Biotin Positive Selection Kit II (“Stemcell Technologies”, Канада) согласно протоколу производителя. Для выделения РНК из селектированной фракции клеток использовали соосаждитель Satellite red (“Евроген”).

Сборка библиотек последовательностей, кодирующих нанотела. Для приготовления библиотек использовали кДНК, полученную в 8 независимых реакциях — в каждой из них использовали по 500 нг мРНК. Амплификацию целевых последовательностей проводили с использованием высокоточной полимеразы Tersus (“Евроген”) и праймеров: AlpVHH3_uni_fwd (5'-CCACCATGTCTAGASAGKTGCAGSTSGTRGAGTCTGKGGGAGG-3'), AlpVHH_R1 (5'-AATCCGGATCCGGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3') и AlpVHH_R2 (5'-AATCCGGATCCGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3') (последние два сконструированы на основании последовательностей, опубликованных ранее [14]) — по следующей программе: 30 с при 95°C, 30 с при 61°C, 30 с при 72°C (30 циклов). Фагмидную библиотеку получали клонированием амплифицированных VHH-последовательностей в фагмиду pHEN2-XB с использованием эндонуклеаз XbaI и BamHI-HF и ElectroLigase (“NEB”). Трансформацию клеток *Escherichia coli*, штамм TG-1, проводили с помощью электропоратора Genepulser (“Bio-Rad”). Селекцию проводили по опубликованному ранее протоколу [15] с использованием антигена, иммобилизованного на иммунологических пробирках Maxibinding (“SPL Lifesciences”, Корея). Для элюции связавшихся с антигеном фаговых частиц использовали 100 мМ водный раствор триэтиламина. В элюат сразу вносили 1/2 объема 1 М Трис-HCl (pH 7.4). Амплификацию выделенных фаговых частиц, а также оставшихся связанными с иммобилизованным антигеном проводили путем последующего заражения экспоненциально растущей культуры клеток *E. coli* TG-1.

Экспрессия и очистка биотинилированных вариантов кандидатных нанотел. Последовательности VHH-фрагментов из препаратов фагмид, полученных из индивидуальных клонов после селек-

ции, клонировали по сайтам XbaI и BamHI в экспрессионный вектор pET-BAD. Полученные конструкции трансформировали в клетки штамма BL21DE3-BirA, экспрессирующие биотинлигазу. Индивидуальные колонии использовали для получения растворимого белка в жидкой среде в соответствии с описанным ранее протоколом [16] с добавлением в среду для культивации 0.2 mM D-биотина ("Covachem"). Растворимые нанотела выделяли из периплазмы путем лизиса осажденных бактерий в буфере, содержащем 50 mM Трис-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.1% Triton X-100 и 10 мг/мл лизоцима, с добавлением PMSF, трехкратной обработкой на ультразвуковом дезинтеграторе Soniprep-100 ("Soniprep", США) с последующей очисткой на HIS Mag Sepharose Excel ("Cytiva") и переводом в PBS.

Иммуноферментный анализ (ИФА). Содержание антител в сыворотках животных определяли методом ИФА по стандартному протоколу. Для этого 96-луночные планшеты ("SPL Lifesciences") сенсibilizировали полученным ранее тримерным эктодоменом S-белка SARS-CoV-2 в концентрации 5 мкг/мл, вносили образцы сывороток животных и обрабатывали поликлональными овечьими антителами, специфичными к IgG альпаки (получены ранее в нашей лаборатории). Для детекции использовали меченные пероксидазой хрена (HRP) поликлональные ослиные антитела против IgG овцы ("Santa Cruz", США).

Оценку обогащения библиотек целевыми вариантами нанотел в ходе селекции проводили по опубликованному ранее протоколу [15]. Лунки планшета сенсibilizировали тримерным эктодоменом S-белка (5 мкг/мл), для детекции использовали HRP-меченные моноклональные антитела к фагу M13 11973-MM05T-H ("Sino Biological", Китай).

При проведении прямого ИФА с нанотелами планшеты также покрывали S-белком и обрабатывали нанотелами в концентрации 1 мкг/мл. Детекцию проводили с использованием биотинилированных антител к эпиту Mус ("СайСторЛаб", Россия) и стрептавидина, конъюгированного с HRP ("R&D Systems", США), а для биотинилированных нанотел — напрямую с HRP-конъюгированным стрептавидином. Непрямой ИФА с нанотелами проводили на планшетах, сенсibilizированных биотинилированным нанотелом-1 в концентрации 5 мкг/мл, а для детекции использовали биотинилированное нанотело-2 в концентрации 1 мкг/мл с последующей обработкой HRP-меченым стрептавидином.

Для постановки конкурентного ИФА лунки планшета сенсibilizировали рекомбинантным эктодоменом ACE2 в концентрации 5 мкг/мл и вносили смесь анализируемых нанотел (в различных концентрациях) с биотинилированным три-

мерным эктодоменом S-белка (конечная концентрация 1 мг/мл) в пропорции 1 : 1. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре в лунки планшета вносили HRP-меченый стрептавидин. В качестве субстрата использовали готовый раствор тетраметилбензидина ("Sigma-Aldrich"). Результаты регистрировали при длине волны 450 нм на микропланшетном сканере Triad ("Dy nex", США).

