Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и
Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

На правах рукописи

Жучков Владислав Александрович

Нанотела в качестве инструмента контроля развития вирусной инфекции

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Научный руководитель:
Кандидат биологических наук
Чумаков Степан Петрович

Москва, 2026 г.

Оглавление

Введение **9**
1. Обзор литературы **15**
1.1. Применение нанотел 15
1.1.1. Структура и свойства нанотел 15
1.1.1.1. Структура нанотела 15
1.1.1.2. Свойства нанотел 17
1.1.2. Применение нанотел 18
1.1.2.1. Использование нанотел в диагностике и исследованиях. 19
1.1.2.2. Методы визуализации с использованием нанотел 20
1.1.2.3. Применение нанотел в терапии заболеваний 23
1.1.2.3.1. Нанотела в терапии рака 23
1.1.2.3.2. Нанотела в CAR-T терапии 28
1.1.2.3.3. Нанотела и естественные киллеры 32
1.1.2.3.4. Нанотела и макрофаги 33
1.1.2.3.5. Нанотела в заболеваниях лёгких 35
1.1.2.3.6. Нанотела в заболеваниях ЦНС 35
1.1.2.3.7. Нанотела в инфекционных заболеваниях 36
1.1.2.3.8. Нанотела против токсинов и ядов 37
2. Материалы и методы **38**
2.1. Иммунизация животных 38
2.2. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови 38
2.2.1. Предварительный отбор В-лимфоцитов. 38
2.3. Работа с нуклеиновыми кислотами 39
2.3.1. Выделение суммарной РНК 39
2.3.2. ПЦР с обратной транскрипцией 39
2.3.3. ПЦР 39

2.3.4. Количественная ПЦР 40
2.3.5. Дизайн праймеров и зондов 40
2.3.6. Горизонтальный электрофорез в агарозном геле 40
2.3.7. Вертикальный электрофорез нуклеиновых кислот 41
2.3.8. Лигирование ДНК 41
2.3.9. Выделение ДНК из агарозного геля и реакционной смеси 41
2.3.10. Ферментативный гидролиз 41
2.3.11. Наработка плазмид 42
2.4. Конструирование экспрессионных плазмид 42
2.4.1. Конструирование плазмиды для экспрессии полноразмерного S-белка 42
2.4.2. Экспрессия ACE2, S-белка и RBD 43
2.4.3. Экспрессия PD1 44
2.4.4. Лентивирусные векторы для экспрессии 44
2.4.5. Упаковочные плазмиды 44
2.4.6. Плазмиды для ретаргетирования лентивируса 45
2.4.7. Экспрессия псевдорецептора на основе VHH 46
2.4.8. Конструкции для сайленсинга FOXP3 46
2.4.9. Белки с BAD 47
2.4.10. Белки с LPETG 48
2.4.11. Другие белки 48
2.4.12. Димерные конструкции 48
2.5. Работа с белковыми препаратами 49
2.5.1. Очистка белковых препаратов из бактериальных культур 49
2.5.1.1. Металл-хелатная аффинная хроматография 49

2.5.1.2. Гель-фильтрация 50
2.5.1.3. Ультрафильтрация 50
2.5.1.4. Диализ 50
2.5.1.5. Катионная хроматография 51
2.5.1.6. Смена буфера 51
2.5.2. Электрофорез белков 51
2.5.3. Вестерн-блот 52
2.5.4. Биотинилирование белка 53
2.5.5. Измерение константы диссоциации 53
2.5.6. Биннинг эпитопов связывания 53
2.5.7. Иммуноферментный анализ 54
2.6. Работа с эукариотическими культурами 55
2.6.1. Ведение культур 55
2.6.2. Трансфекция 55
2.6.3. Трансдукция 56
2.6.4. Люциферазный анализ 56
2.6.5. Активация Т-лимфоцитов и наработка Т-регуляторных клеток 57
2.6.6. Оценка уровня TGFβ 57
2.6.7. Конструирование клеточных линий 58
2.6.7.1. Линии для экспрессии рекомбинантных белков 58
2.6.7.2. Линия, гиперэкспрессирующая ACE2 58
2.6.7.3. Линия, экспрессирующая ERBB2 59
2.6.7.4. Линия, экспрессирующая нанотела в виде псевдорецептора 59
2.6.7.5. Линия, экспрессирующая ERBB2 59
2.6.8. Тесты по нейтрализации 60

2.6.8.1. Оценка нейтрализации при помощи ИФА 60

2.6.8.2. Оценка нейтрализации с использованием репортерного гена люциферазы 60

2.6.8.2.1. Прямое заражение 61

2.6.8.2.2. Заражение от клетки к клетке 61

2.6.8.2.3. Оценка потенциала антителозависимого усиления инфекции 62

2.6.8.3. Оценка нейтрализации с использованием живого вируса и клеточной линии VERO 63

2.6.8.3.1. Оценка нейтрализации по цитопатическому эффекту 63

2.6.8.3.2. Оценка нейтрализации по образованию бляшек 64

2.6.8.4. Оценка нейтрализации с использованием клеточной линии GMB6138 64

2.6.9. Антитела и проточная цитометрия 66

2.7. Тесты на животных моделях 67

2.7.1. Получение модели мышиного ксенотрансплантанта 67

2.7.2. Тестирование нейтрализации SARS-CoV-2 на сирийских хомяках 67

2.8. Работа с прокариотическими культурами 68

2.8.1. Индукция с ИПТГ 68

2.8.2. Подготовка компетентных клеток 69

2.8.3. Автоиндукция бактериальной культуры 70

2.8.4. Получение биотинилированных белков 70

2.8.5. Лизис продуцентов 71

2.8.6. Электропорация бактериальной культуры 71

2.8.7. Использованные клеточные линии 72

2.9. Фаговый дисплей 72

2.9.1. ПЦР VHH фрагментов 72
2.9.2. Наработка бактериофага M13 72
2.9.3. Сборка библиотеки 73
2.9.4. Наработка фаговой библиотеки 73
2.9.5. Титрование фага 75
2.9.6. Селекция 75
2.9.7. Наработка моноклонального фага 77
2.9.8. Отбор продуцентов 78
2.10. Синтез химических соединений, использованных в процессе конъюгации нанотел 78
2.10.1. Общие сведения 78
2.10.2. Перфторфениловый эфир 6-азидогексановой кислоты (N3-гексаноил-Pfp) 79
2.10.3. Общий метод конъюгации 80
2.10.4. AR816 80
2.10.5. AR896 80
2.10.6. N3-гексаноил-Val-Cit-PABC-MMAE 81
2.11. Модификации белков 82
2.11.1. Конъюгация с Fc 82
2.11.2. Тетрамеризация на стрептавидине 83
2.11.3. Конъюгация при помощи сортазы 83
2.11.4. Конъюгация методом клик химии 84
2.11.5. Оценка эффективности конъюгации препаратов на основе нанотел 84
2.12. Статистическая обработка 85
3. Результаты и обсуждение 86
3.1. Отбор нанотел к шиповидному белку SARS-CoV-2 86

3.1.1. Иммунизация животных 86

3.1.2. Сборка библиотеки 88

3.1.3. Фаговый дисплей 88

3.1.4. Селекция антител 90

3.1.5. Отбор наиболее перспективных вариантов 92

3.1.6. Получение и оценка качества чистых белковых препаратов нанотел 95

3.2. Тестирование нейтрализующей активности отобранных нанотел в отношении связывания S-белка с ACE2 97

3.2.1. Проверка нейтрализующей активности методом ИФА 98

3.2.2. Проверка нейтрализующей активности с использованием псевдотипированного лентивируса 99

3.2.3. Проверка нейтрализующей активности на живом вирусе варианта Ухань 101

3.2.4. Биннинг нейтрализующих нанотел 102

3.2.5. Экспрессия в слитом с Fc виде 103

3.2.6. Подтверждение нейтрализующей активности нанотел в отношении разных вариантов вируса 104

3.2.6.1. Оценка способности нанотел нейтрализовать инфекцию при передаче вируса от клетки к клетке 106

3.2.6.2. Стимуляция образования синцитиев нанотелом 1D10 109

4.6.6.3. Экспрессия нанотел на поверхности клетки для оценки возникновения антителозависимого усиления инфекции 112

3.2.7. Оценка подхода модуляции тропизма вируса при помощи нанотела 114

3.3. Модификации нанотел 120

3.3.1. Конъюгация с полезной нагрузкой 122

3.3.1.1. Выбор перспективных соединений для конъюгации с нанотелом 122

3.3.1.2. Оценка активности конъюгатов с полезной нагрузкой в клеточных тестах по нейтрализации 126

3.3.1.3. Оценка влияния линкеров на конъюгацию и нейтрализующий эффект в клеточных тестах 128

3.3.2. Мультимеризация 133

3.3.2.1. Тетрамер на основе ПЭГ 134

3.3.2.2. Тестирование мультимерных молекул на животных моделях 141

3.3.2.3. Тетрамер на основе стрептавидина 146

3.3.2.3.1. Получение тетрамера к CD47 на основе стрептавидина 147

3.3.2.4. Димерные конструкции нанотел 151

3.3.3. Адаптерная конструкция на основе нанотела для модуляции вирусного тропизма 154

4. Выводы 164

Благодарности 166

Список сокращений 167

Список литературы 172

Введение

Актуальность темы исследования

Активное и слабо контролируемое распространение новых вирусных инфекций является глобальной проблемой, несмотря на высокий уровень развития современной медицины и фармацевтики. Во время недавней пандемии COVID-19 возросла важность разработки эффективных средств профилактики и терапии вирусных заболеваний. В связи с этим растёт интерес к новым биомолекулярным платформам, способным обеспечивать избирательное воздействие на патогены. Одной из таких перспективных и в последнее время активно изучаемых платформ для воздействия на вирусы являются специфические тяжелоцепочечные антитела представителей семейства верблюдовые, а в частности, их вариабельные (VHH) фрагменты, отвечающие за связывание с мишенью, называемые нанотелами.

Нанотела обладают рядом преимуществ, значительно отличающих их от моноклональных антител классической структуры. Ключевым отличием является малый размер молекулы (около 16 кДа), сочетающийся с высокой специфичностью и аффинностью к мишеням. Эти характеристики в свою очередь обуславливают ряд других функциональных преимуществ: высокая тканепроникающая способность, эффективность связывания с мишенью из-за удлинённого CDR3, технологическая простота модификации молекулы, а также сравнительно низкая стоимость и простота производства. В совокупности данные свойства выделяют нанотела как перспективных кандидатов для разработки диагностических и терапевтических агентов.

Особое значение в условиях пандемии приобретает возможность использования нанотел для воздействия на вирусные инфекции. В данной области раскрываются широкие перспективы для возможного применения нанотел и молекул на их основе, нанотела могут выступать в качестве нейтрализующих молекул для предотвращения распространения инфекции, кроме того, могут быть использованы в качестве специфического сорбента для

улавливания вирусных частиц при разработке диагностических систем. Более того, малый размер позволяет интегрировать нанотела в состав поливалентных или функционально нагруженных молекулярных комплексов, а также использовать их для разработки модифицированных вирусных гликопротеинов с целью изменения их тропизма.

В настоящее время новые способы применения нанотел активно изучаются как в области воздействия на вирусные инфекции, так и относительно других заболеваний, включая онкопатологии. Широкие возможности применения нанотел позволяют рассматривать их в качестве перспективной платформы для разработки новых диагностических и терапевтических инструментов. Данные исследования являются особенно актуальными и значимыми для современных биомедицинских исследований.

Цель работы и поставленные задачи

Целью исследования является получение панели высокоаффинных нанотел и изучение возможности их использования в качестве инструмента влияния на распространение вирусной инфекции.

В ходе работы для достижения поставленной цели были определены и выполнены следующие задачи:

1. Отбор панели специфических нанотел к шиповидному белку SARS-CoV-2 методом фагового дисплея.
2. Оценка уровня нейтрализующей активности в отношении SARS-CoV-2 у селектированных нанотел в различных тест-системах с использованием разных вариантов вируса.
3. Разработка способов модификации молекулярной конструкции нанотел и оценка влияния модификаций на их функциональную активность.
4. Разработка новых методов применения нанотел в отношении вирусов.
5. Испытание нейтрализующих и модифицированных нанотел в клеточных и живых системах.

Научная новизна и практическая значимость работы

В ходе работы была получена панель из высокоспецифичных нанотел к шиповидному белку SARS-CoV-2. Последовательности отобранных нанотел, проявивших специфичность и эффективность связывания с мишенью, были запатентованы. У 6 нанотел подтверждена нейтрализующая активность в отношении вируса SARS-CoV-2 варианта Ухань. По два образца проявили нейтрализующий эффект в отношении вируса вариантов Дельта и Омикрон. При исследовании отобранных вариантов нанотел было разработано несколько путей модификации их молекулярной структуры. Показано, что мультимеризация нанотел (димеризация, тетрамеризация) является эффективным способом повышения их функциональной активности за счёт увеличения авидности, что сопровождается усилением связывания и восстановлением нейтрализующей способности для отдельных вариантов вируса. Также, подход по тетрамеризации нанотела на основе стрептавидина был использован на примере нанотела к рецептору CD47. Показано значительное снижение IC_{50} и усиление связывания с мишенью, а также подтверждена противоопухолевая активность тетрамерного комплекса in vivo. Полученные результаты экспериментально обосновывают перспективность подхода повышения авидности как универсального инструмента усиления биологической активности нанотел. В рамках исследования была продемонстрирована возможность использования нанотела в качестве модулятора для изменения тропизма лентивирусных частиц (в составе псевдорецептора или адаптерной молекулы), позволившая достичь высоких уровней специфичности при адресной доставке трансгена. Впервые показано, что адаптерная молекула на основе нанотела к гликопротеину VSV-G и DARPin к рецептору HER2 обеспечивает управляемое изменение тропизма вируса без генетической модификации векторной системы, позволяя достигать высокой специфичности трансдукции целевых клеток и превосходя по эффективности традиционные псевдорецепторные стратегии. Кроме того, была проведена комплексная оценка подхода по конъюгации нанотел с цитотоксическими и

противовирусными соединениями для усиления противовирусного эффекта. А также был проведён анализ влияния линкера при конъюгации на эффективность доставки полезной нагрузки. Таким образом, в работе был сформирован комплекс новых экспериментально подтверждённых подходов к применению нанотел как универсальной платформы для нейтрализации вирусов, усиления биологической активности за счёт мультимеризации и направленной доставки генетического материала, что существенно расширяет возможности их использования в биомедицинских исследованиях и разработке терапевтических средств.

Положения выносимые на защиту

1. Методом фагового дисплея селектирована панель нанотел, способных высокоэффективно и специфически связываться с S-белком. Специфичность связывания была подтверждена методами ИФА и биослойной интерферометрии. Константа диссоциации для некоторых образцов достигала нижних наномолярных значений (9.51×10^{-10} М).

2. Протестирована нейтрализующая активность отобранных в процессе селекции нанотел методами конкурентного ИФА (подтверждена у 8 образцов), клеточным тестом с использованием псевдотипированного лентивируса (подтверждена у 6 образцов) и клеточными тестами с использованием живого вируса вариантов Ухань (подтверждена у 5 образцов), Дельта (подтверждена у 2 образцов) и Омикрон (подтверждена у 2 образцов).

3. Подтверждена функциональная активность у молекул с модификациями следующих типов: мультимерные конструкции на основе ПЭГ и стрептавидина; димерный комплекс нанотела с Fc; димерные конструкты, экспрессируемые бактериальной культурой; конъюгаты нанотел с полезной нагрузкой.

4. Разработаны методы использования нанотел в качестве модуляторов вирусного тропизма: в составе псевдорецептора и биспецифической адаптерной молекулы.

5. Проведены испытания нейтрализующих и модифицированных конструкций нанотел в клеточных тестах и живых системах. Для ряда препаратов наблюдалось усиление противовирусного эффекта за счёт внесения модификаций.

Личное участие соискателя в получении результатов, изложенных в диссертации

Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии под руководством к.б.н., с.н.с. Чумакова С.П. Работа с препаратами живого вируса SARS-CoV-2 проводилась на базе ФГБНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» под руководством д.б.н. Козловской Л.И.

Апробация работы

По теме диссертационной работы опубликован 1 патент и 4 статьи в рецензируемых журналах:

1. Чумаков С. П., Жучков В. А. Однодоменные наноантитела против шиповидного белка вируса SARS-CoV-2: патент на изобретение № 2794141 C2. – РФ. – 2023. – Заявл. № 2021117171 от 11.06.2021; опубл. 11.04.2023. – EDN WLQICN.
2. Жучков В. А., Иванов С. В., Кравченко Ю. Е., Чумаков С. П. Получение серии нейтрализующих нанотел к S-белку SARS-CoV-2 // Молекулярная биология. – 2023. – Т. 57, № 3. – С. 505–516.
3. Ratnikova N.M., Kravchenko Y., Ivanova A., Zhuchkov V., Frolova E., Chumakov S. A novel anti-CD47 nanobody tetramer for cancer therapy // Antibodies. – 2024. – Vol. 13. – P. 2.
4. Zhuchkov V.A., Kravchenko Y.E., Frolova E.I., Chumakov S.P. PD1-targeted transgene delivery to Treg cells // Viruses. – 2024. – Vol. 16, No. 12. – P. 1940.
5. Zhuchkov V.A., Valikhov M.P., Kravchenko Y.E., Frolova E.I., Chumakov S.P. Switchable Retargeting of Lentiviral Vectors Through a VSV-G-Binding Adapter Molecule // Viruses. – 2025. – Vol. 17, No. 12. – P. 1563.

Отдельные результаты работы были представлены на XXXV международной зимней молодежной научной школе (Москва, 2023). Опубликован тезис доклада:

1. Жучков, В. А. Получение поливалентных молекул на основе нанотел, нейтрализующих SARS-CoV-2 / В. А. Жучков, С. П. Чумаков // XXXV зимняя молодёжная научная школа "перспективные направления физико- химической биологии и биотехнологии: Сборник тезисов, Москва, 07–10 февраля 2023 года. – Москва: Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 2023. – С. 154. – EDN LYPJLS.

Диссертация выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2024-536.

1. Обзор литературы

1.1. Применение нанотел

1.1.1. Структура и свойства нанотел

Классическая структура антитела типа IgG обычно представляет собой Y-образную молекулу, в составе которой присутствуют две «тяжелые» и две «лёгкие» аминокислотные цепи, с общей молярной массой около 150 кДа[1]. Тяжелая цепь состоит из вариабельного домена VH и трёх константных - CH1, CH2 и CH3. В то время как легкая цепь - из вариабельного домена VL и лишь одного константного – CL. Пара вариабельных доменов VH-VL отвечают за распознавание и связывание с антигеном. CH2 и CH3 играют важную роль в рекрутировании иммунных клеток и эффекторных функциях (например активации комплемента). Уникальный тип строения антител был обнаружен в 1989 году у семейства Camelidae [2]. В данном случае у антител полностью отсутствуют лёгкие цепи, из-за чего они получили название антитела из тяжелых цепей (HCAb). В данной форме присутствуют только два константных домена (CH1 И CH2), а также один гипервариабельный домен VHH, отвечающий за связывание с антигеном. Он является аналогом Fab фрагмента IgG консервативной структуры. Антитела с отсутствующей лёгкой цепью и константным доменом CH1 также были обнаружены у представителей хрящевых рыб [3]. Они носят название V-NAR. Стоит отметить, что в кровотоке обоих семейств антитела, состоящие из тяжелых и лёгких цепей, также присутствуют и сохраняют свою функциональную активность. Кроме того, имеются данные, что из-за генетических нарушений (делеций в VH и CL) такие конструкции антител могут встречаться в сыворотках людей с патологиями [4].

1.1.1.1. Структура нанотела

Из-за отсутствия у HCAb лёгкой цепи и CH1 домена, его размер составляет около 90 кДа, а за комплементарное связывание с антигеном отвечает только один домен – VHH. Он может быть отделен от остальной конструкции с сохранением

его функциональной активности [1]. Отделённый вариабельный домен благодаря своим размерам получил название нанотело (или VHH-антитело): 15-16 кДа, 2,5нм×4нм×3нм. Малый размер позволяет молекуле достигать труднодоступных эпитопов.

VHH домен антител верблюжьих, аналогично VH домену IgG, состоит из четырёх каркасных участков (FR1-4) и трёх участков, определяющих комплементарность (CDR1-3) (Рисунок 1). У VHH-антитела CDR1 и CDR3 имеют более удлиненную последовательность. За специфичность связывания и взаимодействие с антигеном в основном отвечает только CDR3, в то время как в обычных IgG за это отвечают шесть участков вариабельных доменов VH и VL. За счет удлинённой структуры, CDR3 обладает большей гибкостью и способен связываться с менее доступными эпитопами, что определяет более высокую аффинность нанотела [5].

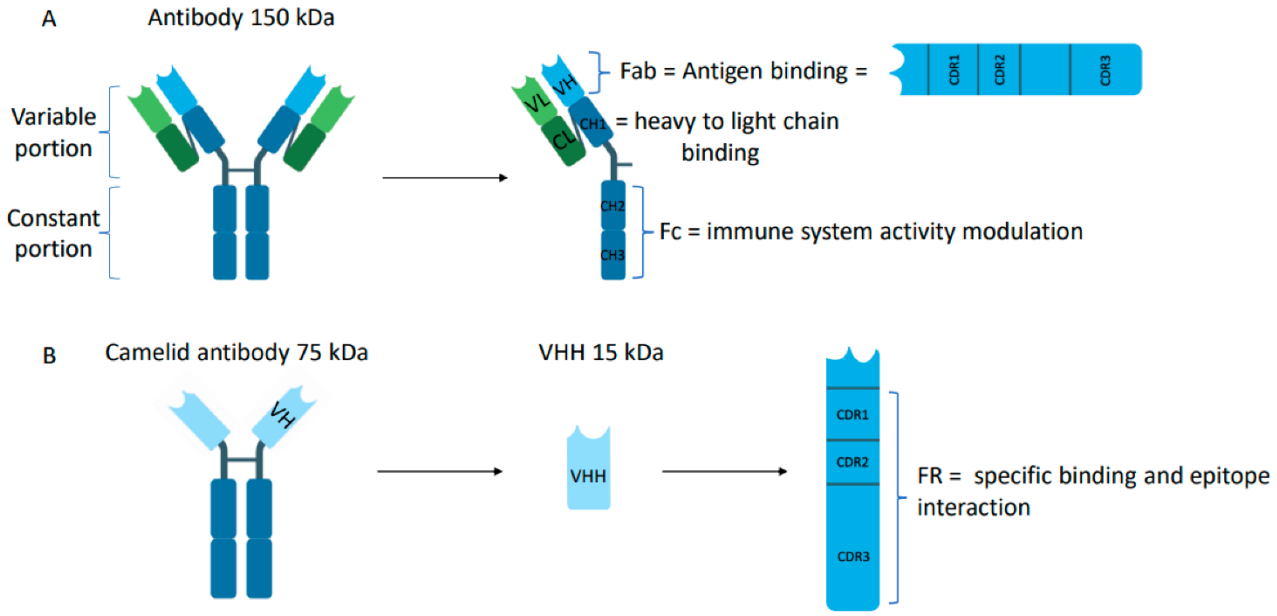

Рисунок 1. Структурные различия между антителом и VHH. A - Структура обычного антитела и структура тяжелой цепи. B - Структура верблюжьего HCAb и структура VHH. VH: тяжелая цепь; VL: легкая цепь; CL CHs: константные домены; CDRs: области, определяющие комплементарность; Fc: фрагмент; Fab: фрагмент кристаллизации; Fab: участок связывания с антигеном; VHH: вариабельные домены тяжелой цепи; FRs: каркасные домены [1].

Замена определённых гидрофобных кислот на гидрофильные в FR2 позволят нанотелу сохранять растворимость и антигенсвязывающие свойства. VHH - F37/E44/R45/G47, IgG - V37/G44/L45/W47 [6]. Кроме того, в структуре антитела присутствует дополнительная дисульфидная связь между Cys23 и Cys94, которая обеспечивает дополнительную стабильность антитела. Такой тип антител, согласно исследованиям, способен сохранять 80% активности после недели хранения при 37°C [7], а также может выдерживать сильные денатурирующие условия [8].

1.1.1.2. Свойства нанотел

Малый размер нанотела обеспечивает хорошую тканепроникающую способность, позволяющую молекулам инфильтрировать солидные опухоли [9]. Более того, молекулы такого размера способны с высокой эффективностью проходить сквозь ГЭБ [10]. VHH антитела обладают низкой иммуногенностью. Они состоят лишь из одного домена и не имеют Fc фрагмента, что способствует отсутствию активации иммунной системы. В экспериментах на животных не наблюдалось какого-либо гуморального или клеточного ответа на введение нанотел [11]. В случае возникновения проблем и нежелательных иммунных реакций, нанотела могут быть подвергнуты дополнительным процедурам по гуманизации [12].

Нанотела могут обладать аффинностью связывания до пикомолярных значений [13]. Паратоп классических антител обычно представляет собой плоскую структуру, в то время как выпуклый удлинённый паратоп нанотела способен осуществлять связывание с эпитопами антигена, находящихся в труднодоступных конформациях [5].

Так как нанотело состоит лишь из одного домена, несущего в себе все функционально-необходимые участки, оно может легко производиться в различных экспрессионных системах: E. coli, S. cerevisiae и P. pastoris. А также относительно просто подвергаться очистке при помощи подходящих видов хроматографии. Чаще всего производство нанотел осуществляют с

использованием бактериальных культур. Экспрессия белков в периплазму позволяет получать молекулы с правильной укладкой и необходимыми дисульфидными связями в своей структуре. Выход в таких случаях может достигать нескольких десятков миллиграмм с литра культуры.

Кроме того, простая структура позволяет вносить различные модификации в конструкцию. Могут быть прикреплены различные метки, позволяющие идентифицировать целевые белки, или осуществлять их очистку. Благодаря тому, что одна молекула нанотела полностью функциональна, несколько молекул могут быть объединены в различные комплексы для повышения аффинности или расширения эпитопов распознавания. Из-за короткого периода полувыведения малых молекул из организма нанотела часто сшивают с Fc фрагментом, хотя такой подход влияет на их проникающую способность. Выбор модификации диктуется целями проводимого исследования.

При использовании современных технологий отбора можно получить нанотела практически на любую мишень. Простая структура позволяет проводить отбор антитела при помощи фагового дисплея. В теории можно иммунизировать животное необходимым белком или его частью для получения пула антител против него, после чего из лимфоцитов собрать библиотеку. Могут быть использованы различные технологии и методы отбора, позволяющие добиться требуемых результатов.

1.1.2. Применение нанотел

Благодаря ряду описанных преимуществ, нанотела вызывают большой интерес в качестве инструментов для терапии и диагностики различных заболеваний. Они могут применятся как в качестве ферментов для нейтрализации рецепторов, так и в качестве нацеливающих молекул для доставки различных веществ. Устойчивость структуры позволяет использовать разнообразные методы введения (энтеральный, парентеральный и ингаляционный). Более того, нанотела также могут быть использованы в

качестве инструментов в исследованиях. Далее будут рассмотрены некоторые из существующих на сегодняшний день возможности применения нанотел.

1.1.2.1. Использование нанотел в диагностике и исследованиях.

Нанотела могут успешно применяться в качестве лигандов на биосенсорах. Методы фагового дисплея позволяют отобрать образцы, обладающие высоким сродством и специфичностью к выбранному эпитопу. Нанотела легко можно иммобилизовать на поверхности биосенсора, с помощью заранее внесенной в их конструкцию гистидиновой или биотиновой метки. Функционализация как правило производится по С-концу, что способствует ориентации паратопа в сторону раствора, тем самым повышая эффективность распознавания и захвата антигена [14].

Широкое применение нанотела получили в иммуноферментном анализе, включая сэндвич-ИФА [15]. Они служат для захвата и обнаружения белков-биомаркеров, вирусов или патогенных молекул. Различные модификации (мультимеризация, прикрепление меток, сшивка с эффекторными молекулами) помогают повышать чувствительность анализа [16, 17]. Кроме того, для понижения порога обнаружения нанотела могут быть конъюгированы с специфическими наночастицами для использования методов электрохемилюминесценции. Такой вариант постановки анализа позволяет повысить чувствительность в 1000 раз [18]. В качестве портативной замены ИФА используется метод иммунохроматографического анализа, в котором также могут быть задействованы VHH-антитела [19].

Нанотела могут применяться в различных диагностических тестах in vitro, особенно для раннего выявления инфекций или заболеваний. Они были использованы в тестах по выявлению рака [20], вирусных инфекций у животных [21]. при мониторинге паразитов в сыворотке крови человека [22] и проверке на наличие загрязняющих веществ, таких как токсины, пестициды и гербициды, в пищевых продуктах [23].

1.1.2.2. Методы визуализации с использованием нанотел

Нанотела считаются отличными индикаторами для диагностической визуализации in vivo благодаря их надежности и адаптируемости. Их можно эффективно пометить короткоживущими γ- или позитронно-излучающими нуклидами [24]. Небольшой размер мономерного нанотела обеспечивает быструю экстравазацию и диффузию в тканях после внутривенной инъекции мышам с опухолями [25]. Это облегчает отслеживание и ассоциацию с антигенами. Избыток нанотел из-за малого размера быстро выводится через почки [26]. Такое быстрое разрешение позволяет получить изображения ОФЭКТ или ПЭТ/КТ вскоре после введения индикатора [27].

Отсутствие Fc-области и короткий период полувыведения делают VHH-антитела подходящими для молекулярной визуализации сердечно-сосудистой системы. Меченное ^{99m}Tc нанотело, нацеленное на молекулу адгезии сосудистых клеток-1 (VCAM-1), предназначено для визуализации воспаленных атеросклеротических бляшек, что открывает потенциал для оценки антиатерогенных агентов [28, 29].

Исследование фазы I с участием негуманизированного нанотела против антигена HER2 при карциноме молочной железы, продемонстрировало быстрое выведение из крови. Радиомеченное нанотело эффективно воздействовало на HER2-положительные первичные и метастатические поражения карциномы молочной железы, демонстрируя при этом очень низкие фоновые уровни в других органах [30].

Нанотела, конъюгированные с гамма-излучающими изотопами, применяемыми в однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) или с позитронно-эмиссионными изотопами для позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), улучшают диагностику опухолей, доставляя радионуклиды конкретно в опухоли и небольшие метастазы с повышенной чувствительностью. Конъюгацию можно осуществить с использованием случайного или сайт-специфического лигирования. Мечение нанотел улучшает

накопление радиоизотопов в опухолях, позволяя неинвазивно обнаруживать их на пикомолярных уровнях [31]. Нанотела обладают быстрым выведением из крови, что делает их перспективными для применения в ядерной визуализации. Исследования нанотел, нацеленных на HER2 и PD-L1, продемонстрировали безопасность, приемлемую дозиметрию и повышенную терапевтическую эффективность при визуализации и лечении рака [30, 32]. Нанотело 7D12, нацеленное на EGFR, меченное $^{68/67}$Ga или ^{89}Zr, использовалось для ПЭТ-визуализации, обеспечивая четкую видимость опухоли с хорошим контрастом [33]. Агент визуализации ^{68}Ga-NOTA-2Rs15d продемонстрировал благоприятное биораспределение и безопасность у онкологических пациентов со сверхэкспрессией HER2, что позволило продвинуться к исследованиям II фазы [30]. Нанотела, нацеленные на MMR и меченные ^{18}F, также продемонстрировали многообещающие результаты в доклинических моделях, подготавливая почву для потенциальных клинических испытаний фазы I и II [34].

Использование ^{18}F для радиоактивной маркировки нанотел позволяет решить проблемы, связанные с коротким периодом полураспада ^{68}Ga, обеспечивая лучшее разрешение ПЭТ-изображений и нацеливание на опухоли. Нанотела, модифицированные для ПЭТ-визуализации, применялись к различным мишеням в доклинических моделях, включая MHC класса II, PD-L1, CTLA-4, фибронектин EIIIB, CD8, CD11b, CD36 и CD45, меченные ^{18}F, ^{64}Cu или ^{89}Zr. Эти агенты визуализируют опухоли, особенно миелоидный отдел микроокружения опухоли, помогая понять реакцию на иммунотерапию рака.

Использование меченых изотопами агентов визуализации в медицинской визуализации создает риск радиационного воздействия как для пациентов, так и для врачей. Короткоживущие изотопы, такие как ^{18}F, позволяют проводить визуализацию вскоре после введения, но уровень инфильтрации тканей и выведение из кровотока имеет решающее значение для эффективной визуализации цели. Нерадиоизотопные методы являются привлекательной альтернативой, хотя тоже имеют ограничения. Оптическая визуализация с использованием нанотел, меченных флуорофором ближнего инфракрасного

диапазона (NIR), обеспечивает быстрое, экономичное и высокочувствительное обнаружение опухолей in vivo [24]. Небольшой размер нанотел обеспечивает быстрое нацеливание на опухоль, накопление, выведение почками и низкое неспецифическое поглощение, что приводит к высокому соотношению сигнал/фон. Гидрофильные флуоресцентные зонды, особенно сульфированные варианты, такие как Cy5, Alexa Fluor, IRDye680RD или IRDye800CW, обычно используются для обеспечения стабильности in vivo [35]. Сайт-специфическое мечение нанотел через С-концевой цистеин обеспечивает функциональную целостность. Сигналы флуоресценции от датчиков NIR предоставляют конкретную информацию в режиме реального времени для точной хирургической операции под контролем визуализации во время резекции опухоли. Примеры включают нанотело против EGFR (7D12), меченное флуорофорами NIR для эффективного обнаружения опухолей и хирургических операций под контролем флуоресценции, демонстрирующее превосходное нацеливание и проникновение по сравнению с моноклональными антителами [36]. В то время как зонды NIR-I (длина волны 700–900 нм) используются для исследования неглубоких тканей и интраоперационных применений, более глубокое проникновение света NIR-II (длина волны 1000–1700 нм) расширяет потенциал зондов на основе нанотел для целевой визуализации опухолей [37, 38]. Применение зондов на основе нанотел в оптической визуализации довольно разнообразно.

При ультразвуковой диагностике органов используются контрастные вещества, такие как микропузырьки или нанопузырьки, которые сильно рассеивают ультразвук из-за находящегося внутри газа. Направленная модификация лиганда позволяет микропузырькам преимущественно прикрепляться к рецепторам сосудистой сети опухоли, повышая чувствительность обнаружения. Например, нанопузырьки, нагруженные темсиролимусом и меченные нанотелами анти-G250 (G250-TNB), были нацелены на почечно-клеточную карциному, значительно улучшая ультразвуковую визуализацию G250-положительных опухолей на мышиной

модели [39]. Мультимодальные методы визуализации, такие как ПЭТ/флуоресценция в ближнем инфракрасном диапазоне (NIRF) и ПЭТ/МРТ, предоставляют дополнительную диагностическую информацию. Двухмодальный зонд ПЭТ/NIRF показал ядерную визуализацию высокого разрешения и чувствительность к хирургическому вмешательству при глиобластоме, при этом положительный результат ПЭТ обеспечил распределение индикаторов in vivo, интраоперационные границы NIRF и послеоперационную корреляцию [40]. Зонды ПЭТ/МРТ на основе нанотел применяются для неинвазивной оценки атеросклероза, используя преимущества нанотел для мультимодальной визуализации [41]. Кроме того, двухмодальный зонд для визуализации ПЭТ/флуоресценции на основе scFv продемонстрировал антигенспецифическое нацеливание на ксенотрансплантаты рака простаты с высоким уровнем целевой флуоресценции [42].

1.1.2.3. Применение нанотел в терапии заболеваний

Использование нанотел при терапии можно условно разделить на три направления: нанотела, действующие как самостоятельный функциональный белок, нанотела, слитые с эффекторными доменами (например, домен Fc, TRAIL, ферменты), и нанотела, нанесённые на поверхность различных наночастиц для доставки полезной нагрузки. Эти направления позволяют варьировать способы доставки и содержание полезной нагрузки на используемой молекуле. Выбор зависит от стратегии лечения заболевания.

1.1.2.3.1. Нанотела в терапии рака

Нанотела эффективно используются для воздействия на трансмембранные белки, связанные с раком, включая рецепторы факторов роста, такие как EGFR1, c-Met, HER1, HER2, VEGFR2 и ACKR3 [43-45]. Отбор нанотел с помощью таких методов, как фаговый дисплей, привел к разработке антагонистических нанотел против EGFR, нанотел, нацеленных на HER2, ингибиторов VEGFR2 и нанотел, нацеленных на c-Met, которые конкурируют с HGF. Кроме того, нанотела были

направлены против специфичных для рака гликопротеинов, таких как MUC-1 и CEA, сверхэкспрессируемых в таких опухолях, как рак молочной железы и толстой кишки [46, 47].

Одним из способствующих пролиферации и метастазированию опухолевых клеток является индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1α). Им осуществляется регулирование ангиогенеза и метаболизма глюкозы через специфические гены-мишени. Группой исследователей было выделено нанотело, способное связываться с кислородозависимым доменом данного фактора, при этом подавляя активность целевого гена. Это в свою очередь предотвращает дальнейшее развитие опухоли [48].

Альтернативный терапевтический подход предполагает использование нанотел, которые напрямую воздействуют на функциональные внеклеточные компоненты опухолей. Существуют нанотела, нацеленные против фактора роста гепатоцитов (HGF) и различных хемокинов. Нанотела анти-HGF были получены путем выбора связующих веществ для иммобилизованного HGF и оценки их способности ингибировать взаимодействие HGF/c-Met. Лам, использованных в исследовании, иммунизировали смесью рекомбинантных хемокинов [49].

Таргетная радионуклидная терапия — это противораковая терапия, предназначенная для доставки цитотоксического излучения к раковым клеткам, с ограниченным воздействием, не затрагивающим ткани. В качестве средств доставки обычно используются моноклональные антитела, фрагменты антител или небольшие молекулы, меченные подходящим радиоизотопом. Такая разновидность терапии с использованием антител была одобрена FDA для лечения некоторых лимфом. Однако при использовании полноразмерных антител против солидных опухолей возникает проблема. Большой размер антител ограничивает способность терапевтических молекул проникать в ткань опухоли на необходимом уровне. В качестве альтернативы, особенно для солидных опухолей, были исследованы более мелкие меченые молекулы, такие как пептиды и нанотела.

В исследованиях использовались нанотела для таргетной радионуклидной терапии, показавшие многообещающие результаты. Нанотело 2Rs15d, меченное ^{177}Lu, продемонстрировало значительную эффективность в ингибировании роста опухоли и повышении безрецидивной выживаемости у мышей с ксенотрансплантатами HER2+ SKOV3 [50]. В первой фазе клинических испытаний на пациентах с раком молочной железы использовалось то же нанотело, меченное ^{131}I [51]. Другое нанотело, 9079, меченное ^{177}Lu, также продемонстрировало лучшую выживаемость у мышей с меланомой B16, а, кроме того, минимальную почечную токсичность [52]. Эти доклинические исследования подчеркивают уникальные характеристики нанотел в радионуклидной терапии и предполагают их потенциальную клиническую полезность. Необходима дальнейшая оптимизация для уменьшения потенциальных побочных эффектов в клинических условиях.

Фотодинамическая терапия, в отличие от радионуклидов в радиоиммунотерапии, достигает необратимого повреждения опухолевых клеток за счет активации фотосенсибилизаторов. В настоящее время ведущее направление исследований связано с использованием разветвлённых наночастиц на основе золота в качестве фотосенсибилизатора из-за их эффективного сечения ядра. При лазерном облучении эти наночастицы выделяют тепло, приводящее к разрушению опухолевых клеток. Избирательное накопление нанотел анти-HER2 и фотосенсибилизаторов в месте опухоли приводит к мощному ингибирующему эффекту [53]. Этот подход демонстрирует положительное дозозависимое цитотоксическое воздействие на опухоли, обеспечивая повышенную специфичность для таргетных фототермических противораковых агентов. Сочетание одновременно молекулярной визуализации с терапией опухолей с использованием одновалентных или мультивалентных нанотел против EGFR и отслеживаемого фотосенсибилизатора (IRDye-700DX) показывает значительный прогресс в клиническом применении технологии фотодинамической терапии [54].

Конъюгаты антитело-лекарственное средство представляют собой особый тип терапии, нацеленной на опухоли, которая сочетает в себе антитела и цитотоксическую нагрузку для повышения специфичности воздействия и уменьшения нецелевых эффектов. Хотя такой формат молекулы, в конструкции которого используются моноклональные антитела, показал свою эффективность, к его ограничениям относится большой размер, препятствующий проникновению в опухоль. Меньшие молекулы, такие как нанотела, привлекают внимание благодаря высокому уровню проникновения в ткани, стабильности и относительной простоте производства. Конъюгаты нанотело-лекарственное средство с использованием мертанзина продемонстрировали эффективность в ингибировании пролиферации раковых клеток и уменьшении метастазов в печени в доклинических моделях [55]. Нанотела, нацеленные на миелоидные клетки (анти-CD11b, Ly-6C и Ly-6G), конъюгированные с экзотоксином A. Pseudomonas, показали цитотоксичность in vitro с потенциалом истощения миелоидных клеток in vivo, что подчеркивает их терапевтический потенциал в терапии рака [56].

Нанотела обеспечивают альтернативу таргетной терапии рака, преодолевая проблемы, связанные с большим размером конъюгатов антитело-лекарство с точки зрения экстравазации и проникновения в опухоль. Конъюгаты нанотело-лекарство могут быть созданы путем конъюгирования цитотоксических полезных нагрузок с нанотелами с высоким сродством с помощью «умных» линкеров, избирательно убивающих опухолевые клетки. Небольшой размер нанотел обеспечивает быстрое распознавание антигена, легкое проникновение в опухоль и высокое накопление. Нанотела демонстрируют высокую эффективность в доставке терапевтических молекул, относительно классических антител. Стратегии продления времени циркуляции нанотел для терапевтических применений включают ПЭГилирование [57], мультимеризацию [58], слияние с альбумином или альбуминсвязывающими доменами [59] и конъюгация с Fc доменом [60]. Эти модификации позволяют увеличить время присутствия молекул в кровотоке, что делает нанотела универсальными инструментами для

таргетной терапии. Мультимеризация не только продлевает период полувыведения in vivo, но и повышает аффинность связывания по сравнению с одиночными нанотелами.

Одной из стратегий адресной доставки лекарств является создание специально сконструированных наночастиц с инкапсулированными в них лекарственными средствами. Такой метод введения позволяет решить ряд проблем, таких как плохая растворимость, ограниченная стабильность и быстрое выведение из организма. Активно используются различные типы наночастиц, включая липосомы, мицеллы, наночастицы на основе альбумина и полимерсомы или полиплексы на основе полимеров [45, 46, 61-63]. Нанотела обладают определенными преимуществами (малый размер и отсутствие Fc фрагмента) для применения в качестве линкеров, покрывающих поверхность наночастиц. Эксперименты in vitro с использованием наночастиц, покрытых нанотелами, показывают усиление связывания с клетками-мишенями [47, 61, 62]. In vivo наночастицам приходится преодолевать эндотелиальные барьеры, но повышенная проницаемость и эффект удержания в опухолях способствуют их накоплению [64]. Таргетированные наночастицы, особенно те, которые направлены на сосуды опухоли, содержащие специфические маркеры на своей клеточной поверхности, являются перспективной платформой для целевой доставки. Высвобождение лекарства из частиц может происходить в результате механического разрушения (например, ультразвуком) или внутриклеточной деградации. Например, липосомы, меченные нанотелами против EGFR, и целевые полимерные мицеллы, содержащие доксорубицин, продемонстрировали повышенную эффективность в ингибировании роста опухоли и продлении выживаемости лабораторных животных по сравнению с ненацеленными аналогами.

Ферритин, природный белок, участвующий в процессе накопления железа, имеет многообещающее применение в качестве носителя лекарств благодаря своей уникальной структуре и характеристикам, таким как высокая стабильность и обратимая денатурация/ренатурация [65]. Ферритин может воздействовать на

опухолевые клетки, сверхэкспрессирующие рецептор трансферрина-1 (TfR1), связываясь с TfR1 и подвергаясь TfR1-опосредованному эндоцитозу. Чтобы улучшить способность ферритина воздействовать на опухоли, для конъюгации используются нанотела. Был разработан гибрид под названием «фенотело», в котором заменяется сегмент ферритина нанотелом против вируса H5N1, в общем на поверхности ферритина присутствуют 24 молекулы нанотел [66]. Фенотело обладает более высокой аффинностью и демонстрирует значительно более длительный период полувыведения по сравнению с отдельно взятыми нанотелами. В исследованиях рассматривался конъюгат нанотело-ферритин, инкапсулированный фталоцианином марганца. Оптимизированная конструкция содержала 82 молекулы фталоцианина и 20 таргетных молекул нанотел. Конъюгат эффективно интернализовался в EGFR-положительные раковые клетки и избирательно убивал их при облучении светом. Эта конструкция нанотело-ферритин облегчает загрузку гидрофобных агентов для доставки к опухоли без сложных химических модификаций молекул лекарств [67].

1.1.2.3.2. Нанотела в CAR-T терапии

Т-клетки с химерными антигенными рецепторами (CAR-T) представляют собой генетически модифицированные Т-лимфоциты, которые экспрессируют синтетические молекулы CAR на своей поверхности, что позволяет им распознавать специфические антигены клеточной поверхности и опосредовать цитотоксичность. CAR взаимодействуют с целевыми антигенами независимо от главного комплекса гистосовместимости в Т-клетках. Терапия CAR-T получила признание как средство, вызывающее ремиссию у пациентов с рецидивирующими/рефрактерными гематологическими новообразованиями, особенно с острым В-клеточным лимфобластным лейкозом. Несколько продуктов CAR-T, в том числе тисагенлеклейцел, аксикабтаген цилолеуцел, брексукабтаген аутолейцел, лизокабтаген маралеуцел, идекабтаген виклеуцел и цилтакабтаген аутолейцел, получили одобрение FDA для клинического использования. Домен нацеливания пяти из этих продуктов основан на

вариабельном одноцепочечном фрагменте (scFv) моноклональных антител, тогда как в аутолейцель цилтакабтагена применяются однодоменные антитела. На сегодняшний день активно исследуются альтернативные домены нацеливания для CAR, включая нанотела, пептиды или лиганды.

MUC1, поверхностный белок, сверхэкспрессируемый более чем в 90% случаев рака молочной железы, является мишенью для иммунотерапии рака. В 2009 году клетки Jurkat, экспрессирующие CAR, с нанотелами против MUC1 продемонстрировали эффективное нацеливание на клетки MUC+ рака молочной железы [68]. CAR-T второго поколения, содержащие костимулирующий домен OX40 и регулятор апоптоза на основе каспазы 8, продемонстрировали целевую антиген-зависимую секрецию IL-2 и значительное снижение количества CAR-T при добавлении димеризующего агента [69, 70]. В 2021 году также была продемонстрирована целевая антиген-зависимая секреция IL-2, TNFα и IFN-γ, а также противоопухолевая активность в отношении линий раковых клеток, экспрессирующих MUC1, при использовании CAR-T [71]. Хотя эти результаты подтверждают туморицидную способность CAR-T, презентирующих нанотела нацеленные на MUC1, глубокие исследования in vivo и тщательные клинические исследования необходимы для установления их эффективности и безопасности для более качественного и селективного устранения MUC1+ злокачественных клеток.

Система интегразы PhiC31, полученная из почвенных бактерий Streptomyces, использовалась для повышения эффективности трансдукции и экспрессии CAR. Эта система способна интегрировать плазмидную ДНК в геномы млекопитающих, что приводит к устойчивой и долгосрочной экспрессии трансгена. Экспрессия анти-MUC1 CAR на клетках Jurkat продемонстрировала значительное увеличение на 30-й день при использовании системы интегразы PhiC31 по сравнению с контролем. Система достигла примерно 10-кратного усиления экспрессии CAR в клетках Jurkat [69].

После успешных исследований с использованием нанотел против MUC1, анти-TAG-72 и HER2 нанотела были включены в конструкцию CAR,

продемонстрировав активность, аналогичную рецепторам на основе scFv. CAR-T-клетки против TAG-72 демонстрировали специфические ответы на TAG-72-положительные опухолевые клетки, в то время как CAR против HER2, особенно с олигоклональными VHH, демонстрировали более высокую пролиферацию, секрецию IL2 и цитотоксичность. Кроме того, VEGFR2 исследовался в качестве антиангиогенной мишени CAR-T, причем однократная доза CAR-T-клеток VEGFR2 значительно ингибировала рост различных опухолей у мышей, что предполагает возможность клинического применения с осторожным увеличением дозы и соображениями безопасности [72, 73].

EGFR, рецепторная тирозинкиназа, сверхэкспрессируемая при различных видах рака, также была использована в качестве мишени CAR-T на основе scFv. CAR-T на основе нанотел, перенацеленные на EGFR, перенаправлялись на уникальный пептидный эпитоп на опухолевых EGFR+ клетках [74]. Связывание с целью индуцировало целевой антиген-зависимый лизис опухолевых клеток in vitro и на доклинических моделях мышей. Новый двухвалентный модуль нацеливания α-EGFR-EGFR продемонстрировал более высокую авидность, чем его моновалентный аналог, что позволяло ему обеспечивать противоопухолевую активность против раковых клеток, экспрессирующих низкие уровни EGFR.[75] Данный подход демонстрирует потенциал нанотел в создании таргетных модулей CAR-T для специфического и эффективного устранения опухолевых клеток, экспрессирующих целевые антигены, ассоциированные с новообразованиями. Для установления применимости платформы необходимы дальнейшие доклинические и клинические исследования.

Глипикан 2 представляет собой трансмембранный протеогликан гепарансульфата, связанный с адгезией нейрональных клеток. Сверхэкспрессия данного белка на поверхности глиобластом обычно коррелирует с плохой общей выживаемостью пациентов. Ингибирование экспрессии GPC2 посредством CRISPR/Cas9 или siRNA приводило к подавлению роста опухолевых клеток нейробластомы. Нацеленная на глипикан 2 CAR-T терапия на основе нанотела

показывала значительный противоопухолевый эффект и вызывала продукцию IFN-γ и TNF-α [76].

Простатспецифический мембранный антиген (ПСМА) представляет собой антиген клеточной поверхности, обнаруженный во всех тканях предстательной железы, и используется в диагностических и терапевтических целях при раке предстательной железы. Были изучены методы CAR-T терапии как на основе scFv, так и на основе нанотел, нацеленных на ПСМА. Было разработано несколько конструкций CAR-T, перенацеленных на данный антиген и проявляющих высокий уровень противоопухолевой активности [77, 78].

B-клеточный антиген созревания (BCMA) является ключевой мишенью иммунотерапии рака, особенно при множественной миеломе. FDA одобрило идекабтаген виклеуцел (Abecma) в 2020 году и цилтакабтаген аутолейцел (CARVYKTI) в 2022 году для лечения рецидивирующей/рефрактерной множественной миеломы, причем оба препарата используют BCMA-специфичные одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFvs). Нанотела, нацеленные на BCMA, также были исследованы в терапии CAR-T. LCAR-B38M, биспецифический анти-BCMA CAR-T вариант, продемонстрировал безопасность и эффективность в клиническом исследовании фазы I на пациентах с миеломой [79]. Аналогичным образом, цилтакабтаген аутолейцел (CARVYKTI) с использованием той же конструкции CAR достиг высоких показателей в многоцентровом клиническом исследовании. В другом клиническом исследовании использовались гуманизированные нанотела против BCMA в CAR-T второго поколения. Кроме того, CAR-T на основе нанотел были успешно применены у пациентов с миеломой с хронической или разрешившейся инфекцией вируса гепатита B, без каких-либо сообщений о повторной активации вируса в организме. Эти исследования подчеркивают потенциал CAR-T на основе нанотел, особенно тех, которые нацелены на BCMA, в лечении множественной миеломы, демонстрируя многообещающие клинические результаты [80].

На сегодняшний день активно изучается вопрос использования нанотел в CAR-T терапии. Проводится постоянная оптимизация конструкций для повышения специфичности доставки и усиления противоопухолевого эффекта. На основе нанотел также были разработаны и протестированы CAR-T, показавшие свою эффективность, против следующих целей: CD38 [81], CD33 [82], CD20 [83], CD7 [84] и CD105 [85].

При CAR-T-терапии в качестве целей в первую очередь рассматриваются рецепторы, расположенные непосредственно на клеточной поверхности, но в солидных опухолях часто отсутствуют уникальные поверхностные антигены. В качестве альтернативы могут быть использованы особенности микроокружения опухоли, такие как ингибирующие молекулы, например, PD-L1, и антигены, экспрессируемые внеклеточным матриксом. Многообещающим оказалось воздействие на PD-L1 и сплайсинговый вариант фибронектина (EIIIB) в строме и сосудистой сети опухоли. Были разработаны CAR-T на основе нанотел против PD-L1 и EIIIB, при использовании которых наблюдалась задержка роста опухоли и продолжительная выживаемость у сингенных моделей мышей. Впоследствии также были разработаны CAR-T с нанотелами против CD47, PD-L1 или CTLA-4, которые усиливали участие врожденной иммунной системы и улучшали противоопухолевые реакции. Локализованная секреция нанотел также улучшила устойчивость CAR-T [64].

1.1.2.3.3. Нанотела и естественные киллеры

Связывание специфических антител с рецептором CD16 (основной домен активатора NK-клеток) опосредует активацию естественных клеток-киллеров (NK). Данным рецептором опосредуется антителозависимая клеточная цитотоксичность. Для таргетной активации NK клеток были отобраны анти-CD16 растворимые нанотела [86]. Кроме того, на основе нанотел разработаны биспецифические (BiKE) и триспецифические (TriKE) конструкции-активаторы NK клеток. Такие молекулы создают своеобразный мостик между клетками

опухоли и киллерами. В нескольких доклинических исследованиях такие молекулы показали значительный уровень активации NK клеток, с последующим ингибированием опухолевого роста.

Например, биспецифическая конструкция против CD16/CEA эффективно воздействовала на CD16+ и CEA+ клетки рака яичников и колоректального рака, что приводило к значительной активации NK-клеток и ингибированию прогрессирования рака на мышиных моделях [87]. Другие варианты, например анти-CD16/CD19, анти-CD16/HER2 и анти-CD16/EGFR, демонстрировали специфическую активацию и антителозависимую клеточную цитотоксичность против опухолевых клеток, экспрессирующих соответствующие антигены [88]. Клинические испытания анти-CD30/CD16 биспецифических конструкций у пациентов с лимфомой Ходжкина, также показывали многообещающие результаты.

Триспецифические конструкции, такие как CD16/IL-15/CLEC12A и CD16/IL-15/HER2, активируют NK-клетки, при этом демонстрируя эффективность в борьбе с острым миелоидным лейкозом, и раковыми клетками HER2+ в доклинических моделях [89, 90]. Нанотела представляют собой ценный инструмент в разработке новых средств взаимодействия NK-клеток. Также, триспецифические конструкции на основе нанотел, нацеленные на опухолевые антигены, такие как EpCAM и CD33, продемонстрировали эффективную активацию NK-клеток и высокий уровень цитотоксичности в доклинических исследованиях. Кроме того, нанотела в клетках CAR-NK, особенно нанотела анти-CD7 и анти-CD38, показали успех в доклинических экспериментах и продвигаются к клиническим исследованиям лечения лейкемии, лимфомы и миеломы [91, 92].

1.1.2.3.4. Нанотела и макрофаги

Макрофаги, как легко адаптируемые иммунные клетки, играют двойную роль в развитии рака: сначала предотвращают рост опухоли, а затем способствуют её развитию. Макрофаги могут проникать в микроокружение

опухоли значительно чаще, чем Т-клетки. Макрофаги делятся на подтипы M1 (противоопухолевые) и M2 (проопухолевые) в зависимости от функциональных характеристик. Опухолеассоциированные макрофаги в микроокружении опухоли обычно проявляют фенотип M2, экспрессируя ингибирующие цитокины и лиганды иммунных контрольных точек, препятствуя противоопухолевым ответам. Нацеливание на макрофаги, особенно на опухолеассоциированные, может стать многообещающим подходом в усилении иммунотерапии рака. Различные стратегии включают истощение или реполяризацию M2, блокирование лигандов/рецепторов иммунных контрольных точек, вмешательство в передачу сигналов «не ешь меня» и предотвращение инфильтрации макрофагов в микроокружение опухоли [93].

Нанотела проявляют себя в качестве эффективных инструментов воздействия на макрофаги при иммунотерапии рака. Например, биспецифическое нанотело, нацеленное на хемокины CCL2 и CCL5, продемонстрировало улучшение показателей выживаемости по сравнению с традиционными антителами при гепатоцеллюлярной карциноме [94]. Нанотела, слитые с наногелями, продемонстрировали специфическое нацеливание на опухолеассоциированные макрофаги и доставку терапевтических молекул, воздействующих на сложную опухолевую среду. Кроме того, нанотела, нацеленные на блокаду пути CD47/SIRPα и поверхностные маркеры макрофагов, показали многообещающие результаты в доклинических исследованиях, преодолевая ограничения, присутствующие при использовании полноразмерных антител [95, 96].

Перепрограммирование макрофагов с фенотипа M2 на M1 с помощью стратегий на основе нанотел, включая блокирование поверхностных маркеров, путей иммунных контрольных точек и использование CAR-макрофагов, представляет собой потенциальную возможность для иммунотерапии рака [97, 98]. Разработка нанотел, нацеленных на различные маркеры опухолеассоциированных макрофагов, обещает расширить их применение в иммунотерапии, опосредованной макрофагами, предлагая потенциальные

преимущества по сравнению с традиционными подходами с использованием антител.

1.1.2.3.5. Нанотела в заболеваниях лёгких

Для лечения заболеваний легких лекарства можно вводить системно или ингаляционно. Ингаляционный метод введения обладает такими преимуществами, как прямая доставка, быстрое начало действия, более низкая дозировка и низкое системное воздействие, помогающее избежать побочных эффектов. Важным условием является сохранение препаратом его функциональной активности. Нанотела благодаря своей стабильности и устойчивости к жестким условиям подходят для ингаляционного способа введения. Трехвалентное нанотело массой 42 кДа (ALX-0171), нацеленное на респираторно синцитиальный вирус человека, находится в стадии клинической разработки для аэрозольных ингаляций, демонстрируя быструю доставку и положительные результаты в исследовании фазы I [99]. Однако компания Sanofi прекратила клинические испытания ALX-0171 на инфицированных детях. Другой пример включает в себя нанотела, нацеленные на белок А легочного сурфактанта для лечения заболеваний легких, при этом нанотело Nb17 демонстрирует специфическое воздействие на легкие на мышиных моделях и минимальное удержание в других органах [100].

1.1.2.3.6. Нанотела в заболеваниях ЦНС

Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) является проблемой в вопросе доставки лекарств в мозг из-за его полупроницаемой природы. Для повышения проницаемости ГЭБ были изучены различные стратегии, включая физические методы и рецептор-опосредованный трансцитоз. Подходы «троянского коня», использующие лиганды или антитела, нацеленные на рецепторы ГЭБ, облегчают перенос молекул в мозг [101]. Нанотела, в том числе против рецептора трансферрина, являются многообещающими кандидатами для проникновения

через ГЭБ [102]. Нанотело FC5 подвергается актин- и PI3-киназ-зависимому трансцитозу через покрытые клатрином эндоцитарные пузырьки, распознавая специфические олигосахаридные эпитопы на поверхности эндотелиальных клеток головного мозга человека. Хотя FC5 демонстрирует потенциал для транспорта ГЭБ, требуется дальнейшая оптимизация его структуры.

Нанотела открывают возможности для молекулярной диагностики патологий центральной нервной системы, но их способность пересекать ГЭБ ограничена, что частично объясняется их коротким периодом полувыведения. Мономерные нанотела могут свободно пересекать ГЭБ, но данное свойство теряется при попытках доставки терапевтически значимых количеств необходимых веществ, для чего и требуется оптимизация [103]. Нанотела с высокой изоэлектрической точкой (pI) могут пересекать ГЭБ посредством адсорбционно-опосредованного эндоцитоза. Однако ограничения включают необходимость использования относительно больших количеств нанотел для достижения желаемых эффектов в экспериментальных моделях [104].

В контексте опухолей головного мозга нанотела исследуются для воздействия на глиомы IV степени, особенно на глиобластомы, которые очень агрессивны. Нанотела против EGFR, трансмембранного гликопротеина, часто амплифицируемого в глиобластомах, были разработаны для ингибирования передачи сигналов и пролиферации клеток [43]. Подход таргетного лечения включает комбинацию нанотел против EGFR и проапоптозных EGFR-специфичных нанотел, а также их иммунных конъюгатов против TRAIL. Эти конъюгаты нанотел, вводимые нервными стволовыми клетками с замедленным высвобождением, демонстрируют достаточное поглощение глиобластомой, что приводит к снижению роста опухоли и ее инвазивности как in vitro, так и in vivo [105].

1.1.2.3.7. Нанотела в инфекционных заболеваниях

Несмотря на обилие исследуемых и тестируемых нанотел в онкологии и аутоиммунных заболеваниях, их использование в клинических исследованиях

при инфекционных заболеваниях гораздо ниже. Яркие примеры включают группу VHH 203027, нацеленных на ротавирус [106], и ALX-0171 для респираторно-синцитиального вируса, причем последний оказался безуспешным в исследовании фазы 2b [107]. LMN-101, терапевтический кандидат на нанотела для лечения инфекций Campylobacter jejuni, в настоящее время находится на второй фазе испытаний. Область создания терапевтических нанотел для лечения инфекционных заболеваний находится на ранних стадиях своего развития, но недавние разработки показывают многообещающие результаты. В случае SARS-CoV-2 нанотела, нацеленные на связывающий домен рецептора шиповидного белка, продемонстрировали универсальность против различных штаммов [108]. Другие заслуживающие внимания области применения включают нанотела против вирусов, например, несущих миРНК против ВИЧ [109], и бивалентные конструкции с высоким сродством к вирусу гриппа H7N9 [110]. Нанотела также обладают потенциалом против бактерий и токсинов, нейтрализуя факторы вирулентности Listeria monocytogenes и E. coli [111, 112]. При рассмотрении паразитарных инфекций, например, нанотела проявляют антитрипаносомный эффект и обеспечивают адресную доставку лекарств против вызывающего малярию Plasmodium falciparum, что может свидетельствовать об их универсальности в борьбе с различными инфекционными заболеваниями [113].

1.1.2.3.8. Нанотела против токсинов и ядов

Интересные разработки также наблюдались в области разработки нанотел, способных блокировать эффекты ядов. Разработано несколько вариантов конструкций с использованием нанотел, для лечения от отравления токсином скорпиона Androctonus australis hector [114] и ядов Naja kaouthia [115] и Bothrops atrox [116].

2. Материалы и методы

2.1. Иммунизация животных

Каждая иммунизация животных проводилась с использованием белковых препаратов, разведённых в неполном адъюванте Фрейнда (Pierce, США). Каждая доза содержала 600 мкг белкового препарата (около 1010 IFU в случае использования VSV) в 500 мкл PBS и 500 мкл адъюванта, а инъекции проводились трижды с интервалами в две недели. Введение антигенов осуществляли подкожно и внутримышечно в бедро животного. После каждой иммунизации проводили забор 10 мл крови для выделения сыворотки с целью контроля обогащения антителами к целевому белку. Сбор крови для выделения РНК осуществлялся через пять дней после третьей финальной инъекции.

2.2. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови

Выделение мононуклеаров проводили с использованием метода центрифугирования в градиенте плотности при помощи пробирок SepMate (STEMCELL Technologies, Канада). В качестве градиентного раствора использовали Фиколл (ПанЭко, Россия). Выделение осуществлялось согласно инструкции производителя. $CD4^+$ Т-лимфоциты были выделены с использованием набора EasySep Human $CD4^+$ T Cell Isolation Kit (STEMCELL Technologies, Канада) в соответствии с инструкцией производителя.

2.2.1. 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 соосадитель Satellite red (Евроген, Россия).

2.3. Работа с нуклеиновыми кислотами

2.3.1. Выделение суммарной РНК

Выделение суммарной РНК проводили фенол-хлороформным методом. В качестве лизирующего раствора использовался ExtractRNA (Евроген, Россия). Выделение осуществлялось из изолированных мононуклеарных клеток периферической крови согласно инструкции производителя. Полученный препарат РНК, разведённый в воде, разделяли на аликвоты и хранили при -75°С непосредственно до использования, избегая циклов замораживания/размораживания.

2.3.2. ПЦР с обратной транскрипцией

ПЦР с обратной транскрипцией проводили с использованием набора SuperScript III (Invitrogen, США). Процедуру ревертирования проводили согласно инструкции производителя. В качестве матрицы использовался предварительно полученный препарат суммарной РНК в количестве до 5 мкг на реакционную смесь. В реакции применяли праймер CH2-IgG–sp rev (5’-GGTACGTGCTGTTGAACTGTTCC-3’) в количестве 2 пмоль. В качестве ингибитора РНКаз был использован RiboLock RNase Inhibitor (Thermo Fisher Scientific, США) в количестве 40 е.а. на реакцию. Полученные препараты кДНК хранили при -20°С до использования.

2.3.3. ПЦР

Для проведения ПЦР использовали Tersus полимеразу (Евроген, Россия), HS-Taq полимеразу (Евроген, Россия) или DeepVent полимеразу (New England Biolabs, США). В качестве прибора для термоциклирования использовался Biorad Dual 48 Well DNA Engine (Bio-Rad, США). Для моделирования ПЦР и оценки температур отжига для выбранных праймеров использовали программу SnapGene (SnapGene, США).

2.3.4. Количественная ПЦР

Уровень экспрессии исследуемых генов в клетках определяли методом количественной ПЦР (qPCR), используя полимеразу HS-Taq (Евроген, Россия), подобранные пары праймеров и зонды, синтезированные компанией «Евроген» (Россия). При использовании интеркалирующего красителя применялся EvaGreen (Biotium, США). Все эксперименты выполнялись в шести независимых повторностях. Количественную оценку уровня транскриптов осуществляли методом анализа порогового цикла (C_t). Внутренним контрольным геном при нормализации экспрессии служил GAPDH. Изменения экспрессии гена оценивали по формуле $2^{-\Delta C_{Te}-\Delta C_{Tk}}$, где ΔC_{Te} и ΔC_{Tk} соответствовали разностям C_t между исследуемым геном и GAPDH. Реакции ПЦР выполнялись на системе MyiQ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США).

Для оценки уровня экспрессии ACE2 использовали праймеры ACE2_qPCR_d1 (5'-GGGATCAGAGATCGGAAGAAGAAA-3') и ACE2_qPCR_r1 (5'-GGAGGTCTGAACATCATCAGTG-3').

2.3.5. Дизайн праймеров и зондов

Дизайн праймеров осуществляли с помощью сервиса Primer-BLAST (NIH NCBI, США), а анализ их вторичной структуры проводили с использованием инструмента OligoAnalyzer Tool (IDT, США).

2.3.6. Горизонтальный электрофорез в агарозном геле

Для проведения электрофореза в агарозном геле использовался буфер TBE (90 мМ Трис, 90 мМ борная кислота, 2 мМ ЭДТА, pH 8.3). Готовили гель с концентрацией агарозы (VWR International LLC, США) 1,5%. Электрофорез проводили в течение 60 минут при напряжении 130 В. В качестве стандарта для определения длин фрагментов использовался маркер длин ДНК 1 kb (Евроген, Россия). Окрашивание геля проводили с SYBR Gold (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции производителя. Детекцию результатов

осуществляли с использованием трансиллюминатора Safe Imager 2.0 (Invitrogen, США) и цифрового фотоаппарата (Canon, США).

2.3.7. Вертикальный электрофорез нуклеиновых кислот

Вертикальный электрофорез нуклеиновых кислот использовался на этапе рестрикционного картирования отобранных в процессе селекции вариантов антител и распределения их по семействам. Использовали 10% акриламидный гель на основе TBE буфера. В качестве маркера использовали Ultra Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США). Процедуру проводили 90 минут в буфере TBE при 120 В. Окрашивание и детекцию проводили аналогично с ранее описанным электрофорезом в агарозном геле.

2.3.8. Лигирование ДНК

Лигирование фрагментов ДНК в векторные плазмиды проводили с помощью фермента T4 ДНК лигаза (Евроген, Россия). Реакцию проводили согласно инструкции производителя в течение 14-16 часов. Объем реакционной смеси варьировался в зависимости от количества используемой ДНК. Молярное соотношение вектора к вставке в реакции поддерживалось 1:5. Инактивацию фермента осуществляли путём инкубации реакционной смеси при 70°C в течение 15 минут.

2.3.9. Выделение ДНК из агарозного геля и реакционной смеси

Выделение ДНК из агарозного геля и реакционной смеси проводили с использованием набора CleanUp Mini (Евроген, Россия) согласно инструкции производителя. Элюирование образцов с колонок осуществляли водой для упрощения проведения дальнейших ферментативных реакций.

2.3.10. Ферментативный гидролиз

Для гидролиза фрагментов ДНК использовались ферменты фирмы New England Biolabs (США). Гидролиз проводили в 20 мкл реакционной смеси с

использованием буфера, рекомендованного производителем. Количество ДНК рассчитывалось исходя из указанной активности для каждого фермента согласно инструкции. Инкубацию проводили при 37°C в течение 1-3 часов в зависимости от количества ДНК. Ферменты инактивировали при 80°C в течение 20 минут. Для векторных плазмид проводили дополнительное дефосфорилирование 5′ и 3′ концов для повышения качества дальнейшего лигирования с использованием щелочной фосфатазы креветок (rSAP) (New England Biolabs, США). Для реакции использовали 1 е.а. фермента и инкубировали реакционную смесь 30 минут при 37°C. Далее также проводили инактивацию при 80°C в течение 20 минут.

2.3.11. Наработка плазмид

Для наработки необходимых плазмид их трансформировали в компетентные клетки E. Coli штамма SURE 2 (1 минута при 42°C). Клетки выращивали в течение ночи в среде LB с применением селекционного антибиотика. Выделение ДНК из клеток производили с использованием центрифужных колонок QIAprep Spin Miniprep (Qiagen, США) для небольшого количества ДНК или набора Plasmid Plus Maxi Kit (Qiagen, США) для препаративных количеств. Выделение проводили согласно протоколам производителя.

2.4. Конструирование экспрессионных плазмид

2.4.1. Конструирование плазмиды для экспрессии полноразмерного S-белка

Для получение нуклеотидной последовательности, кодирующей полноразмерынй шиповидный белок, использовали кДНК вируса SARS-CoV-2 варианта Ухань. Затем последовательно амплифицировали фрагменты с использованием ПЦР с амплификацией перекрывающихся участков (OE-PCR), позволяющей в итоге получить целевую последовательность. В ходе работы были использованы следующие праймеры:

SC2_S_dir (5'-GAACAATGTTTGTTTTTCTTGTTTTATTGCC-3'),

SC2_S_dir2 (5'-CCACTAGTCTCTAGTCAGTGTGTTAATC-3'),

SC2_S_rev (5'-TTATGTGTAATGTAATTTGACTCCTT TGAGC-3'),

SC2_S_RT (5'-GTAGCATCCTTGATTTCACCTTGCTTC-3'),

SC2_RBD_D1 (5'-AAATCGCTCCAGGGCAA- ACT-3'),

SC2_RBD_D6 (5'-TGCACTTGACCCTCTCTCAG-3'),

SC2_RBD_R1 (5'-TGTGGATCACGGACAGCATC-3'),

SC2_RBD_R6 (5'-ACACCTGTGCCTGTTAAACCA-3'),

SC2_Sm_D1 (5'-CACCAGCAACTGTTTGTGGAC-3'),

SC2_Sm_R1 (5'-GCACCAAAGGTCCAACCAGA-3') и

SC2_St_D1 (5'-ACGGCCTTACTGTTTTGCCA-3').

Финальную конструкцию клонировали в вектор pMD2-G по сайту рестрикции EcoRI - pMD2-Swt.

2.4.2. Экспрессия ACE2, S-белка и RBD

Для проведения амплификации кДНК, полученной из клеток линии H1299, использовали высокоточную ДНК-полимеразу Tersus в сочетании с набором праймеров: ACE2_XbaI_dir (5'-TATATCTAGAGCCACCATGTCAAGCTCTTCCTGGCTC-3') и либо ACE2_8His_SalI_rev (5'-CTCTCTCTGTCGACTTATCAATGGTGATGGTGATGGTGATGGTGGGAAACAGGGGGCTGGTTAGGAG-3'), либо ACE2_SalI_rev (5'-ATATGTCGACCTAAAAGGAGGTCTGAACATCATCAGTG-3'). Полученные фрагменты разделяли электрофорезом в агарозном геле с концентрацией 1 %, затем очищали методом твердофазной экстракции. Клонирование продуктов амплификации осуществляли лигированием по сайтам рестрикции XbaI и SalI (New England Biolabs, США) в последовательность лентивирусного вектора pLCMV-PL4-puro.

Для получения последовательностей, кодирующих тримеризованный эктодомен S-белка SARS-CoV-2 и его RBD-фрагмент, использовали плазмиды pCAGGS-Spike и pCAGGS-RBD соответственно. Амплификация

последовательности эктодомена проводилась с праймерами S_CO_BsmBI_AGCT_dir (5'-AGAGAGCGTCTCAAGCTTAGGCCACCATGTTCGTGTTTC-3') и S_CO_XbaI_rev (5'-AGAGAGTCTAGATTAGTGATGATGATGATGATGTCCCAAGAAGGTCGACAG-3'), тогда как для получения фрагмента RBD применялась пара S_CO_BsmBI_AGCT_dir и RBD_CO_XbaI_rev (5'-AGAGAGCGTCTCAAGCTTAGGCCACCATGTTCGTGTTTC-3'). Полученные ДНК-конструкции затем клонировали в экспрессионный вектор pSI-PL1-10His-puro через сайты рестрикции HindIII и XbaI.

2.4.3. Экспрессия PD1

Вектор лентивирусной экспрессии PD1 (pLSF-PD1puro) был сконструирован путем клонирования полной кодирующей последовательности гена PDCD1, амплифицированной с использованием праймеров PD1-Xba-dir (5'-AGAGATCTAGACTCCAGGCATGCAGATCCCAC-3') и PD1-Sal-rev (5'-AGAGAGGTCGACGGTCAGAGGGGCCAAGAG-3'). После рестрикции полученного ампликона соответствующими ферментами его вставляли в плазмиду pLSF-PL4-puro, предварительно линеаризованную аналогичными эндонуклеазами.

2.4.4. Лентивирусные векторы для экспрессии

Плазмидные векторы pLCMV-fLuc, pLCMV-tagRFP, pLCMV-nanoLuc и pLCMV-tagGFP2 были сконструированы аналогично ранее проведённому исследованию [117].

2.4.5. Упаковочные плазмиды

Плазмиды psPAX2 и pMD2.G, использованные в работе, были предоставлены Дидье Троно (Addgene, №12260 и №12259 соответственно), а плазмида pCG-HcΔ18-AA — Якобом Рейзером (Addgene, №86559).

2.4.6. Плазмиды для ретаргетирования лентивируса

Промежуточный вектор pCG-4AHcΔ24-AAXB был получен на основе pCG-HcΔ18-AA методом амплификации с праймерами 4AHd24-BsmBi-gatc dir (5'-AGAGAGCGTCTCAGATCTAGGGTGCAAGATCATCCACAATGGCCGCTGCAGCCAACCGGGAGCACCTGATG-3') и Hcd18-aa-xba-bamh-rev (5'-ATCCTCTTGCGGCCGCCGGATCCCTCTCTCTCTCTTCTTCTAGATTCCCGGGTGACTGTGC-3'). Плазмида pCG-HcΔ18-AA была подарком от Якоба Рейзера (плазмиды Addgene № 86559). Продукты ПЦР подвергались двойной рестрикции ферментами BsmBI и NotI и последующему клонированию в pCG-HcΔ18-AA, гидролизованный BamHI и NotI. В результате данной модификации на 3'-конце последовательности белка H были введены уникальные сайты рестрикции XbaI и BamHI, что позволило далее клонировать последовательность нанотела 102c3.

Для создания конструкции pCG-NipFΔ22, кодирующей укороченный вариант белка F вируса Нипах, использовали синтетическую последовательность, содержащую терминальные сайты рестрикции BamHI и SpeI, которую клонировали в плазмиду pCG-HcΔ18-AA, линеаризованную теми же ферментами.

Конструкция pMD2.Gmut, кодирующая модифицированный белок VSV-G (с заменами I41L, K47Q, R354A), была получена с использованием метода трехфрагментной ПЦР с перекрыванием и праймерами VSVG EcoRI dir (5'-GCACGTGAGATCTGAATTCAACAGAGATCG-3'), VSVG 4147 rev (5'-CCTTGTGACTCTGGGGCATTTTGACTTGTAAGGCTGTGCC-3'), VSVG 4147 dir (5'-GGCACAGCCTTACAAGTCAAAATGCCCCAGAGTCACAAGG-3'), VSVG 354 rev (5'-CCAGTCATCCCACAGTTCGGCTTCTGTGGTAGTTCCACTG-3'), VSVG 354 dir (5'-CAGTGGAACTACCACAGAAGCCGAACTGTGGGATGACTGG-3') и VSVG EcoRI rev (5'-GCACTGGTGGGGTGAATTCC-3'). Полученный фрагмент

рестриктировали ферментом EcoRI и вставляли в расщепленную тем же ферментом плазмиду pMD2.G.

2.4.7. Экспрессия псевдорецептора на основе VHH

Плазмида pCG-VHHR, кодирующая псевдорецептор, была сконструирована на основе синтетической последовательности, содержащей лидерную последовательность Козак, трансмембранный домен CD8, сайты рестрикции XbaI и BamHI, 12-аминокислотный спейсер и трансмембранный домен CD28 с добавлением сайта NheI. Амплификация осуществлялась праймерами CD8s-BglII-dir (5'-AGAGAGAGATCTGCCACCATGGCCTTACCAGTGACCG-3') и CD28TM-NheI-rev (5'-CCTCTTACTCCTGCTAGCCACCC-3'). После расщепления BglII и NheI амплифицированный фрагмент вставляли в pCG-HcΔ18-AA, расщепленный BamHI и SpeI.

Плазмида pCG-102c3R была получена путем клонирования нанотела nb102c3 в pCG-VHHR по сайтам XbaI и BamHI. Плазмида pHAGE-ERBB2 была предоставлена Гордоном Миллсом и Кеннетом Скоттом (плазмида Addgene № 116734). Плазмида pCG-929R была получена клонированием кодирующей последовательности DARPin 9.29 в pCG-VHHR.

2.4.8. Конструкции для сайленсинга FOXP3

Для получения лентивирусного вектора pLH1-7SKP-shFOXP3, экспрессирующего малые шпилькообразующие РНК (shRNA) против гена FOXP3, были синтезированы и отожжены фосфорилированные олигонуклеотиды shFOXP3-1-dir (5'-GATCCGGCCACATTTCATGCACCAGCTGTGCTTGCTGGTGCATGAAATGTG GCTTTTTG-3') и shFOXP3-1-rev (5'-AATTCAAAAAGCCACATTTCATGCACCAGCAAGCACAGCTGGTGCATGAA ATGTGGCCG-3'), которые затем клонировали в плазмиду pLH1p, линеаризованную ферментами BamHI и EcoRI, с получением конструкции

pLH1p-shFOXP3-1. Аналогично была сконструирована плазмида pL7SKP-shFOXP3-2, основанная на олигонуклеотидах shFOXP3-2-dir (5'-GATCCGGAGTCTGCACAAGTGCTTTGTTGTGCTTACAAAGCACTTGTGCAGACTCTTTTTG-3') и shFOXP3-2-rev (5'-AATTCAAAAAGAGTCTGCACAAGTGCTTTGTAAGCACAACAAAGCACTTGTGCAGACTCCG-3'). Затем фрагмент длиной 300 п.н., ограниченный сайтами SalI и SpeI, был перенесен из pL7SKP-shFOXP3-2 в pLH1p-shFOXP3-1.

2.4.9. Белки с BAD

Экспрессионные векторы на основе плазмиды pET32b$^+$, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие нанотела, были модифицированы с целью добавления к белку домена, распознаваемого системой биотинилирования (BAD-домена, аминокислотная последовательность GGLNDIFEAQKIEWH). Для этого синтетически были получены олигонуклеотидные последовательности, кодирующие BAD-домен и шарнирный участок IgA. Эти последовательности были гибридизированы между собой и далее клонированы в векторы pET32b$^+$ в области С-конца последовательности нанотела.

Конструкция BAD–hinge включала сайты рестрикции для ферментов BamHI (в прямом праймере) и SalI (в обратном праймере), что обеспечивало возможность направленного клонирования. Последовательности праймеров были следующими: прямой праймер (BAD_dir): 5′-AGAGAGGGATCCGTCTCCGTCTACTCCGCCAACTCCGTCTCCGTCTACTCCGCCAGCTAGCGGAGGCCTGAACGATATTTTCGAAGCTCAG-3′; обратный праймер (BAD_rev): 5′-AGAGAGGTCGACTCAGTGATGATGGTGATGATGGTATTTGTATTTGCTCGAGCCGTGCCATTCGATTTTCTGAGCTTCGAAAATATCGTTCAGGCCTC-3′.

Для обеспечения биотинилирования белка in vivo, штамм E. coli BL21(DE3) был трансформирован плазмидой, несущей ген биотин-лигазы BirA, выделенной из штамма E. coli AVB101.