Измерение активности нанотел с помощью псевдовирального репортера. Для приготовления псевдовиральных частиц использовали векторную плазмиду pLCMV-luc-риго, кодирующую последовательность люциферазы светлячка. Приготовление лентивирусных частиц, псевдотипированных S-белком SARS-CoV-2, проводили по протоколу, описанному выше для лентивирусной трансдукции, за исключением того, что вместо упаковочной плазмиды pMD2.G использовали плазмиду pMD2-S. После сбора и фильтрации вирусосодержащей среды вирусные частицы концентрировали центрифугированием при 35000 g в течение 3 ч. Полученный осадок перерастворяли в среде DMEM-F12 ("PAA"), смешивали в пропорции 1 : 1 с исследуемыми нанотелами, растворенными в различных концентрациях в такой же питательной среде, и инкубировали смесь в течение 20 мин. После этого в смесь добавляли полибрен ("Sigma-Aldrich") до концентрации 5 мкг/мл и вносили в клетки линии HEK-293-ACE2 или HEK-293T-ACE2, которые за 24 ч до эксперимента высевали на 96-луночный планшет (1.2×10^4 клеток/лунка). Планшеты центрифугировали при 850 g в течение 3 ч при 37°C, заменяли псевдовирусосодержащую среду на обычную и культивировали клетки в течение 48 ч. Люминесцентный сигнал регистрировали с использованием Luciferase Assay System ("Promega", США) на микропланшетном сканере Triad ("Dy nex"). За 100% принимали величину люминесцентного сигнала в лунках с псевдовирусом без нанотел.

Биослойная интерферометрия. Для определения константы диссоциации (K_d) взаимодействия нанотел с тримерным эктодоменом S-белка использовали очищенные препараты биотинилированных нанотел и препарат экспонированного тримера S-белка. Определение проводили при помощи биосенсоров Streptavidin (SA) и прибора BLItz ("ForteBio", США). Для оценки перекрытия эпипептидов различных нанотел использовали пары "биотинилированное нанотело-1—небиотинилированное нанотело-2" и препарат рекомбинантного RBD. На биосенсор сорбировали биотинилированное нанотело-1, погружали биосенсор в раствор препарата RBD (1 мг/мл), отмывали и помещали в раствор нанотела-2 (1 мг/мл). Критерием, определяющим взаиморасположение эпипептидов, служила высота плато сигнала после добавления

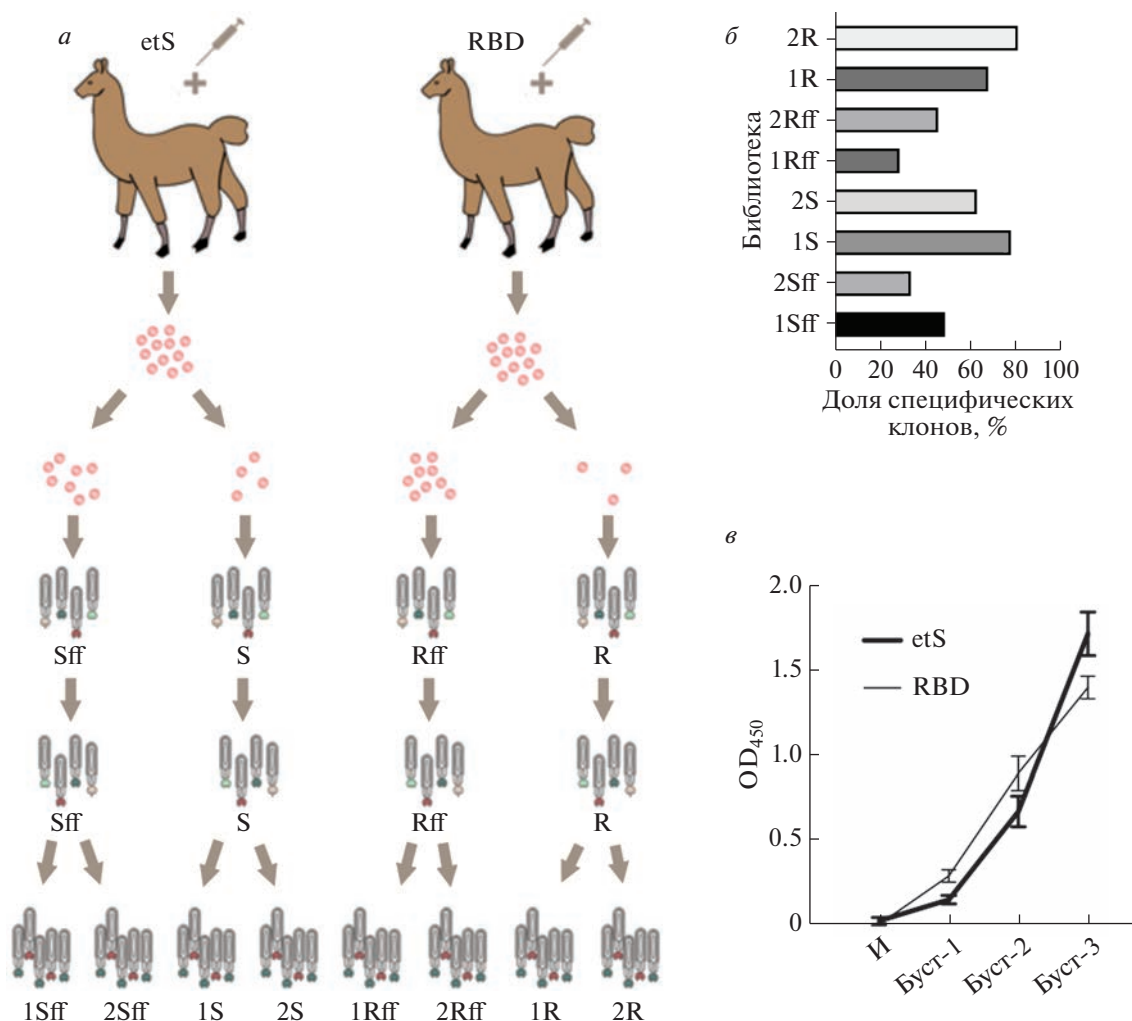


Рис. 1. Селекция нанотел из иммунных библиотек. *а* – Схема приготовления библиотек и проведения селекции. Sff, Rff – библиотеки, полученные из тотальных фракций периферических мононуклеаров животных; S и R приготовлены из селектированных с тримерным эктодоменом S-белка (etS) В-клеток. Под цифрой 1 (1S, 1R, 1Sff, 1Rff) приведены библиотеки, полученные после второго раунда селекции против RBD; под цифрой 2 (2S, 2R, 2Sff, 2Rff) – библиотеки после второго раунда селекции против S-белка. *б* – Доля специфических антител в каждой из библиотек после проведения селекции, определенная по результатам ИФА на единичных клонах. *в* – Специфическая активность сывороточных антител в крови животных на момент каждого из раундов иммунизации. И – иммунизация.

RBD и после отмытки от нанотела-2. В случае, когда оба плато были одинаковой высоты, считали, что эпитопы перекрываются; когда второе плато было выше первого, считали, что эпитопы отделены друг от друга. Для каждой пары нанотел эксперимент повторяли в прямой и обратной постановке.

Статистический анализ. Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета статистических программ Prism 8 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для конструирования иммунных библиотек использовали генетический материал, получен-

ный от двух иммунизированных альпак (*Vicugna pacos*). Для иммунизации одного из животных использовали тримерный эктодомен S-белка SARS-CoV-2 (Уханьский штамм), второго иммунизировали рекомбинантным RBD S-белка. После проведения четырехкратной иммунизации и достижения высоких уровней сывороточных антител против S-белка по данным ИФА (рис. 1в) у животных проводили забор периферической крови и выделяли субфракции мононуклеарных клеток, связывающихся с иммуобилизованным на микроносителях S-белком. Помимо отобранных с помощью селекции фракций В-клеток для создания библиотек использовали и тотальные фракции периферических мононуклеаров. Дальнейшую селекцию проводили в два раунда, при-

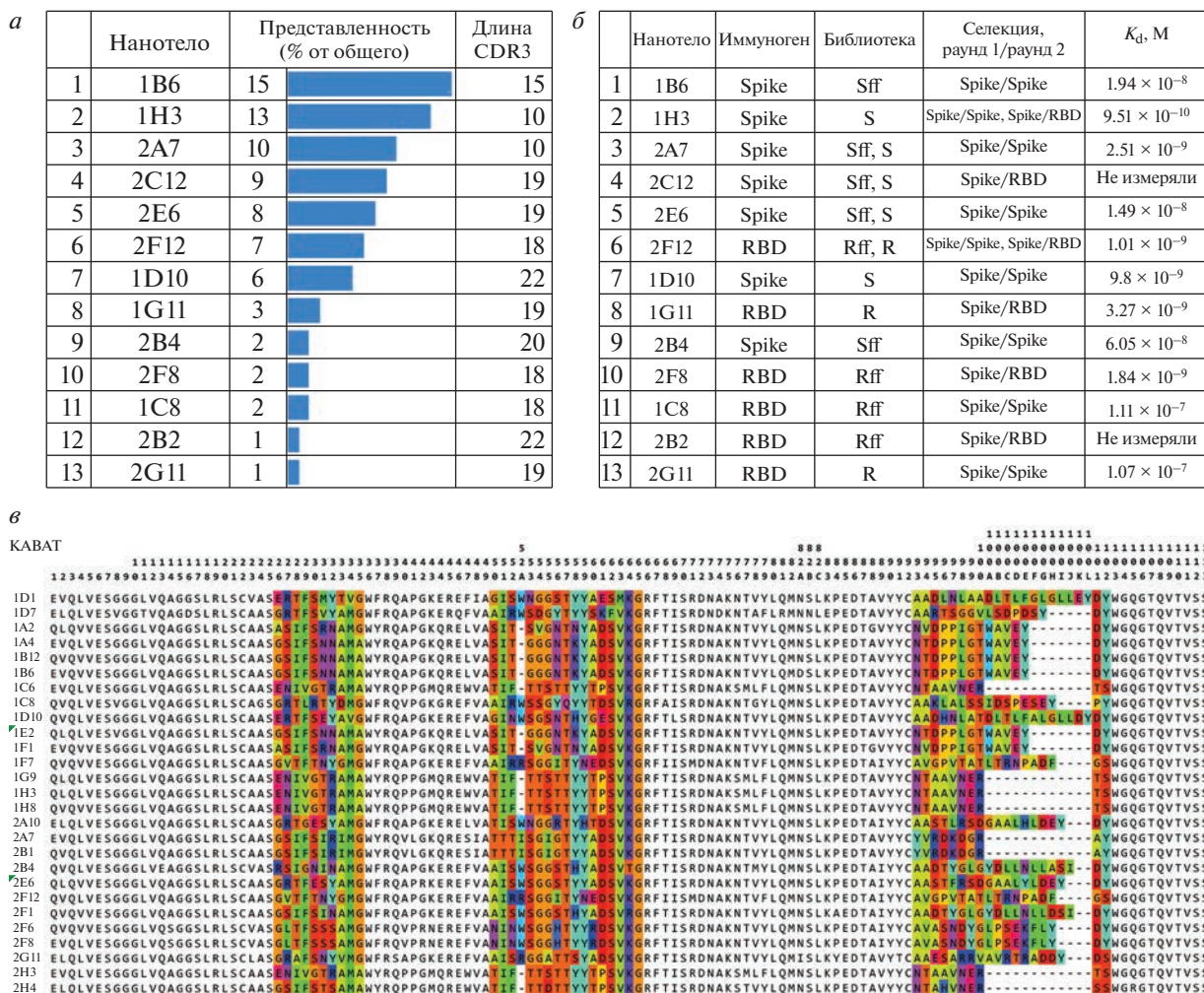


Рис. 2. Характеристики отобранных нанотел. *а* – Перечень наиболее распространенных последовательностей нанотел. Длина варибельных областей (CDR) приведена в виде числа аминокислотных остатков. *б* – Общая характеристика полученных нанотел: иммуноген, в ответ на который сформировалось нанотело; исходная библиотека, в которой оно было обнаружено; мишени, использованные для селекции на первом и втором раундах, и константа диссоциации для растворимого варианта нанотела. *в* – Выравнивание аминокислотных последовательностей нанотел. Сверху – нумерация по Кабату; цветом выделены аминокислоты, входящие в CDR.