2.4.10. Белки с LPETG

Конструкции для экспрессии нанотел с мотивом LPETG по С-концу вместо BAD были получены путём клонирования последовательности (5`-CTAGCCTGCCGGAAACCGGCGGCCATCATCACCATCATCACTGAC-3`) по сайтам NheI и XhoI. Экспрессия проводилась путём трансформации вектора pET22 в клетки ROSETTA gami codon^{+}.

2.4.11. Другие белки

Белковый препарат барназы был получен при помощи наработки в бактериальной культуре BL21 (DE3) с использованием экспрессионного вектора pET22 (Novagen, США). Кодирующая последовательность барназы (GenBank: M14442.1) была клонирована в вектор с добавлением в белковую последовательность двух дополнительных глицинов по N-концу. Данная модификация была необходима для проведения реакции конъюгации сортазой А. Также в используемом варианте вектора отсутствовала аффинная метка для очистки белка. Сортаза А была получена методом экспрессии в бактериальной культуре BL21 (DE3). Для экспрессии использовался коммерческий вектор sortase A 5M в pET29 (Addgene, США).

Мышиное анти-CD47 mAb B6H12 было либо получено и очищено из гибридомы HB9771, приобретенной в ATCC, либо приобретено в Santa-Cruz Biotechnology (США). Биотинилированное мышиное анти-CD47 mAb (клон B6H12.2) было приобретено в BioLegend (США).

2.4.12. Димерные конструкции

Димерные варианты конструкции были получены путём амплификации последовательности нанотела из плазмиды pET с праймерами Alp_VHH_uni_fwd (5`-GAACAGACCACCATGTCTAGASAGKTGCAGSTSGTRGAGTCTGKGGGAGG-3`) и Alp_VHH_R1_2_Xho (5`-

AGAGAGCTCGAGGGGGGGGTCTTCGCTGTGGTGCG-3`) или Alp_VHH_R2_2_Xho (5`-AGAGAGCTCGAGGGGTTGTGGTTTTGGTGTCTTGGG-3`). Затем полученный ампликон был клонирован в вектор pET, содержащий последовательность нанотела и LPETG мотив, по сайтам рестрикции NheI и XhoI. Полученный конструкт позволял получить полноразмерный димерный белок в процессе экспрессии.

2.5. Работа с белковыми препаратами

2.5.1. Очистка белковых препаратов из бактериальных культур

2.5.1.1. Металл-хелатная аффинная хроматография

Для очистки белков была использована Agarose HisPur Ni-NTA Superflow (Thermo Fisher Scientific, США), наполненная двухвалентными ионами никеля. Смолу загружали в пустую колонку в объёме 1,5 мл. Нанесение растворов проводили с использованием перистальтического насоса Econo gradient pump (Bio-Rad, США) через мембранный фильтр с диаметром пор 0,45 мкм. Все растворы предварительно фильтровали и дегазировали. Скорость нанесения растворов составляла 3 мл/мин. В процесс подготовки колонки к хроматографии входит промывка 10 объёмами 20% раствора этанола, промывка 10 объёмами деионизированной воды, загрузка колонки 5 объёмами 0,1 М раствором хлорида никеля ($NiCl_2$), промывка 10 объёмами воды, а затем 10 объёмами связывающего буфера (50 мМ Трис, 500 мМ NaCl, pH 7,5). Детекцию оптической плотности осуществляли благодаря использованию хроматографа BioLogic Duo-Flow (Bio-Rad, США) и оптическому модулю с детектором QuadTec 40 System на длине волны 280 нм. Для наблюдения в реальном времени использовалось программное обеспечение от производителя. Далее наносили предварительно фильтрованный клеточный лизат в полном объеме при скорости нанесения 1-2 мл/мин. После нанесения колонку промывали связывающим буфером до избавления от фона на графике оптической плотности (обычно 10-20 объёмов). Далее производили

отмывку от неспецифически связанных продуктов путем последовательного нанесения 10 объёмов связывающего буфера с 20 мМ концентрацией имидазола и 10 объёмов – с 50 мМ концентрацией имидазола. Элюцию целевого белка проводили 3-5 мл (в зависимости от количество сходящего белка на графике) связывающего буфера с 0,5 М концентрацией имидазола. Полученные белковые препараты хранились при 4°С до дальнейшего использования. После элюции колонку промывали 10 объёмами промывочного буфера (50 мМ Трис, 500 мМ NaCl, 50 мМ ЭДТА, pH 7,5), затем 20 объёмами воды и 10 объёмами 20% этанола для хранения.

2.5.1.2. Гель-фильтрация

Использовали колонку HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 HR (Cytiva, США). Для нанесения и детекции результатов использовали приборы, ранее описанные в разделе, посвященному металл-хелатной хроматографии. Перед нанесением белка колонку промывали 200 мл буфера (50 мМ Трис, 500 мМ NaCl, pH 7,5). Далее наносили до 5 мл белкового препарата и 150 мл буфера с контролем оптической плотности. В зонах повышения оптической плотности осуществляли сбор фракций по 2 мл для дальнейшей оценки их чистоты. Степень чистоты собранных фракций определяли при помощи вертикального электрофореза в полиакриламидном геле с последующим окрашиванием Кумасси.

2.5.1.3. Ультрафильтрация

Для концентрирования белков в малом объёме использовали фильтрующие устройства Amicon (Millipore, Германия) объёмом 0,5 – 15 мл для центрифугирования. Молекулярную массовую отсечку подбирали в зависимости от размера концентрируемого белка.

2.5.1.4. Диализ

Для диализа использовали мембрану SnakeSkin (Thermo Scietific, США). Размер пор в мембранах использовали в вариантах 3 кДа и 10 кДа в зависимости

от используемого белка. Препарат вымачивали в буфере при постоянном перемешивании в течение ночи.

2.5.1.5. Катионная хроматография

Очистку барназы проводили методом катионной хроматографии. В качестве сорбента использовали колонку с SP-сефарозой HiTrap SP FF (Cytiva, США). Смолу балансировали буфером (50 мМ фосфат натрия, pH 6.0, 50 мМ NaCl) при скорости потока 1 мл/мин. Подготовленный фильтрованный лизат загружали в колонку при скорости 0,5–1 мл/мин. Барназа, обладая положительным зарядом при pH 6.0, связывается с сорбентом, тогда как примеси удаляются промывкой. Для удаления слабосвязанных примесей колонку промывали 10 объемами буфера (50 мМ натриевый фосфат, pH 6.0, 50 мМ NaCl) при скорости 1 мл/мин. Чистый белок элюировали градиентом NaCl (от 50 мМ до 500 мМ) в буфере 50 мМ натриевого фосфата, pH 6.0. Скорость градиента составляла 10% NaCl на 10 колоночных объемов. Фракции собирали при 200–300 мМ NaCl опираясь на данные спектрофотометра (A280). Фракции, содержащие барназу, объединяли и диализовали против буфера для хранения (50 мМ Tris-HCl, pH 7.5, 100 мМ NaCl). Очищенный белок хранили при 4°C в присутствии 10% глицерина.

2.5.1.6. Смена буфера

Для смены буфера, в котором растворены белки, использовали гравитационные колонки для обессоливания (Cytiva, США) для образцов объёмом 0,5 мл и 2,5 мл. Наполнителем колонки в данном случае является сефадекс G25. Смену буфера проводили согласно инструкции производителя.

2.5.2. Электрофорез белков

Вертикальный электрофорез белков проводили в акриламидном геле с 10% концентрацией акриламида для разделяющего геля и 5% концентрацией – для концентрирующего. Гель смешивали на основе бис-трисового буфера в

концентрации 0,33 мМ. В форезной камере использовали два варианта буферов на основе MES (для лучшего разрешения белков до 75 кДа) и MOPS (для лучшего разрешения белков 30-200 кДа). Общий состав выглядел следующим образом: 50 мМ MES/MOPS, 50 мМ Трис, 1 мМ EDTA и 0.1% SDS. В качестве маркеров длин использовали PageRuler Prest или PageRuler Prest Plus. В буфер перед использованием добавляли пиросульфат натрия до концентрации 50 мМ. Для нанесения образцов в гель готовили Sample Buffer (62,5 мМ Трис, 10% глицерол, 2% SDS, 5% бета-меркаптоэтанол, 0,05% бромфенол синий, pH 6.8). Электрофорез проводили при 120 В в течение 90 минут.

Полученный гель либо подвергали окрашиванию раствором Кумасси R-250 (Sigma-Aldrich, США) (0,25% Кумасси R-250 (м/о), 40% метанол, 5% ледяная уксусная кислота) для оценки анализируемых белков в течение 30 минут с последующей отмывкой (40% этанол, 10% ледяная уксусная кислота), либо использовали для переноса на мембрану.

2.5.3. Вестерн-блот

Для переноса использовали мембрану Immobilon-FL PVDF (Merck Millipore, Германия), предварительно смоченную в метаноле. Для буфера для переноса использовали следующий состав: 25 мМ Трис, 192 мМ глицин, 20% метанол, pH 8.3. Гель выкладывали на 3 слоя фильтровальной бумаги, смоченной в буфере для переноса, сверху аккуратно покрывали мембраной и также покрывали 3 слоями фильтровальной бумаги. Перенос проводили при постоянной силе тока в 200 мА в течение 180 минут.

После переноса мембрану 1 час инкубировали в 5% растворе сухого молока в PBST (MPBS) при постоянном перемешивании на шейкере для блокирования. Инкубацию с первичными антителами проводили в течение 60 минут при комнатной температуре, со вторичными – 40 минут. Отмывку между антителами и перед проявкой проводили 3 раза по 5 минут на шейкере в 0,05% растворе PBST. Используемые антитела разводили в 5% MPBS. Для проявления использовали реагенты ECL chemiluminescence kit (Servicebio, China).

2.5.4. Биотинилирование белка

Получение биотинилированных препаратов белков осуществляли с помощью реагента Sulfo-NHS-LC-Biotin (Thermo Fisher Scientific, США). Процесс биотинилирования проводили согласно инструкции производителя. Для реакции использовали 100 мкг целевого белка. От непрореагировавших остатков биотина избавлялись ультрацентрифугированием. Контроль реакции биотинилирования проводили с использованием ИФА.

2.5.5. Измерение константы диссоциации

Для измерения константы диссоциации был использован прибор BLITz (ForteBio, США) и специальные стрептавидиновые сенсоры Dip and Read (ForteBio, США). Для проведения процедуры использовали программное обеспечение, предоставляемое производителем. Перед запуском необходимо задать параметры продолжительности каждого этапа (стабилизация, иммобилизация, отмывка, связывание и диссоциация). Данные показатели варьировались в зависимости от проводимого опыта.

Для экспериментов использовали стрептавидиновые сенсоры, на поверхность которых иммобилизовали полноразмерный шиповидный белок, предварительно меченный биотином. После измерения показателей связывания на выходе получали график ассоциации/диссоциации для каждого образца, а также числовые данные об измеренных параметрах. Сенсор утилизировали после проведения опыта.

2.5.6. Биннинг эпитопов связывания

Для определения схожести эпитопов связывания проводили биннинг наиболее перспективных вариантов нанотел. Для этого использовали прибор BLITz и стрептавидиновые сенсоры. На сенсоре иммобилизовали нанотело, конъюгированное с биотином. Далее проводили связывание иммобилизованного нанотела с целевым белком (RBD). После чего окунали сенсор в препарат

нанотела без биотина и наблюдали за графиком связывания. В случае, если нанотела распознают и связываются с одним и тем же эпитопом, мы не наблюдаем на графике накопления белка на этапе связывания, если же эпитопы разные, то в результате наблюдается образование кривой накопления за счет связывания нанотела с другим участком целевого белка.

2.5.7. Иммуноферментный анализ

Антиген, сорбирующийся на лунках, разводили в PBS до концентрации 2-3 мкг/мл, после чего разносили на лунки планшета в объёме 50 мкл. Сорбцию антигена проводили 4 часа при комнатной температуре, либо ночь при 4°C. Блокирование лунок осуществляли 5% раствором сухого молока в PBST в течение 2 часов при 37°C. Инкубацию всех наносимых белковых препаратов и первичных антител проводили в течение 1 часа при комнатной температуре на шейкере. Отмывку между всеми этапами нанесения растворов в лунки планшета проводили последовательными трёхкратными отмывками PBST и PBS с 5-минутными интервалами инкубации на шейкере при комнатной температуре. Инкубацию со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена, проводили также при комнатной температуре 40 минут. После финальной отмывки проявляли лунки буфером TMB в объёме 50 мкл, который при сильной интенсивности реакции окрашивания останавливали 50 мкл 5% раствора серной кислоты. Детекцию результатов осуществляли с использование микропланшетного анализатора Triad LT (Dynex Technologies, США) при длине волны 585 нм (без остановки реакции) или 450 нм (с остановкой реакции серной кислотой). Концентрация используемых белковых препаратов варьировалась в зависимости от типа проводимого эксперимента. Коммерческие антитела использовались в концентрациях, рекомендуемых производителем. Количество этапов ИФА так же могло варьироваться в зависимости от цели проводимого эксперимента. В каждой постановке использовались лунки с положительным и отрицательным контролями для оценки протекания реакции.

2.6. Работа с эукариотическими культурами

2.6.1. Ведение культур

В данной работе использовались клеточные линии U937 AML, SKOV3, GMB6138, VERO, BT-474, HEK-293, HEK-293T (человеческие трансформированные клетки), BHK-21, HCC1954, IMR-32, а также линия H1299 (немелкоклеточный рак легкого), предоставленные Американской коллекцией типовых культур клеток (ATCC, США). Линия клеток HEK-293LTV была приобретена в Cell Biolabs (Сан-Диего, Калифорния, США). Культуры выращивали при температуре 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO_2, в питательной среде DMEM-F12 (PAA, Австрия), дополненной 10 % эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (FBS) (Gibco, США), 2 мМ аланилглутамина (ПанЭко, Россия), 20 мМ буфера HEPES, а также антибиотиками — пенициллином (100 мкг/мл) и стрептомицином (100 мкг/мл) производства компании «ПанЭко».

Клетки U937 вели в RPMI1640. Культуральная среда содержала 10% фетальной бычьей сыворотки, пенициллин-стрептомицин, L-глутамин и заменимые аминокислоты (Gibco). Линия клеток гибридомы B6H12.2 HB9771 культивировалась в IMDM (ATCC, США) с 2% FBS для получения моноклональных антител.

Периферические мононуклеарные клетки крови (PBMC) и Т-лимфоциты культивировали в среде AIM-V (Thermo, Уолтем, США). Все клетки поддерживали в инкубационных условиях при температуре 37 °C и концентрации CO_2 5%.

2.6.2. Трансфекция

Трансфекция эукариотических клеток осуществлялась химическим способом с использованием подкисленного полиэтиленимина (ПЭИ). Цитотоксичность минимизируется подкислением стокового раствора и сменой культуральной среды через 8-12 часов после трансфекции.

Стоковые растворы: полиэтиленимин: 5 мг/мл линейного ПЭИ в 0,2 N HCl; лактатный буфер: 20 мМ лактата натрия, pH 4,0, 150 мМ NaCl; плазмидная ДНК в буферном растворе; бессывороточная культуральная среда DMEM (заменяющий сыворотку раствор, липидная смесь, кофеин 4 мМ); культуральная среда Opti-MEM; культуральная среда DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки.

Клетки HEK-293T предварительно высаживались на лунки или культуральные чашки до достижения конфлюэнтности 70-90%. Непосредственно перед началом трансфекции производилась смена культуральной среды на свежую среду Opti-MEM. ДНК и ПЭИ смешивали с лактатным буфером в разных пробирках. ПЭИ использовался в пятикратном массовом превышении относительно используемой ДНК. Оба раствора аккуратно объединялись, перемешивались и инкубировались при комнатной температуре 20 минут. Полученный раствор разбавлялся Opti-MEM и раскапывался на лунку. Клетки инкубировались 8-12 часов при 37°, после чего осуществлялась замена среды на DMEM с 10% FBS. Через 24 часа среда снова заменялась на бессывороточную среду DMEM для замедления размножения клеток. Видимый результат наблюдался на третий день после проведения трансфекции. Количество ДНК и используемых буферов рассчитывалось индивидуально для каждого эксперимента исходя из пропорций, описанных ранее [118].

2.6.3. Трансдукция

Трансдукцию клеток проводили путём добавления среды с определённым титром вируса и полибреном (10 мкг/мл) в случае доставки плазмиды. Через сутки производили замену среды и инкубировали 72 часа.

2.6.4. Люциферазный анализ

Анализ люминесценции люциферазы светлячка (TRIS 100 мМ, MgSO4 60 мМ, DTT 5 мМ, EDTA 4 мМ, ATP 4 мМ, люциферин 0,6 мМ, глицерин 10%, CoA 0,4 мМ, Na2P2O7 0,1 мМ) проводили в белых 96-луночных планшетах (SPL Life

Sciences, Почхон -си, Кёнгидо, Корея) в соответствии со стандартным протоколом. Показания люминесценции регистрировали с помощью микропланшетного ридера Triad (Dynex Technologies, Шантилли, Вирджиния, США).

2.6.5. Активация Т-лимфоцитов и наработка Т-регуляторных клеток

Для активации клеток и индукции экспрессии PD1 $CD4^+$ Т-лимфоциты и PBMC культивировали при плотности 10^6 клеток/мл в присутствии различных стимулов: только интерлейкина-2 (IL-2); IL-2 совместно с фитогемагглютинином М-формы (PHA-M); комбинации форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA), иономицина и PHA-M; либо смеси PMA, иономицина, IL-2, интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-21 (IL-21), интерферона-γ (IFNγ) и PHA-M. Концентрации добавляемых факторов составляли: IL-2, IL-4, IL-21 и IFNγ (Peprotech, США) — по 20 нг/мл, PMA (Sigma, США) — 50 нг/мл, иономицин (Sigma) — 2 мкМ, PHA-M (Gibco, США) — 1% объема среды. Культивирование клеток проводили в течение 7 суток с добавлением свежих цитокинов каждые три дня.

Для индукции индуцированных регуляторных Т-клеток (iTreg) в среду дополнительно вносили 20 нг/мл IL-2, 5 нг/мл трансформирующего фактора роста β (TGFβ) (R&D Systems, США), 10 нМ алл-транс-ретиноевой кислоты и 100 нг/мл рапамицина (Cayman Chemical, США). Культивирование осуществляли также в течение 7 суток с периодическим восполнением цитокинов.

2.6.6. Оценка уровня TGFβ

Уровни TGFβ в культуре клеток iTreg определяли с использованием комплекта Human TGF-beta 1 DuoSet (R&D Systems, США) на 96-луночных планшетах MaxiSorp (Nunc, Дания) согласно инструкции производителя. Клетки были промыты трижды и посеяны в среду AIM-V с соответствующими добавками, исключая TGFβ. Для контроля из каждой лунки был взят образец до посева, который использовался в качестве эталонного. Клетки культивировали в

течение 48 часов, после чего измеряли уровни TGFβ. Для измерений использовался микрооптический спектрофотометр Triad (Dynex, США).

2.6.7. Конструирование клеточных линий

2.6.7.1. Линии для экспрессии рекомбинантных белков

Плазмиды pRA-1D10-Fc, pSI-S-puro и pSI-RBD-puro использовали для химический трансфекции клеток линии HEK-293T в среде Opti-MEM (Gibco, США). Через 24 ч среду меняли на свежую с добавлением 1 мкг/мл пуромицина и продолжали культивирование до получения устойчивой к селективному антибиотику культуры.

2.6.7.2. Линия, гиперэкспрессирующая ACE2

Доставку плазмид pLCMV-ACE2-puro и pLCMV-ACE2-His-puro в клетки HEK-293 и HEK-293T проводили путём лентивирусной трансдукции. Предварительно высаживали 10^6 клеток HEK-293T на культуральную чашку 10 см в диаметре. 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/ a-ddgene:12259; RRID:Addgene_12259) (обе плазмиды были любезно предоставлены Didier Trono). По истечении суток проводили замену культуральной среды на бессывороточную – DMEM-F12 – с добавлением Serum replacement solution и Lipid mixture (Peprotech, США) и 4 мМ кофеина (Sigma-Aldrich, США). По истечении 48 часов со смены среды осуществляли сбор обогащённой вирусом культуральной среды. После фильтрации и добавления полибрена (до 10 мкг/мл) использовали для заражения клеток линии HEK-293T либо HEK-293. Клетки предварительно высаживали на 10 см чашки по 5×10^5 клеток. Через 24 часа проводили замену культуральной среды на обычную (10% FBS). Через 72 часа после заражения к культуральной

среде добавляли селекционный антибиотик (пуромицин, 1мкг/мл (Sigma-Aldrich, США) для отбора трансдуцированных клеток. Клетки культивировали в течение 10 дней с тщательным визуальным контролем общего состояния линии.

2.6.7.3. Линия, экспрессирующая ERBB2

Для получения стабильной клеточной линии-экспрессора ERBB2 были трансдуцированы клетки HEK-293TLTV. Использовали лентивирусный вектор, кодирующий человеческий ERBB2 (pHAGE-ERBB2). Селекцию целевых клеток проводили с использование пуромицина в концентрации 1 мкг/мл в течение 14 дней. Экспрессию рецептора контролировали методом проточной цитометрии.

2.6.7.4. Линия, экспрессирующая нанотела в виде псевдорецептора

Для получения клеточной линии HEK-293T, экспрессирующей на поверхности одноцепочечное антитело VHH в составе псевдорецептора, использовали метод лентивирусной трансдукции с применением вектора на основе плазмиды pLSFFV. Нуклеотидная последовательность нанотел была клонирована в вектор по сайтам рестрикции XbaI и BamHI. Сначала препарат вируса готовили путём ко-трансфекции клеток HEK-293T упаковочными плазмидами psPAX2 и pMD2.G в сочетании с конструкцией pLSFFV, кодирующей псевдорецептор с VHH-доменом. Через 48 часов вируссодержащую среду собирали, фильтровали и использовали для трансдукции свежих клеток HEK-293T в присутствии полибрена (10 мкг/мл). После инкубации в течение 24 часов среду заменяли на свежую, а через 72 часа осуществляли отбор трансдуцированных клеток по соответствующему селекционному маркеру (G418 (Gibco, США), 1 мг/мл).

2.6.7.5. Линия, экспрессирующая ERBB2

Стабильная клеточная линия HEK-ERBB2 была получена путем трансдукции клеток HEK-293LTV лентивирусным вектором, кодирующим человеческий ERBB2 (pHAGE-ERBB2). Трансдукцию проводили, как описано

выше, с использованием лентивирусных частиц с псевдотипом VSV-G. Через 48 часов после трансдукции клетки отбирали с помощью пуромицина (1 мкг/мл) в течение 14 дней для создания популяции со стабильной экспрессией ERBB2. Поверхностную экспрессию ERBB2 проверяли методом проточной цитометрии с использованием антител к ERBB2, меченных CFL555.

2.6.8. Тесты по нейтрализации

2.6.8.1. Оценка нейтрализации при помощи ИФА

На сорбционном планшете MaxiSorp (Nunc, Дания) иммобилизовали рецепторный белок ACE2, наносили по 50 мкл на лунку в концентрации 2 мкг/мл. Планшет инкубировали на шейкере в течение ночи при 4°C. После инкубации опорожняли лунки и ополаскивали PBS. 2 часа блокировали 5% MPBS по 300 мкл на лунку при 37°C. С 1 по 7 лунку наносили раствор нанотела в PBS по 50 мкл (4 мкг на первую лунку, далее 5-ти кратные разведения), 8 лунка – контрольная без нанотела. Для каждого нанотела тест проводили в трёх повторах. После этого в каждую лунку добавляли 20 мкл раствора S-белка в PBS концентрацией 6 мкг/мл. Планшет инкубировали 2 часа на шейкере при комнатной температуре. Планшет опорожняли и выполняли отмывку 3 раза по 5 минут на шейкере раствором PBST (300 мкл на лунку), а затем раствором PBS. В каждую лунку наносили по 50 мкл разведённого стрептавидина, конъюгированного с HRP. Инкубировали 40 минут на шейкере при комнатной температуре. Отмывку проводили аналогично. Проявляли буфером TMB, останавливали реакцию 5% раствором серной кислоты. Каждый эксперимент проводили в 3 – 6 повторах.

2.6.8.2. Оценка нейтрализации с использованием репортерного гена люциферазы

Тестирование проводили с рекомбинантными лентивирусами, несущими ген S-белка SARS-CoV-2 (варианты Ухань, Дельта и Омикрон) и кодирующими

люциферазу светлячка. Лентивирусные векторы были получены путём трансфекции линии клеток HEK-293T с полиэтиленимином и плазмидами pLuc, pGAG, pRev и плазмидой с геном S-белка SARS-CoV-2 - pMD2-S. После 72 часов инкубации при 37°C и 5% CO_2 среду собирали, фильтровали через мембранный фильтр и хранили при -75°C.

2.6.8.2.1. Прямое заражение

Для оценки нейтрализующей активности предварительно рассеивали клетки HEK293T-ACE2 в 96-луночные планшеты (по 2×10^4 клеток/лунку) и инкубировали в течение ночи. Готовили серийные разведения тестируемых нанотел в DMEM. В лунках 96-луночного планшета смешивали в пропорции 5 мкл серийных разведений нанотел к 50 мкл среды с псевдовирусом и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Из лунок с клетками HEK293T-ACE2 удаляли среду и заменяли ее смесью вируса с нанотелом (50 мкл/лунку). Планшет центрифугировали при 850 g в течение 3 ч при 37°C, заменяли псевдовируссодержащую среду на обычную и культивировали клетки в течение 48 ч.

По окончании инкубации из лунок удаляли среду, добавляли 100 мкл лизирующего буфера (25 мМ трис-фосфат, pH 7.8, 1% Triton X-100, 10% глицерол, 2 мМ DTT) и инкубировали 5 минут при комнатной температуре. Затем добавляли по 20 мкл реагента Bright-Glo Luciferase Assay Substrate (Promega, США) в белые 96-луночные планшеты с 80 мкл клеточного лизата, после чего измеряли интенсивность люминесценции и производили вычисления нейтрализации.

2.6.8.2.2. Заражение от клетки к клетке

Для получения клеток-продуцентов псевдовирусов, HEK-293T клетки в количестве 9×10^5 высевали в чашки диаметром 6 см, содержащие 5 мл питательной среды. На следующий день проводили трансфекцию с использованием комплекса из 1,67 мкг плазмиды pCMV-dR8-2, 2,22 мкг pUCHR-

inLuc-mR и 1,11 мкг pCG1-SARS-2-SdFdC19. В качестве трансфекционного реагента применяли Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Через 24 часа после трансфекции клетки-доноры отделяли с помощью раствора 1 мМ ЭДТА, дважды промывали фосфатно-солевым буфером (PBS), после чего $2{,}6\times10^4$ клеток инкубировали с последовательными разведениями антител в общем объеме 200 мкл при температуре 4 °C в течение одного часа. Затем к смеси добавляли $5{,}4\times10^4$ клеток-мишеней линии 293T/ACE2, предварительно отделённых с помощью 1 мМ ЭДТА и ресуспендированных в 200 мкл среды. Полученную клеточную суспензию помещали в лунки 24-луночного планшета и культивировали в финальном объеме 400 мкл. Через 48 часов регистрировали активность люциферазы.

2.6.8.2.3. Оценка потенциала антителозависимого усиления инфекции

Для оценки потенциала усиления вирусной инфекции при экспрессии нанотел на поверхности клетки в составе псевдорецептора была использована клеточная линия HEK-293T, стабильно экспрессирующая VHH-домены. После отбора и культивирования трансдуцированных клеток проводилась инфекция псевдовирусом, несущим шиповидный белок SARS-CoV-2 и содержащими в геноме ген люциферазы в качестве репортерной системы.

Для проведения реакции нейтрализации за день до инфицирования засеивали клетки в 96-луночный планшет (5×10^4 клеток/лунку) в 200 мкл DMEM с 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение ночи до достижения ~70–80% конфлюентности. Затем с лунок планшета удаляли культуральную среду и добавляли по 100 мкл культуральной среды с псевдовирусом в трёх повторах. Планшет инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 52 часов.

После инкубации с лунок удаляли культуральную среду, клетки лизировали 50 мкл люциферазного буфера. Инкубировали планшет 15 минут при комнатной температуре. К лункам добавляли по 50 мкл люциферазного субстрата и измеряли люминесценцию на приборе TRIAD series. Уровень инфекции

измеряли в процентном отношении, где 0 – люминесценция линии без целевого рецептора, а 100% - инфекция линии с рецептором ACE2.

2.6.8.3. Оценка нейтрализации с использованием живого вируса и клеточной линии VERO

2.6.8.3.1. Оценка нейтрализации по цитопатическому эффекту

Для проведения экспериментов по проверке нейтрализующей активности у отобранных вариантов нанотел на живом вирусе варианта Ухань использовали перевиваемую культуру клеток Vero, представляющую собой аттестованную линию клеток почки зелёной мартышки, широко применяемую в производстве вакцин и вирусологических исследованиях. В качестве тестового вируса использовали штамм ПИК35 SARS-CoV-2 (GISAID ID: EPI ISL 428852), который был выделен на клетках Vero из назофарингеального мазка пациента с COVID-19. Данный штамм прошёл четыре последовательных пассажа в культуре клеток Vero и вызывал характерное цитопатическое поражение клеток. Вирусные частицы выращивали в клетках Vero, после чего аликвоты вируса замораживали и хранили при -80°C до использования в экспериментах.

Для проведения реакции нейтрализации препараты разводили в два раза, начиная с разведения 1:50, и смешивали их в соотношении 1:1 с вирусной суспензией, содержащей 50–200 $ТЦД_{50}$ (тканевых цитопатических доз). После инкубации при 37°C в течение 1 часа смеси добавляли к монослою клеток Vero в двух повторностях. В каждом эксперименте проводили контрольные титрования положительной и отрицательной референс-сывороток, а также раститоровку дозы вируса. Оценку цитопатического эффекта проводили визуально на пятые сутки после заражения. Титры нейтрализующих антител рассчитывали по формуле Кербера. Препараты, которые в разведении 1:50 не вызывали нейтрализацию вируса, считались отрицательными.

2.6.8.3.2. Оценка нейтрализации по образованию бляшек

Нейтрализующая активность образцов нанотел на разных вариантах SARS-CoV-2 оценивалась с помощью реакции нейтрализации, в ходе которой исследовали способность нанотел подавлять образование негативных колоний SARS-CoV-2 в 24-часовом монослое клеток Vero C1008 под агаровым покрытием. Образцы нанотел разводили в физиологическом растворе с добавлением антибиотиков (стрептомицин сульфат и бензилпенициллин G в концентрации 100 Ед/мл каждого). Рабочий вируссодержащий раствор SARS-CoV-2 готовили в сбалансированном солевом растворе Хэнкса с 2% фетальной бычьей сыворотки (FBS) и антибиотиками. Концентрация вируса в растворе составляла 100–150 PFU/мл (эквивалентно 40–60 бляшкам на флакон). В эксперименте использовали однодневный монослой клеток Vero C1008 в T25-флаконах.

Равные объемы разведенных вариантов нанотел и вирусной суспензии (по 0,5 мл) смешивали и инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Для каждого разведения нанотела использовали минимум четыре флакона. После инкубации смесь распределяли по поверхности клеточного монослоя в T25-флаконах и оставляли на 1 час при 37°C для адсорбции вируса. Затем инокулят удаляли, наносили первичное агаровое покрытие (10 мл на флакон) и инкубировали клетки при 37°C в течение 2 суток. Спустя 48 часов наносили вторичное агаровое покрытие с 0,1% нейтральным красным для окрашивания клеток и выдерживали при комнатной температуре в темноте в течение 24 часов. После завершения инкубации подсчитывали количество бляшек (участков лизиса клеток) и оценивали изменения титра вируса в зависимости от концентрации нанотела.

2.6.8.4. Оценка нейтрализации с использованием клеточной линии GMB6138

Для тестирования был использован препарат Омикрон варианта SARS-CoV-2. Наработку препарата вируса осуществляли путём трансдукции

заражения клеточной линии GBM6138, гиперэкспрессирующей на своей поверхности рецептор ACE2 [119]. Зараженные клетки инкубировали 4 дня при 37°C с 5% CO_2. После детектируемого ЦПЭ проводили сбор среды и её фильтрацию через мембранный фильтр 0,45 мкм. Препарат краткосрочно хранили при 4°C.

Тестирование проводили на лунках 12-луночного планшета в трёх пятикратных разведениях вируса. Предварительно определяли титр вирусного препарата, чтобы во время проведения эксперимента в среднем разведении наблюдалось не более 100 бляшек в контрольном образце. За сутки до титрования рассаживали клеточную линию GBM6138 в количестве 4×10^5 клеток на лунку.

В день проведения эксперимента готовили 3 пятикратных разведения вирусного препарата (стартовое разведение определялось по итогам предварительной раститровки препарата) в среде DMEM без сыворотки. Далее из каждого разведения разносили по 750 мкл в 1,5 мл пробирки для каждого тестируемого соединения. В каждую пробирку добавляли 150 мкл разведённого в PBS тестируемого варианта молекулы. В контрольную пробирку добавляли 150 мкл PBS без нанотела. Смесь перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение часа. После инкубации с лунок планшета удаляли культуральную среду и разносили по 300 мкл смеси вируса с нанотелом по лункам в трёх повторах. Лунки со смесью инкубировали 1 час при 37°C с 5% CO_2. Далее с лунок удаляли культуральную среду и в каждую наносили 1 мл среды DMEM, содержащей 1% сыворотки и 1,2% карбоксиметилцеллюлозы. Планшеты инкубировали 3-4 суток при 37°C с 5% CO_2.

По истечении времени визуально контролировали образование бляшек на лунках. При достижении необходимого уровня ЦПЭ аккуратно удаляли среду с лунок и промывали PBS. Фиксировали клетки 300 мкл 4% раствора параформальдегида на лунку в течение часа при комнатной температуре. Раствор удаляли и окрашивали клетки 0,1% раствором кристаллического фиолетового по 300 мкл на лунку при комнатной температуре в течение 15 минут. Раствор

удаляли, лунки 1-2 раза промывали PBS. Проводили подсчет количества образовавшихся бляшек и оценивали изменение вирусного титра.

2.6.9. Антитела и проточная цитометрия

Для окрашивания ERBB2 на клеточных линиях рака молочной железы использовались козьи антитела против человеческого ErbB2/Her2 AF1129 (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота, США) и мышиные антитела против козьего IgG-CFL 555 (Santa Cruz Biotechnology, Даллас, Техас, США). Для обнаружения ERBB2 в клеточных смесях использовался трастузумаб (Биокад, Москва, Россия), конъюгированный с AlexaFluor 488 (Thermo, Уолтем, Массачусетс, США). Все окрашивания проводились на живых клетках с использованием стандартных протоколов. Для измерений, включающих экспрессию tagRFP или антитела, меченные CFL555, флуоресценция собиралась через эмиссионный фильтр 585/40 нм при возбуждении на длинах волн 473 нм и 532 нм для различения специфической флуоресценции от клеточной аутофлуоресценции. Два канала (Ex 473 нм/Em 585/40 нм и Ex 532 нм/Em 585/40 нм) были сопоставлены друг с другом для различения истинно флуорофор-положительных событий (высокое соотношение 532 нм/473 нм) от аутофлуоресцентных популяций (более низкое соотношение). При обнаружении ERBB2 с помощью вторичных антител, конъюгированных с CFL555, интенсивность флуоресценции по обеим осям обозначается как ERBB2 (CFL555) с соответствующими длинами волн возбуждения. Анализ FACS проводился на проточном цитометре FACSVantage SE (Beckton-Dickinson, Франклин-Лейкс, Нью-Джерси, США). Данные были дополнительно обработаны и визуализированы с помощью Cytobank Community Edition (https://community.cytobank.org).

2.7. Тесты на животных моделях

2.7.1. Получение модели мышиного ксенотрансплантанта

Клетки U937 вводили подкожно дозой 10^6 клеток в задние части 4-6-месячных самцов мышей Balb/c nude. Каждая группа, состоящая из пяти животных, получала лечение на третий, восьмой и четырнадцатый день. Лечение включало внутривенные инъекции через ретробульбарный путь антител B6H12.2, стрепто-47VHH1H4 или антитела против M13 (контрольный образец). Каждая инъекция содержала 100 мкг соответствующего вещества, растворенного в 100 мкл стерильно фильтрованного PBS. На момент начала лечения у животных не было видимых опухолей. Размеры ксенографтов оценивались на 3, 7, 8, 9, 11, 14, 17 и 22 день с помощью штангенциркуля. Для каждого ксенографта измеряли две наибольшие перпендикулярные оси в плоскости x/y с точностью до 0,5 мм. Объем опухоли ксенографта рассчитывался по формуле: $V = L \times W^2/2$.

2.7.2. Тестирование нейтрализации SARS-CoV-2 на сирийских хомяках

В исследовании использовали сирийских хомячков (Mesocricetus auratus), полученных из питомника «Столбовая». Возраст животных – 6–8 недель. Перед экспериментом хомяки проходили 5-дневную адаптацию, содержались группами по 5 особей в клетках с вытяжной вентиляцией в условиях работы с патогенами II группы опасности. Для заражения использовали штамм SARS-CoV-2 ПИК35 (GISAID ID EPI_ISL_428852), выделенный на культуре клеток Vero. Вирус культивировали в клетках Vero, хранили при −80°C. Инфекционный титр определяли по цитопатическому эффекту и рассчитывали по формуле Кербера.

Хомяков заражали интраназально суспензией вируса (5,0 ± 0,09 $ТЦД_{50}$/животное), вводя по 25 мкл в каждый носовой ход (итого 50 мкл/животное). Перед инфицированием животных анестезировали (Золетил 20 мг/кг + Ксила 5 мг/кг). В процессе исследования было задействовано 3 группы животных: интактная группа (не зараженные, контроль), негативный контроль (зараженные без лечения), экспериментальная группа (животные, получавшие

тестируемые препараты антител). Введение препаратов осуществляли внутрибрюшинно во время заражения и через 24 часа после инокуляции вируса. Концентрация раствора для введения – 10 мг/мл (приготовлен непосредственно перед введением). Каждое нанотело в параллели тестировалось на трёх животных. Количество вводимого рассчитывали из соотношения 20 мг/кг.

Животных ежедневно осматривали, регистрировали изменение массы тела, активность, поведенческие реакции. На 7-й день после заражения животных эвтаназировали путем передозировки анестетиков с последующим обескровливанием.

Результаты анализировали в OriginPro8. Проверку на нормальность проводили с помощью критерия Шапиро-Уилка. Данные сравнивали с использованием t-критерия Стьюдента или критерия Манна-Уитни ($p<0,05$ считалось статистически значимым).

2.8. Работа с прокариотическими культурами

2.8.1. Индукция с ИПТГ

Для получения отдельных вариантов нанотел, экспрессируемых в бактериальной культуре HB2151 в растворимой форме, использовали индукцию экспрессии с ИПТГ (Изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид). Инфицированные бактериофагом колонии клеток высаживали в среду LB с ампициллином на ночь с постоянным перемешиванием в объёме 3 мл при 37°C. На следующий день из каждой пробирки пересаживали часть клеточной суспензии (1:100) в свежую среду с антибиотиком. Культуру выращивали на шейкере при 37°C до достижения оптической плотности 0,9 при длине волны 600 нм, после чего в пробирку добавляли ИПТГ до финальной концентрации 0,5 мМ. Пробирки выращивали в течение ночи (12-16 часов) при постоянном перемешивании при 37°C. Далее осаждали клетки при помощи центрифугирования и удаляли супернатант. Полученный клеточный осадок был использован для дальнейшей обработки (лизис, очистка, анализ продуктов на электрофорезе).

2.8.2. Подготовка компетентных клеток

Для трансформации плазмид было необходимо провести процедуру приготовления компетентных клеток из штаммов SURE2, Rosetta и BL21. Для этого использовался следующий протокол: https://openwetware.org/wiki/TOP10_chemically_competent_cells. Готовые суспензии клеток разделяли на аликвоты и хранили при -75°C непосредственно до процесса трансформации.

Культуру TG-1 для электропорации готовили непосредственно в день проведения. Из замороженного клеточного стока предварительно производили высадку бактерий в культуральную среду 2YT в объеме 3 мл. После ночной инкубации 50 мкл клеточной суспензии инокулировали в 500 мл среды 2YT. Далее осуществлялся контроль роста бактериальной культуры до оптической плотности 0,4-0,6 при длине волны 600 нм. При достижении клетками необходимой оптической плотности колба с культурой 20 минут инкубировалась на льду. После чего суспензию клеток откручивали 15 минут при 3000g и 4°C. Клеточный осадок ресуспендировали в 500 мл холодной деионизированной воды и снова откручивали при тех же условиях. После центрифугирования осадок снова ресуспендировали в 250 мл воды и повторно подвергали центрифугированию. Полученный осадок ресуспендировали в 50 мл 20% холодном растворе глицерина и центрифугировали 10 минут при 3000g и 4°C. Из полученного осадка пипеткой аккуратно удаляли все остатки супернатанта и ресуспендировали его в 1,5 мл 20% раствора глицерина. Полученная суспензия клеток хранилась на льду до использования.