чем для второго раунда использовали в параллели либо тримерный эктодомен S-белка, либо RBD. Схема процесса селекции приведена на рис. 1а. По окончании селекции в каждой из библиотек оценивали долю клонов, специфически связывающихся с эктодомом S-белка. Установлено, что наибольшая доля специфических клонов выявлена в библиотеках 2R и 1S. Наименьшее число релевантных вариантов нанотел содержали библиотеки, полученные из тотальных фракций периферических мононуклеаров (рис. 1б). Это означает, что предварительная селекция В-клеток на иммобилизованном антигене позволяет избираться от нецелевых последовательностей, которые иначе продолжают контаминировать смесь бактериофагов даже после проведения двух раундов селекции. Кроме того, использование в качестве мишени для селекции альтернативной фор-

мы целевого белка (эктодомена S-белка в случае RBD-библиотеки или RBD для библиотеки, полученной от животного, иммунизированного эктодомом S-белка) позволяет добиться большей представленности релевантных последовательностей за счет обеднения вариантов, распознающих недоступные эпитопы.

Рестрикционное картирование индивидуальных клонов нанотел, связывающихся с S-белком, и последующее выборочное секвенирование представителей каждого типа показало, что в библиотеках 1S, 2S, 1R и 2R доминируют 13 семейств последовательностей. Представленность каждого из них варьировала от единственной копии до 15% от всех проанализированных клонов, а длина наиболее варибельных областей (CDR3) – от 10 до 22 аминокислотных остатков (рис. 2а). Структура нанотел была характерной для пред-

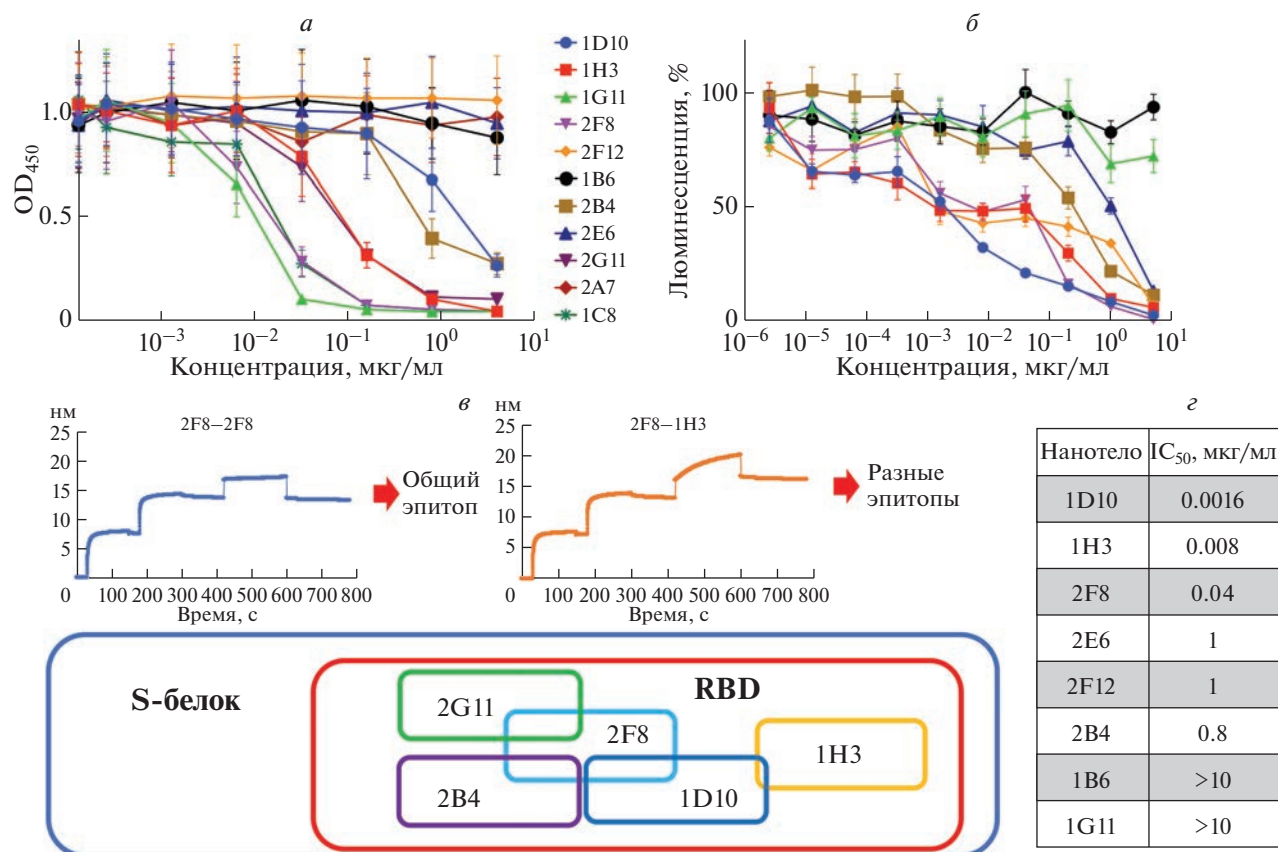


Рис. 3. Функциональная активность отобранных нанотел и эпитопное картирование. *а* – Результаты конкурентного ИФА на эктодомен ACE2 с отобранными нанотелами; детекция – по биотинилированному эктодомену S-белка. *б* – Ингибирование нанотелами трансдукции чувствительных клеток репортерными псевдовирuсами. За 100% принят люминесцентный сигнал в контрольных лунках (без добавления нанотел). *в* – Пример анализа на перекрывание эпитопов связывания для двух нанотел (2F8–2F8 – общий эпитоп; 2F8–1H3 – различные эпитопы) и схематическое изображение взаимного расположения эпитопов, распознаваемых нанотелами. *г* – Ингибирование нанотелами трансдукции клеточной линии HEK-293T-ACE2 репортерными псевдовирuсами.

ставителей Верблюдовых Нового света; однако наличие дополнительной дисульфидной связи, как отличительной особенности состоящих из тяжелых цепей антител Верблюдовых, было выявлено только у одного варианта – 2B2 (50С–100С). Сравнение последовательностей различных семейств нанотел приведено на рис. 2в.

Представители каждого из отобранных семейств нанотел были экспрессированы в свободной форме и исследованы методом биослойной интерферометрии для определения степени сродства к S-белку и специфичности такого взаимодействия (рис. 2б). Наиболее сильное связывание было зафиксировано для варианта 1H3 ($K_d = 9.51 \times 10^{-10}$ М), а наименьшее – для варианта 2G11 ($K_d = 1.07 \times 10^{-7}$ М). Все проанализированные варианты характеризовались минимальной фоновой активностью в тесте с клеточными лизатами.

Для анализа ингибиторной активности отобранных вариантов в отношении взаимодействия S-белка с ACE2 был использован конкурентный

формат ИФА. При оценке активности нанотел в диапазоне концентраций от 5 мкг/мл до 2.5 пг/мл показано, что варианты 1G11, 1C8, 2F8, 2G11, 1H3, 2B4 и 1D10 блокируют взаимодействие S-белка с ACE2, причем наименьшие концентрации требовались для вариантов 1G11, 1C8 и 2F8, а наибольшая – для 1D10 (рис. 3а). Все другие проанализированные нанотела (2A7, 2E6, 2F12, 1B6) заметной ингибиторной активностью не обладали. С целью верифицировать релевантность полученных результатов на модели, более приближенной к естественным условиям вирусной инфекции, мы получили клеточную линию HEK-293T-ACE2, экспрессирующую на плазматической мембране белок ACE2, и конструкцию pMD2-Swt, кодирующую полноразмерную последовательность S-белка. Используя эту конструкцию, мы получили лентивирусные частицы, псевдотипированные S-белком и несущие репортерный ген люциферазы. Варианты нанотел, сработавшие в конкурентном ИФА, были проанализированы на способность подавлять инфекцию чувствитель-

ных клеток линии НЕК-293Т-ACE2 репортерсодержащими псевдовиральными частицами. Показано, что варианты 1D10, 1H3, 2F8, 2F12, 2B4 и 2E6 блокируют трансдукцию клеток псевдовиральными. Лучшим ингибитором в этом случае оказался вариант 1D10 — с 50%-ной концентрацией ингибирования (IC_{50}) 0.0016 мкг/мл, а самыми слабыми были варианты 2E6 и 2F12 (IC_{50} = 1 мкг/мл). Нанотела 1G11 и 1B6 не ингибировали трансдукцию (рис. 3б и 3г).

С целью определить, связываются ли отобранные нанотела с каким-то одним эпитопом в составе S-белка либо их области связывания не перекрываются, мы провели эксперимент с парным эпитопным картированием. Для этого на биосенсор BLI сорбировали первое нанотело и регистрировали сигнал, после чего сенсор обрабатывали эктодоменом S-белка либо RBD, а затем вторым нанотелом. В том случае, когда обработка вторым нанотелом приводила к увеличению сигнала, считали, что все три белка сохраняют связь с сенсором. Следовательно, анализируемые нанотела связываются с разными эпитопами S-белка. В том случае, когда сигнал сохранялся на прежнем уровне либо снижался, считали, что эпитопы исследуемых нанотел перекрываются. На основании полученных данных построена схематичная карта расположения эпитопов нейтрализующих нанотел. Все варианты нанотел связывались с доменом RBD, причем эпитоп нанотела 2F8 частично перекрывался с эпитопами 2G11, 2B4 и 1D10, которые при этом взаимно не перекрывались; а эпитоп варианта 1H3 незначительно перекрывался только с эпитопом 1D10 (рис. 3в).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

При сравнении эффективности проведения селекции из библиотек, полученных с использованием и без использования процедуры обогащения В-клеточной фракции целевыми последовательностями, можно заключить, что ее введение повышает выход релевантных последовательностей и снижает контаминацию выходных пулов неспецифическими вариантами нанотел. Для проведения обеих стадий селекции использовали более интенсивные, чем обычно, режимы отмывки, что теоретически должно снижать влияние селекции В-клеток за счет быстрого удаления несвязавшихся бактериофагов [17], однако различия в содержании целевых клонов между библиотеками сохранились на достаточно высоком уровне. На основании этого можно сделать вывод, что обогащение целевыми В-клетками перед приготовлением библиотеки позволяет снизить трудозатраты и быстро получить высокоспецифичные нанотела против мишени. Вместе с тем, в библиотеках, полученных из тотальной фракции мононуклеаров, помимо примесных, по-видимо-

му, сохранялось большее разнообразие редких целевых последовательностей нанотел [18], что позволило получить из них варианты, обладающие высоким сродством к S-белку и хорошей нейтрализующей активностью (например, 2F8). Сравнивая результаты проведенной нами селекции с полученными другими авторами [19–24], можно отметить их хорошую сходимость. Так, при селекции нанотел к SARS-CoV-2 из синтетических библиотек [22], либо с использованием глубокого секвенирования последовательностей между раундами селекции [23], либо с применением бактериального дисплея [24] максимальные значения аффинности находились в нижнем наномолярном или субнаномолярном диапазоне, что примерно соответствует характеристикам нанотел, полученных нами. Это подтверждает, что использование обогащения В-клеточной фракции позволяет ускорить получение высокоспецифичных нанотел без снижения качества по сравнению с другими методами селекции.