Первым этапом подготовки штаммов TG-1 и HB2151 к заражению бактериофагом была их предварительная высадка на культуральные чашки с обеднённой средой M9. Данный этап способствует увеличению на поверхности бактерий количества F пилей, которые опосредуют их заражение бактериофагом. Далее отдельная колония инокулируется в среду 2YT в необходимом объёме. Заражение клеток бактериофагом проводится после достижения ими

логарифмической фазы роста при оптической плотности в диапазоне 0,4-0,6 при 600 нм.

2.8.3. Автоиндукция бактериальной культуры

При работе с большим количеством образцов применяли метод автоиндукции экспрессии без использования ИПТГ. Отдельные колонии предварительно высаживали в 3 мл среды LB с селективным антибиотиком и выращивали при 37 °C в течение ночи. На следующий день выполняли приготовление среды для автоиндукции. Для этого проводили смешивание растворов: 20× NPS (0.5 M $(NH_4)_2SO_4$, 1 M KH_2PO_4, 1 M Na_2HPO_4), 50× 5052 (25% м/о глицерин, 2,5 % глюкоза, 10 % альфа-лактоза), 1 M $MgSO_4$ (используется как 1000×), селективные антибиотики, конечный объём доводится культуральной средой LB без добавления NaCl в состав. После выращивания ночника, его часть (1:1000) пересаживали в среду для автоиндукции и выращивали при постоянном перемешивании при 30°C в течение 16-24 часов. Полученную суспензию осаждали центрифугированием, удаляли супернатант, осадок использовали для дальнейших процедур.

2.8.4. Получение биотинилированных белков

Клетки штамма E. coli, содержащие плазмиду с геном BirA, были дополнительно трансформированы конструкцией pET32b+, включающей нанотело с BAD-доменом (VHH-BAD). Экспрессию как нанотела, так и биотин-лигазы осуществляли методом автоиндукции в течение ночи, добавляя в культуральную среду D-биотин до конечной концентрации 0,3 мМ (Covachem, США). После завершения экспрессии биотинилированные нанотела выделяли методом металл-хелатной аффинной хроматографии с использованием Ni-NTA, а затем дополнительно очищали с помощью гель-фильтрации. Полученные биотинилированные нанотела были проанализированы методом электрофореза в 15% полиакриламидном геле с последующим окрашиванием Кумасси, а также с

использованием вестерн-блота с детекцией через стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена (разведение 1:1000).

2.8.5. Лизис продуцентов

Лизирование экспрессионной культуры для выделения белка осуществляли в четыре этапа: обработка лизирующим буфером, ультразвуковая дезинтеграция, осветление лизата, фильтрация супернатанта. Сначала бактериальный осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 10% глицерол, 0,1% тритон, pH 8) в объёме 10% от исходного объема суспензии. Далее полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут с постоянным перемешиванием. По истечению времени коагулят подвергали интервальному соникированию (1 минута дезинтеграции, 30 секунд перерыв, 7 циклов). Пробирку во время обработки держали во льду во избежание перегрева раствора, влекущего за собой денатурацию белков. Следующим этапом проводили осветление полученного лизата путём центрифугирования в течение 3 часов при 12000g и 4°C. Осветлённый супернатант переливали в чистую пробирку и фильтровали с использованием мембранного фильтра с размером пор 0,45 мкм.

2.8.6. Электропорация бактериальной культуры

Трансформацию клеток E. coli, штамма TG-1, проводили с помощью электропоратора Genepulser (Bio-Rad, США). Для процедуры использовали кюветы с шириной зазора 1 мм. В кюветы данного формата вмещается суспензия клеток объёмом 100 мкл. 500 мкл предварительно подготовленных компетентных клеток смешивали с лигазной смесью и инкубировали на льду в течение 10 минут. Далее аликвоты по 100 мкл загружали в кювету и подвергали электропорации при следующих параметрах: 1,8 кВ, 25 мкФ, 200 Ом. После чего клетки из кюветы перемещали в подготовленную культуральную среду SOC, а затем повторяли процесс электропорации до использования всего объема клеточной суспензии.

2.8.7. Использованные клеточные линии

В процессе исследования были использованы следующие штаммы E. Coli: SURE 2 (Agilent, США), Rosetta GAMI DE3 Codon^{+} (Novagen, Германия), BL21 DE3 (Евроген, Россия), TG-1 (Agilent, США), HB2151 (K12 (lac-pro), ara, nalr, thi/F'[proAB, lacIq, lacZ M15]).

2.9. Фаговый дисплей

2.9.1. ПЦР VHH фрагментов

Амплификация участков, кодирующих последовательности VHH фрагментов, проводилась с использованием ДНК полимеразы Deep Vent (New England Biolabs, США). В качестве прямого праймера использовался Alp_VVH3_uni_fwd (5'-GAACAGACCACCATGTCTAGASAGKTGCAGSTSG TRGAGTCTGKGGGAGG-3') позволяющий амплифицировать последовательности VHH из семейства 3, а также внести сайт для гидролиза рестриктазой XbaI. В качестве обратных использовали одновременно два праймера Alp_VHH_R2 (5'-CCTTGTAATCCGGATCCGGTTGTGGTTT TGGTGTCTTGGG-3') - для амплификации в кодирующей области короткого шарнира, и Alp_VHH_R1 (5'-CCTTGTAATCCGGATCCGGGG GGTCTTCGCTGTGGTGCG-3') – для амплификации в кодирующей области длинного шарнира. Кроме того, оба праймера позволяли внести сайт для гидролиза рестриктазой BamHI. Амплификацию проводили при следующем режиме термоциклирования: первичная денатурация 5 минут при 95°C, 29 циклов – денатурация 95°C 30 секунд, отжиг 61°C 30 секунд, элонгация 72°C 30 секунд, финальная элонгация 72°C 10 минут. Контроль протекания реакции детектировали при помощи электрофореза в агарозном геле.

2.9.2. Наработка бактериофага M13

Предварительно высаженную культуру TG-1, достигшую оптической плотности 0,2, инфицировали 10 мкл из десятикратных серийных разведений

хэлперного бактериофага M13KO7 (New England Biolabs, США). Инкубировали 30 минут при 37°C. Далее смешивали зараженные клетки с 3 мл расплавленного YT-top агара (50°C) и быстро выливали на разогретые чашки петри с YT-агаром. После застывания инкубировали ночь при 37°C. На следующий день отбирали одиночную изолированную бляшку с фагом и высаживали её к 3–4 мл экспоненциально растущей культуры TG-1. Инкубировали 2 часа при 37°C с постоянным перемешиванием. По истечении времени бактерии пересаживали из пробирки в 500 мл среды 2×YT и выращивали 1 час, затем добавляли канамицин (50 мкг/мл) и инкубировали еще 8–16 часов при 37°C.

Полученную клеточную суспензию центрифугировали (15 мин, 10 800 × g, 4°C). К супернатанту добавляют 1/5 объема PEG/NaCl, выдерживают на льду ≥30 минут и повторно центрифугировали (15 мин, 10800 × g, 4°C). Осадок ресуспендировали в 2 мл буфера ТЕ (pH 7,0) и фильтровали через мембрану 0,45 мкм. Титр определяли по описанному ранее методу и доводили концентрацию до 10^{12} БОЕ/мл (бляшкообразующие единицы на миллилитр). Препарат разделяли на аликвоты по 0,5 мл и хранили при −20°. Сток применяли в разведении 1:10000.

2.9.3. Сборка библиотеки

После проведения электропорации фагмидной библиотекой клетки 1 час инкубировали на шейкере при 37°C, после чего высаживали на чашки Петри большой площади для выращивания библиотеки и параллельно на несколько стандартных 10 см чашек в разных разведениях для оценки размера полученной библиотеки. Чашки инкубировали ночь при 30°C. После вырастания колоний оценивали размер библиотеки и шпателем собирали колонии в общую пробирку с культуральной средой и 20% глицерола для хранения в замороженном виде при -75°C.

2.9.4. Наработка фаговой библиотеки

После получения первичной библиотеки необходимо провести её инфицирование бактериофагом M13 для сборки фаговой библиотеки, при помощи которой проводится селекция. Для этого в 500 мл культуральной среды

2YT высаживали аликвоту (~100 мкл) из предварительно собранного и замороженного стока бактериальной библиотеки и выращивали до оптической плотности 0,4-0,6 на длине волны 600 нм. Далее 100 мл бактериальной суспензии инфицировали хэлперным бактериофагом M13KO7 (используемый сток бактериофага использовали в разведении 1:10000). После добавления фага клетки инкубировали при 37°C без перемешивания, а затем 30 минут при постоянном перемешивании. По истечении 30 минут к клеточной суспензии добавляли канамицин (конечная концентрация 50 мкг/мл) и инкубировали в течение ночи при 30°C или 4 часов при 37°C при постоянном перемешивании. После инкубации клетки осаждали центрифугированием в течение 15 минут на максимальных оборотах при 4°C, а супернатант переливали в чистые пробирки и добавляли раствор ПЭГ/NaCl (33,(3) мМ ПЭГ 6000, 2,5 М NaCl) в соотношении 1:5. Полученный раствор перемешивали и инкубировали во льду от 1 часа. Затем раствор центрифугировали 30 минут на 10800 g при 4°C. Аккуратно удаляли супернатант, а полученный осадок ресуспендировали в 40 мл воды, добавляли 8 мл раствора ПЭГ/NaCl, перемешивали и инкубировали во льду 30 минут. Затем снова центрифугировали 10 минут на 10800 g при 4°C, сэмплером полностью удаляли супернатант, осадок перерастворяли в 5 мл PBS и центрифугировали 10 минут на 11600 g при комнатной температуре для удаления остатков бактериального дебриса. Для долгосрочного хранения фаговой библиотеки добавляли глицерол до концентрации 15%. Препарат хранили при -75°C до использования. Полученный препарат фаговой библиотеки использовали в раундах селекции и тестировании обогащения на ИФА.

Протокол сборки фаговой библиотеки после раундов селекции практически аналогичен описанному протоколу, за исключением нескольких изменений. Аликвоту бактерий высаживали в 100 мл среды вместо 500 мл. На инфекцию бактериофагом отбирали 100 мл бактериальной суспензии необходимой оптической плотности. После инфекции бактериофагом и инкубации добавляли культуральную среду с канамицином до объёма 50 мл и инкубировали при аналогичных условиях. После осаждения бактериофага

осадок ресуспендировали в 2 мл вместо 5 мл, 1 мл из которых использовали в раунде селекции, а остаток хранили в заморозке с добавлением глицерола.

2.9.5. Титрование фага

Для оценки количества частиц бактериофага в миллилитре препарата фаговой библиотеки проводили его растительную на клетках TG-1. Бактерии выращивали в среде 2YT до достижения оптической плотности 0,3-0,4 на длине волны 600 нм. Параллельно готовили 4 разведения (10^{-2}, 10^{-4}, 10^{-6}, 10^{-8}) бактериофага с шагом в 2 порядка (исходное разведение 10 мкл библиотеки в 990 мкл MPBS, разведение 10^{-2}). Из разведений 10^{-6} и 10^{-8} по 10 мкл переносили в чистые пробирки, в которые добавляли по 90 мкл клеточной суспензии, доросшей до необходимой оптической плотности. Пробирки 15 минут инкубировали при 37°C без перемешивания, а затем 45 минут с перемешиванием. Далее по 50 мкл из каждой пробирки параллельно рассаживали на 2 чашки петри со средой LB (одна с ампицилином, вторая в канамицином) и выращивали колонии в течение ночи при 37°C. После вырастания колоний осуществляли подсчет колоний на чашках, согласно их разведению. Число колоний на чашке с ампициллином позволяло рассчитать общее число единиц бактериофага в препарате, в то время как число колоний на чашке с канамицином позволяло определить процент частиц хэлперного фага в библиотечном препарате. Для раундов селекции использовали 10^{11}-10^{12} частиц фага на пробирку.

2.9.6. Селекция

Для селекции специфических вариантов нанотел использовали иммунологические пробирки Maxibinding (SPL Lifesciences, Корея) для иммобилизации на их поверхности специфического белка. За день до проведения селекции в пробирку вносили 1 мл раствора целевого белка в PBS (100 мкг на пробирку для первого раунда, 50 мг – для второго). Пробирки плотно закупоривали и оставляли инкубироваться в течение ночи при 4°C на роторе. Параллельно в 3 мл среды 2YT скалывали колонию клеток TG-1 с чашки со

средой M9 и выращивали в течение ночи при 37°C. На следующий день аликвоту (1:100) пересаживали в необходимый объем (15 мл на одну иммунную пробирку) свежей среды 2YT и выращивали до оптической плотности 0,4-0,6. По достижении нужной оптической плотности клетки оставляли без перемешивания при комнатной температуре до использования. Готовые иммунные пробирки ополаскивали PBS, заполняли до верха 5% раствором MPBS и инкубировали при 37°C 2 часа для блокирования неспецифических сайтов связывания. После блокирования пробирки ополаскивали PBS и добавляли необходимое количество бактериофага (10^{11}-10^{12} частиц фага на пробирку для первой селекции, 1 мл от селекционной библиотеки – для второго), разведенного в 4 мл PBS. Пробирку закупоривали и оставляли на вращающемся роторе на 2 часа при комнатной температуре. По истечении времени проводили серию отмывок: пробирку почти до краёв заполняли раствором и интенсивно встряхивали в течение 10 секунд, затем раствор сливали. Данную процедуру проводили 10 раз сначала раствором PBST, затем 10 раз раствором PBS (по 20-30 для последующих селекций). Для элюирования связавшегося бактериофага в пробирку добавляли 1 мл свежеприготовленного раствора 100 мМ триэтиламина, закупоривали пробирку и инкубировали 1 час на вращающемся роторе при комнатной температуре. Далее раствор из иммунной пробирки переносили в 1,5 мл пробирки и к ним добавляли 500 мкл 1 М раствора трис (pH 7,4) для нейтрализации pH. В иммунную пробирку также добавляли 250 мкл трис и аккуратно распределяли по всей поверхности. Далее в 15 мл пробирку наливали 9,25 мл предварительно выращенной суспензии клеток TG-1, к ним добавляли 750 мкл нейтрализованного фага и аккуратно перемешивали. В иммунную пробирку также добавляли 4,75 мл суспензии. Обе пробирки инкубировали 30 минут при 37°C для инфицирования бактериальной культуры. Далее обе пробирки объединяли, аликвоту (100 мкл) оставляли для серийных разведений и оценки размера полученной селекционной библиотеки, а остальное осаждали центрифугированием, ресуспендировали в 2 мл культуральной среды и высаживали на большую чашку с антибиотиком. Библиотеку выращивали в течение ночи при 30°C. На следующий день

проводили оценку размера библиотеки по количеству колоний на чашках с серийными разведениями, затем шпателем собирали полученную библиотеку в 5 мл пробирку, разводили культуральной средой и глицерином (до 20%) и убирали на хранение при -75°С до дальнейшего использования. Полученные библиотеки далее использовались для получения на их основе препаратов фаговых библиотек или исследования моноклонов.

2.9.7. Наработка моноклонального фага

Для тестирования способности отобранных клонов нанотел специфически связываться с целевым антигеном с колоний TG-1 было необходимо получить моноклональный бактериофаг, презентирующий на своей поверхности один вариант нанотела. После раунда селекции с чашек Петри скалывали отдельные колонии, полученные в процессе разведения селекционной библиотеки, в количестве 96 штук для заполнения глубоколуночного планшета. Клетки инокулировали в 1 мл среды 2YT с селекционным антибиотиком (ампициллин, 0,1 мг/мл) и выращивали на шейкере при 37°С в течение ночи. На следующий день 40 мкл клеточной суспензии пересаживали аналогичные лунки нового планшета с 800 мкл среды с антибиотиком на лунку. Клетки инкубировали 2 часа при 37°С на шейкере. Далее в каждую лунку добавляли по 100 мкл культуральной среды с разведённым в ней хэлперным бактериофагом M13. 30 минут планшет инкубировали при 37°С без перемешивания и затем 30 минут с перемешиванием. После чего в каждую лунку добавляли по 100 мкл среды с канамицином (итоговая концентрация в лунке 50 мкг/мл). Планшет инкубировали в течение 4 часов при 37°С или в течение ночи при 30°С. По истечению времени планшет центрифугировали 15 минут на максимальных оборотах, после чего супернатант, содержащий моноклональный бактериофаг, использовали для проведения ИФА и оценки специфичности презентируемого нанотела.

2.9.8. Отбор продуцентов

Дот блот для отбора лучшего продуцента интересующего белка проводили с использованием вакуумной камеры для переноса Minifold (Schleicher and Schuell, Великобритания). Клеточные культуры, экспрессирующие целевой белок, выращивали в течение ночи в среде для автоиндукции в глубоколуночном планшете. Планшет центрифугировали 15 минут на максимальных оборотах, и удаляли супернатант. Клеточный осадок ресуспендировали в 300 мкл лизирующего буффера (50 мМ Трис, 150 мМ NaCl, 10% глицерол, 0,1% тритон, pH 8). Планшет откручивали 15 минут на максимальных оборотах. В вакуумную камеру закрепляли нироцеллюлозную мембрану. После создания отрицательного давления в камере в лунки наносили 200 мкл клеточного лизата, избегая попадания осадка на мембрану. После прогона жидкости мембрану высушивали и блокировали в 5% растворе MPBS в течение 1 часа. Далее подвергали окрашиванию антителами по протоколу, описанному в разделе вестерн блот.

2.10. Синтез химических соединений, использованных в процессе конъюгации нанотел

Азидосодержащие производные ARVI11 были получены путем конденсации ARVI11 с N3-гексаноил-Pfp (в случае AR816) или N3-гексаноил-Val-Cit-PABC-pNP (в случае AR896) в присутствии TEA. Соединение N3-гексаноил-Val-Cit-PABC-MMAE было получено путем реакции монометиларистатина E (MMAE) с N3-гексаноил-Val-Cit-PABC-pNP в условиях, ранее описанных для аналогичного соединения [120].

2.10.1. Общие сведения

Все реагенты, если не указано иное, были приобретены у коммерческих поставщиков и использовались без дополнительной очистки. Растворители также закупались у коммерческих поставщиков. Тонкослойная хроматография (ТСХ) проводилась на пластинах Merck, покрытых силикагелем (60 мкм, F254),

визуализация осуществлялась при УФ-освещении (254 и 365 нм). Колоночная хроматография (КХ) выполнялась с использованием силикагеля (0,040–0,063 мм, Merck, Германия).

Спектры ЯМР ^{1}H регистрировали на спектрометрах Bruker Avance III с рабочими частотами 600 и 800 МГц (Германия). Химические сдвиги указаны в δ (ppm), в качестве внутреннего стандарта использовался остаточный сигнал растворителя (дейтерацетон DMSO или хлороформ). Условные обозначения сигналов: s — синглет, d — дублет, t — триплет, m — мультиплет. Константы спин-спинового взаимодействия (J) приведены в Гц.

Масс-спектры высокой точности (HRMS) с ионизацией электроспреем (ESI) получены на гибридном масс-спектрометре Thermo Scientific LTQ Orbitrap (Thermo Electron Corp., Германия) в режиме прямой подачи пробы (положительные ионы).

Соединения 6-азидогексановая кислота, N3-гексаноил-Val-Cit-PABC-pNP и ARVI11 были синтезированы в соответствии с опубликованными методиками[121-123].

2.10.2. Перфторфениловый эфир 6-азидогексановой кислоты (N3-гексаноил-Pfp)

К раствору пентафторфенола (0,46 г, 2,5 ммоль) и 3-азидогексановой кислоты (0,41 г, 2,6 ммоль) в этилацетате (20 мл) при 0 °C порционно добавляли EDC·HCl (0,5 г, 2,6 ммоль). Смесь перемешивали 1 ч при 0 °C, затем доводили до комнатной температуры и продолжали перемешивание ещё 4 ч. Реакционную смесь промывали водными растворами: 10% Na_2CO_3 (20 мл), 5% $KHSO_4$ (20 мл), затем водой (2 × 20 мл). Органическую фазу упаривали под вакуумом, получая N3-гексаноил-Pfp в виде прозрачного масла (0,77 г, 95%).^{1}H ЯМР (800 МГц, $CDCl_3$): δ 3.31 (t, J = 6.8 Гц, 2H), 2.69 (t, J = 7.4 Гц, 2H), 1.84–1.79 (m, 2H), 1.69–1.65 (m, 2H), 1.54–1.50 (m, 2H). HRMS (ESI) m/z: теоретически рассчитанная точная масса для иона $C_{12}H_{11}F_5N_3O_2^+$ $[M+H]^+$: 324.0766; экспериментально найденное значение массы 324.0766.

2.10.3. Общий метод конъюгации

К раствору ARVI11 (0,014 ммоль) и N3-гексаноил-Pfp (для AR816) или соответствующего пара-нитрофенилкарбоната (для AR896) (0,014 ммоль) в ДМФ (0,5 мл) при комнатной температуре добавляли TEA (8 мкл, 0,028 ммоль). Смесь выдерживали при той же температуре в течение 3 ч, затем упаривали раствор и очищали продукт по заданной методике, получая целевые производные.

2.10.4. AR816

5-Азидопентильный (2-((3-((2R,4S,5R)-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2-оксо-2,10-дигидро-3H-бензо[b]пиримидо[4,5-e][1,4]оксазин-9-ил)окси)этил)карбамат (AR816)

Остаток после реакции очищали колонной хроматографией на силикагеле (0–7% метанол в хлороформе), получая AR816 (6,1 мг, 0,011 ммоль, 82%) в виде желтоватой пены. ^{1}H ЯМР (600 МГц, DMSO-d_6): δ 9.72 (br s, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.64 (s, 1H), 6.80 (t, J = 7.9 Гц, 1H), 6.60 (d, J = 7.9 Гц, 1H), 6.44 (d, J = 7.9 Гц, 1H), 6.13 (t, J = 6.1 Гц, 1H), 5.29(d, J = 3.5 Гц, 1H), 5.07 (t, J = 4.2 Гц, 1H), 4.25-4.20 (m, 1H), 3.94–3.88 (m, 2H), 3.81–3.76 (m, 1H), 3.64–3.53 (m, 2H), 3.50–3.41 (m 2H), 3.21 (t, J = 6.5 Гц, 2H), 2.12 (t, J = 6.6 Гц, 2H), 2.06–1.98 (m, 2H), 1.57–1.45 (m, 4H), 1.32–1.23 (m, 2H). HRMS (ESI) m/z: теоретически рассчитанная точная масса для иона $C_{23}H_{30}N_7O_7^+$ $[M+H]^+$: 516.2201; экспериментально найденное значение массы 516.2201.

2.10.5. AR896

4-((S)-2-((S)-2-(6-азидогексанамидо)-3-метилбутанамидо)-5-уреидопентанамидо)бензил (2-((3-((2R,4S,5R)-4-гидрокси-5-(гидроксиметил)тетрагидрофуран-2-ил)-2-оксо-2,10-дигидро-3H-бензо[b]пиримидо[4,5-e][1,4]оксазин-9-ил)окси)этил)карбамат (AR896)

Продукт выделяли с помощью колоночной хроматографии (0–14% метанол в хлороформе), получая AR896 (10,2 мг, 0,011 ммоль, 79%) в виде желтоватой

пены. ^{1}H ЯМР (600 МГц, DMSO-d_6) δ 9.96 (s, 1H), 9.79 (br s, 1H), 8.04 (d, J = 7.7 Гц, 1H), 7.81 (d, J = 8.7 Гц, 1H), 7.69 (m, 1H), 7.66 (m, 1H), 7.58 (d, J = 8.7 Гц, 2H), 7.30 (d, J = 8.7 Гц, 2H), 6.80 (dd, J = 8.5 Гц, J = 8.2 Гц, 1H), 6.61 (d, J = 8.5 Гц, 1H), 6.44 (d, J = 8.2 Гц, 1H), 6.13 (t, J = 6.7 Гц, 1H), 5.96 (t, J = 5.6 Гц, 1H), 5.39 (s, 2H), 5.19 (m, 1H), 5.07 (m, 1H), 4.98 (s, 2H), 4.40–4.36 (m, 1H), 4.24–4.21 (m, 1H), 4.19 (dd, J = 8.6 Гц, J = 6.9 Гц, 1H), 3.93 (t, J = 4.7 Гц, 2H), 3.79–3.77 (m, 1H), 3.62–3.58 (m, 1H), 3.58–3.54 (m, 1H), 3.43–3.39 (m, 2H), 3.04–2.98 (m, 1H), 2.97–2.91 (m, 1H), 2.23–2.11 (m, 2H), 2.12–2.07 (m, 1H), 2.03–1.95 (m, 2H), 1.73–1.66 (m, 1H), 1.62–1.55 (m, 1H), 1.55–1.48 (m, 4H), 1.46–1.40 (m, 1H), 1.39–1.33 (m, 1H), 1.32–1.26 (m, 2H), 0.86 (d, J = 6.8 Гц, 3H), 0.84 (d, J = 6.8 Гц, 3H). HRMS (ESI) m/z: теоретически рассчитанная точная масса для иона $C_{42}H_{57}N_{12}O_{12}^+$ $[M+H]^+$: 921.4213; экспериментально найденное значение массы 921.4222.

2.10.6. N3-гексаноил-Val-Cit-PABC-MMAE

В микропробирке объёмом 1,5 мл с завинчивающейся крышкой растворяли монометилауристатин E (15,1 мг, 0,021 ммоль, 1,0 экв.) в сухом ДМФ (0,245 мл). Добавляли сухую пиридин (39 мкл, 0,48 ммоль, 23 экв.), затем твердое вещество N3-гексаноил-Val-Cit-PABC-pNP (17,3 мг, 0,025 ммоль, 1,2 экв.) и раствор HOBt·H_2O (0,6 мг, 0,0039 ммоль, 0,19 экв.) в сухом ДМФ (45 мкл). Пробирку продували аргоном и выдерживали при 23 °C на орбитальном шейкере 17 ч. По ТСХ (двойной прогон, силикагель, хлороформ/метанол 9:1) подтверждали образование продукта. Сырой продукт осаждали порциями в новой пробирке добавлением эфира (1,8 мл) к 100 мкл аликвотам реакционной смеси, далее центрифугировали и сливали супернатант. Объединённый осадок промывали эфиром (1,8 мл) и сушили под вакуумом. Очищали продукт флэш-хроматографией (EtOAc–CH_3OH, градиент 15:1 → 12:1 → 10:1), получая N3-гексаноил-Val-Cit-PABC-MMAE (16,3 мг, 61%) в виде светло-бежевого твердого вещества. ^{1}H ЯМР (800 МГц, DMSO-d_6, два ротамера в соотношении 6:4) 9.98 (s, 0.6H), 9.96 (s, 0.4H), 8.30–8.20 (m, 0.4H), 8.07 (d, J = 7.6 Гц, 1H), 8.03–7.95 (m, 0.6H), 7.87 (d, J = 8.7 Гц, 0.6H), 7.829 (d, J = 8.7 Гц, 0.4H), 7.826 (d, J = 8.7 Гц,

0.6H), 7.60 (d, J = 8.6 Гц, 0.4H), 7.55–7.60 (m, 2H), 7.35–7.23 (m, 6H), 7.19–7.13 (m, 1H), 5.98 (br s, 1H), 5.44–5.27 (m, 1H), 5.39 (br s, 2H), 5.13–4.94 (m, 2H), 4.74 (br s, 0.6H), 4.63 (br s, 0.4H), 4.53–4.46 (m, 1H), 4.45–4.36 (m, 2H), 4.27 (d, J = 10.8 Гц, 0.6H), 4.24 (d, J = 10.9 Гц, 0.4H), 4.19 (dd, J = 8.7, 6.8 Гц, 1H), 4.05–3.92 (m, 2H), 3.78 (dd, J = 9.4, 2.4 Гц, 0.4H), 3.62–3.59 (m, 0.4H), 3.59–3.54 (m, 0.6H), 3.49–3.44 (m, 0.4H), 3.29 (t, J = 6.9 Гц, 2H), 3.25 (s, 1.8H), 3.23 (s, 1.2H), 3.20 (s, 1.8H), 3.18 (s, 1.2H), 3.11 (br s, 1.8H), 3.07–2.91 (m, 4H), 2.90–2.85 (m, 1.8H), 2.85–2.82 (m, 1.2H), 2.43–2.38 (m, 1H), 2.30–2.24 (m, 1H), 2.24–2.18 (m, 1H), 2.18–2.03 (m, 3H), 2.03–1.92 (m, 2H), 1.85–1.66 (m, 4H), 1.59 (dtd, J = 13.9, 9.3, 4.7 Гц, 1H), 1.56–1.46 (m, 6H), 1.46–1.40 (m, 1H), 1.39–1.33 (m, 1H), 1.33–1.26 (m, 3H), 1.05 (d, J = 6.7 Гц, 1.8H), 1.01 (app d, J = 6.6 Гц, 3H), 0.98 (d, J = 6.7 Гц, 1.2H), 0.90–0.73 (m, 24H). HRMS (ESI) m/z: теоретически рассчитанная точная масса для иона $C_{64}H_{104}N_{13}O_{13}^{+}$ $[M+H]^{+}$: 1262.7871; экспериментально найденное значение массы 1262.7878.

2.11. Модификации белков

2.11.1. Конъюгация с Fc

Для получения модифицированных вариантов молекул, конъюгированных с Fc фрагментом, нуклеотидная последовательность нанотела была клонирована в специализированный экспрессионный вектор pRA (plasmid Rodent Antibody), который обеспечивает экспрессию гибридной молекулы VHH-Fc в эукариотических клетках. Затем рекомбинантная конструкция была введена в клетки линии HEK-293 методом трансфекции. Для отбора продуцентов использовали селективную среду с пуромицином, поскольку в составе вектора pRA присутствует ген устойчивости к данному антибиотику.

После получения стабильной линии продуцентов клетки культивировали до необходимой плотности, после чего собирали культуральную среду, содержащую секретируемый белок. Белок из среды выделяли при помощи металл-хелатной хроматографии.

2.11.2. Тетрамеризация на стрептавидине

Для получения тетрамерных комплексов на основе стрептавидина (стрептаводи) биотинилированные формы нанотел инкубировали с коммерческим стрептавидином при комнатной температуре в течение 30 минут, в молярном соотношении 6:1 (нанотело:стрептавидин).

2.11.3. Конъюгация при помощи сортазы

Сортаза А является бактериальным ферментом, катализирующим сайт-специфическую транс-пептидазную реакцию между мотивом LPETG (лейцин-пролин-глутамат-треонин-глицин) в белке и аминосодержащими соединениями. Данный метод широко применяется в биотехнологии для ковалентного присоединения функциональных групп к целевым белковым молекулам. В результате реакции образовывался раствор, содержащий функционализированные меткой нанотела, а также побочные компоненты — непрореагировавшее нанотело с гистидиновой меткой, сортазу А и избыток свободного пришиваемого агента.

Конъюгацию нанотел с функциональными агентами с использованием сортазы А проводили при следующих условиях. Буфер для реакции: 50 мМ трис, 150 мМ NaCl, 10 мМ $CaCl_2$, pH 7,4. Нанотело использовали в концентрации 70 мкМ. Малые химические молекулы (DBCO-amine, AR-VI-11) добавляли до итоговой концентрации 8 мМ, барназу – в молярном превышении 1:2. Концентрация сортазы А в растворе для малых химических молекул 1 мг/мл, для барназы – 12,5 мкг/мл. Реакционную смесь инкубировали 1 час при комнатной температуре или 8-12 часов при 4°С.

Для удаления примесей функционализированный белок подвергался многоступенчатой очистке. Металлохелатной хроматографией из раствора удаляли сортазу А и непрореагировавшее нанотело, благодаря наличию гистидиновых меток на них. Далее при помощи гель-фильтрации из раствора удаляли свободные химические молекулы, которые могут негативно влиять на

последующие реакции. После очистки был получен чистый функционализированный, готовый к использованию белок.

2.11.4. Конъюгация методом клик химии

Для конъюгации нанотела, меченного дибензоциклооктин-амином (DBCO-amine, Sigma-Aldrich, США), с химическими соединениями (AR896, AR 816, MMAE, ПЭГ-азид) использовали буфер следующего состава: 50 мМ трис, 150 мМ NaCl, pH 7,4. Концентрацию нанотела в реакционной смеси использовали 30 мкМ для конъюгации с цитотоксической химией и 90 мкМ для тетрамеризации на полиэтиленгликоле (4-arm PEG-azide, Sigma-Aldrich, США). Химические молекулы для конъюгации в реакционную смесь добавляли в молярном превышении 1:1,2, ПЭГ-азид в молярном соотношении к нанотелу 8:1. Реакционную смесь инкубировали 24-48 часов при 4°C. Остатки непрореагировавших химических соединений из раствора удаляли диализом и дополнительной гель-фильтрацией.

2.11.5. Оценка эффективности конъюгации препаратов на основе нанотел

Определение степени мечения (DOL) для всех конъюгатов нанотел, за исключением 1H3-ARVI11 и 2F8-ARVI11, было выполнено с помощью GelAnalyzer 23.1.1 (доступно на www.gelanalyzer.com) by Istvan Lazar Jr., PhD and Istvan Lazar Sr., PhD, CSc.

Поскольку электрофоретическая подвижность конъюгатов нанотел 1H3-ARVI11 и 2F8-ARVI11 не отличалась от подвижности соответствующих родительских нанотел, оценка эффективности конъюгации была проведена на основе спектров УФ-поглощения конъюгатов. Формула для расчета DOL выглядит следующим образом:

$$DOL = \frac{A_{362}/\varepsilon_{362}^{ARVI11}}{(A_{280} - CF_{280} \cdot A_{362})/\varepsilon_{280}^{VHH}}$$

где *VHH* = 1H3 или 2F8, $CF_{280} = \varepsilon_{280}^{ARVI11} / \varepsilon_{362}^{ARVI11} = 0.93$, а используемые коэффициенты экстинкции приведены в Таблице 1.

Таблица 1. Молярные коэффициенты поглощения компонентов конъюгации.

Соединение	ε_{280}, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$	ε_{362}, $M^{-1} \cdot cm^{-1}$
1H3	24000	-
2F8	28420	-
ARVI11	9720	10500

Молярный коэффициент поглощения был вычислен с использованием программы Expasy ProtParam [124]; $\varepsilon_{362}^{ARVI11}$ был ранее описан в журнале Glen Research, и $\varepsilon_{280}^{ARVI11}$ был вычислен по спектру поглощения ARVI11 в воде.

2.12. Статистическая обработка

Построение графиков и статистическую обработку производили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 10. Числовые данные обрабатывали в Microsoft Excel 2025.

3. Результаты и обсуждение

Пандемия COVID-19 нанесла серьёзный урон глобальному здравоохранению, экономике и социальной стабильности, продемонстрировав, насколько уязвимым остаётся человечество перед лицом неконтролируемо распространяющихся вирусных инфекций. Возросла актуальность создания новых эффективных инструментов для ранней диагностики, контроля и лечения подобных заболеваний. Среди перспективных биомолекулярных платформ особое внимание привлекают нанотела - вариабельные фрагменты тяжёлых цепей антител верблюдовых (VHH), обладающие уникальными свойствами: малым размером, высокой специфичностью, стабильностью и способностью проникать в ткани [31, 44, 49, 74]. Благодаря этим характеристикам нанотела рассматриваются как многообещающая основа для разработки диагностических и терапевтических средств [125, 126]. Кроме того, их можно относительно просто и эффективно отбирать к целевым антигенам с помощью технологии фагового дисплея, что делает их ещё более привлекательными для биомедицинских исследований [44, 114, 116]. Первым этапом исследовательской работы стал отбор специфических нанотел к шиповидному белку SARS-CoV-2 из иммунной библиотеки альпака.

3.1. Отбор нанотел к шиповидному белку SARS-CoV-2

3.1.1. Иммунизация животных

Мы провели иммунизацию двух взрослых альпака (Lama pacos) двумя различными вариантами антигена (полноразмерный гомотримерный шиповидный белок (S-белок) и отдельный рецептор-связывающий домен (RBD), что способствовало повышению разнообразия вырабатываемых антител. В качестве референсных последовательностей использовались ранее описанные кодон-оптимизированные конструкции [127]. Кроме того, в структуру шиповидного белка был внесен ряд изменений, направленных на получение более стабильного белкового препарата: удален сайт расщепления фурином,

введены стабилизирующие мутации K986P и V987P, а также заменены последовательности, кодирующие трансмембранный домен и эндодомен на последовательность, содержащую сайт расщепления тромбина, домен тетрамеризации (фолдон T4) и гексагистидиновую метку. Отдельная конструкция RBD была дополнена гексагистидиновой меткой на С-конце, что облегчало очистку белка из культурального супернатанта.

Иммунизация позволила индуцировать специфический иммунный ответ, необходимый для дальнейшего создания фаговой библиотеки однодоменных антител (VHH). Оценку уровня индукции проводили методом ИФА с использованием сыворотки крови иммунизированных животных (Рисунок 2). Возросшие уровни представленности специфических антител указывают на развитие иммунного ответа и позволили перейти к следующему этапу – сборке библиотеки.

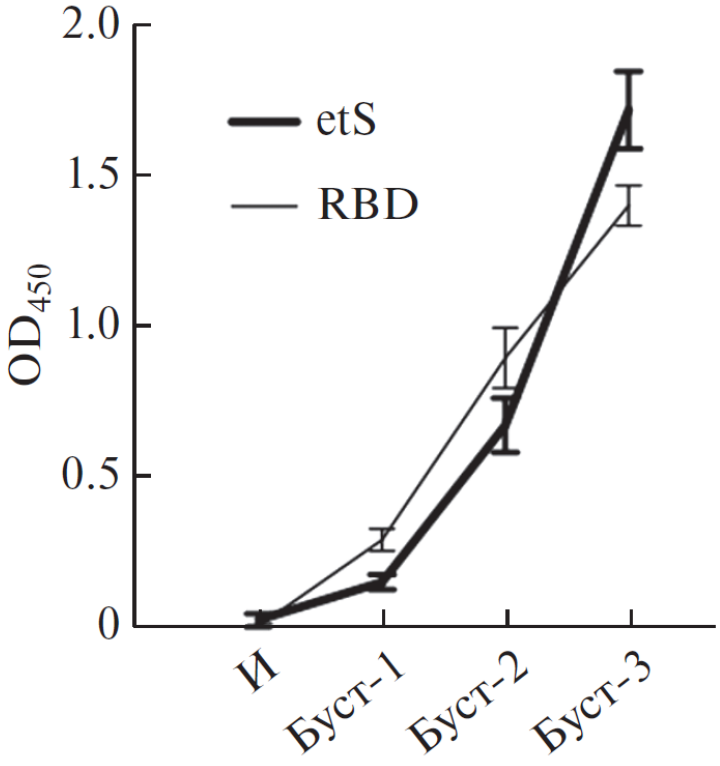

Рисунок 2. Специфическая активность сывороточных антител в крови животных на момент каждого из раундов иммунизации [128]. И – иммунизация. etS – эктодомен S-белка. RDB – рецептор-связывающий домен S-белка.

3.1.2. Сборка библиотеки

Результатом иммунизации стало получение препаратов цельной крови животных. В данных образцах присутствуют В-лимфоциты, содержащие генетический материал, кодирующий последовательности нанотел. Выделение мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) проводили центрифугированием в градиенте плотности для сепарации их от других форменных элементов.

Дополнительно было проведено предварительное обогащение библиотеки за счёт селекции фракции В-клеток. Были отделены субфракции, способные связываться с иммобилизованным на микроносителях S-белком. Таким образом, планировалось получить библиотеку нанотел, содержащую больший процент специфических вариантов, что в свою очередь должно положительно сказаться на процедуре дальнейшей селекции. Полученные фракции В-клеток и тотальных мононуклеаров были использованы для выделения суммарной РНК, последующей обратной транскрипции, амплификации и клонирования. В качестве векторной плазмиды использовали pHEN2.

После молекулярного клонирования библиотеки фрагментов антител проводилась электропорация полученных конструктов в бактериальную культуру TG-1, затем клетки рассаживали на культуральные чашки большой площади параллельно с их серийными разведениями для оценки размера полученных библиотек. В результате была осуществлена сборка 4 библиотек антител (>50 миллионов колоний в каждой), которые далее были использованы непосредственно для фагового дисплея.