Оба варианта использованных антигенов обладали высокой иммуногенностью в организме альпак, а высокое содержание специфически связывающихся с ними клонов нанотел уже после двух раундов селекции может быть обусловлено тем, что в ходе отбора чередовали использование S-белка и RBD. При анализе структуры отобранных нанотел следует обратить внимание на низкую частоту возникновения характерной для тяжелоцепочечных антител Верблюдовых дополнительной дисульфидной связи, что может быть связано с особенностями наиболее иммуногенных эпитопов в структуре белка. Это может затруднить использование этих нанотел в качестве лекарственных средств, для которых важны такие показатели как устойчивость к агрегированию и высокая стабильность в широком диапазоне температур [25].

Сравнивая результаты тестирования отобранных нанотел в конкурентном ИФА и в тесте с репортерными псевдовиральными частицами, мы пришли к заключению, что применение ИФА позволяет с высокой долей вероятности предсказать наличие биологической активности нанотел и в тестах *in vivo*, так как этот метод нечувствителен к побочным факторам и определяет только взаимодействие между S-белком и его мишенью — ACE2. При этом следует учитывать, что конкурентный ИФА не позволяет выявлять нанотела, нейтрализующие вирус иным образом, например за счет блокирования конформации S-белка в неактивированной форме, что препятствует слиянию мембран вируса и клетки [26]. Мы предполагаем, что именно этим эффектом можно объяснить результаты, полученные при измерении активности нанотел 2E6 и 2F12: неактивные в конкурентном ИФА, они блокировали трансдукцию чувствительных клеток репортерными псев-

довirusными частицами. В целом, по результатам проведенной работы, для дальнейших исследований — с целью создания терапевтического препарата — логично выбрать наиболее активные нанотела: 1D10, 1H3 и 2F8, — для которых получены наименьшие значения IC_{50} как в конкурентном ИФА, так и в тесте с псевдовиральными частицами.

Эпитопы, с которыми связываются отобранные нанотела, различаются и перекрываются на небольших областях. Это повышает вероятность того, что как минимум часть идентифицированных нанотел сохранит свою активность и в отношении мутантных вариантов S-белка, в частности B.1.617.2 и B.1.1.529. Мы считаем, что наибольшей терапевтической эффективностью будет обладать коктейль из нескольких вариантов нанотел [27]. Это позволит перекрыть широкий спектр эпитопов SARS-CoV-2 и нейтрализовать появляющиеся эволюционные варианты вируса без необходимости изменять формулу лекарственного средства [28]. Малый размер нанотел, их физико-химические свойства и возможность быстрого получения — эти факторы позволяют надеяться на применение такого коктейля в ингаляционной форме [29]. Это важно для быстрой доставки препарата к цели — в клетки легочного эпителия [30]. Такой способ введения обеспечит быстрое достижение терапевтического эффекта на ранней стадии заражения, а также позволит применять препарат в профилактических целях.

При помощи селекции В-клеток перед сборкой фагмидных библиотек и чередования антигенов в ходе отбора нам удалось получить панель нейтрализующих нанотел к S-белку SARS-CoV-2, которые эффективно ингибируют взаимодействие между S-белком и его клеточным рецептором — ACE2. Полученные нанотела с высокой аффинностью и специфичностью связываются с разными эпитопами в области RBD S-белка SARS-CoV-2. Терапевтическое применение коктейля таких нанотел можно рассматривать как потенциальное противовирусное средство, эффективное в отношении вновь появляющихся вариантов вируса SARS-CoV-2, быстро эволюционирующего в человеческой популяции.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-04-60488.

Все манипуляции, проведенные с животными, соответствовали этическим стандартам, сформулированным в Хельсинкской декларации и принятой практике проведения таких процедур.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pidiyar V., Kumraj G., Ahmed K., Ahmed S., Shah S., Majumder P., Verma B., Pathak S., Mukherjee S.