3.1.3. Фаговый дисплей

Селекция нанотел в процессе фагового дисплея является наиболее важным этапом для получения специфических образцов. На протяжении всей процедуры необходимо проводить периодический мониторинг обогащения библиотеки, так как при каждом раунде многократно возрастает вероятность отбора

неспецифических вариантов нанотел. В ходе исследования было проведено по два раунда селекции для каждой библиотеки. Общая схема процедуры представлена на Рисунке 3.

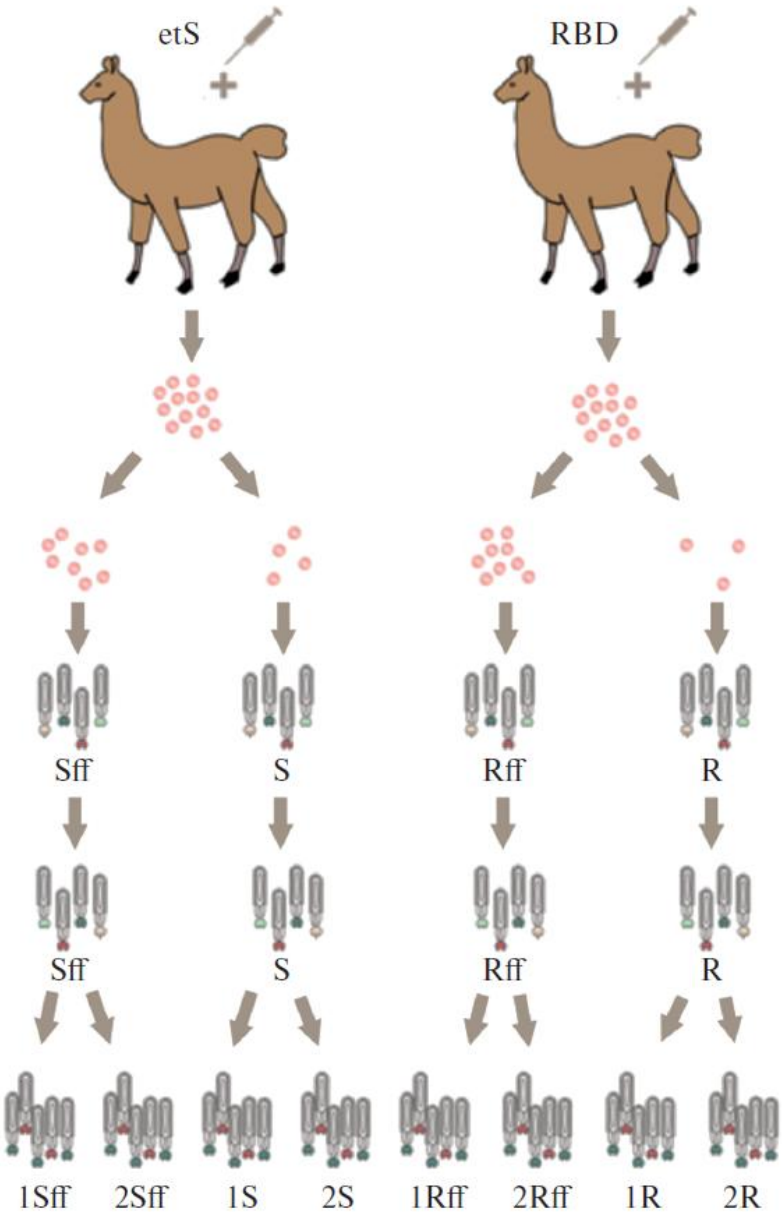

Рисунок 3. Схема приготовления библиотек и проведения селекции [128]. Sff, Rff – библиотеки, полученные из тотальных фракций периферических мононуклеаров животных; S и R приготовлены из селектированных с тримерным эктодоменом S-белка (etS) В-клеток. Под цифрой 1 (1S, 1R, 1Sff, 1Rff) приведены библиотеки, полученные после второго раунда селекции против RBD; под цифрой 2 (2S, 2R, 2Sff, 2Rff) – библиотеки после второго раунда селекции против S-белка.

3.1.4. Селекция антител

Первый раунд селекции проводили с использованием белков, соответствующих иммунизациям для каждой из библиотек. В ходе первого раунда было зафиксировано обеднение библиотеки: в среднем 10^5 колоний после селекции при 10^{12} нанесенных частиц бактериофага. В первичной библиотеке варианты нанотел, специфичные к целевому белку, представлены в меньшинстве, в связи с чем в первом раунде отбора наблюдается значительное обеднение библиотеки (до 10^4 колоний). В последующих раундах этот разрыв сокращается, так как происходит обогащение целевыми клонами.

Во втором раунде для улучшения отбора специфичных клонов была реализована перекрёстная селекция, то есть для каждой библиотеки в параллели проводили отбор на обоих вариантах белка (S-белок и RBD). Данное нововведение было сделано с целью повышения специфичности отобранных антител к наиболее терапевтически релевантному участку S-белка, а, с другой стороны, для избавления от антител, неспособных связываться с целевым участком (RBD) в его нативной конформации в составе полноразмерного белка.

Несмотря на более жесткие условия отбора антител во втором раунде, по результатам этого этапа наблюдалось значительное обогащение фаговой библиотеки как по количеству колоний клеток, так и по проценту клонов, проявивших специфичность связывания на ИФА (Рисунок 4). Это подтвердило успешное обогащение библиотеки специфичными клонами и позволило приступить к поиску конкретных вариантов антител, обладающих необходимой специфичностью и аффинностью.

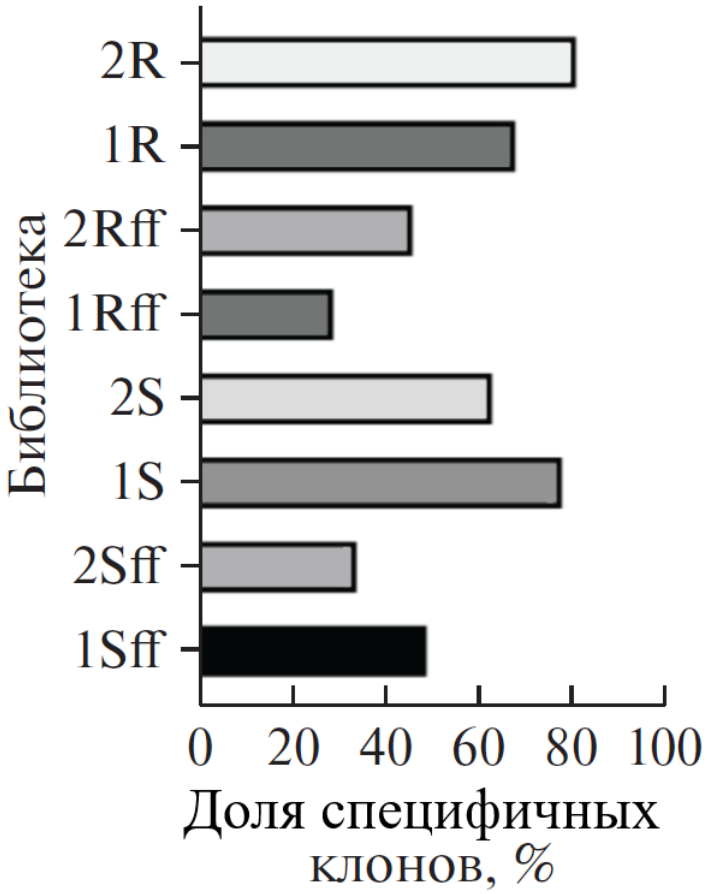

Рисунок 4. Оценка обогащения фаговых библиотек специфичными вариантами нанотел при помощи метода ИФА против S-белка [128].

Было установлено, что наибольшее количество уникальных клонов присутствует в библиотеках 2R и 1S, полученных из клеточных фракций, обогащенных В-клетками. Наименьшее же число нанотел, отвечающих параметрам специфичности, выявлено в библиотеках, полученных из общей популяции периферических мононуклеарных клеток. Это позволяет сделать вывод, что предварительный отбор В-лимфоцитов с использованием иммобилизованного антигена помогает эффективно удалить нежелательные последовательности, которые, в противном случае, могут сохраняться в фаговой библиотеке даже после двух этапов селекции. Кроме того, применение в процессе отбора альтернативной формы целевого антигена при перекрестной селекции, как предполагалось ранее, способствует увеличению доли нужных последовательностей за счёт исключения клонов, взаимодействующих с труднодоступными участками антигена.

3.1.5. Отбор наиболее перспективных вариантов

Далее был проведён ИФА моноклональных фагов, для которого из каждой из восьми полученных селекционных библиотек было отобрано по 24 наиболее перспективных клона. Уровень сигнала на контрольных лунках не превышал фоновых значений (0,07 OD) в обоих экспериментах. В ходе этого эксперимента были выделены клоны, продемонстрировавшие высокий уровень сигнала, что указывает на их способность специфично связываться с целевым белком (Таблицы 2, 3).

Таблица 2. Оценка оптической плотности при скрининге моноклональных бактериофагов из библиотек, селектированных против S-белка во втором раунде.

Библиотека		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sff	A	0,07	**0,42**	**0,68**	**1,04**	0,06	**0,87**	0,07	**0,63**	0,06	0,08	0,07	**0,23**
Sff	B	0,06	0,06	**0,33**	**0,98**	0,05	**1,44**	0,06	0,06	0,10	0,07	0,07	**0,61**
Rff	C	0,05	0,05	**0,34**	0,05	**0,31**	**1,15**	0,07	**1,79**	0,08	0,17	**0,62**	0,15
Rff	D	0,09	**0,96**	0,04	0,12	**0,48**	**0,89**	**0,41**	0,37	0,08	**0,99**	**1,59**	**1,04**
S	E	0,15	**1,67**	**1,95**	0,06	0,05	0,06	0,09	**0,26**	**1,23**	0,16	**0,43**	0,12
S	F	**1,55**	0,04	0,07	0,05	0,06	**1,14**	**1,04**	0,23	0,07	0,07	0,07	**0,79**
R	G	**0,69**	0,05	0,20	0,22	0,05	**0,77**	**0,58**	**0,71**	**1,17**	0,13	**0,60**	0,13
R	H	**1,16**	0,15	**1,22**	**0,79**	0,08	0,05	0,09	**1,58**	0,07	**0,76**	**0,33**	**0,84**

Для дальнейшего анализа были отобраны клоны: A2, A3, A4, A6, A8, A12, B3, B4, B6, B12, C3, C5, C6, C8, C11, D2, D5, D6, D7, D10, D11, D12, E2, E3, E8, E9, E11, F1, F6, F7, F12, G1, G6, G7, G8, G9, G11, H1, H3, H4, H8, H10, H11, H12.

Таблица 3. Оценка оптической плотности при скрининге моноклональных бактериофагов из библиотек, селектированных против RBD во втором раунде.

Библиотека		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Sff	A	0,02	**0,44**	0,07	0,19	**0,45**	**0,46**	**0,46**	0,06	**0,45**	**0,44**	**0,41**	0,08
Sff	B	**0,53**	**0,47**	**0,39**	**0,53**	0,02	**0,49**	**0,45**	0,08	**0,36**	0,10	0,17	**0,38**
Rff	C	0,53	0,53	**0,49**	**0,42**	**0,41**	**0,48**	**0,35**	**0,32**	**0,35**	**0,43**	**0,42**	**0,48**
Rff	D	0,39	0,38	**0,45**	**0,34**	**0,42**	0,22	0,05	**0,49**	0,24	0,27	0,20	0,12
S	E	0,36	**0,36**	0,08	**0,39**	**0,37**	**0,40**	0,08	**0,36**	0,30	**0,36**	0,52	**0,40**
S	F	**0,36**	**0,46**	0,23	**0,46**	**0,08**	**0,42**	0,07	**0,40**	0,42	**0,39**	0,53	**0,45**
R	G	**0,43**	0,34	**0,33**	0,34	**0,39**	0,05	**0,37**	0,31	**0,28**	0,36	0,45	**0,39**
R	H	0,04	0,07	**0,34**	**0,40**	0,03	0,02	0,23	0,13	0,03	0,10	0,22	0,17

Для дальнейшего анализа были отобраны клоны: A2, A5, A6, A7, A9, A10, A11, B1, B2, B3, B4, B6, B7, B9, B12, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9, C10, C11, C12, D3, D4, D5, D8, E2, E4, E5, E6, E8, E10, E12, F1, F2, F4, F5, F6, F8, F10, F12, G3, G5, G7, G9, G1, G12, H3, H4. Далее, для облегчения дифференцирования клонов из разных библиотек, перед кодом лунки рассматриваемого клона будут использоваться цифры, соответствующие белку, использованному во втором раунде селекции: 1 –S-белкок, 2 – RBD.

После отбора отдельных клонов было проведено их рестрикционное картирование с использованием мелкощепящей рестриктазы HaeIII, для оценки разнообразия и распределения их по семействам. Все образцы разделили на 7 семейств и 6 отдельных клонов из библиотеки полноразмерного белка и на 12 семейств и 10 отдельных клонов из библиотеки на RBD, исходя из схожего паттерна фрагментации. На основании этих данных были выбраны наиболее перспективные клоны. По результатам анализа нуклеотидных последовательностей было сформировано окончательное распределение отобранных клонов в 13 семейств, с разным уровнем представленности в библиотеках (Таблица 4).

Таблица 4. Распределение отобранных нанотел в группы по аминокислотной последовательности CDR3 [128].

Лидер	Все клоны	Иммуноген	Общее количество	CDR3
1B6	1A8, 1A12, 1B3, 1E2, 1E9, 1E3, 1E11, 1F6, 1B4, 1A2, 1A4, 1E2, 1F1, 1B6, 1B12	Spike	15	DPPIGTWAVE
1H3	1D7, 1G7, 1G8, 1H11, 2G5, 2G7, 1H10, 1C6, 1H3, 1G9, 2H4, 2H3, 1H8	Spike/RBD	13	AVNERTS
2A7	2A5, 2A6, 2A9, 2B3, 2B6, 2B7, 2B9, 2B12, 2A7, 2B1	Spike	10	RDKDGRA
2C12	2C4, 2C5, 2C6, 2C10, 2C11, 2D3, 2D4, 2D5, 2C12	RBD	9	LQLRGYSLRTTEG
2E6	2A11, 2E4, 2E5, 2E6, 2E8, 2F2, 2A10, 2E6	Spike	8	STLRSDGAALHLDE
2F12	1F12, 2E12, 2F4, 2F5, 2F10, 2F12, 1F7	Spike/RBD	7	GPVTATLTRNPADFGS
1D10	1C11, 1D2, 1D5, 1D11, 1D12, 1D10	RBD	6	HNLATDLTLFALGLLD
1G11	1G1, 1G6, 1G11	RBD	3	RQIQEKVVVTAAE
2B4	2B4, 2F1	Spike	2	DTYGLGYDLLNLLASI
2F8	2F6, 2F8	Spike	2	SNDYGLPSEKFL
1C8	1C5, 1C8	RBD	2	LALSSIDSPESE
2B2	2B2	Spike	1	AFTSCGTDWYDGSNNAMDF
2G11	2G11	RBD	1	SARRVAVRTRADD

Для подтверждения способности отобранных вариантов нанотел специфически связываться с целевым белком был проведён ИФА с использованием растворимой формы антитела для каждого кандидатного варианта. По результатам эксперимента (Таблица 5) был сделан вывод, что отобранные образцы показывают высокие уровни специфичности по отношению к S-белку, что позволяет использовать их в дальнейших опытах.

Таблица 5. Оценка специфичности связывания отобранных нанотел с S-белком методом ИФА.

Клон	S-белок	ACE2	Контроль
1B6	0,91	0,06	0,12
1H3	1,48	0,19	0,11
2A7	0,8	0,05	0,14
2C12	0,84	0,06	0,12
2E6	1,1	0,06	0,12
2F12	1,23	0,06	0,12
1D10	1,47	0,06	0,1
1G11	1,27	0,06	0,12
2B4	1,45	0,07	0,15
2F8	1,56	0,07	0,13
1C8	1,51	0,06	0,1
2B2	1,04	0,06	0,14
2G11	1,18	0,06	0,14

3.1.6. Получение и оценка качества чистых белковых препаратов нанотел

Для получения чистого белкового препарата было выполнено молекулярное клонирование кандидатных вариантов в экспрессионный вектор pET32b. Экспрессионная кассета в данной плазмиде содержит N-концевую последовательность сигнального пептида PelB, который направляет рекомбинантные белки в периплазматическое пространство, где формируются дисульфидные связи, важные для поддержания оптимальной структуры нанотел. Кроме того, на С-конце содержится биотин-акцепторный домен, который может быть специфически биотинилирован при помощи фермента биотин лигазы

(BirA), что позволяет проводить in vivo биотинилирование синтезируемых нанотел без нарушения общей структуры белка. Также, на С-конце находится участок, кодирующий гексагистидиновую метку для очистки антител при помощи металл-хелатной хроматографии, и детекции специфическими антителами. Параллельно была использована конструкция, в которой BAD был заменен на фрагмент, кодирующий аминокислотную последовательность LPETG, распознаваемую сортазой А.

Были получены чистые белковые препараты 11 отобранных кандидатных варианта нанотел, способных специфически связываться с шиповидным белком коронавируса. С образцами из семейств 2C12 и 2B2 не удалось получить необходимые для анализа белковые препараты из-за дефектов в нуклеотидной последовательности. Конструкции с BAD были экспрессированы в штамме E. coli Bl21(DE3), дополнительно содержащим ген BirA. Конструкции с LPETG были экспрессированы в штамме E. coli Rosetta-Gami (DE3) pLysS Codon^{+}. Использование данного штамма позволяет получать более высокие выходы белка и поддерживать его правильную укладку благодаря образованию дисульфидных связей непосредственно в цитоплазме [129]. Получение чистого препарата белка из осветлённого лизата проводили в два этапа: металл-хелатная аффинная хроматография и гель-фильтрация.

Для оценки степени связывания нанотел с целевым белком, в ходе проведённых исследований была измерена константа диссоциации (K_d) путем биослойной интерферометрии с использованием прибора BLItz (Таблица 6). Данный метод позволяет в реальном времени анализировать взаимодействие биологических молекул без необходимости использования меченых вторичных реагентов, обеспечивая высокую чувствительность и точность измерений [130].

Таблица 6. Константы диссоциации отобранных нанотел при связывании с S-белком [128].

Нанотело	Иммуноген	Селекция (раунды 1/2)	Константа диссоциации (М)
1B6	Spike	Spike/Spike	1.94×10^{-8}
1H3	Spike	Spike/Spike, Spike/RBD	9.51×10^{-10}
2A7	Spike	Spike/Spike	2.51×10^{-9}
2E6	Spike	Spike/Spike	1.49×10^{-8}
2F12	RBD	Spike/Spike, Spike/RBD	1.01×10^{-9}
1D10	Spike	Spike/Spike	9.8×10^{-9}
1G11	RBD	Spike/RBD	3.27×10^{-9}
2B4	Spike	Spike/Spike	6.05×10^{-8}
2F8	RBD	Spike/RBD	1.84×10^{-9}
1C8	RBD	Spike/Spike	1.11×10^{-7}
2G11	RBD	Spike/Spike	1.07×10^{-7}

Протестированные нанотела демонстрировали широкий диапазон значений константы диссоциации. Варианты, обладающие высокой аффинностью к шиповидному белку, имели константу диссоциации в нижнем наномолярном диапазоне, что указывает на прочное и специфическое взаимодействие с целевым антигеном. В результате данного эксперимента мы подтвердили эффективность проведённого процесса селекции и отбора образцов с высокими уровнями прочности связи с целевым белком. Нуклеотидные последовательности отобранных в процессе скрининга нанотел были запатентованы.

3.2. Тестирование нейтрализующей активности отобранных нанотел в отношении связывания S-белка с ACE2

После получения высокоочищенных мономерных белковых препаратов нанотел, продемонстрировавших специфическое связывание с шиповидным белком SARS-CoV-2, была исследована их функциональная активность. В частности, необходимо было определить, способны ли отобранные нанотела препятствовать связыванию шиповидного белка с рецептором ACE2, который

является ключевым для проникновения вируса в клетки человека. Для оценки блокирующей активности нанотел было решено провести серию экспериментов, направленных на выявление их нейтрализующего потенциала.

3.2.1. Проверка нейтрализующей активности методом ИФА

Первым этапом проверки нейтрализующей активности отобранных вариантов нанотел стал конкурентный иммуноферментный анализ, позволяющий оценить способность нанотел предотвращать взаимодействие шиповидного белка SARS-CoV-2 с его клеточным рецептором ACE2. На поверхности лунок сорбирующего планшета иммобилизовали белок ACE2, после чего последовательно добавляли нанотела в различной концентрации и S-белок – в константной. При отсутствии нейтрализующего эффекта шиповидный белок свободно связывается с иммобилизованным ACE2 в результате чего регистрируется сигнал. Если же исследуемые нанотела обладают нейтрализующей активностью, они частично или полностью препятствуют связыванию шиповидного белка с рецептором, что приводит к снижению уровня сигнала. Интенсивность изменения оптической плотности при разных концентрациях нанотел позволило количественно оценить их эффективность в блокировании взаимодействия вирусного белка с рецептором (Рисунок 5).

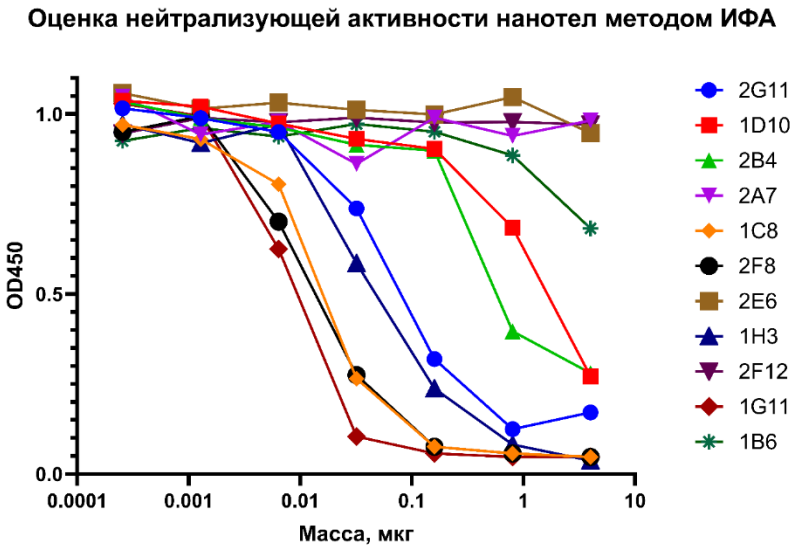

Рисунок 5. График нейтрализации S-белка нанотелами с использованием конкурентного ИФА [128].

По полученным в ходе конкурентного ИФА данным нейтрализации, были отобраны следующие кандидатные варианты, показавшие наиболее сильный уровень блокирования связывания S-белка с рецептором: 1H3, 1C8, 1G11, 2F8, 2G11, 2B4, 1D10, 1B6, которые рассматривались в качестве наиболее перспективных при проведении дальнейших тестов в других системах.

3.2.2. Проверка нейтрализующей активности с использованием псевдотипированного лентивируса

Следующим этапом оценки нейтрализующей активности стало тестирование нанотел на эукариотической клеточной линии с применением псевдотипированного S-белком SARS-CoV-2 лентивирусного вектора. В качестве модельной линии была использована HEK-293T, с введённой экспрессионной кассетой для презентации ACE2 на своей поверхности. В рамках проведения эксперимента был получен псевдотипированный S-белком лентивирусный вектор, что позволило моделировать взаимодействие вируса с клетками-мишенями in vitro (Рисунок 6). Данный подход позволил оценить эффективность нанотел в условиях, приближенных к физиологическим, и определить наиболее перспективные образцы для дальнейшего изучения.

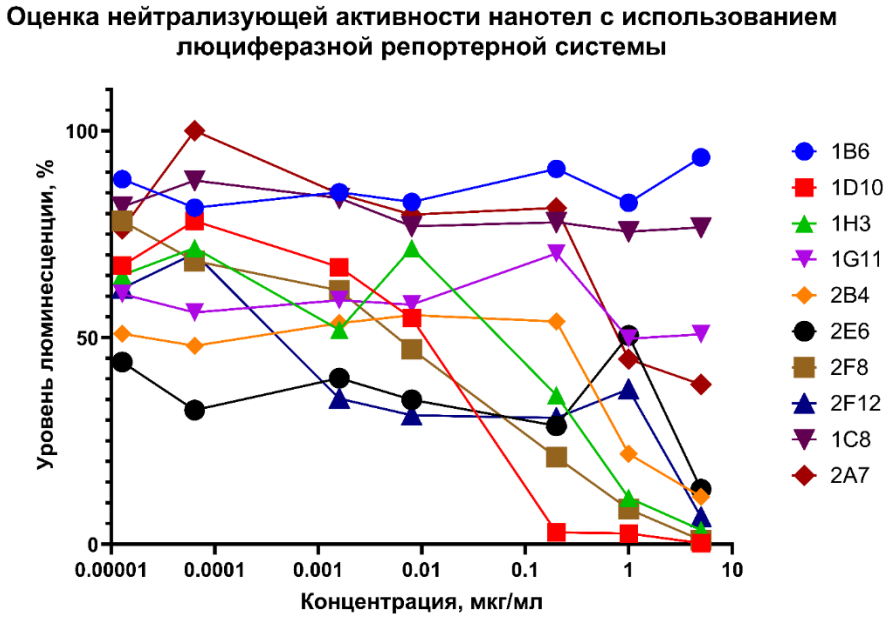

Рисунок 6. График нейтрализации нанотелами лентивируса, псевдотипированного ACE2 [128].

Мы выделили несколько нанотел, продемонстрировавших способность блокировать взаимодействие псевдотипированного лентивируса с ACE2. Данный эффект свидетельствует о потенциальной нейтрализующей активности отобранных образцов нанотел в отношении живого вируса и их перспективности для дальнейшего изучения. Ранжирование нанотел по уровню нейтрализации представлено в Таблице 7, где наглядно показана их эффективность в подавлении связывания вируса с рецептором.

Таблица 7. Ранжирование нанотел по уровню нейтрализации [128].

Ранжирование по уровню нейтрализации	Нанотело	EC50, мкг/мл
1	1D10	0,0003
2	1H3	0,0016
3	2F8	0,04
4	2E6	1
5	2F12	1
6	2B4	0,8
7	2A7	нет
8	1G11	нет
9	1B6	нет
10	1C8	нет

Анализ данных показал, что образцы 1B6 и 1C8 не продемонстрировали значимого уровня нейтрализации, что может указывать на отсутствие специфического взаимодействия с вирусной частицей либо недостаточную аффинность при моделировании условий, приближенных к естественным. Варианты нанотел, подтвердившие способность к нейтрализации, были отобраны для дальнейших экспериментов с использованием живого вируса. Эти исследования проводились для оценки их эффективности нейтрализации в физиологических условиях, а также для проверки способности предотвращать инфицирование клеток.

3.2.3. Проверка нейтрализующей активности на живом вирусе варианта Ухань

Следующим этапом тестирования нанотел стал клеточный тест с использованием живого вируса варианта Ухань. Эксперименты проводились с использованием клеточной линии Vero. Уровень нейтрализации оценивали по возникновению ЦПЭ на лунках при разном разведении исследуемых нанотел. Данные представлены в Таблице 8, где активность препаратов выражена в виде 50% эффективной концентрации (EC_{50}).

Таблица 8. Оценка результатов нейтрализации вируса SARS-CoV-2 отобранными нанотелами.

№	Наименование	Исходная концентрация, мг/мл	Эксперимент 1		Эксперимент 2		EC50 (M±SD), мкг/мл
			Разведение	EC50, мкг/мл	Разведение	EC50, мкг/мл	
1	2F8	0,26	0,2382	0,919	0,2382	0,919	0,919
2	1D10	0,19	0,1396	1,35	0,1396	1,348	1,348
3	2G11	0,49	0,2382	1,731	0,2382	1,731	1,731
4	1H3	0,78	0,1806	3,9	0,2382	2,756	3,33±0,81
5	2B4	0,45	0,0910	6,338	0,0910	6,338	6,338
6	2F12	0,18	n/a	>0,36	n/a	>0,36	n/a
7	2A7	0,14	n/a	>2,8	n/a	>2,8	n/a
8	1G11	0,17	n/a	>3,4	n/a	>3,4	n/a
9	1B6	0,24	n/a	>4,8	n/a	>4,8	n/a
10	2E6	0,29	n/a	>5,8	n/a	>5,8	n/a
11	1C8	0,34	n/a	>6,8	n/a	>6,8	n/a

Вируснейтрализующие антитела в детектируемых количествах были обнаружены в пробах 1H3, 2F8, 1D10, 2G11 и 2B4. Поскольку результаты совпали в двух независимых экспериментах, расчёт стандартного отклонения для большинства проб не представлялся возможным. Наиболее эффективными в вопросе нейтрализации взаимодействия вируса с рецептором стали нанотела 1D10, 2F8 и 1H3.

В экспериментах, проведённых с данными вариантами нанотел, наблюдались высокие уровни нейтрализующей активности во всех тест-системах, а также ранее были зафиксированы наномолярные константы диссоциации этих нанотел из комплекса с S-белком. Данные параметры выделяют их на фоне остальной панели, что определило их выбор для дальнейшего изучения и внесения модификаций в молекулярную конструкцию с целью усиления противовирусного эффекта.

3.2.4. Биннинг нейтрализующих нанотел

После подтверждения нейтрализующей активности у некоторых вариантов нанотел в результате теста с живым вирусом было решено оценить, перекрываются ли их эпитопы связывания. Для этого был проведен биннинг нейтрализующих нанотел 1H3, 2F8, 1D10, 2G11 и 2B4 с помощью прибора для биослойной интерферометрии BLITz (Рисунок 7).

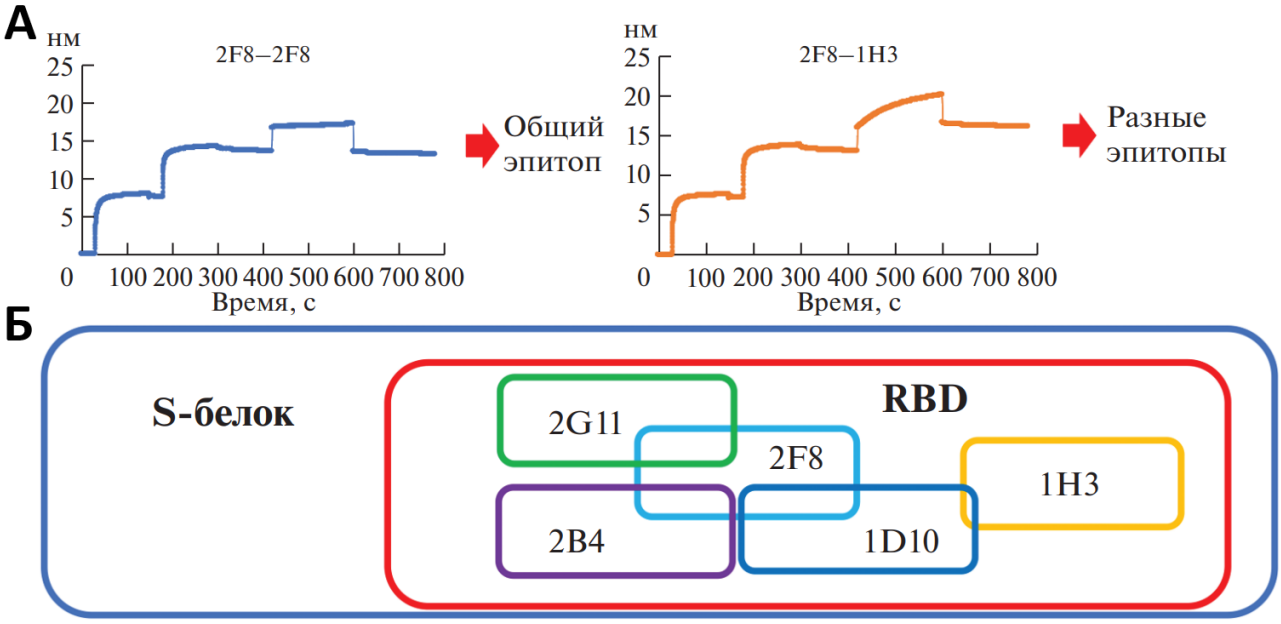

Рисунок 7. Эпитопное картирование нейтрализующих нанотел на S-белке [128]. А – Пример анализа на перекрывание эпитопов: 2F8-2F8 – общий эпитоп, 2F8-1H3 -– эпитопы не перекрываются. Б – схематическое взаиморасположение эпитопов связывания.

Подтверждено, что все нейтрализующие варианты нанотел специфически связываются именно с RBD. Полного перекрывания эпитопов связывания не наблюдается. Некоторые образцы, вероятно, имеют небольшие зоны перекрытия. Общая схема взаимного расположения нанотел на поверхности белка, составленная по результатам анализа, представлена на Рисунке 7Б.

После получения положительных результатов в рамках экспериментов по оценке специфичности связывания отобранных нанотел с шиповидным белком SARS-CoV-2, подтверждению нейтрализующего эффекта в отношении взаимодействия вируса с рецептором ACE2 у некоторых вариантов нанотел и проверки перекрывания эпитопов связывания у нейтрализующих вариантов, была опубликована статья [128].

3.2.5. Экспрессия в слитом с Fc виде

Далее было исследовано, возможно ли усилить нейтрализующий эффект за счет конверсии нейтрализующих нанотел в формат полноразмерного тяжелоцепочечного антитела. За счет этого можно замедлить почечный клиренс, что способствует продлению циркуляции молекулы в крови, а также повысить авидность за счёт присутствия одновременно двух антиген-связывающих доменов в одной молекуле, что позволяет значительно усилить связывание с целевой мишенью. Кроме того, введение в структуру Fc-фрагмента способствует восстановлению взаимодействия молекулы с иммунной системой, что позволяет запускать механизмы антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC), усиливая противовирусный эффект молекулы. Был получен модифицированный вариант на основе нанотела 1D10 путём клонирования последовательности в экспрессионную плазмиду, содержащую участок, кодирующий Fc (Рисунок 8).

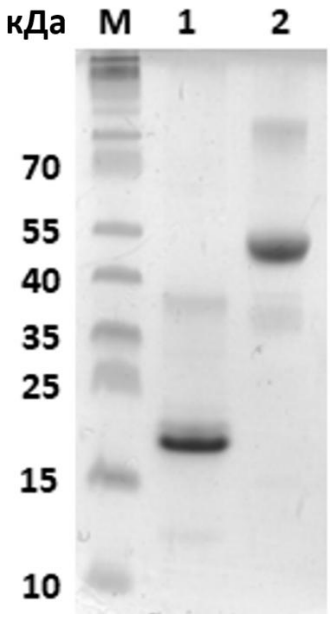

Рисунок 8. Электрофоретический анализ препаратов на основе нанотела 1D10. Линия 1: мономер 1D10; 2: 1D10-Fc. M – маркер длин.

В результате проведённых работ был получен чистый и стабильный белковый препарат, который использовался в последующих экспериментах для оценки его функциональных свойств. Полученный вариант был использован в тестах для сравнения эффекта нейтрализации относительно мономерных вариантов.

3.2.6. Подтверждение нейтрализующей активности нанотел в отношении разных вариантов вируса

С течением времени появлялись новые варианты вируса, отличающиеся как остротой протекания болезни, так и строением вирусного капсида [131, 132]. В процессе накопления мутаций изменилась антигенная структура шиповидного белка, на который ранее были отобраны используемые в экспериментах нанотела, и, в частности, структура домена RBD. Было исследовано, сохраняется ли нейтрализующий эффект отобранных нанотел на более новых вариантах вируса.

Далее было проведено тестирование нанотел (1D10, 2F8 и 1H3) на разных вариантах вируса. Для проверки нейтрализации вируса отобранными

нанотелами было использовано две системы оценки: с использованием псевдовируса с репортерным геном люциферазы и титрование с живым вирусом и подсчетом количества образуемых бляшек. Использовали три варианта вируса, чтобы оценить функциональную активность нанотел при разных мутациях в S-белке: B.1.1 (Ухань), B.1.617.2 (Дельта), B.1.1.529 (Омикрон). У всех образцов нанотел была подтверждена нейтрализующая активность на варианте B.1.1 (Рисунок 9).

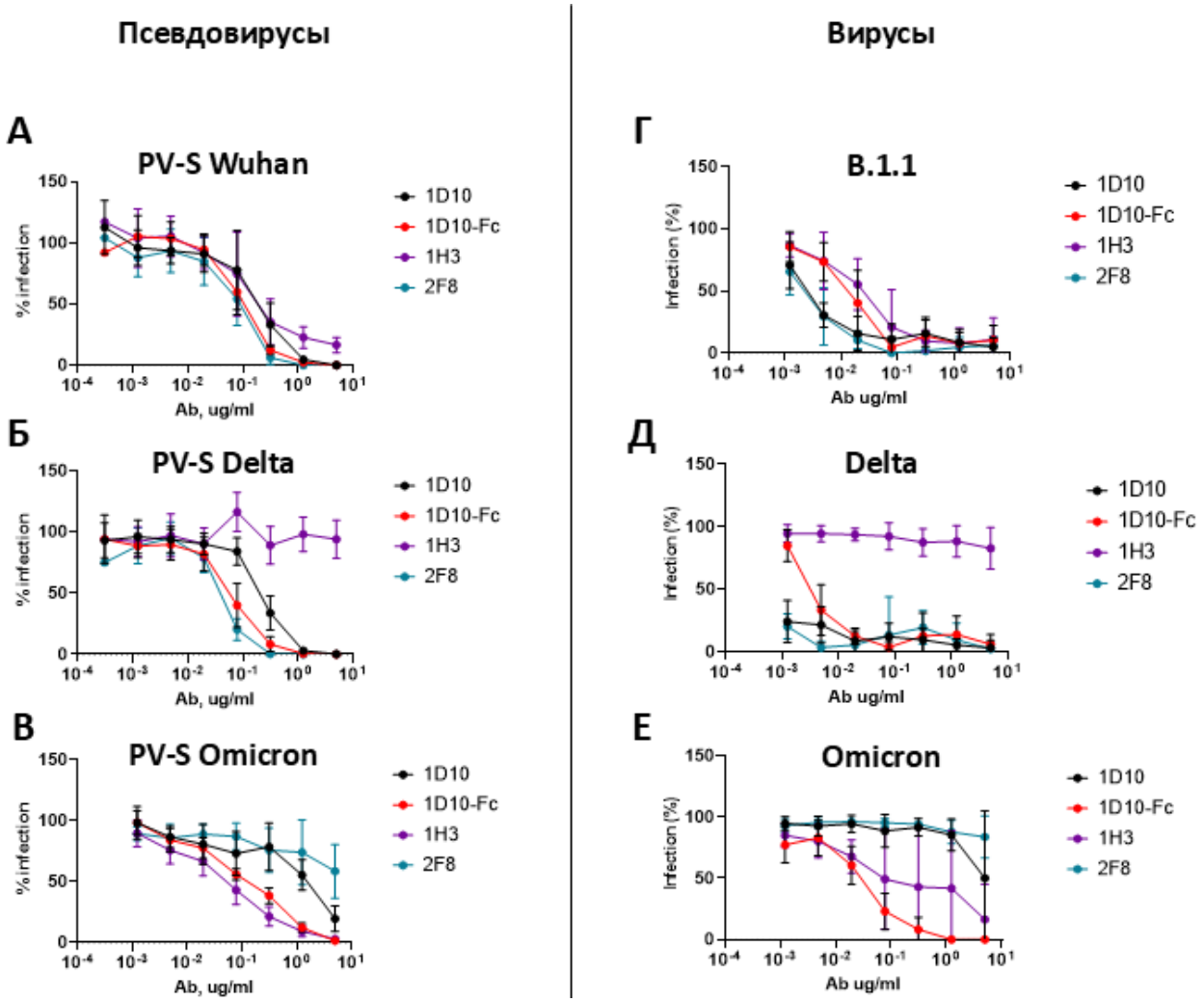

Рисунок 9. Графики нейтрализации нанотелами различных вариантов вируса SARS-CoV-2. А-В – графики нейтрализации при использовании псевдотипированных лентивирусов. Г-Е – графики нейтрализации при использовании препаратов живого вируса.

Было отмечено, что образец 1H3 терял способность нейтрализовывать вирус варианта B.1.617.2 (Дельта). На варианте B.1.1.529 (Омикрон) вариант 2F8 терял нейтрализующую активность, в то время как 1H3 её сохранял. 1D10 демонстрировал слабую активность в отношении живого вируса варианта Омикрон, в то время как тяжелоцепочечный вариант 1D10 показывал наилучший результат. По итогам эксперимента каждое антитело проявило нейтрализующий эффект в отношении 2-3 исследуемых вариантов SARS-CoV-2. Для дальнейшей оценки модифицированных вариантов молекул был выбран вариант вируса Омикрон, как позволяющий полноценно оценить влияние модификации нанотела на его нейтрализующую способность: образец 2F8 не обладает нейтрализующим эффектом в нативном формате, следовательно, можно оценить восстановление такового после внесения модификаций; образец 1H3 сохраняет нейтрализующий эффект, что позволяет оценить влияние на него изменений молекулярной конструкции; образец 1D10 сохраняет нейтрализующую активность и в нативном, и в модифицированном варианте, что позволяет использовать его в качестве положительного контроля в рамках экспериментов.