- (2022) COVID-19 management landscape: a need for an affordable platform to manufacture safe and efficacious biotherapeutics and prophylactics for the developing countries. *Vaccine*. **40**, 5302–5312.
2. Zhou D., Zhou R., Chen Z. (2022) Human neutralizing antibodies for SARS-CoV-2 prevention and immunotherapy. *Immunother. Adv.* **2**, Itab027.
3. Miguez-Rey E., Choi D., Kim S., Yoon S., Sandulescu O. (2022) Monoclonal antibody therapies in the management of SARS-CoV-2 infection. *Expert Opin. Investig. Drugs*. **31**, 41–58.
4. Liu L., Iketani S., Guo Y., Chan J.F., Wang M., Liu L., Luo Y., Chu H., Huang Y., Nair M.S., Yu J., Chik K.K., Yuen T.T., Yoon C., To K.K., Chen H., Yin M.T., Sobieszczyk M.E., Huang Y., Wang H.H., Sheng Z., Yuen K.Y., Ho D.D. (2022) Striking antibody evasion manifested by the Omicron variant of SARS-CoV-2. *Nature*. **602**, 676–681.
5. Planas D., Saunders N., Maes P., Guivel-Benhassine F., Planchais C., Buchrieser J., Bolland W.H., Porrot F., Staropoli I., Lemoine F., Pere H., Veyer D., Puech J., Rodary J., Baele G., Dellicour S., Raymenants J., Gorissen S., Geenen C., Vanmechelen B., Wawina-Bokalanga T., Marti-Carreras J., Cuypers L., Seve A., Hocqueloux L., Prazuck T., Rey F.A., Simon-Loriere E., Bruel T., Mouquet H., Andre E., Schwartz O. (2022) Considerable escape of SARS-CoV-2 Omicron to antibody neutralization. *Nature*. **602**, 671–675.
6. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. (1993). Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. **363**, 446–448.
7. Тиллиб С.В. (2020) Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине. *Молекулярная биология*. **54**(3), 362–373.) <https://doi.org/10.31857/S0026898420030167>
8. Huo J., Le Bas A., Ruza R.R., Duyvesteyn H.M.E., Mikolajek H., Malinauskas T., Tan T.K., Rijal P., Dumoux M., Ward P.N., Ren J., Zhou D., Harrison P.J., Weckener M., Clare D.K., Vogirala V.K., Radecke J., Moynie L., Zhao Y., Gilbert-Jaramillo J., Knight M.L., Tree J.A., Buttigieg K.R., Coombes N., Elmore M.J., Carroll M.W., Carrique L., Shah P.N.M., James W., Townsend A.R., Stuart D.I., Owens R.J., Naismith J.H. (2020) Neutralizing nanobodies bind SARS-CoV-2 spike RBD and block interaction with ACE2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **27**, 846–854.
9. Zost S.J., Gilchuk P., Chen R.E., Case J.B., Reidy J.X., Trivette A., Nargi R.S., Sutton R.E., Suryadevara N., Chen E.C., Binshtein E., Shrihari S., Ostrowski M., Chu H.Y., Didier J.E., MacRenaris K.W., Jones T., Day S., Myers L., Eun-Hyung Lee F., Nguyen D.C., Sanz I., Martinez D.R., Rothlauf P.W., Bloyet L.M., Whelan S.P.J., Baric R.S., Thackray L.B., Diamond M.S., Carnahan R.H., Crowe J.E., Jr. (2020) Rapid isolation and profiling of a diverse panel of human monoclonal antibodies targeting the SARS-CoV-2 spike protein. *Nat. Med.* **26**, 1422–1427.
10. Amanat F., Stadlbauer D., Strohmaier S., Nguyen T.H.O., Chromikova V., McMahon M., Jiang K., Arunkumar G.A., Jurczyszak D., Polanco J., Bermudez-Gonzalez M., Kleiner G., Aydllo T., Miorin L., Fierer D.S., Lugo L.A., Kojic E.M., Stoeve J., Liu S.T.H., Cun-