3.2.6.1. Оценка способности нанотел нейтрализовать инфекцию при передаче вируса от клетки к клетке

Далее было исследовано, сохраняется ли нейтрализующая активность нанотел при использовании альтернативной модели заражения. Была разработана модель, имитирующая передачу вируса от инфицированной клетки к соседней здоровой через мембранные контакты. Такой сценарий ближе к реальным условиям внутри тканей, где распространение вирусной инфекции может происходить не только посредством свободно циркулирующих вирусных частиц, но и через прямой клеточный контакт.

В этой части эксперимента нами использовалось нейтрализующее нанотело 1D10 в двух структурных форматах – в мономерном и тяжелоцепочечном виде. В эксперименте были применены лентивирусные

векторы с псевдотипами Ухань и Дельта из-за наиболее показательного нейтрализующего эффекта в их отношении (Рисунок 10). Была проведена трансфекция клеток-доноров с последующей инкубацией с антителом и сокультивированием с клетками-мишенями.

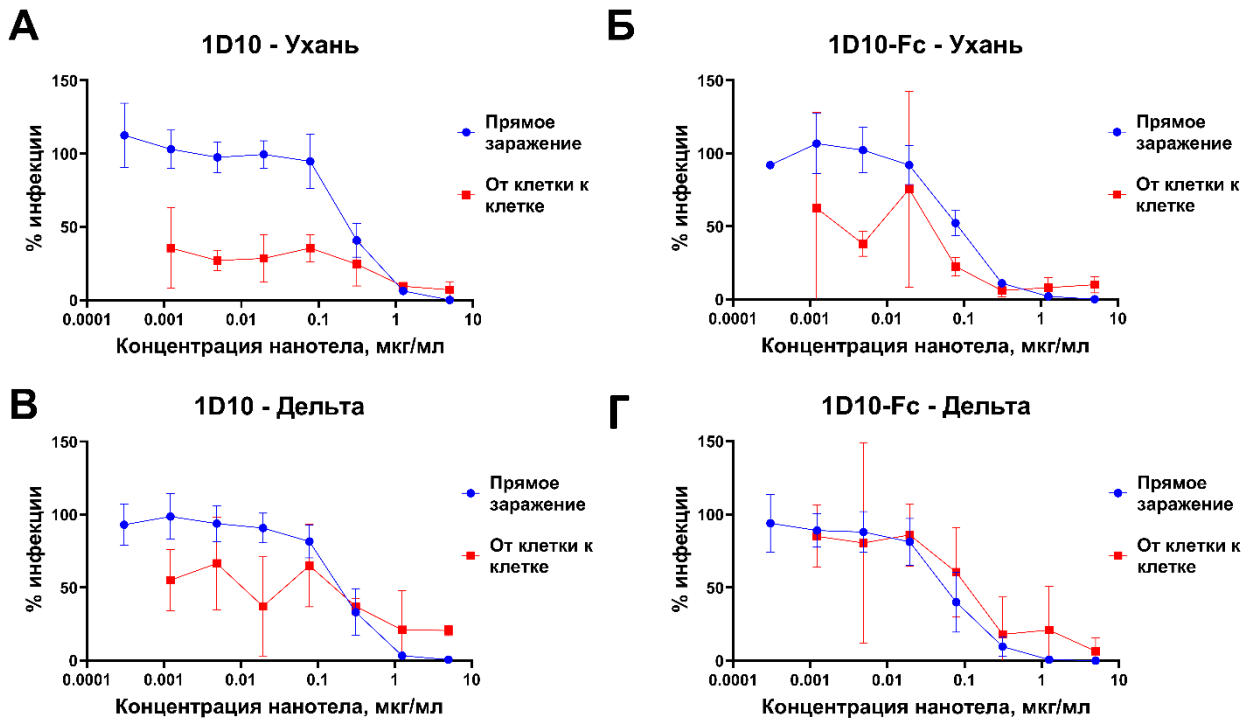

Рисунок 10. Графики нейтрализации инфекции при передаче вируса от клетки к клетке. А – тестирование мономерного варианта 1D10 на варианте Ухань. Б – тестирование тяжелоцепочечного варианта 1D10 на варианте Ухань. В – тестирование мономерного варианта 1D10 на варианте Дельта. Г – тестирование тяжелоцепочечного варианта 1D10 на варианте Дельта.

Мы установили, что нанотело 1D10 обладает способностью эффективно ингибировать не только заражение клеток свободными вирусными частицами, но и межклеточную передачу инфекции. Особенно примечательно, что при использовании S-белка оригинального уханьского варианта SARS-CoV-2 эффективность блокирования межклеточной передачи оказалась даже выше, чем в условиях прямой вирусной инфекции. Это может указывать на высокую

чувствительность нанотела 1D10 к консервативным эпитопам, характерным для данного варианта вируса, особенно в контексте его межклеточной передачи.

Сравнение различных форматов нанотела продемонстрировало, что мономерный формат 1D10 превосходит тяжелоцепочечный аналог в способности препятствовать межклеточному распространению вируса. Предположительно, это преимущество связано с меньшими размерами мономерной формы, что, вероятно, способствует лучшему проникновению нанотела в узкие межклеточные пространства и более точному взаимодействию с вирусными белками на уровне клеточного контакта.

Такой эффект может быть обусловлен тем, что межклеточная передача вируса часто осуществляется через специализированные структуры, такие как синцитии, туннельные нанотрубки или иные типы мембранных контактов, где доступ к вирусным антигенам может быть ограничен для крупных молекул [133, 134]. В данном контексте компактная структура мономерного нанотела обеспечивает ему преимущество, позволяя проникать в эти труднодоступные участки и эффективно блокировать механизмы передачи вируса от клетки к клетке [126].

Проведение экспериментов по моделированию клеточного заражения предоставляет возможность более точного моделирования реальных механизмов распространения вируса в тканях и позволяет выявить потенциальные различия в эффективности различных наноструктур. Эти данные могут стать основой для разработки новых стратегий противодействия вирусным инфекциям, учитывая сложности, связанные с вирусной передачей в условиях клеточного контакта. Результаты эксперимента позволяют оценить потенциал нанотел в качестве терапевтических агентов нового поколения, в частности, в борьбе с вирусными инфекциями.

3.2.6.2. Стимуляция образования синцитиев нанотелом 1D10

Интересным наблюдением в ходе проведённых экспериментов стало образование синцитиев клеток при использовании варианта нанотела 1D10 в концентрации ≥5 мкг/мл (Рисунок 11). Такой эффект не проявлялся при обработке клеточных культур другими исследуемыми образцами, что вызвало научный интерес и необходимость более детального изучения механизма данного явления.

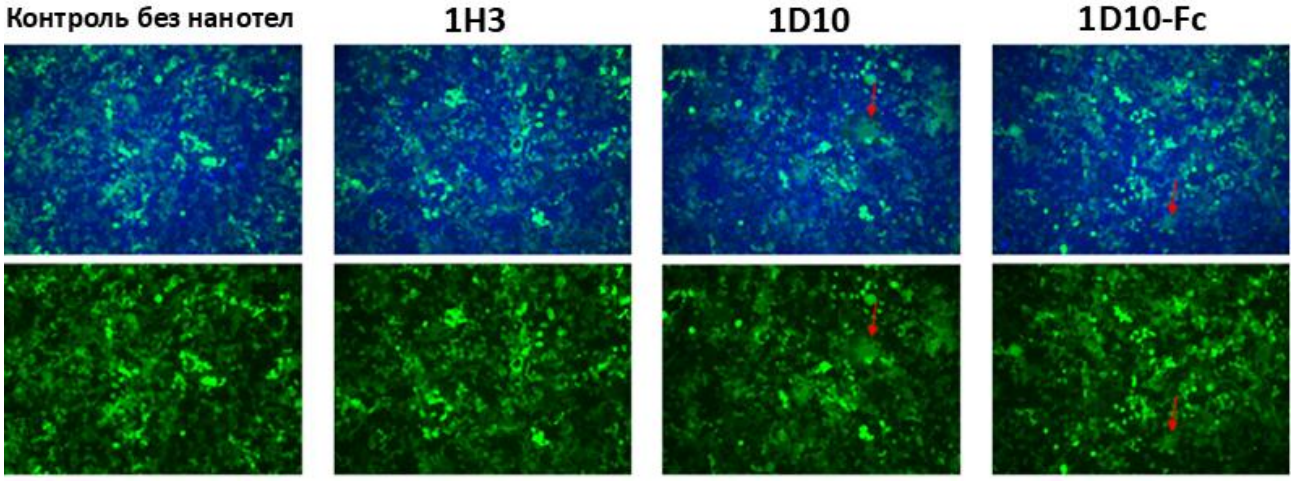

Рисунок 11. Контроль синцитиеобразования на линии клеток HEK-293T при добавлении нанотел.

Как видно на Рисунке 11, при добавлении на лунку с клетками вируса в комбинации с нанотелом 1D10 наблюдается явное образование синцитиев. Чего в свою очередь не происходит на контрольном образце без нанотела и с нанотелом 1H3. Основной гипотезой, объясняющей этот феномен, стало предположение о способности нанотела 1D10 усиливать процесс расщепления шиповидного белка вируса SARS-CoV-2 до его активной формы – S2` [135]. Согласно литературным данным, именно S2`-форма белка играет ключевую роль в слиянии мембран вируса и клетки, инициируя процесс инфицирования. Для проверки этой гипотезы был проведен сравнительный анализ лизатов клеток, подвергавшихся обработке различными нанотелами (Рисунок 12). При добавлении в лунку нанотела 1D10 наблюдается увеличение концентрации S2` субъединицы относительно контрольных препаратов.

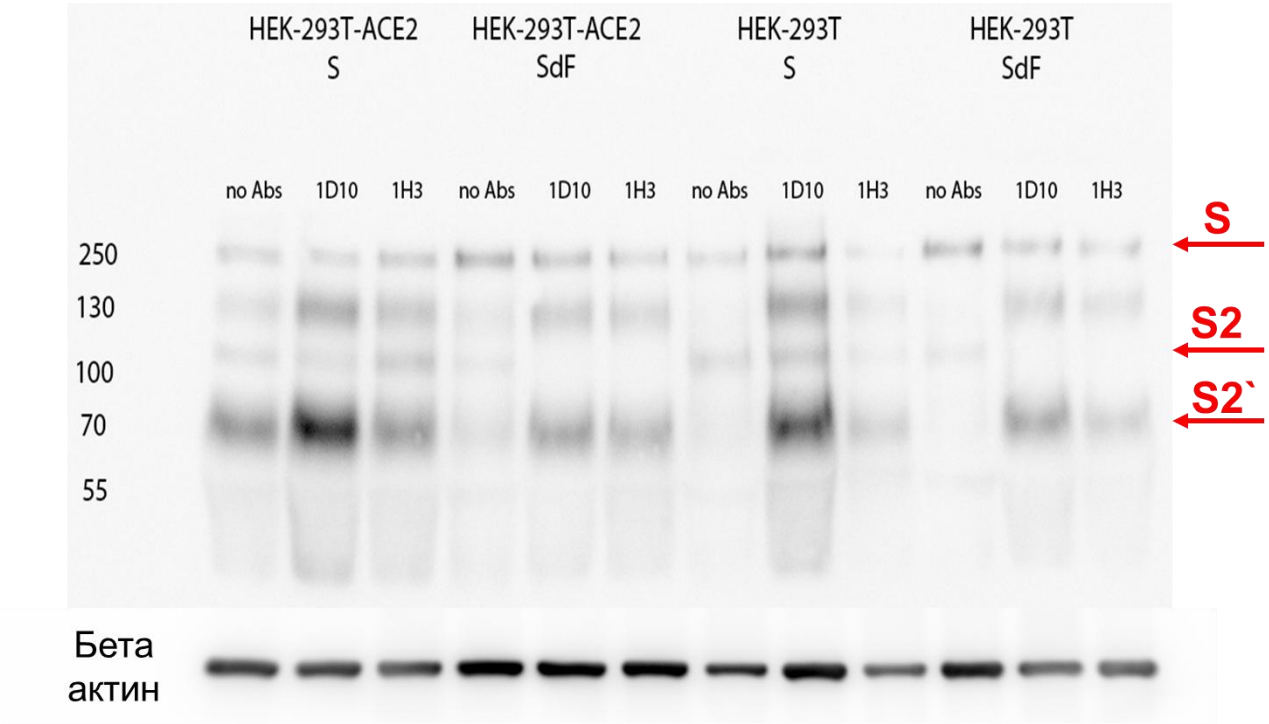

Рисунок 12. Вестерн-блот клеточных лизатов для оценки изменения концентрации S2` субъединицы при добавлении нанотел. SdF - S-белок имеет мутантный сайт расщепления фурина.

Как видно из Рисунка 12, при присутствии в лунке нанотела 1D10 наблюдается значительное увеличение концентрации S2` субъединицы (полоса в районе 70 кДа). Причем в слабой степени данное явление наблюдается, даже когда S-белок имеет мутантный сайт расщепления фурина (дорожки с SdF) и когда клетки-мишени не несут ACE2 (дорожки с HEK-293T). Окрашивание лизатов проводили SARS-CoV-2 Spike Protein S2 антителом (Invitrogen, США), для количественного контроля использовали beta Actin Monoclonal Antibody (Invitrogen, США).

Субъединица S2′ образуется в результате протеолитической активации S-белка после его взаимодействия с рецептором ACE2 [136]. Данный процесс включает последовательное расщепление: сначала в участке S1/S2 фурином или фуриноподобными протеазами по аминокислотному остатку R685, затем - в участке S2′ по остатку R815 с участием сериновой протеазы TMPRSS2 [135]. Показано, что введение мутации в позиции R815 (канонический сайт S2′) приводит к снижению образования синцитиев, тогда как мутация в позиции R865

не оказывает сопоставимого эффекта [135]. При этом мутация R685A не полностью блокирует образование S2′, однако существенно снижает уровень слияния клеток или полностью его подавляет [137]. Таким образом, протеолитическая активация в сайте S2′ значительно ускоряет процесс слияния мембран, однако не является строго обязательной, поскольку в ряде случаев синцитиеобразование может происходить и при её нарушении [136, 137].

По литературным данным, антитела к S-белку способны влиять на его протеолитическую обработку и конформационную динамику, изменяя доступность участков, ответственных за связывание с рецептором и слияние мембран. Так, моноклональные антитела CB6 и REGN10933 могут индуцировать отщепление субъединицы S1 и способствовать расщеплению в сайте S2′ в клетках, экспрессирующих S-белок [137]. Антитело CB6 также способно модифицировать конформационный переход S-белка, стабилизируя промежуточное состояние, связанное с субъединицей S2, и снижая эффективность расщепления, опосредованного TMPRSS2 [138]. Кроме того, антитело CV30, обладающее эпитопом связывания, перекрывающим участок взаимодействия с ACE2, может индуцировать преждевременное отщепление субъединицы S1 как один из механизмов нейтрализации [139].

Полученные нами данные в целом согласуются с литературными сведениями. В частности, показано, что нанотело 1D10 при взаимодействии с S-белком усиливает его протеолитическую обработку до состояния S2′, что, в свою очередь, способствует ускорению слияния клеточных мембран. Дальнейшее изучение данного эффекта не только поможет глубже понять механизмы функционирования вируса SARS-CoV-2, но и потенциально откроет новые пути для разработки терапевтических подходов, направленных на модуляцию процесса слияния вируса с клеткой.

4.6.6.3. Экспрессия нанотел на поверхности клетки для оценки возникновения антителозависимого усиления инфекции

После наблюдения эффекта синцитиеобразования при использовании нанотела 1D10, было решено более детально изучить, могут ли другие исследуемые нанотела вызывать аналогичный эффект, а также оценить их потенциальную способность индуцировать антителозависимое усиление инфекции (АЗУИ) – эффект, возникающий в присутствии определённых антител, которые вместо нейтрализации вируса способствуют его проникновению в клетки, часто через взаимодействие с Fc-рецепторами или другими путями.

Для проведения такого анализа нами были созданы стабильные линии клеток на основе HEK-293T, экспрессирующие на своей поверхности различные варианты нанотел. Эти клеточные линии были разработаны с целью имитировать ситуацию, при которой нанотела могут быть представлены на поверхности клетки, потенциально взаимодействуя с вирусными частицами и влияя на последующее проникновение в клетки.

Далее был проведён функциональный тест с использованием псевдотипированного лентивируса, несущего шиповидный белок SARS-CoV-2 и содержащего репортерный ген люциферазы (Рисунок 13). Такой подход позволил количественно оценить уровень трансдукции (заражения) клеток на основе интенсивности люциферазной активности. Изменение сигнала служило индикатором возможного повышения или, наоборот, подавления инфекции в присутствии нанотел, экспрессируемых на поверхности клеток.

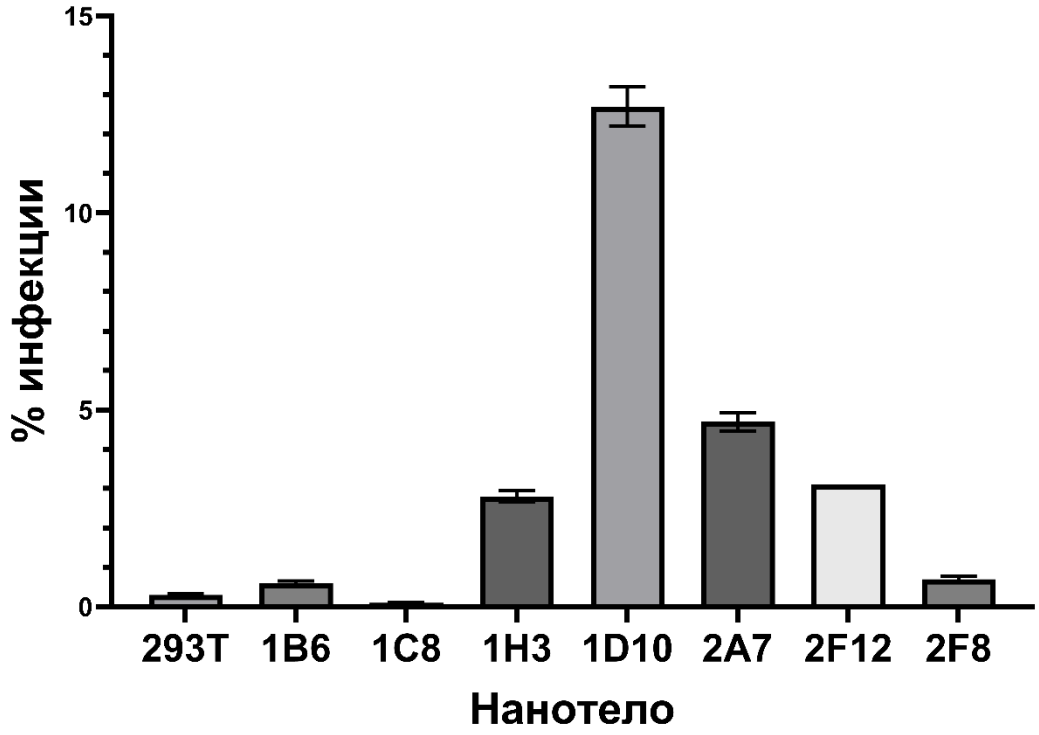

Рисунок 13. Оценка усиления инфекции при экспрессии нанотел на поверхности клеточной линии HEK-293T.

Мы зафиксировали изменение уровня вирусной инфекции при использовании отдельных вариантов нанотел, экспрессируемых на поверхности клеток (Рисунок 13). Наиболее выраженное влияние на уровень трансдукции демонстрировали нанотела 1D10, 2A7 и 2F12. Среди них особенно выделялось нанотело 1D10, при котором наблюдалось усиление инфекции более чем на 10 % по сравнению с отрицательным контролем (клетки без нанотел и рецептора ACE2). Это может свидетельствовать о потенциале данного варианта нанотела усиливать инфекцию при связывании с вирусом, опосредованно способствуя его проникновению в клетки. Остальные нанотела, включая 2A7 и 2F12, вызывали лишь незначительное повышение уровня инфекции (менее чем на 5%) относительно контроля.

Данная модель эксперимента, хоть и не полноценно позволяет воспроизвести физиологические условия в организме из-за отсутствия иммунных клеток и крайне близкому расположению нанотела к поверхности

клетки в составе псевдорецептора, но позволяет оценить перспективы возникновения эффекта АЗУИ по динамике изменения уровня инфекции. Учитывая тот факт, что нанотело 1D10 не только вызывало усиление инфекции, но и сопровождалось выраженным синцитиеобразованием, этот вариант был исключен из дальнейшего тестирования в качестве потенциального терапевтического кандидата. Несмотря на это, 1D10 сохранило свою ценность в рамках экспериментов благодаря высокой нейтрализующей активности, продемонстрированной в предыдущих тестах, и поэтому использовалось в ряде опытов в качестве положительного контроля при сравнении с другими, менее активными нанотелами.

Представленный экспериментальный подход позволил нам оценить, как различные форматы и специфичность нанотел могут повлиять на клеточную восприимчивость к инфекции и исключить или подтвердить потенциальную возможность индуцирования АЗУИ нанотелами в живом организме. Подобные исследования критически важны при разработке нанотел как потенциальных терапевтических агентов, поскольку наличие способности вызывать АЗУИ может ограничить их клиническое применение.

3.2.7. Оценка подхода модуляции тропизма вируса при помощи нанотела

После проведения комплексной оценки нейтрализующего потенциала отобранных нанотел к шиповидному белку SARS-CoV-2 и анализа их возможного участия в механизмах усиления инфекции, исследование было расширено, чтобы более полно оценить функциональный потенциал нанотел как инструмента для контроля вирусных инфекций.

Поскольку нанотела обладают не только способностью блокировать вирус, но и уникальными свойствами, их применение было рассмотрено не только в качестве пассивных ингибиторов инфекции, но и как активных модуляторов таргетной доставки вирусных векторов. Для этого, на следующем этапе работы мы провели оценку возможности использования нанотел для перенаправления лентивирусных векторов на конкретные мишени.

На сегодняшний день известен ряд способов для перенацеливания лентивекторов с использованием модифицированных гликопротеинов вирусов кори, Синдбис и Нипах [140-142]. В недавних исследованиях также рассматривалась возможность перенацеливания с использованием модифицированного G белка вируса везикулярного стоматита (VSV) в комбинации с псевдорецептором на основе ScFv или DARPin [143, 144]. Наиболее широко изученный метод перенацеливания лентивирусных векторов включает использование рецептор ослеплённого белка H вируса кори, слитого с целевой молекулой - цитокином, DARPin или ScFv [145]. Похожий подход применяется при использовании рецептор ослеплённого белка G вируса Нипах [146].

Преимущество этого метода псевдотипирования заключается в высокой специфичности трансдукции, воздействующей исключительно на клетки, которые несут целевой рецептор на своей поверхности, а к недостаткам относится значительное снижение вирусного титра - по крайней мере, на порядок ниже по сравнению с лентивирусными векторами, псевдотипированными с интактным белком H вируса кори [147]. Этот метод несовместим со многими известными высокоаффинными ScFv или DARP-инами, так как для эффективного инфицирования клеток путем слияния вирусной и клеточной мембран гликопротеин F должен находиться на оптимальном расстоянии от клеточной мембраны и быть правильно ориентированным. Это требование накладывает ограничения на оптимальную длину аминокислотной цепи внешней части рецепторного белка [148]. Другие методы ретаргетинга, которые полагаются на псевдорецептор (индивидуальную молекулу, закрепленную на вирусной мембране, в сочетании либо со стеблевым доменом белка H вируса кори, либо с «ослеплённым» белком G VSV) имеют меньше ограничений, при этом, использование отдельного псевдорецептора может быть связано со сниженной специфичностью трансдукции [149]. Нанотела практически идеально подходят для применения в данной области, благодаря

своей хорошей растворимости, компактному размеру и простоте отбора из иммунных библиотек.

Ретаргетирование лентивирусов на конкретные рецепторы повышает их терапевтический потенциал, особенно для модуляции иммунных клеток в опухолевом микроокружении. В этой области часто наблюдается снижение активности эффекторных Т-лимфоцитов и избыток регуляторных Т-клеток (Treg), способствующих иммунной толерантности через иммуносупрессивные цитокины. Характерной чертой Т-клеток в опухоли является гиперэкспрессия иммунного чекпойнта PD1, а PD-L1 - на опухолевых клетках[150]. В нормальных условиях взаимодействие PD-1/PD-L1 сдерживает гиперактивацию иммунных клеток, но в опухолевом микроокружении за счет такого взаимодействия происходит активация ингибирующих сигнальных путей в Т-лимфоцитах (в частности, с участием фосфатазы SHP-2), что противодействует каскаду сигналов TCR, снижает пролиферацию и продукцию цитокинов, а также цитотоксическую активность. Таким образом происходит истощение иммунных клеток и нарушается их активация [151]. Современная терапия использует антитела для блокировки взаимодействия PD1/PD-L1, чтобы восстановить активность Т-клеток [152]. Высокий уровень экспрессии PD1 также делает его перспективной мишенью для направленной доставки генетических структур через ретаргетированные лентивирусы, что может позволить селективно модифицировать Т-клетки в опухолевом микроокружении. Поскольку PD1 экспрессируется и на T_{reg}-лимфоциах, таргетная доставка генетических конструкций, подавляющих их функциональную активность, может ослабить иммунную толерантность. Основной маркер T_{reg} - транскрипционный фактор FOXP3, который направляет дифференциацию наивных $CD4^+$ Т-лимфоцитов в сторону регуляторного фенотипа и необходим для поддержания функции T_{reg}-лимфоцитов. Его подавление с помощью РНК-интерференции может позволить уменьшить количество T_{reg}-лимфоцитов, что в свою очередь будет способствовать усилению противоопухолевого иммунитета [153, 154].

В рамках исследования, было разработано несколько вариантов PD1-таргетированных лентивирусных векторов для доставки shRNA против FOXP3 и сравнили их эффективность и специфичность. Для этой цели было использовано нанотело nb102c3, специфичное к рецептору PD1 [155]. В ходе работы нанотело nb102c3 интегрировали в модифицированные гликопротеины вируса кори (рецептор-слепой (Y481A, R533A) белок H из вируса кори с делецией 24 аминокислоты с N-конца - 4AHcΔ24AA-102c3) и VSV (с «ослеплённым» рецептором), что позволило создать псевдотипированные лентивирусные векторы с избирательным тропизмом к PD1-положительным клеткам (Рисунок 14).

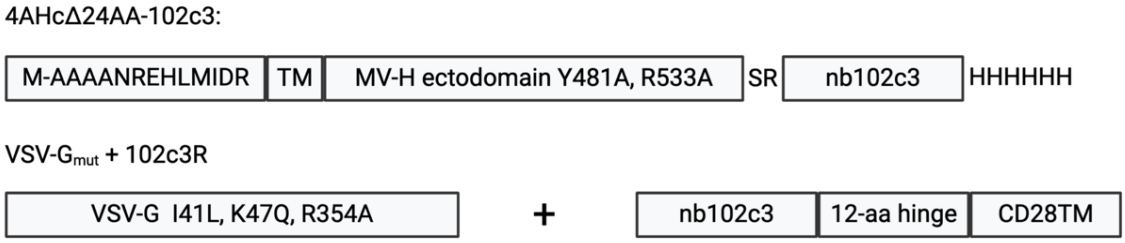

Рисунок 14. Схематические изображения перенаправленных гликопротеинов кори (4AHcΔ24AA-102c3) и VSV (VSV-Gmut +102c3R), протестированных на перенаправление лентивирусного вектора [156].

Эксперименты продемонстрировали высокую избирательность и эффективность ретаргетированной трансдукции активированных $CD4^+$ Т-лимфоцитов и T_{reg}-лимфоцитов, экспрессирующих PD1, при использовании этих векторов (Рисунок 15). В частности, вариант с гликопротеином кори 4AHcΔ24AA-102c3 обеспечивал наиболее высокую специфичность, тогда как вариант с VSV-Gmut+102c3R давал более высокие инфекционные титры, но с меньшей избирательностью.

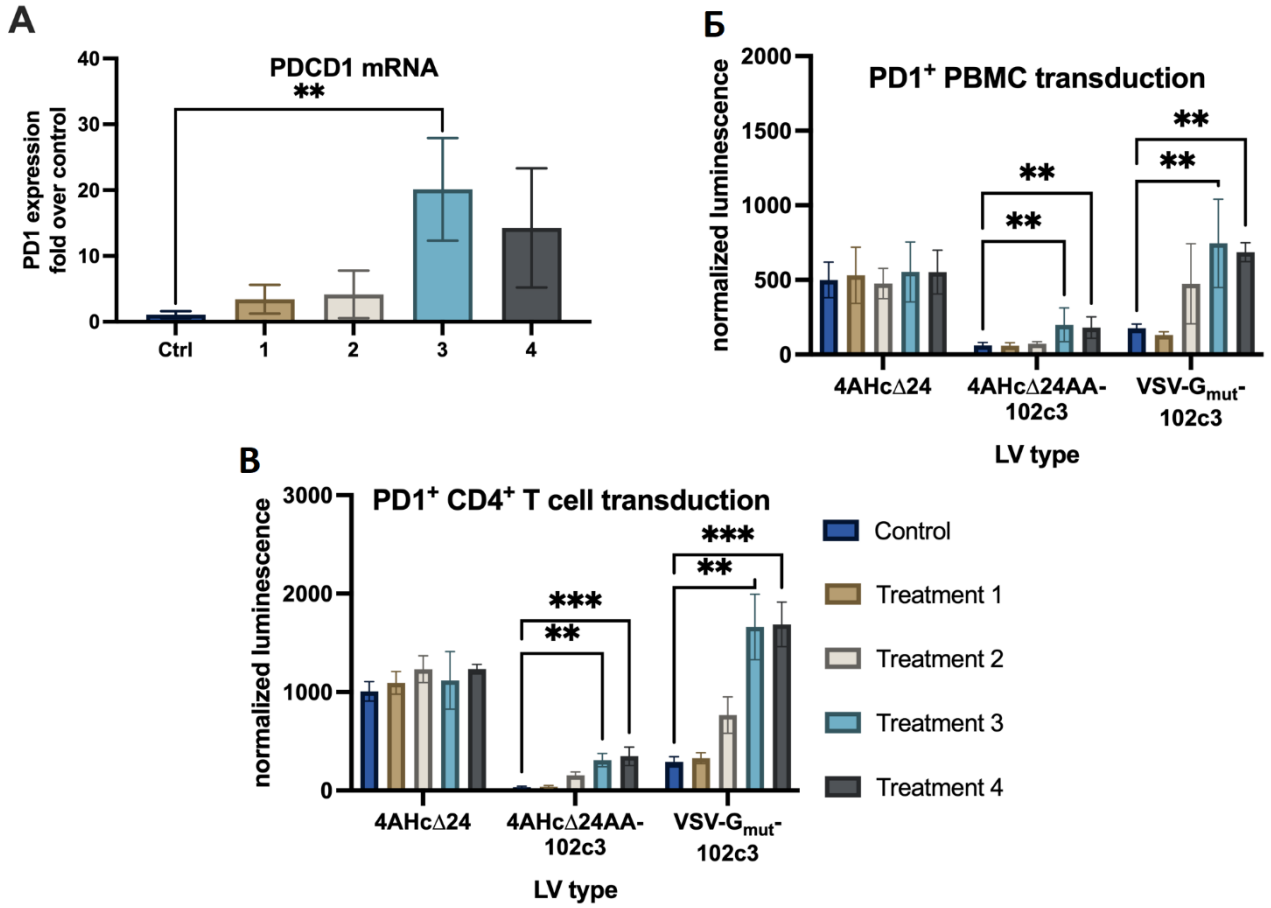

Рисунок 15. А – Количественный анализ уровня PDCD1 методом qPCR в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), культивированных с: IL-2 (контроль), IL-2 + PHA-M (1), PMA + иономицин + PHA-M (2), IL-2 + PHA-M + PMA + иономицин (3), и IL-2 + PHA-M + PMA + иономицин + IFNγ + IL-4 + IL-12 (4). Б - Уровни люминесценции nanoLuc, нормализованные по количеству клеток, после трансдукции контрольными (4AHcΔ24) и таргетированными (4AHcΔ24AA-102c3, VSVGmut+102c3R) лентивекторами. В - Уровни люминесценции nanoLuc в трансдуцированных CD4+ Т-клетках [156].

Примечание: ** - P < 0,0075, *** - P = 0,0005.

Анализ люминесценции показал, что эффективность трансдукции векторами с оболочками 4AHcΔ24AA-102c3 и VSVGmut+102c3R коррелирует с уровнем экспрессии PDCD1, чего не наблюдалось при использовании 4AHcΔ24 (Рисунок 15Б). При стимуляции клеток комбинацией IL-2, PHA-M, PMA и иономицина, а также с добавлением IFNγ, IL-4 и IL-12, наблюдалось достоверное

увеличение сигнала у клеток, трансдуцированных указанными таргетированными векторами, по сравнению с контролем (Рисунок 15B). При этом наибольшую активность nanoLuc показали клетки, трансдуцированные векторами с VSVGmut+102c3R, что согласуется с данными, полученными на клеточных линиях HEK-293T-PD1 и HEK-293T.

В последующих экспериментах, ретаргетированные векторы были успешно использованы для доставки кшРНК, направленной против транскрипционного фактора FOXP3, ключевого регулятора функций Treg-клеток. В результате наблюдалось снижение экспрессии FOXP3 и уровня секреции TGF-β, что свидетельствует о функциональной супрессии Treg-фенотипа (Рисунок 16).

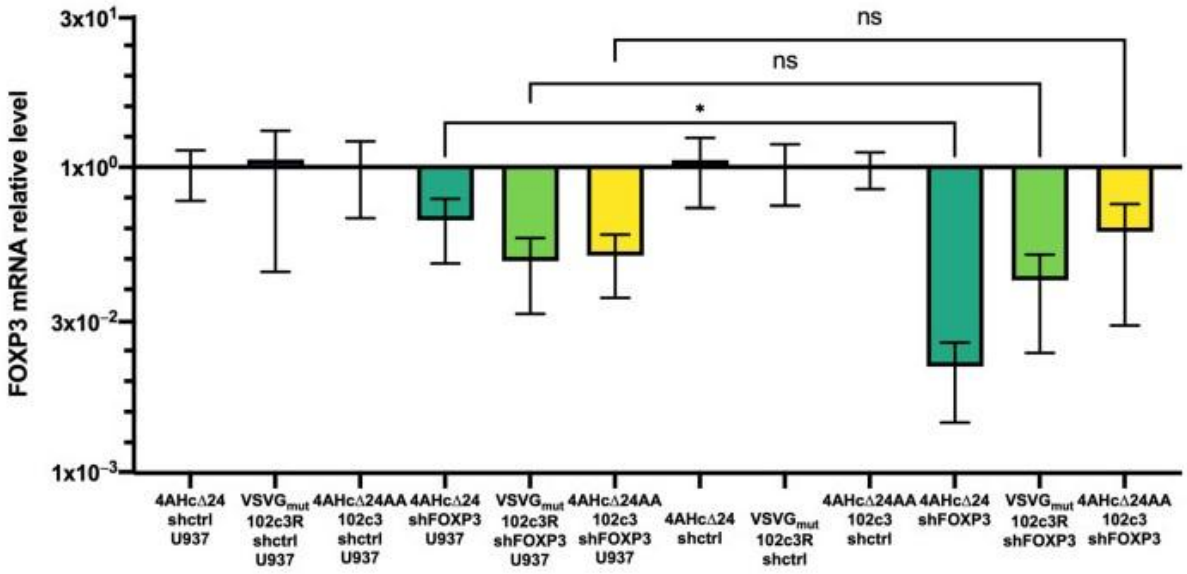

Рисунок 16. **Экспрессия FOXP3 в PD1$^+$ T_{reg}, совместно культивируемых с клетками U937 и трансдуцированных различными псевдотипами LV, несущими shFOXP3 или контрольную shRNA. *- P = 0,0485, ns - P > 0,05 [156].**

Наши результаты продемонстрировали четкую корреляцию между уровнями экспрессии PD1 и эффективностью трансдукции в активированных Т-лимфоцитах, подтверждая специфичность наших PD1-таргетных векторов. Важно отметить, что наивные Т-клетки, по-видимому, не были восприимчивы к

трансдукции, что потенциально делает доставку трансгена специфичной для участков воспаления, таких как микроокружение опухоли.

В целом, полученные результаты демонстрируют возможность использования нанотела nb102c3 для перенаправления лентивирусных векторов на PD1-позитивные Т-лимфоциты, предоставляя новый инструмент для модуляции иммунных реакций в микроокружении опухоли. Избирательное подавление FOXP3 в Treg-лимфоцитах представляет собой новую потенциальную стратегию для усиления противоопухолевого иммунитета. На основе этого подхода могут быть разработаны новые методы иммунотерапии, направленные на селективное вмешательство в функции иммунных клеток, участвующих в прогрессии опухоли.

3.3. Модификации нанотел

В результате проведённых экспериментов было отобрано два наиболее перспективных варианта нанотел к S-белку SARS-CoV-2: 1H3, 2F8. Эти образцы продемонстрировали высокую степень связывания с целевым белком в различных тест-системах, а также способность эффективно нейтрализовать различные варианты вируса SARS-CoV-2 в экспериментах с использованием эукариотических клеток и живого вируса. Дополнительным преимуществом изучения модификаций на примере данных нанотел является их различие нейтрализующего эффекта в отношении разных вариантов вируса, за счет чего можно оценить влияние модификаций на эффект нейтрализации при его разном стартовом уровне.

В качестве положительного контроля в рамках экспериментов использовалось нанотело 1D10, обладающее сильным нейтрализующим эффектом против всех вариантов исследованных вирусов. Применение его тяжелоцепочечного формата позволяет в свою очередь наблюдать достоверное усиление нейтрализации. При этом дальнейшее исследование модификаций на основе данного варианта не имеет практического значения из-за его склонности усиливать синцитиеобразование на клеточных линиях.

К числу ключевых проблем при использовании нанотел в живых системах относится их короткий период полувыведения, что снижает терапевтическую эффективность и требует частого введения для поддержания необходимой концентрации. Благодаря относительно простой молекулярной структуре, нанотела могут подвергаться различным модификациям, что открывает новые пути к преодолению указанных ограничений. В рамках работы были рассмотрены две основные стратегии модификации нанотел, направленные на повышение их терапевтического потенциала.

Первая рассмотренная стратегия заключается в конъюгации мономерных нанотел с цитотоксическими или противовирусными агентами [157]. Такой подход направлен на усиление противовирусного эффекта за счёт селективного уничтожения заражённых клеток или таргетной доставки противовирусной нагрузки внутрь инфицированной клетки. Даже если концентрации функционализированных нанотел недостаточно для полного блокирования вируса, конъюгированный с ним агент будет специфически проникать в клетку в составе комплекса с нанотелом, связавшимся с вирусной оболочкой. Такой подход может позволить предотвратить дальнейшее распространение инфекции и снизить вирусную нагрузку в организме.

Вторая стратегия основана на увеличении размера молекулы. Увеличение молекулярной массы способствует замедлению выведения нанотела из организма, что позволяет ему дольше циркулировать в кровотоке и обеспечивать пролонгированную нейтрализацию вируса. Более того, конструкция может включать сразу несколько молекул нанотел, что не только усиливает связывание с мишенью, но и повышает вероятность эффективной блокировки вирусных частиц [66, 158-160].

Описанные модификации нанотел потенциально способны значительно повысить их терапевтический потенциал, обеспечивая как пролонгированную циркуляцию в организме, так и дополнительную стратегию борьбы с вирусом на клеточном уровне.

3.3.1. Конъюгация с полезной нагрузкой

В качестве наиболее перспективного подхода для проведения комплекса исследований была выбрана конъюгация мономерных молекул нанотел с полезной нагрузкой. Она основана на использовании высокоактивных цитотоксических или противовирусных соединений в сочетании с нанотелами для избирательного воздействия на инфицированные клетки, предотвращая тем самым дальнейшую репликацию вируса.

Использование нанотел, несущих цитотоксический агент, может позволить значительно повысить эффективность нейтрализации вируса. В отличие от классического механизма блокирования вирусных частиц, этот метод включает дополнительное воздействие на клетку, что приводит к её гибели до начала активной вирусной репликации. Такой подход особенно важен для борьбы с вирусами, способными быстро размножаться внутри клеток и уходить от иммунного ответа.

3.3.1.1. Выбор перспективных соединений для конъюгации с нанотелом

Ключевым критерием при выборе соединений стала их активность в низких концентрациях. Оптимальными кандидатами для конъюгации являются агенты, обладающие высокой токсичностью при наномолярных или субнаномолярных концентрациях. Такие соединения не могут применяться в свободной форме из-за высокого риска системной токсичности, однако в составе конъюгатов с нанотелами их доза в итоговом препарате значительно снижена, что позволяет избежать нежелательной гибели здоровых клеток. Целевая молекула будет оказывать воздействие только на клетки, которые захватывают её вместе с вирусной частицей, что обеспечит селективность действия и минимизацию побочных эффектов.

Первым кандидатом для тестирования в качестве цитотоксического агента для конъюгации с нанотелами стала бактериальная рибонуклеаза - барназа. Этот фермент представляет собой экзонуклеазу, продуцируемую бактерией Bacillus

amyloliquefaciens, и обладает способностью разрушать клеточную РНК, тем самым инициируя процессы апоптоза [161]. В природных условиях ферментативная активность барназы подавляется специфическим белковым ингибитором - барстаром, который связывается с барназой с высокой аффинностью. Однако в клетках млекопитающих барстар отсутствует, что делает барназу способной беспрепятственно разрушать внутриклеточную РНК, приводя к гибели клетки. Данный фермент проявляет цитотоксическую активность уже в низких микромолярных и наномолярных концентрациях (IC_{50} - 0,2 до 13 мкМ для линий клеток карциномы человека) [161], что делает его перспективным агентом для таргетной терапии.

Был получен ряд препаратов нанотел, ферментативно конъюгированных с барназой. Оптимизация условий реакции показала, что наиболее высокий выход конъюгированного продукта составлял 28% от исходного количества нанотела. Полученный конъюгированный белок подвергался очистке при помощи метода металл-хелатной аффинной хроматографии (Рисунок 17). Избыток барназы оставался в растворе из-за отсутствия аффинной метки. Для оценки влияния чистой барназы на инфекцию она была использована в качестве контрольного образца параллельно с основными.

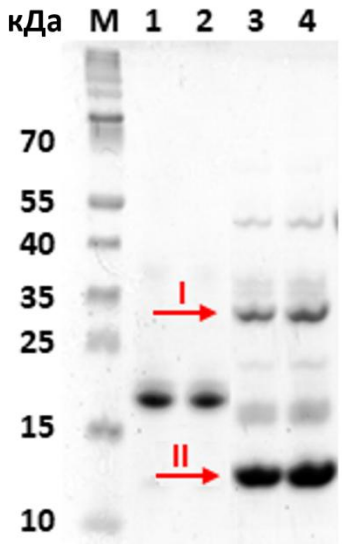

Рисунок 17. Электрофоретический анализ конъюгатов нанотела-барназы. Дорожки 1-2: неконъюгированные 1H3 и 2F8; 3: 1H3-барназа; 4: 2F8-барназа. I - Конъюгат нанотела с барназой. II – барназа.

Следующим кандидатом для тестирования в качестве цитотоксического агента стал монометилауристатин Е (ММАЕ). Это синтетическое производное доластатина 10, обладающее мощным ингибирующим действием на микротрубочки. ММАЕ связывается с β-тубулином, что нарушает процессы полимеризации и деполимеризации микротрубочек, необходимых для клеточного деления. В результате останавливается клеточный цикл на стадии G2/M, что приводит к активации апоптоза и последующей гибели клетки [162].

ММАЕ характеризуется высокой цитотоксичностью (CC_{50} = 1.44 нМ) [120], поэтому не может применяться в чистом виде, так как вызывает системное токсическое воздействие на организм. Он активно используется в антитело-препаратных конъюгатах, где соединяется с моноклональными антителами, что обеспечивает селективную доставку препарата в опухолевые клетки. Примеры таких препаратов включают брентуксимаб ведотин (Adcetris®) [163], направленный против CD30, и полатузумаб ведотин, нацеленный на CD79b [164]. Подобный подход позволяет поддерживать низкие концентрации препарата в организме, минимизируя побочные эффекты за счёт таргетного высвобождения цитотоксического агента в клетках-мишенях.

В рамках данного исследования была реализована альтернативная стратегия доставки ММАЕ, основанная на опосредованном механизме высвобождения, который активируется после связывания специфического нанотела с вирусной оболочкой. Такой метод позволяет избежать неспецифического воздействия на здоровые клетки, поскольку цитотоксический агент высвобождается только в инфицированных клетках, предотвращая распространение вируса.

Для получения функционального конъюгата ММАЕ был синтезирован с азидной группой на N-конце, а также соединён с широко применяемым расщепляемым линкером Val-Cit-PAB (Рисунок 18). Этот линкер содержит валино-цитруллиновую последовательность, распознаваемую катепсином В - лизосомальной протеазой, которая активируется после проникновения

конъюгата в клетку. После интернализации нанотела, связанного с вирусом, катепсин B расщепляет линкер, освобождая MMAE и запуская процесс апоптоза.

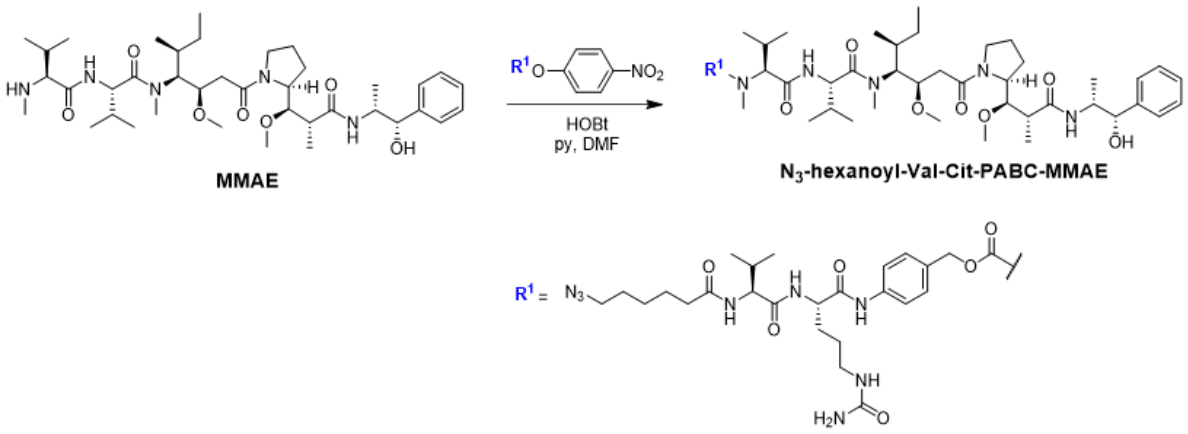

Рисунок 18. Синтез производного MMAE с расщепляемым линкером (N3-гексаноил-Val-Cit-PABC-MMAE).

В качестве третьего соединения было выбрано соединение ARVI11. Оно является производным 1,3-диаза-2-оксофеноксазина, структурного аналога цитозина с расширенной гетероциклической системой (Рисунок 19).

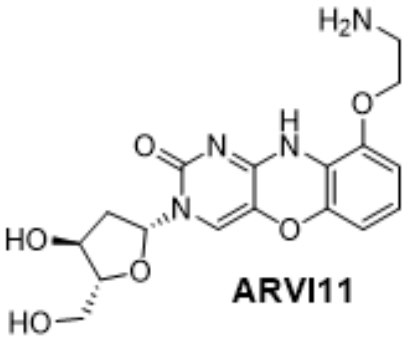

Рисунок 19. Химическая структура ARVI11.

Феноксазиновые нуклеозиды встраиваются в нуклеиновые кислоты, нарушая процессы репликации и транскрипции за счет взаимодействия с ДНК- и РНК-полимеразами. По данным исследований рассматриваемое соединение проявляет противовирусную активность против варицелла-зостер вируса (VZV) (EC_{50} = 2.23 мкМ), цитомегаловируса (CMV) (EC_{50} = 1.46 мкМ), клещевого энцефалита (TBEV) (EC50 = 12 мкМ) и вируса SARS-CoV-2 (EC_{50} = 1.12 ± 0.03

мкМ) [123, 165]. Как и в случае с MMAE высокая цитотоксичность ограничивает его потенциальное применение без дальнейшей модификации (CC_{50} = 1.81 ± 0.56 мкМ).

3.3.1.2. Оценка активности конъюгатов с полезной нагрузкой в клеточных тестах по нейтрализации

В рамках исследования были получены конструкции нанотел со всеми типами рассматриваемой полезной нагрузки для оценки влияния конъюгации на изменение противовирусной активности. Конъюгация с ARVI11 и барназой была проведена прямой сшивкой при помощи сортазы А. Присоединение MMAE было опосредовано функционализацией нанотела DBCO, после чего проводили конъюгацию методом клик-химии. Далее была проведена оценка активности всех полученных вариантов модифицированных молекул в клеточном тесте (Рисунок 20). Для эксперимента был выбран вариант B.1.1. 529 (Омикрон).

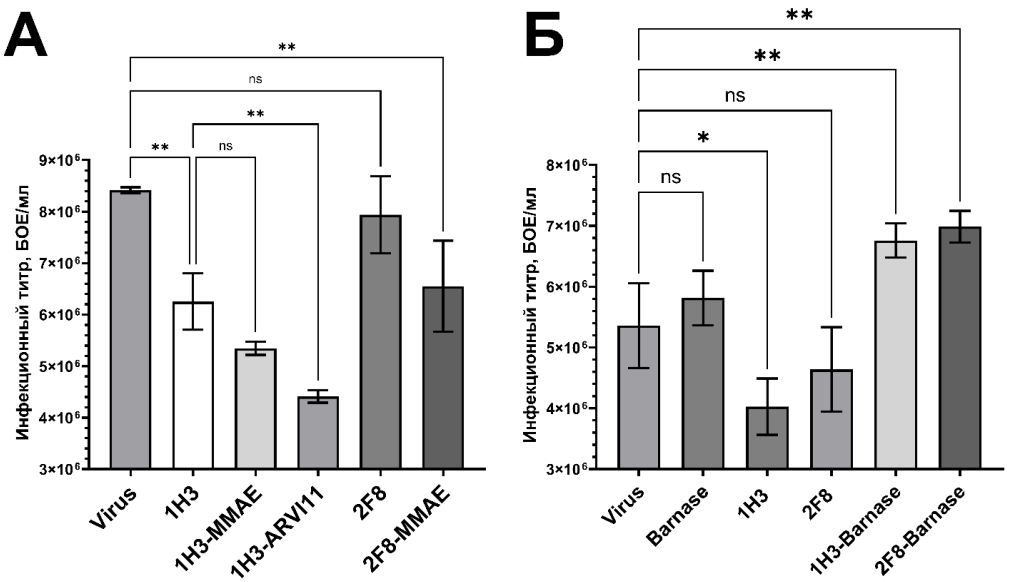

Рисунок 20. Результаты экспериментов по оценке влияния конъюгации нанотел на вирусный титр. А – Результаты при конъюгации нанотел с различными химическими молекулами. Б – Результаты при конъюгации нанотел с барназой.

Примечание: * - P < 0.05; ** - P < 0.01.

По результатам экспериментов с химически синтезированными молекулами не наблюдалось ослабления нейтрализующего эффекта. Конъюгация с MMAE не дала эффекта усиления нейтрализации в комплексе с нейтрализующим нанотелом 1H3, но позволила восстановить эффект нейтрализации в случае 2F8 (Рисунок 20A). Разница в эффективности может быть обусловлена низкой скоростью клеточного цикла, из-за чего эффект от конъюгации с цитотоксической химией ослабевает. Общее применение подхода по усилению нейтрализации вируса за счёт таргетного уничтожения клеток может быть продемонстрировано в экспериментах с клеточными линиями с высокими темпами клеточного цикла, однако, в условиях применения в организме, такая модификация, скорее всего, будет малоэффективна из-за того, что конечной целью воздействия терапевтической молекулы являются клетки лёгочного эпителия. Из-за низких темпов клеточного цикла вирус успеет реплицироваться и высвободиться раньше, чем будет вызван апоптоз за счёт использования цитотоксического агента.

В представленном этапе исследования мы рассматривали нанотела, конъюгированные с MMAE, для противовирусной терапии. В предыдущих работах, посвященных противовирусным конъюгатам нанотел против SARS-CoV-2 использовалось неспецифическое химическое связывание, нацеленное на лизин, которое, хотя и эффективно для мышей, может нарушить сродство нанотел, если конъюгация происходит вблизи сайта связывания антигена [166]. В представленном эксперименте был продемонстрировал метод сайт-специфического конъюгирования MMAE через расщепляемый линкер, что позволило получить более однородный и стабильный препарат, у которого сохранялась нейтрализующая активность нанотела.

Наиболее значимый результат наблюдался при конъюгации исходно нейтрализующего нанотела 1H3 с противовирусной нагрузкой ARVI11 (Рисунок 20A). Было обнаружено статистически значимое усиление нейтрализующего эффекта. Данный тип полезной нагрузки был выбран в качестве наиболее

перспективного направления для дальнейшего развития исследования. Было сделано предположение, что, как и в случае с MMAE, наиболее оптимальным может стать применение ферментативно расщепляемого линкера для усиления эффекта нейтрализации.

Необычный эффект также наблюдался при тестировании конъюгатов с барназой (Рисунок 20Б). В случае применения таких молекул наблюдалось статистически значимое усиление инфекции, учитывая, что при использовании отдельных нанотел или чистого препарата барназы, такого явления обнаружено не было. Возможно, при использовании в клеточном тесте такого конъюгата усиливается взаимодействие вируса с мембранами клеток за счёт неспецифического связывания или изменения поверхностного заряда вирусной частицы. По данным литературы, в МТТ-анализе было показано, что барназа проявляет избирательную цитотоксичность в отношении опухолевых клеток [161]. Высокий положительный заряд барназы (pI ≈ 9,2) [167], а также повышенное содержание отрицательно заряженных компонентов (фосфолипидов, гликопротеинов и гликолипидов) на поверхности опухолевых клеток [161] обуславливают возможность сильного электростатического взаимодействия. Таким образом, наблюдаемое усиление инфекции может быть связано с тем, что конъюгат нанотело–барназа функционирует как адаптер, обеспечивающий неспецифическое связывание вирусной частицы с клеточной мембраной.

3.3.1.3. Оценка влияния линкеров на конъюгацию и нейтрализующий эффект в клеточных тестах

Для оценки влияния линкера, используемого при конъюгации полезной нагрузки с нанотелом, соединение ARVI11 было синтезировано в трёх разных модификациях (Рисунок 21А): ARVI11 – исходная формула для конъюгации при помощи сортазы А; AR896 – замена CH2-CH2-NH2 на расщепляемый линкер Val-Cit-PAB с азидом для клик-химии; AR816 – ARVI11 с присоединённым к

аминогруппе -OOC-C5H10-N3. Изучение влияние линкера на нейтрализующую активность соединения должно позволить определить наиболее оптимальный путь конъюгации для создания такого рода комбинированных противовирусных агентов. Были получены конъюгаты нанотел со всеми типами полезной нагрузки и линкеров (Рисунок 21Б, В).

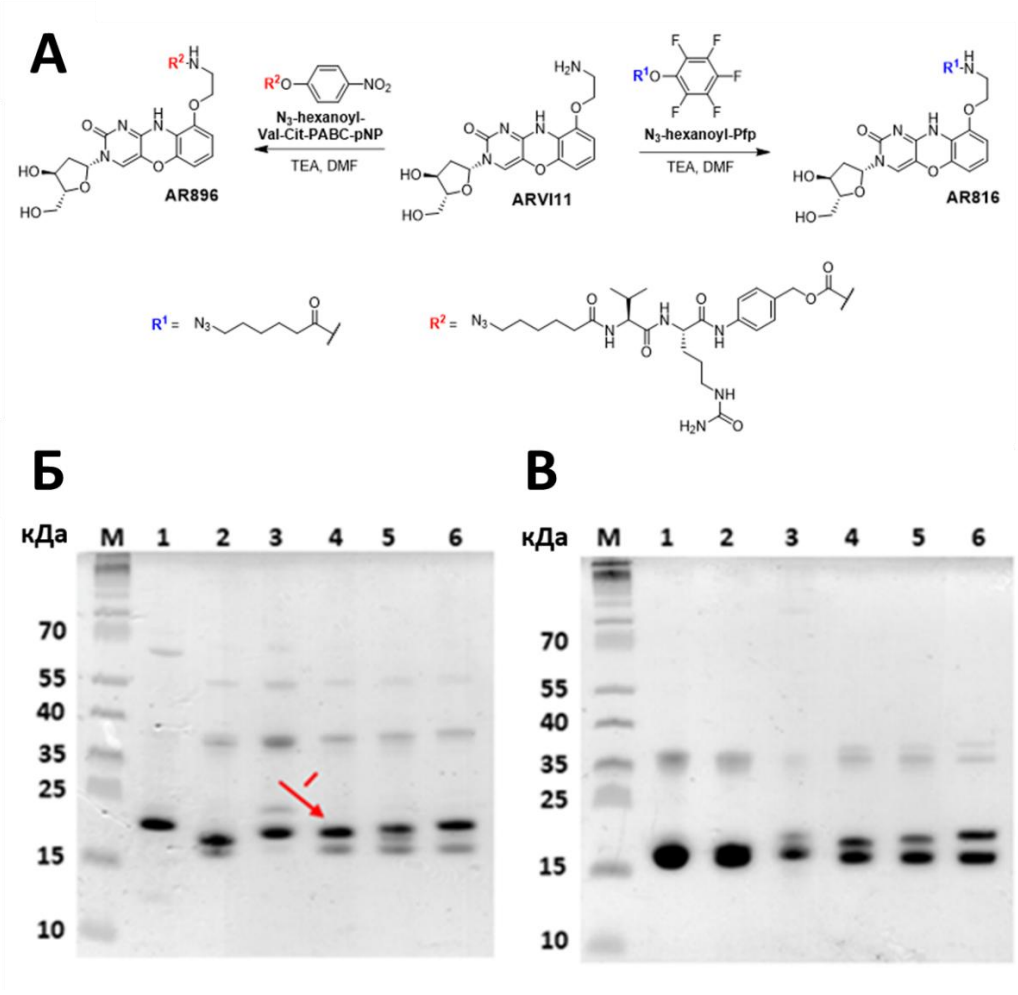

Рисунок 21. А- Синтез производных ARVI11 с нерасщепляемым (AR816) или расщепляемым (AR896) линкером. Б - Электрофоретический анализ конъюгатов нанотел 2F8. Дорожка 1: неконъюгированный 2F8; 2: 2F8-DBCO; 3: 2F8-ARVI11; 4: 2F8-AR816; 5: 2F8-AR896; 6: 2F8-MMAE. I - Отчетливое расщепление полос позволяет оценить эффективность реакции (конъюгат: верхняя полоса; непрореагировавшее нанотело: нижняя полоса). В - Электрофоретический анализ конъюгатов нанотел 1H3. Дорожки 1: неконъюгированный 1H3; 2: 1H3-DBCO; 3: 1H3-ARVI11; 4: 1H3-AR816; 5: 1H3-AR896; 6: 1H3-MMAE. M – маркер молекулярной массы.

Как показано на Рисунке (21Б - дорожки 4–6, 21В – дорожки 4-6), эффективность конъюгации, оцениваемая как соотношение между неконъюгированным и конъюгированным нанотелом, различалась в зависимости от образца. Результаты эффективности конъюгации для каждого образца представлены в Таблице 9.

Таблица 9. Оценка эффективности конъюгации нанотел.

Образец	**Эффективность конъюгации, %**
1H3-AR816	38
1H3-AR896	26
1H3-ARVI11	44
1H3-Барназа	26
1H3-MMAE	39
2F8-AR816	77
2F8-AR896	56
2F8-ARVI11	60
2F8-Барназа	28
2F8-MMAE	78

Конъюгация с использованием сортазы А обеспечивала наибольшее удобство контроля качества реакции и эффективность очистки, позволяя получить препарат, не содержащий остаточного нанотела и побочных продуктов. Однако этот метод требовал значительного избытка связующего агента. Вариант с использованием реакции клик-химии оказался более экономичным, но сопровождался потерей гистидиновой метки, что затрудняло количественное определение неконъюгированных нанотел в реакционной смеси.

Далее были проведены тесты по оценке изменения нейтрализующей противовирусной активности полученных конъюгатов (Рисунок 22). Тест проводили с использованием клеточной культуры GMB6138 и вариантом вируса

Омикрон. Вирусный титр определяли по количеству бляшек, образовавшихся в результате инфекции.

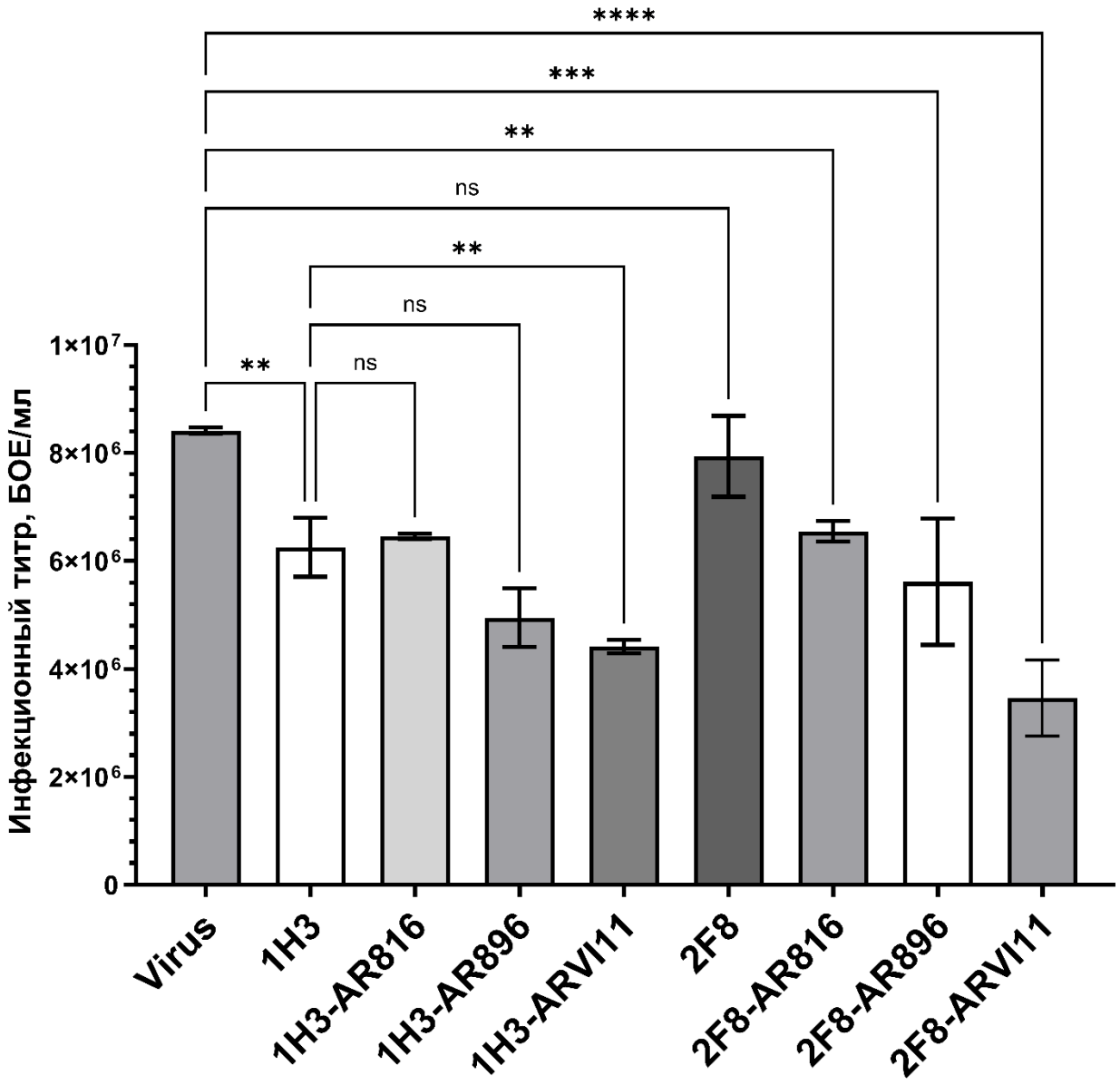

Рисунок 22. Оценка изменения вирусного титра при использовании конъюгатов нанотел с разными типами линкера.

Примечание: * - P < 0.05; ** - P < 0.01; *** - P < 0.001.

Эксперимент показал, что тип используемого линкера оказывает значительное влияние на биологическую активность конечного конъюгата. Среди всех протестированных конструкций наибольшую нейтрализующую активность проявил варианты, функционализированные ARVI11 через сортазу А.

Конъюгаты с AR896 также проявили значимые, но более низкие уровни эффективности, в то время как варианты на основе AR816 стабильно демонстрировали наименьшую активность. Для конструкции 1H3-AR816 противовирусное действие было сопоставимо с исходным, немодифицированным 1H3.

Учитывая схожую эффективность конъюгации у препаратов с AR896 и AR816, а также принимая во внимание, что теоретически активность 1H3/2F8-AR816 должна была быть близка к показателям 1H3/2F8-ARVI11, полученные результаты свидетельствуют о том, что использование расщепляемых линкеров, таких как Val-Cit-PAB, существенно повышает противовирусную активность феноксазин-содержащих антитело-лекарственных конъюгатов. Важным этапом, определяющим эффективность используемого конъюгата, является его очистка от побочных продуктов и непрореагировавших белков.

Учитывая уникальные структурные и функциональные свойства, нанотела активно изучаются в качестве инструментов для лечения вирусных и онкологических заболеваний [126, 168, 169]. Большинство ADC на основе нанотел или так называемых конъюгатов фрагмента антитела с лекарственным средством (FDC) разрабатываются для онкологии, часто включающих расщепляемые линкеры для внутриклеточного высвобождения препарата [170]. Аналогичные подходы используются для полноразмерных конъюгатов антитела с лекарственным средством, где расщепляемые линкеры помогают смягчить системную токсичность, обеспечивая целенаправленное высвобождение полезной нагрузки [171, 172].

Конъюгация нанотел с блокирующим проникновение в клетку противовирусным пептидом также была предложена для одновременного блокирования S-белка и рецептора ACE2 [173]. Противовирусные ADC/FDC также были протестированы против вируса гриппа, где занамивир, ингибитор нейраминидазы, был слит либо с антителом против HN, либо с VHH против каппа-цепи, сочетая ингибирование вирусного фермента с иммунной активацией

[174, 175]. Наиболее обширные исследования были проведены по анти-ВИЧ ADC [176-178]. Данные, полученные в ходе тестирования молекул, функционализированных ARVI11, также подтверждают применимость подхода конъюгации нанотел в области усиления противовирусного эффекта. Важным фактором, непосредственно влияющими на результат, является не только сама функциональная молекула и чистота препарата, но и тип линкера, образующего связь. .

Понимание того, как конъюгация нанотел с различными эффекторными молекулами влияет на активность, имеет важное значение для рационального проектирования FDC следующего поколения. Было продемонстрировано, что связывание аналога нуклеозида с двойной противовирусной и цитотоксической активностью с нанотелами через расщепляемый линкер может существенно дополнить присущую нейтрализующую активность. Дальнейшая оптимизация условий реакции и методов очистки может повысить противовирусную эффективность таких конъюгатов. Наши результаты предоставляют доказательство концепции для будущей разработки противовирусных FDC с использованием полезных нагрузок на основе нуклеозидов с цитотоксическими и противовирусными свойствами.

3.3.2. Мультимеризация

Вторым исследованным подходом по модификации структуры нанотел стало получение их мультимерных форм. Для увеличения молекулярной массы нанотел и усиления авидности к целевому белку, был оценен подход, основанный на тетрамеризации - объединение четырёх нанотел в составе одной молекулы, что потенциально способствует более прочному и стабильному связыванию с мишенью за счёт многовалентного взаимодействия.

Ключевыми преимуществами тетрамеризации являются, с одной стороны, относительная простота проведения, а с другой - возможность сохранения относительно компактных размеров получаемой конструкции (≈74 кДа в случае

тетрамеризации на ПЭГ). Последний аспект особенно важен, поскольку небольшой размер нанотел по-прежнему обеспечивает им определённые фармакокинетические и фармакодинамические преимущества, включая улучшенную тканепроникающую способность.

В рамках дальнейших исследований нами были выбраны два подхода получения тетрамеров: с использованием разветвленного полиэтиленгликоля (ПЭГ) в качестве ядра и посредством применения стрептавидина, обладающего естественной способностью к образованию тетрамерных комплексов.

3.3.2.1. Тетрамер на основе ПЭГ

Тетрамеризация нанотел на ядре из разветвленного ПЭГ ранее применялась и продемонстрировала свою эффективность для получения мультимерных конструкций антител [159, 179, 180]. В данной работе была использована схема конъюгации четырех молекул нанотела с центральным звеном на основе разветвленного ПЭГ, содержащего четыре свободных азидных группы (Рисунок 23). Для реализации данной стратегии потребовалось получить мономерные конструкции нанотел, меченные дибензоциклооктинамином (DBCO) на С-конце, что затем позволило осуществить реакцию безмедного азид-алкинового циклоприсоединения (SPAAC). Для этого были использованы белковые препараты нанотел, содержащие специфический LPETG-мотив на С-конце, который служил мишенью для ферментативной функционализации с участием сортазы А.

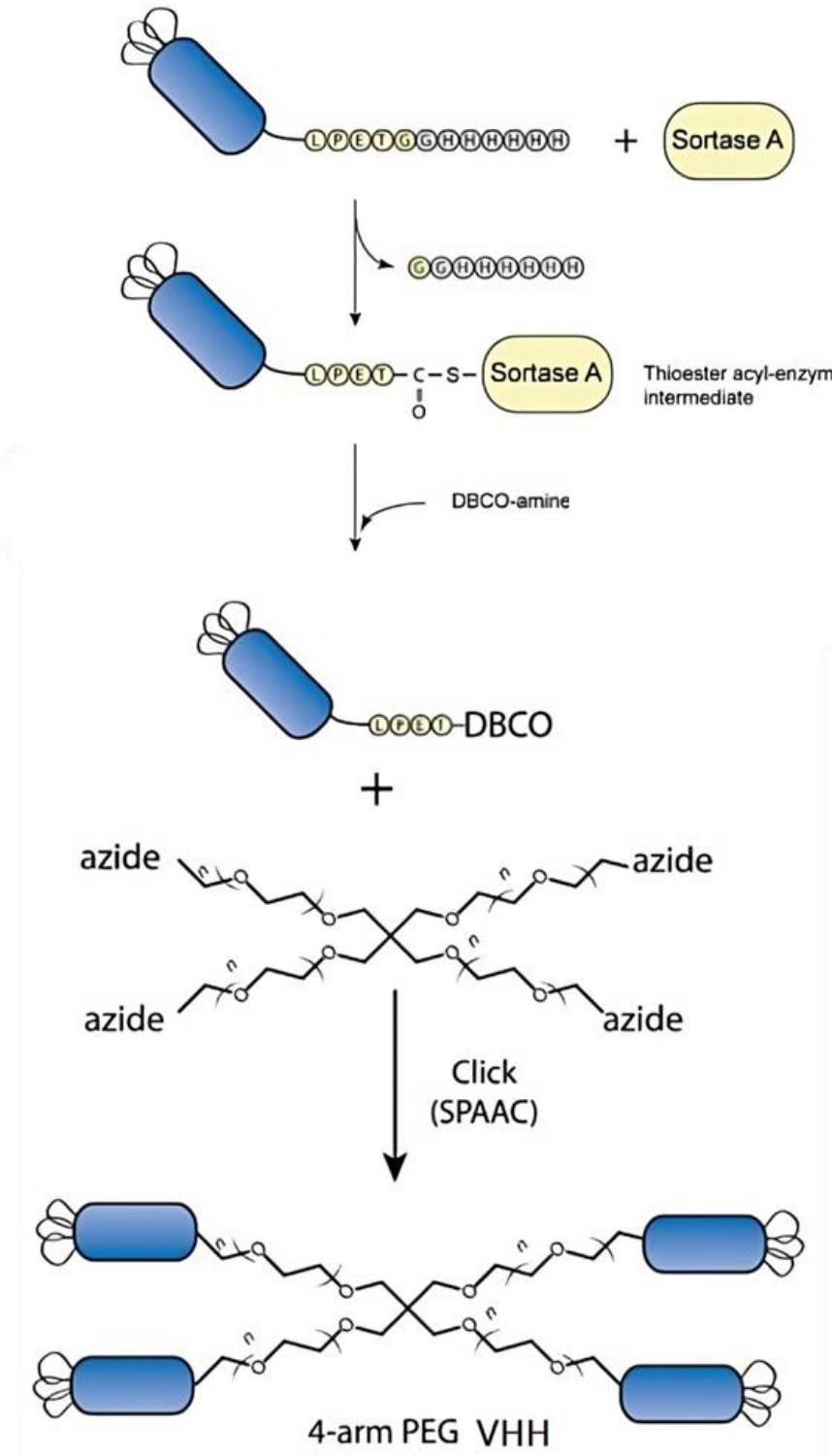

Рисунок 23. Общая схема синтеза тетрамерного комплекса нанотел на основе ПЭГ [159].

Тетрамеризацию проводили путем реакции SPAAC. В результате происходило значительное увеличение молекулярной массы полученного белка, что в теории должно приводить к замедлению почечного клиренса и, следовательно, увеличению времени циркуляции в организме. Кроме того, при

использовании мультивалентной структуры усиливается авидность за счёт присутствия четырёх молекул нанотел одновременно, что способствовало повышению сродства к S-белку. Был проведён мониторинг реакции на разных этапах, а также оценено влияние концентрации ПЭГ-азида в реакционной смеси на эффективность формирования тетрамерного комплекса (Рисунок 24).

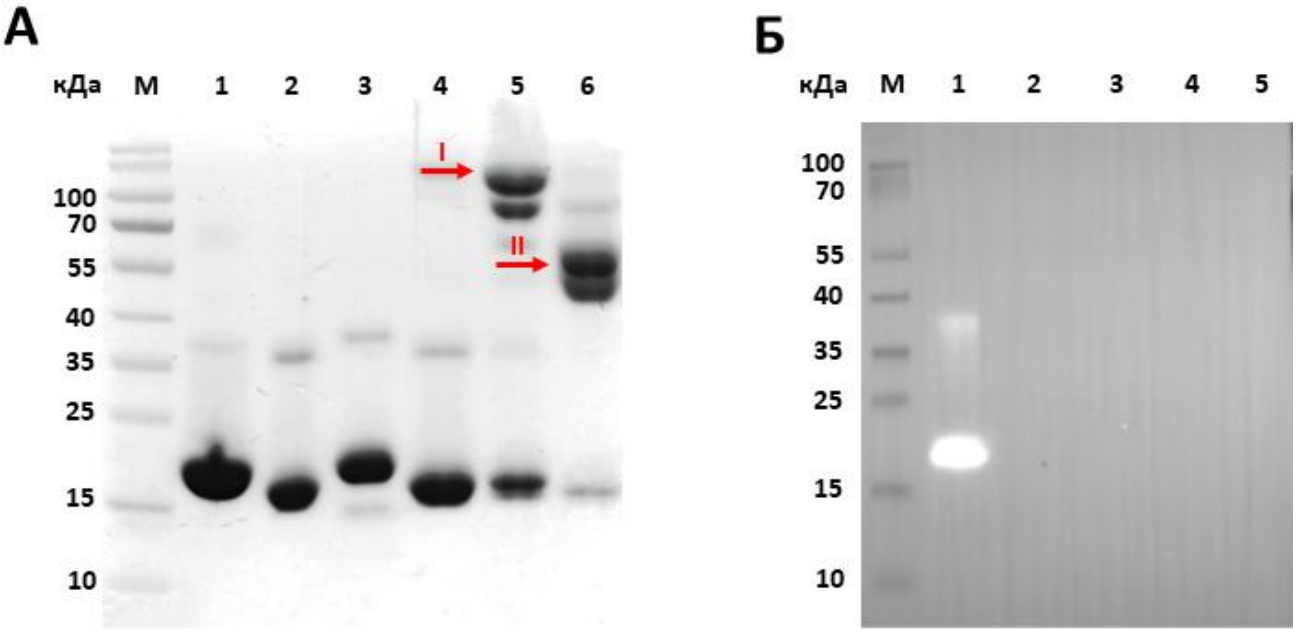

Рисунок 24. Оценка протекания реакции тетрамеризации при помощи вертикального электрофореза в ПААГ и вестерн блота. А – Электрофорез белков в ПААГ. 1 – нанотело 1H3 в нативной мономерной конструкции. 2 – нанотело 1H3, функционализированное DBCO. 3 – сортаза А. 4-6 реакционные смеси с нанотелом 1H3 при разной концентрации ПЭГ (0.1x, 1x, 10x соответственно. I – тетрамерная форма нанотела. II – тримерная форма нанотела. Б – Вестерн блот соединений с окрашиванием анти-His-tag-HRP антителом для контроля качества реакции. 1 – нанотело 1H3 в нативной мономерной конструкции. 2 – нанотело 1H3, функционализированное DBCO. 3-5 реакционные смеси с нанотелом 1H3 при разной концентрации ПЭГ (0.1x, 1x, 10x соответственно).

Как видно из Рисунка 24А, при недостатке ПЭГ-азида практически не происходит формирования мультивалентных комплексов, а при использовании сверхстехиометрического количества – не хватает мономерных молекул

меченного нанотела, в результате чего продуктом реакции является смесь ди- и тримерных структур. По результатам вестерн-блота (Рисунок 24Б) можно наблюдать, что, в результате функционализации нанотела DBCO, оно утрачивает гексагистидиновую метку, что затрудняет дальнейший контроль эффективности протекания реакции и процесс очистки.

Получив тетрамерные конструкции нанотел 1H3 и 2F8 было оценено изменение эффективности их связывания с целевым белком. На сенсор иммобилизовали биотинилированный шиповидный белок, а затем осуществляли связывание с различными вариантами модифицированных нанотел. В результате были получены графики взаимодействия и диссоциации белковых комплексов (Рисунок 25), а также числовые значения константы диссоциации (Таблица 10).

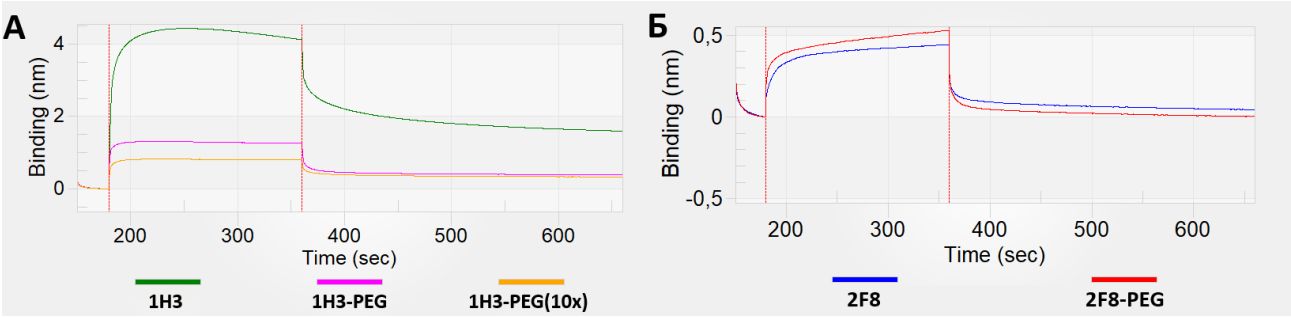

Рисунок 25. Графики диссоциации при исследовании мономера 1H3 и мультимерных комплексов на его основе. А – исследование молекул на основе 1H3. Б – исследование молекул на основе 2F8.

Таблица 10. Константы диссоциации мономерных нанотел и мультимерных комплексов на их основе.

Образец	Концентрация, нМ	K_d, М
1H3	475000	1.021×10^{-9}
1H3-PEG	20510	0.497×10^{-10}
1H3-PEG (10×)	26230	0.563×10^{-10}
2F8	81250	1.907×10^{-9}
2F8-PEG	10810	2.708×10^{-10}

В результате измерения константы диссоциации было обнаружено усиление связывания для тетрамерных комплексов (Таблица 10). Было зафиксировано усиление связывания в 20,5 раз в случае комплекса на основе 1H3 и в 7 раз – для 2F8. Полученные результаты позволяют рассматривать такой метод модификации в качестве перспективного в области улучшения функциональных свойств конструкций на основе нанотел. Для достоверного подтверждения эффективности подхода мультимеризации для усиления противовирусного эффекта было принято решение провести серию клеточных тестов по нейтрализации вируса.