- ningham-Rundles C., Felgner P.L., Moran T., Garcia-Sastre A., Caplivski D., Cheng A.C., Kedzierska K., Vapalahti O., Hepojoki J.M., Simon V., Krammer F. (2020) A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. *Nat. Med.* **26**, 1033–1036.
11. Fukumoto Y., Obata Y., Ishibashi K., Tamura N., Kikuchi I., Aoyama K., Hattori Y., Tsuda K., Nakayama Y., Yamaguchi N. (2010) Cost-effective gene transfection by DNA compaction at pH 4.0 using acidified, long shelf-life polyethylenimine. *Cytotechnology*. **62**, 73–82.
 12. Ginestier C., Cervera N., Finetti P., Esteyries S., Esterni B., Adelaide J., Xerri L., Viens P., Jacquemier J., Charafe-Jauffret E., Chaffanet M., Birnbaum D., Bertucci F. (2006) Prognosis and gene expression profiling of 20q13-amplified breast cancers. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4533–4544.
 13. Pfaffl M.W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45.
 14. Maass D.R., Sepulveda J., Pernthaner A., Shoemaker C.B. (2007) Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs). *J. Immunol. Methods*. **324**, 13–25.
 15. Benhar I., Reiter Y. (2002) Phage display of single-chain antibody constructs. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 10, Unit 10 19B.
<https://doi.org/10.1002/0471142735.im1019bs48>
 16. Studier F.W. (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr. Purif.* **41**, 207–234.
 17. Ch'ng A.C.W., Ahmad A., Konthur Z., Lim T.S. (2019) A high-throughput magnetic nanoparticle-based semi-automated antibody phage display biopanning. *Methods Mol. Biol.* **1904**, 377–400.
 18. Yuan T.Z., Garg P., Wang L., Willis J.R., Kwan E., Hernandez A.G.L., Tuscano E., Sever E.N., Keane E., Soto C., Mucker E.M., Fouch M.E., Davidson E., Doranz B.J., Kailasan S., Aman M.J., Li H., Hooper J.W., Saphire E.O., Crowe J.E., Liu Q., Axelrod F., Sato A.K. (2022). Rapid discovery of diverse neutralizing SARS-CoV-2 antibodies from large-scale synthetic phage libraries. *mAbs*. **14**, 2002236.
 19. Favorskaya I.A., Shchelyakov D.V., Esmagambetov I.B., Dolzhikova I.V., Alekseeva I.A., Korobkova A.I., Voronina D.V., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Kovyryshina A.V., Iliukhina A.A., Botikov A.G., Voronina O.L., Egorova D.A., Zubkova O.V., Ryzhova N.N., Aksanova E.I., Kunda M.S., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. (2022) Single-domain antibodies efficiently neutralize SARS-CoV-2 variants of concern. *Front. Immunol.* **13**, 822159.
 20. Ye G., Gallant J., Zheng J., Massey C., Shi K., Tai W., Odle A., Vickers M., Shang J., Wan Y., Du L., Aihara H., Perlman S., LeBeau A., Li F. (2021) The development of *Nanosota-1* as anti-SARS-CoV-2 nanobody drug candidates. *Elife*. **10**, e64815.
<https://doi.org/10.7554/eLife.64815>
 21. Maeda R., Fujita J., Konishi Y., Kazuma Y., Yamazaki H., Anzai I., Watanabe T., Yamaguchi K., Kasai K., Nagata K., Yamaoka Y., Miyakawa K., Ryo A., Shirakawa K., Sato K., Makino F., Matsuura Y., Inoue T., Imura A., Namba K., Takaori-Kondo A. (2022) A panel of nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants including Omicron. *Commun. Biol.* **5**, 669.
 22. Custodio T.F., Das H., Sheward D.J., Hanke L., Pazicky S., Pieprzyk J., Sorgenfrei M., Schroer M.A., Gruzinov A.Y., Jeffries C.M., Graewert M.A., Svergun D.I., Dobrev N., Remans K., Seeger M.A., McInerney G.M., Murrell B., Hallberg B.M., Low C. (2020) Selection, biophysical and structural analysis of synthetic nanobodies that effectively neutralize SARS-CoV-2. *Nat. Commun.* **11**, 5588.
 23. Hanke L., Vidakovic Perez L., Sheward D.J., Das H., Schulte T., Moliner-Morro A., Corcoran M., Achour A., Karlsson Hedestam G.B., Hallberg B.M., Murrell B., McInerney G.M. (2020) An alpaca nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by blocking receptor interaction. *Nat. Commun.* **11**, 4420.
 24. Valenzuela Nieto G., Jara R., Watterson D., Modhiran N., Amarilla A.A., Himelreichs J., Khromykh A.A., Salinas-Rebolledo C., Pinto T., Cheuquemilla Y., Margolles Y., Lopez Gonzalez Del Rey N., Miranda-Chacon Z., Cuevas A., Berking A., Deride C., Gonzalez-Moraga S., Mancilla H., Maturana D., Langer A., Toledo J.P., Muller A., Uberti B., Krall P., Ehrenfeld P., Blesa J., Chana-Cuevas P., Rehren G., Schwefel D., Fernandez L.A., Rojas-Fernandez A. (2021) Potent neutralization of clinical isolates of SARS-CoV-2 D614 and G614 variants by a monomeric, sub-nanomolar affinity nanobody. *Sci. Rep.* **11**, 3318.
 25. Kunz P., Zinner K., Mucke N., Bartoschik T., Muyltermans S., Hoheisel J.D. (2018) The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance. *Sci. Rep.* **8**, 7934.
 26. Rossey I., Gilman M.S., Kabeche S.C., Sedeyn K., Wrapp D., Kanekiyo M., Chen M., Mas V., Spitaels J., Melero J.A., Graham B.S., Schepens B., McLellan J.S., Saelens X. (2017) Potent single-domain antibodies that arrest respiratory syncytial virus fusion protein in its prefusion state. *Nat. Commun.* **8**, 14158.
 27. Touret F., Baronti C., Pastorino B., Villarreal P.M.S., Ninove L., Nougaiere A., de Lamballerie X. (2022) *In vitro* activity of therapeutic antibodies against SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.2 and BA.5. *Sci. Rep.* **12**, 12609.
 28. Hwang Y.C., Lu R.M., Su S.C., Chiang P.Y., Ko S.H., Ke F.Y., Liang K.H., Hsieh T.Y., Wu H.C. (2022) Monoclonal antibodies for COVID-19 therapy and SARS-CoV-2 detection. *J. Biomed. Sci.* **29**(1), 1.
 29. Piepenbrink M.S., Park J.G., Oladunni F.S., Deshpande A., Basu M., Sarkar S., Loos A., Woo J., Lovanti P., Sloan D., Ye C., Chiem K., Bates C.W., Burch R.E., Erdmann N.B., Goepfert P.A., Truong V.L., Walter M.R., Martinez-Sobrido L., Kobia J.J. (2021) Therapeutic activity of an inhaled potent SARS-CoV-2 neutralizing human monoclonal antibody in hamsters. *Cell Rep. Med.* **2**, 100218.
 30. Lu J., Yin Q., Pei R., Zhang Q., Qu Y., Pan Y., Sun L., Gao D., Liang C., Yang J., Wu W., Li J., Cui Z., Wang Z., Li X., Li D., Wang S., Duan K., Guan W., Liang M., Yang X. (2022) Nasal delivery of broadly neutralizing antibodies protects mice from lethal challenge with SARS-CoV-2 delta and omicron variants. *Virol. Sin.* **37**, 238–247.

Development of a Series of Neutralizing Nanobodies against SARS-CoV-2 Spike Protein

V. A. Zhuchkov¹, S. V. Ivanov¹, J. E. Kravchenko¹, and S. P. Chumakov^{1, *}

¹*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997 Russia*

**e-mail: hathkul@gmail.com*

Countering the spread of new respiratory infections and reducing the damage they cause to society requires efficient strategies for rapid development of targeted therapeutics, such as monoclonal antibodies. Nanobodies, defined as variable fragments of heavy-chain camelid antibodies, have a set of characteristics that make them particularly convenient for this purpose. The speed at which the SARS-CoV-2 pandemic had spread has confirmed that a key factor in the development of therapeutics is obtaining highly effective blocking agents as soon as possible, as well as the diversity of epitopes to which these agents bind. We have optimized the process of selection of blocking nanobodies from the genetic material of camelids and obtained a panel of nanobody structures with affinity to spike protein in the lower nanomolar and picomolar ranges and high binding specificity. The subset of nanobodies that demonstrate the ability to block the interaction between the spike protein and the cellular ACE2 receptor was selected in experiments *in vitro* and *in vivo*. It has been established that the epitopes bound by the nanobodies are located in the RBD domain of the spike protein and have little overlap. The diversity of binding regions may allow the mixture of nanobodies to retain potential therapeutic efficacy towards new variants of the spike protein, and the structural features of nanobodies, in particular, their compact size and high stability, indicate the possibility of their utilization in the form of aerosols.

Keywords: nanobodies, SARS-CoV-2, spike protein, RBD, ACE2, neutralizing antibodies, monoclonal antibody, immunotherapy