Мы провели серию клеточных тестов с живым вирусом варианта Омикрон. В ходе исследования оценивалось количество бляшек, образующихся на лунках в результате воздействия вируса, по изменению их количества определялось изменение вирусного титра относительно контрольного образца при использовании различных модифицированных вариантов (Рисунок 26). Концентрация мономерных вариантов на лунках – 3,24 нМ, 1D10-Fc – 1,8 нМ, 1H3-PEG – 1,12 нМ, 2F8-PEG – 0,74 нМ.

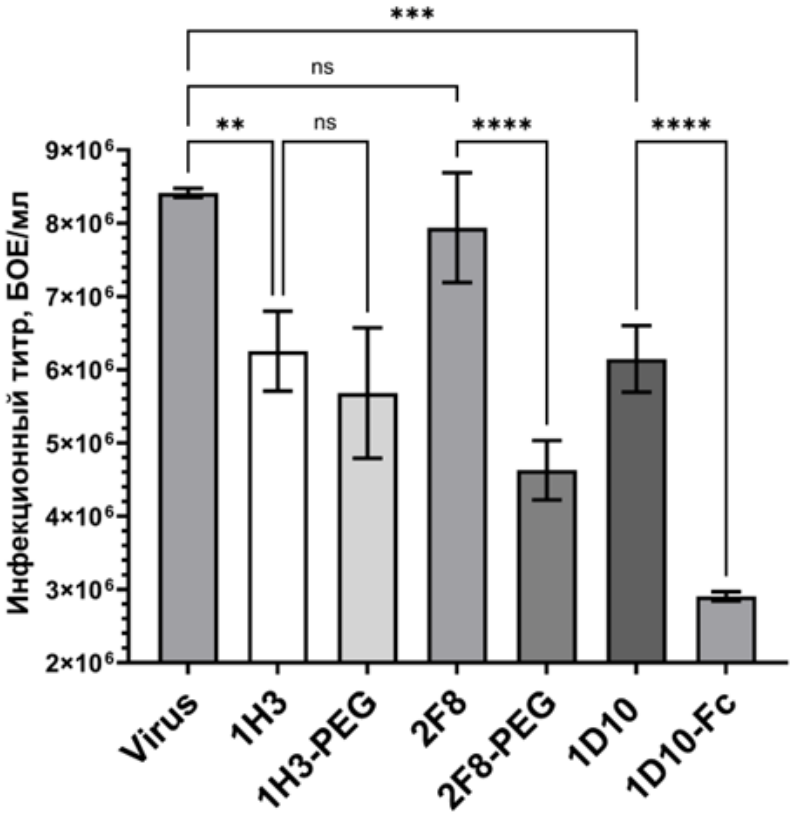

Рисунок 26. Результаты клеточных тестов по оценке изменения уровня нейтрализации при использовании мультивалентных конструкций с положительным контролем в виде тяжелоцепочечного варианта 1D10.

Примечание: * - P < 0.05; ** - P < 0.01; *** - P < 0.001; **** - P < 0.0001.

По результатам проведённого эксперимента не наблюдалось снижения нейтрализующей активности ни для одного из тестируемых препаратов. Мономерное нанотело 2F8 не проявляло нейтрализующей активности в отношении варианта Омикрон. Однако его тетрамеризованный вариант обеспечивал статистически значимое повышение уровня нейтрализации (Рисунок 26). Следует отметить, что используемая молярная концентрация тетрамерной формы была ниже по сравнению с мономерной, что свидетельствует о повышенной функциональной авидности комплекса. Вероятно, усиление эффекта обусловлено более эффективным пространственным взаимодействием с S-белком или стабилизацией его конформационного состояния.

Мономерное нанотело 1H3, напротив, уже обладало выраженной нейтрализующей активностью. Тетрамерная конструкция на его основе сохраняла данный эффект, однако не приводила к его значимому усилению (Рисунок 26). Это может указывать на достижение близкого к максимальному уровня нейтрализации в мономерном формате, при котором дальнейшее увеличение валентности не даёт дополнительного эффекта. Кроме того, ограничивающим фактором могут выступать особенности эпитопа и стерические ограничения, препятствующие одновременному эффективному взаимодействию нескольких доменов в составе комплекса.

Для нанотела 1D10 были исследованы мономерный и Fc-слитый (1D10-Fc) форматы. Последний представляет собой димерную (бивалентную) конструкцию за счёт Fc-домен-опосредованной димеризации. Оба варианта демонстрировали статистически значимую нейтрализующую активность, при этом для формата 1D10-Fc наблюдалось её достоверное усиление по сравнению с мономером (Рисунок 26).

В совокупности полученные результаты указывают на то, что конструирование поливалентных форм нанотел может являться эффективным подходом для повышения их функциональной активности. Однако степень этого эффекта определяется свойствами исходной молекулы, включая её аффинность и механизм нейтрализации. В частности, для высокоаффинного, но исходно ненейтрализующего нанотела (2F8) мультивалентность может приводить к появлению нейтрализующей активности, тогда как для уже эффективных нейтрализаторов (1H3) данный подход не обеспечивает дополнительного усиления. Существенную роль также могут играть пространственные факторы, включая ориентацию связывания, архитектуру CDR и длину линкеров.

Отдельно следует отметить значимость этапов экспрессии и очистки препаратов. Среди протестированных конструкций наибольшей стабильностью и однородностью обладал препарат 1D10-Fc, для которого также наблюдалось наиболее выраженное усиление нейтрализующей активности. Полученные

данные обосновывают целесообразность дальнейшего исследования данных конструкций в экспериментах in vivo.

3.3.2.2. Тестирование мультимерных молекул на животных моделях

Исследования на животных моделях являются важной частью проводимого исследования и позволяют изучить влияние нанотел на распространение инфекции в условиях, приближенных к человеческому организму. В нашей работе использовалась модель инфекции SARS-CoV-2 у сирийских хомяков путем однократного интраназального введения препарата вируса. Проводилась оценка успешности инфицирования, а также протективных свойств препаратов антител путем регистрации динамики изменения массы тела.

В первом опыте использовалось два варианта нанотел для примерной оценки терапевтического эффекта: тетрамерный комплекс на основе 1H3 и эффективно показавший себя в тестах на нейтрализацию мономерный вариант 1D10. Животных наблюдали ежедневно, отмечались любые отклонения в общем состоянии у каждого животного. Массу тела животных измеряли ежедневно. Данные изменения массы тела относительно исходной в день заражения (день 0) представлены на Рисунке 27.

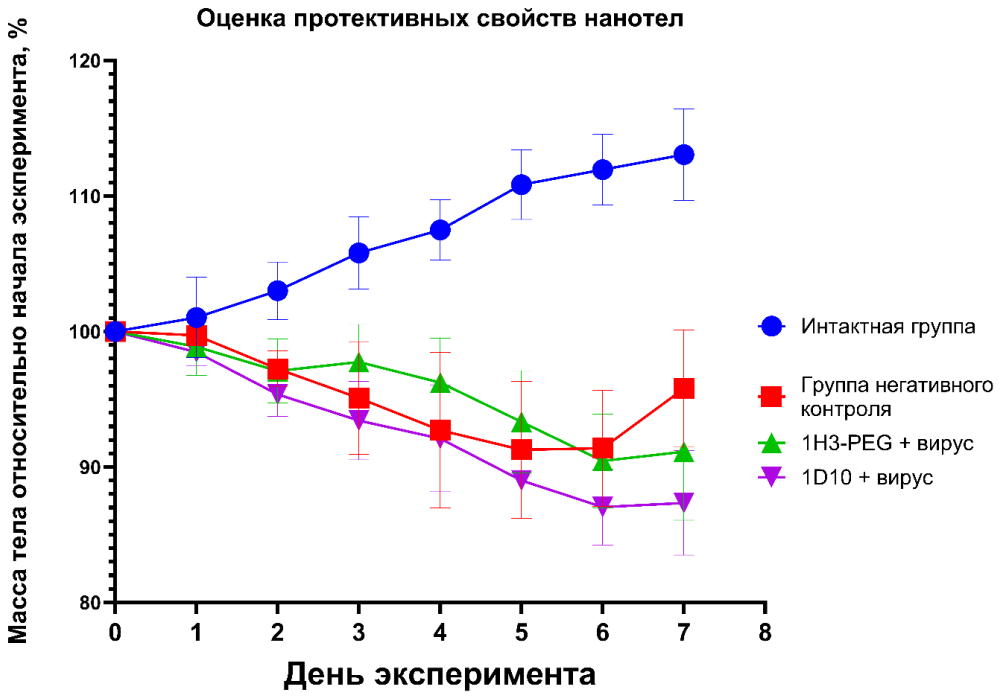

Рисунок 27. График изменения относительной массы тела у исследуемых животных после инфекции и иммунизации.

В интактной группе хомяков наблюдался ежедневный прирост массы тела, свидетельствующий об их благополучном состоянии. В группе негативного контроля отмечались общее угнетение и снижение массы тела животных; в последние два дня наблюдения был зафиксирован небольшой прирост массы. Динамика изменения массы тела в экспериментальных группах в целом соответствовала группе негативного контроля и также характеризовалась ежедневным снижением массы тела.

У интактных хомяков на протяжении всего наблюдения не было отмечено симптомов интоксикации. При осмотре в клетке - активность и реакция на раздражители была стандартная, без признаков угнетения или возбуждения, отношение к другим животным без признаков агрессии. Тонус мышц был умеренный у интактных животных. Шерсть блестящая, опрятного вида, без очагов облысения. Кожные покровы и видимые слизистые поверхности не имели признаков раздражения и воспаления, петехий, экхимоз и гематом не зарегистрировано. Целостность покровов и оболочек не была нарушена,

видимые слизистые поверхности были блестящие. Деформации или отека конечностей не отмечено. Экзофтальма, нарушения целостности, слезотечения, патологических выделений из глаз не отмечали. Нос у всех животных был умеренно влажный, без патологических выделений. Нарушений слюноотделения не наблюдали. Двигательная активность у интактных животных находилась в пределах нормы. Нарушений походки и координации не отмечено. У всех животных отмечали нормальное дыхание. Патологических выделений при уринации и дефекации не регистрировали.

У контрольных хомяков на 2-5 сутки после заражения отмечались симптомы интоксикации; при осмотре в клетке – активность и реакция на раздражители умеренно угнетена. На 6-7 сутки состояние контрольных животных улучшилось, и показатели возвращались к норме по мере набора веса.

У хомяков экспериментальных групп на 2-5 сутки после заражения отмечались симптомы интоксикации; взъерошенность шерсти, активность и реакция на раздражители умеренно угнетена, у некоторых животных повышена частота дыхания. На 6-7 сутки состояние улучшилось, но снижение активности и угнетённость наблюдались до окончания эксперимента. Гибель животных не была зарегистрирована ни в одной из групп.

В результате проведения эксперимента не было получено данных, подтверждающих протективные свойства нанотел в рамках эксперимента в живой системе. При использовании разных форматов нанотел сохранялось общее угнетение состояния исследуемых животных. Кроме того, к 7 дню эксперимента у контрольной группы наблюдалось улучшение состояния, относительно животных в экспериментальной группе.

В повторном эксперименте была расширена панель исследуемых и контрольных образцов. В качестве исследуемых молекул был использован мономерный формат нанотела 1H3 и его тетрамерный комплекс на основе ПЭГ. Кроме того, было исследовано нанотело 2F12 ($Kd = 1.01\times10^{-9}$) в

тяжелоцепочечном формате (2F12-Fc), препаративно наработанное коллегами из ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН. Заражение, иммунизация и мониторинг данных по изменению массы тела животных (Рисунок 28) осуществлялись в соответствии с ранее проведённым экспериментом.

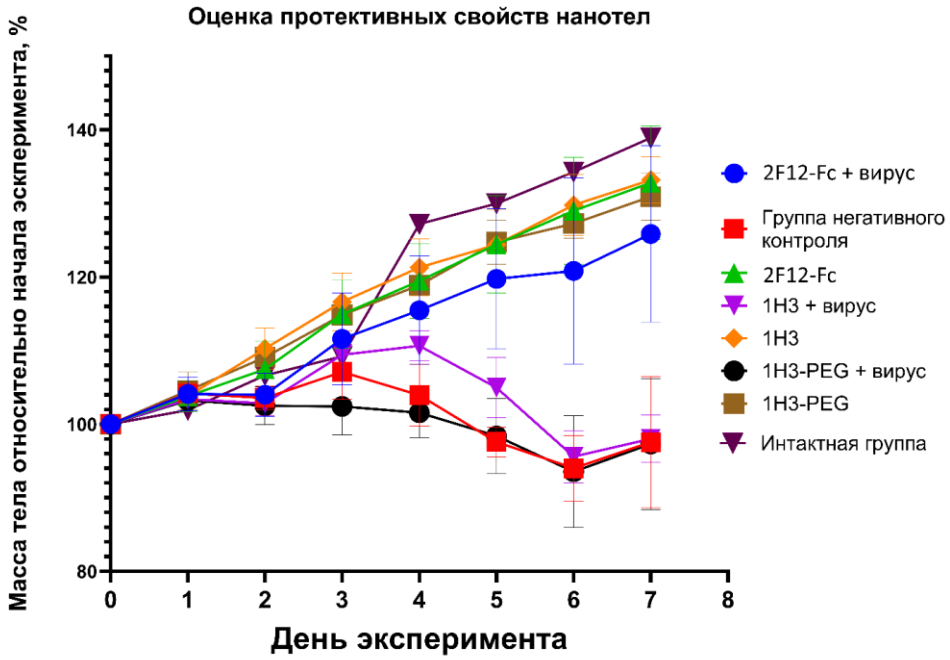

Рисунок 28. График изменения относительной массы тела у контрольных и исследуемых животных после инфекции и иммунизации.

По результатам проведённого эксперимента положительный результат в рамках исследования протективных свойств in vivo у нанотел наблюдался только в отношении тяжелоцепочечного формата нанотела 2F12. У экспериментальных животных наблюдалось сохранение общего позитивного состояния, динамика протекания болезни практически полностью соответствовала интактной группе.

Введение белковых препаратов без инфицирования также не оказало негативного влияния на общее состояние животных. При иммунизации нанотелами на основе 1H3 у инфицированных животных не наблюдалось четкого изменения протекания болезни. При использовании мономерного варианта 1H3 до четвертого дня сохранялось общее позитивное состояние, но затем темпы развития болезни соответствовали группе отрицательного контроля. В случае же

тетрамерного комплекса, используемого в данном эксперименте, ключевой проблемой является стабильность комплекса при его препаративной наработке.

Результаты для мономерного варианта исследуемого нанотела можно объяснить коротким периодом полувыведения из организма, что обусловлено его малыми размерами. Для улучшения его протективной способности необходимо либо поддерживать его концентрацию в организме постоянными дополнительными инъекциями, либо рассмотреть альтернативные способы его введения. Одним из таких решений может стать ингаляционное введение нанотел, активно рассматриваемое в литературе. При таком пути введения поддерживается высокая концентрация нанотел в клетках эпителия дыхательных путей, являющихся основной целью вируса при инфекции SARS-CoV-2.

Реализация двукратного введения экспериментальным животным требует получения препаративных количеств модифицированного нанотела, что связано с высокой ресурсоёмкостью процессов функционализации и очистки. Многостадийный характер получения тетрамерных конструкций сопровождается неизбежными потерями продукта на отдельных этапах, что ограничивает выход целевого соединения. В связи с этим эффективность применения данного подхода в экспериментах in vivo в значительной степени ограничивается степенью оптимизации и воспроизводимости процессов синтеза и очистки поливалентных форм нанотел.

Наиболее эффективной конструкцией в in vivo эксперименте стал тяжелоцепочечный формат нанотела. Такой конструкт обладает одновременно двумя эпитопами связывания и стабильной структурой, что благоприятно сказывается на связывании с мишенью. А увеличенный размер молекулы способствует пролонгированной циркуляции в организме исследуемого животного. Совершенствование процедур производства нанотел и конструкций на их основе может способствовать повышению доступности препарата в необходимых количествах и расширению возможностей его применения в доклинических исследованиях.

3.3.2.3. Тетрамер на основе стрептавидина

В ходе исследования также был испытан способ тетрамеризации нанотел с использованием стрептавидина. Такой подход считается перспективным и применяется для создания мультимерных белковых комплексов с повышенной авидностью. Метод основан на предварительном биотинилировании нанотел посредством введения в последовательность специфического биотин-акцепторного домена, после чего биотинилированные молекулы связываются с тетрамерной формой стрептавидина (Рисунок 29) [160, 181, 182]. За счёт высокой прочности взаимодействия между стрептавидином и биотином [181] формируется стабильный белковый комплекс (стрептаводи), в составе которого одновременно присутствуют четыре нанотела. Такая организация может позволить значительно повысить эффективность связывания с мишенью по сравнению с мономерными формами нанотел [182]. Одним из ключевых достоинств данного подхода является относительная технологическая простота его реализации [182]. Более того, использование коммерчески доступного стрептавидина обеспечивает воспроизводимость и масштабируемость процесса.

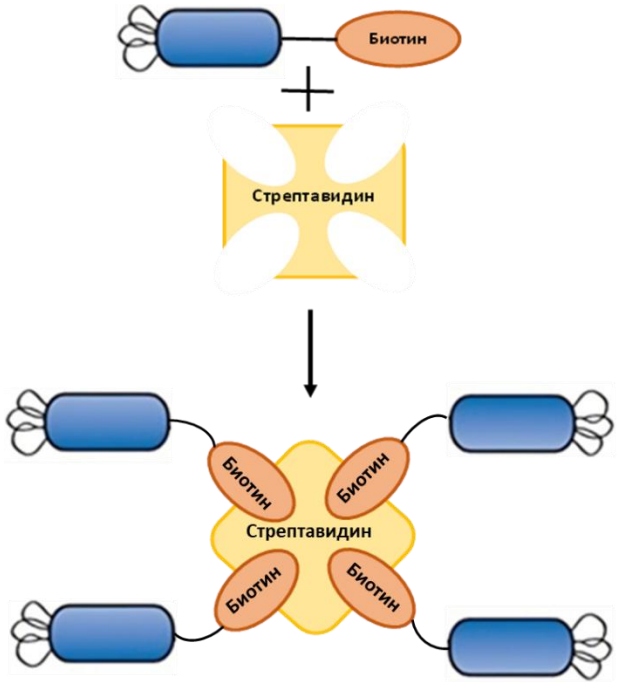

Рисунок 29. Общая схема получения тетрамерного комплекса нанотел на основе стрептавидина.

Помимо преимуществ, применение стрептавидин-зависимой тетрамеризации имеет ограничения, связанные с потенциальной иммуногенностью стрептавидина при использовании in vivo. По этой причине данный подход не был использован для создания тетрамеров нанотел, направленных против SARS-CoV-2, так как в условиях вирусной инфекции иммунный ответ может существенно повлиять на интерпретацию результатов. Кроме того, молекулы биотина, встречающиеся в кровотоке, могут вытеснять нанотела из состава комплекса, что негативно сказывается на его стабильность и итоговую эффективность. В качестве альтернативного подхода оценка эффективности стрептаводи была проведена в модели с нанотелом, нацеленным на другую мишень - CD47 - белок, играющий ключевую роль в иммунной регуляции опухолей. Для минимизации влияния иммунного ответа из-за риска формирования антител против стрептавидина эксперименты были выполнены на иммунодефицитных мышах линии Balb/c nude, что позволило адекватно исследовать функциональные характеристики стрептаводи.

3.3.2.3.1. Получение тетрамера к CD47 на основе стрептавидина

Из ранее полученной панели нанотел к CD47 наибольшую активность продемонстрировал вариант 47VHH1H4, обладавший высокой специфичностью и наномолярным сродством к мишени, что было подтверждено с помощью ИФА и анализа методом поверхностного плазмонного резонанса ($K_d \approx 30$ нМ). Этот клон показал лучшую эффективность блокирования взаимодействия CD47 с его естественным лигандом SIRPα по сравнению с референсным блокирующим моноклональным антителом B6H12.2, что делает его перспективным кандидатом для дальнейшего терапевтического использования.

Для усиления связывающей способности и функциональной активности нанотела 47VHH1H4, были получены тетрамеры использованием стрептавидина. В экспрессионную конструкцию вместе с последовательностью, кодирующей нанотело, была введена последовательность биотин-акцепторного домена, что позволило получить биотинилированную форму нанотела

(47VHH1H4B). Далее, путём инкубации 47VHH1H4B со стрептавидином формировался тетрамерный комплекс - стрепто-47VHH1H4B. Такой формат способствует усилению авидности (Рисунок 30) за счёт наличия четырёх связывающих эпитопов. снижением IC_{50} в ИФА

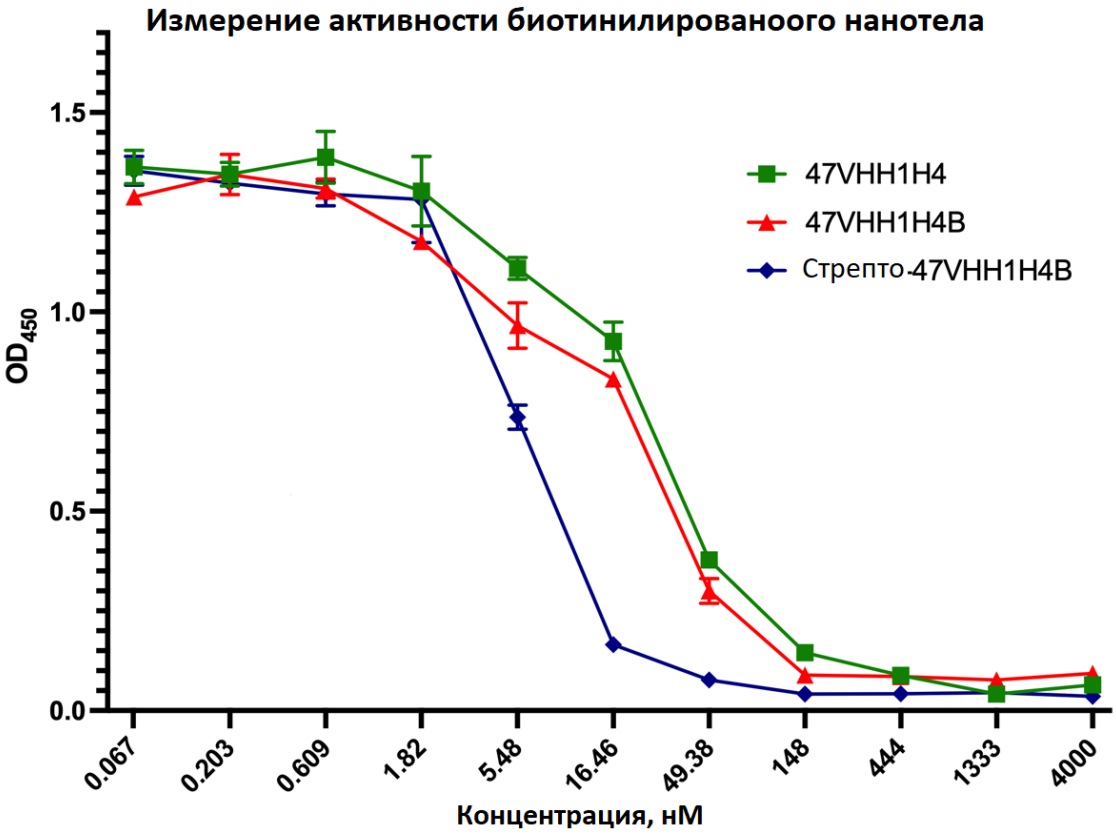

Рисунок 30. Результаты конкурентного ИФА [183]. IC_{50}: 47VHH1H4 = 23,89 (20,64–27,15), 47VHH1H4B = 18,26 (14,76–21,76), стрепто-47VHH1H4B = 5,901 (5,541–6,261)

Для оценки функциональной активности был выполнен конкурентный ИФА с определением IC_{50}. Установлено, что тетрамерный комплекс характеризуется более чем четырёхкратным снижением IC_{50} по сравнению с мономерной формой (Рисунок 30), что свидетельствует о повышении эффективности взаимодействия с целевым рецептором. Полученные результаты согласуются с данными, ранее полученными для тетрамерных PEG-содержащих конструкций, для которых наблюдалось усиление связывания в диапазоне от 2 до 7 раз. Общие результаты показывают, что увеличение валентности молекулы за

счёт мультивалентной архитектуры приводит к повышению функциональной авидности.

Функциональные свойства тетрамера были подтверждены в эксперименте in vivo по подавлению опухолевого роста. Препараты, блокирующие CD47, могут вызывать апоптоз опухолевых клеток с высокой экспрессией этого белка, что делает их перспективными для торможения роста опухоли в модельных системах с ксенотрансплантатами. Чтобы оценить эффективность нанотела 47VHH1H4 в этом контексте, мышей линии Balb/c nude, несущих опухоли, разделили на группы и лечили внутривенными инъекциями: коммерческим анти-CD47 антителом B6H12.2, или стрепто-47VHH1H4B. В качестве контроля использовали моноклональное антитело против белков оболочки бактериофага M13. Ранее проведённые эксперименты на модельных животных (раздел 4.3.2.2.) показали неэффективность применения мономерной формы нанотела в живом организме, что, вероятнее всего, объясняется его коротким периодом полувыведения из организма. Поэтому в данном эксперименте акцент был сделан именно на исследовании свойств стрептавидинового тетрамерного комплекса.

Начиная с 8-го дня, у мышей, получавших стрепто-47VHH1H4B, началось уменьшение объема опухоли по сравнению с контролем, а к 14-му дню различие стало статистически значимым (Рисунок 31). В группе B6H12.2 снижение опухолевого роста стало заметным с 17-го дня. К завершению эксперимента (22-й день) медианный объём опухоли в обеих экспериментальных группах был в три раза меньше, чем у контрольных животных.

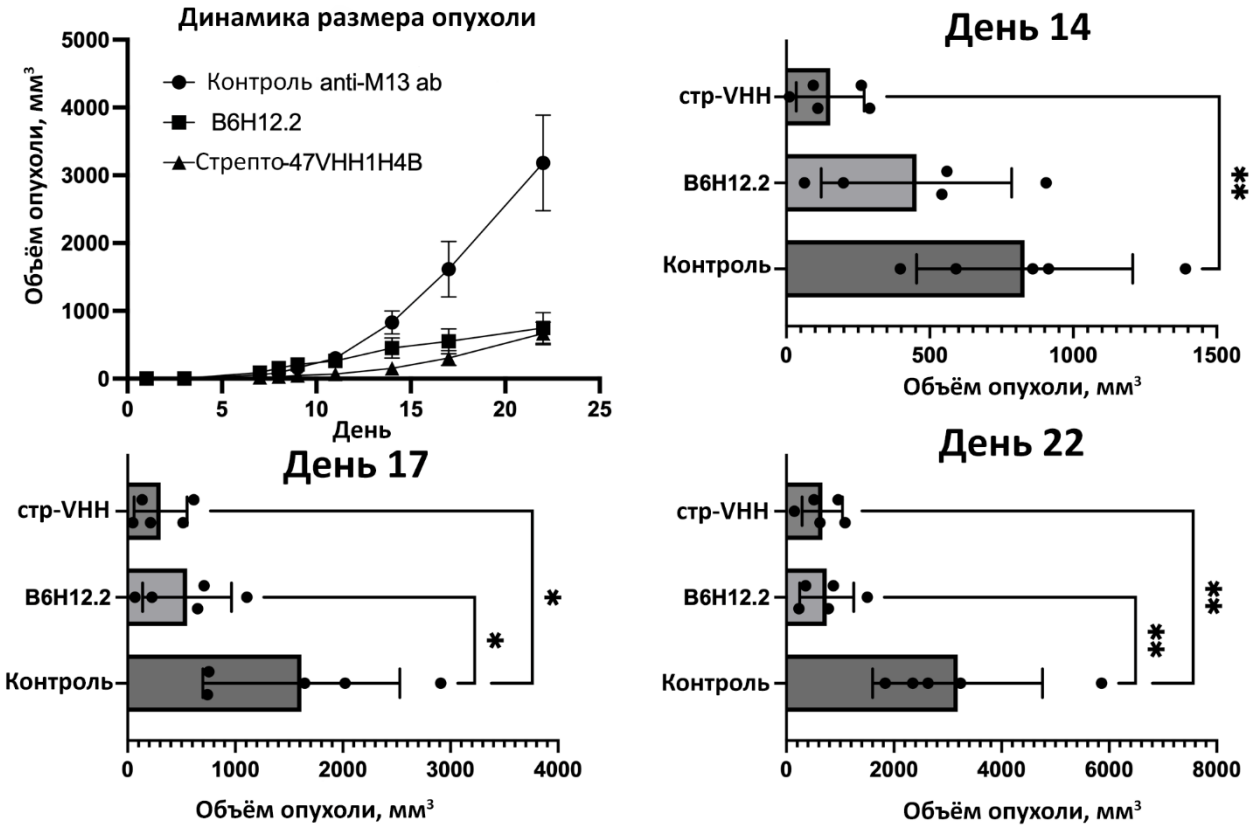

Рисунок 31. Динамика роста ксенотрансплантата опухоли U937 у мышей Balb/c nude, получавших лечение B6H12.2, стрепто-47VHH1H4B или контрольным антителом против M13, *— P < 0,033, **— P < 0,0021 [183].

Эксперименты in vivo показали, что стрепто-47VHH1H4B по эффективности незначительно превосходит антитело B6H12.2. Учитывая, что терапию вводили с интервалом 5–6 дней, можно предположить, что тетрамерная форма нанотела обладает более длительным периодом полужизни в организме. У мышей линии Balb/c взаимодействие белка SIRPα с человеческим CD47 происходит с относительно низким сродством (~0,3 мкМ). Вероятно, и стрепто-47VHH1H4B, и B6H12.2 успешно конкурировали с SIRPα за связывание с рецептором CD47 на опухолевых клетках, что может объяснить отсутствие выраженных различий в торможении опухолевого роста между двумя препаратами. Можно предположить, что при использовании сингенных опухолевых моделей или мышей с NOD терапевтический эффект будет выражен значительно сильнее. Общие результаты подтвердили потенциал применения подхода по тетрамеризации нанотела на основе стрептавидина как эффективного

метода для усиления аффинности за счёт повышения авидности, а также были опубликованы в формате научной статьи [183].

3.3.2.4. Димерные конструкции нанотел

В качестве альтернативного усиления активности нанотел, были получены димеризованые формы. Такой подход направлен на повышение авидности молекул за счёт образования двух центров связывания, при этом сохраняя достаточно малый размер белка (≈35 кДа), что может быть полезным в ряде терапевтических и диагностических применений. Преимуществом рассматриваемого подхода является возможность экспрессировать сразу димеризованное нанотело, избегая этапа конъюгации.

Были получены конструкции, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие два нанотела в рамках одной полипептидной цепи. В качестве гибкого линкера между нанотелами был использован шарнир IgA, хорошо зарекомендовавший себя в белковой инженерии благодаря своей способности обеспечивать необходимую пространственную подвижность и предотвращать стерические помехи при взаимодействии с мишенью [184]. Были получены димерные белковые молекулы с различными комбинациями нанотел: 1H3-1H3 (гомодимер), 1H3-2F8 и 1H3-1D10 (гетеродимеры) (Рисунок 32).

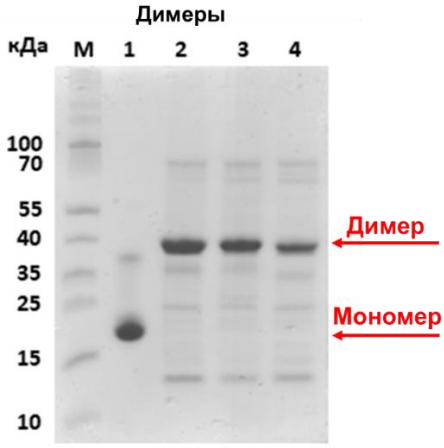

Рисунок 32. Электрофорез мономерного варианта нанотела и очищенных димерных конструкций. 1 – мономер 1H3. 2 – гомодимер 1H3-1H3. 2 – гетеродимер 1H3-2F8. 3 – гетеродимер 1H3- 1D10.

Полученные конструкты были протестированы на предмет связывающей способности и биологической активности. Аналогично тетрамерным комплексам, было произведено сравнительное измерение константы диссоциации у мономеров и димеров нанотел (Рисунок 33) (Таблица 11).

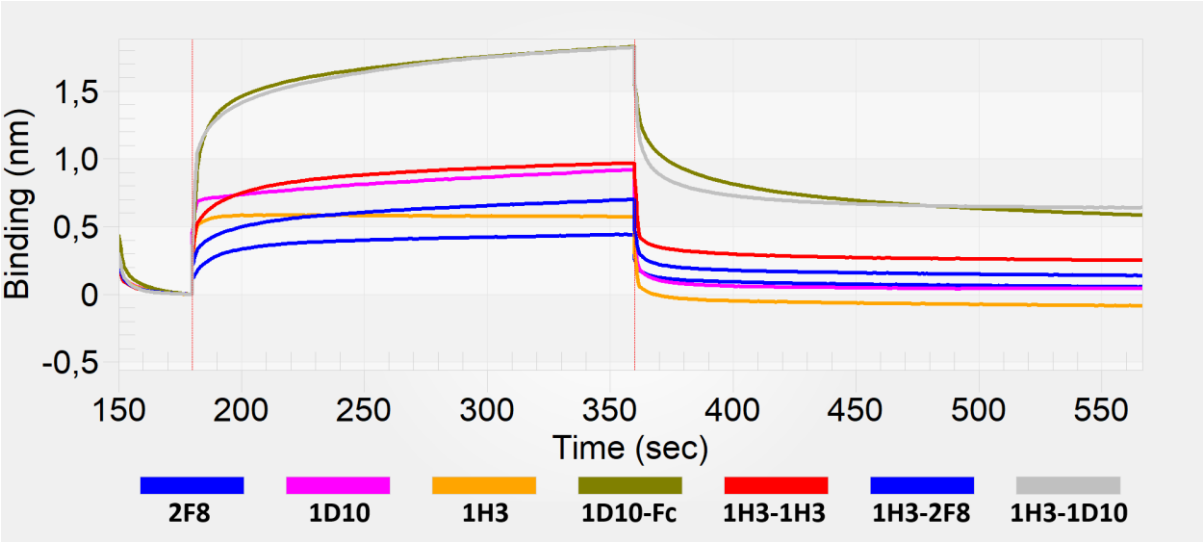

Рисунок 33. Графики диссоциации при исследовании мономерных и димерных конструкций нанотел.

Таблица 11. Измерение констант диссоциации мономерных нанотел и мультимерных комплексов на их основе.

Образец	**Концентрация, нМ**	**K_d, М**
2F8	81250	1.907×10^{-9}
1D10	81250	9.934×10^{-9}
1H3	87500	9.722×10^{-10}
1D10-Fc	11020	5.704×10^{-9}
1H3-1H3	34240	4.861×10^{-10}
1H3-2F8	15450	4.635×10^{-11}
1H3-1D10	29390	7.311×10^{-11}

Результаты исследования димеризованных конструкций белков варьировались. В случае гомодимера 1H3-1H3 наблюдалось усиление

связывания в 2 раза. При исследовании гетеродимера 1H3-2F8 наблюдалось усиление в 41 раз относительно варианта 2F8 и в 21 раз относительно 1H3. В случае гетеродимера 1H3-1D10 при сравнении с мономерным вариантом 1D10 связывание усилилось в 135 раз, а с 1H3 – в 13,3 раза. В целом полученные результаты свидетельствуют об увеличении функциональной авидности для всех димерных конструктов. Для сравнительной оценки эффективности димеризации также был использован Fc-слитый формат нанотела 1D10 (1D10-Fc), также представляющий собой бивалентную молекулу за счёт димеризации Fc-фрагмента. Применение данного формата приводило к усилению связывания в 1,74 раза. Положительные результаты эксперимента позволили нам перейти к клеточным тестам для оценки влияния димеризации на нейтрализующий эффект (Рисунок 34).

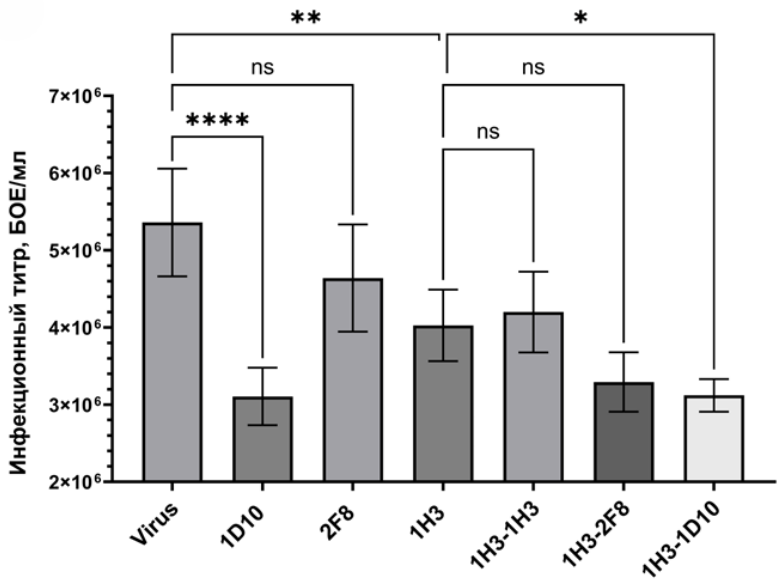

Рисунок 34. Результаты клеточных тестов по оценке изменения уровня нейтрализации при использовании димерных конструкций нанотел.

Примечание: * - P < 0.05; ** - P < 0.01; *** - P < 0.001; **** - P < 0.0001.

Мы не зафиксировали ни значимого ослабления нейтрализации, ни её усиления (Рисунок 34Б). Кроме того, интересным наблюдением являлось то, что димеризованные конструкции сохраняли эффект нейтрализации в соответствии с наиболее сильным нейтрализующим нанотелом, присутствующим в паре. Так

при исследовании гетеродимера 1H3-1D10 наблюдается статистически значимое изменение нейтрализации относительно гомодимера 1H3-1H3, но совпадающее по уровню при исследовании мономера 1D10. Возможно, оптимизация линкера, связывающего между собой два нанотела в такой конструкции, может увеличить эффективность связывания и нейтрализации за счет более подходящего расположения молекул нанотел в составе димера.

Результаты опыта показали, что нанотела сохраняют функциональную активность, находясь в составе димерной белковой молекулы и в N-концевом, и в С-концевом положении. В разделе 4.2.7. уже была рассмотрена возможность использования нанотел в качестве модулятора вирусного тропизма. Было выдвинуто предположение, что создание димерной молекулы, содержащей домены связывания с разными мишенями, и, таким образом, выступающей в качестве адаптера, может быть использовано для модуляции вирусного тропизма.

3.3.3. Адаптерная конструкция на основе нанотела для модуляции вирусного тропизма

Выше была продемонстрирована эффективность нанотел в нейтрализации вирусной активности (разделы 3.2.1. – 3.2.3.) и модуляции вирусного тропизма в составе псевдорецептора раздел 3.2.7.). Также показана возможность их функционализации посредством химической сшивки (раздел 3.3.1.) или экспрессии в составе димеризованного комплекса (раздел 3.3.2.4.). Далее был испытан альтернативный метод влияния на тропизм вирусов с использованием адаптерной конструкции на основе нанотела.

Одним из наиболее распространённых гликопротеинов для псевдотипирования является G-белок вируса везикулярного стоматита (VSV-G). Однако его использование не позволяет добиться специфичности трансдукции, поскольку рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR) экспрессируется практически на всех клетках [185]. В качестве альтернативы применяют модифицированные гликопротеины вирусов кори [186], Нипах [146] или тупайи

[187]. Такой подход позволяет получить стабильные лентивирусные препараты со специфической трансдукцией, но с инфекционными титрами, как правило, на порядок меньшими, чем у векторов на основе VSV-G [188].

Определение кристаллической структуры комплекса VSV-G/LDLR позволило создать «ослеплённый» вариант гликопротеина путём внесения точечных мутаций (K47Q, R354A) [189]. На основании этого был разработан метод ретаргетирования путём экспрессии лентивируса в клеточной линии с мембранно-закреплённым псевдорецептором [149]. Генетическая последовательность, кодирующая целевой псевдорецептор, включается непосредственно в геном лентивируса, что обеспечивает генетически связанный тропизм вирусных частиц.

Ранее, в разделе 4.4.7., был применён такой подход для получения лентивирусного препарата, с избирательным тропизмом к рецептору PD-1. Однако, модификация структуры рецепторов, использование специфических клеточных линий-экспрессоров и введение дополнительных генетических конструкций сопряжены с рядом ограничений и требуют длительной оптимизации. Мы разработали модель адаптерной бифункциональной конструкции на основе нанотела, способной специфически связываться с гликопротеином G и целевым рецептором. Это позволило бы модулировать специфичность трансдукции лентивируса внешним воздействием без изменений в генетической структуре или строении поверхностных рецепторов. Общая схема предполагаемого подхода представлена на Рисунке 35.

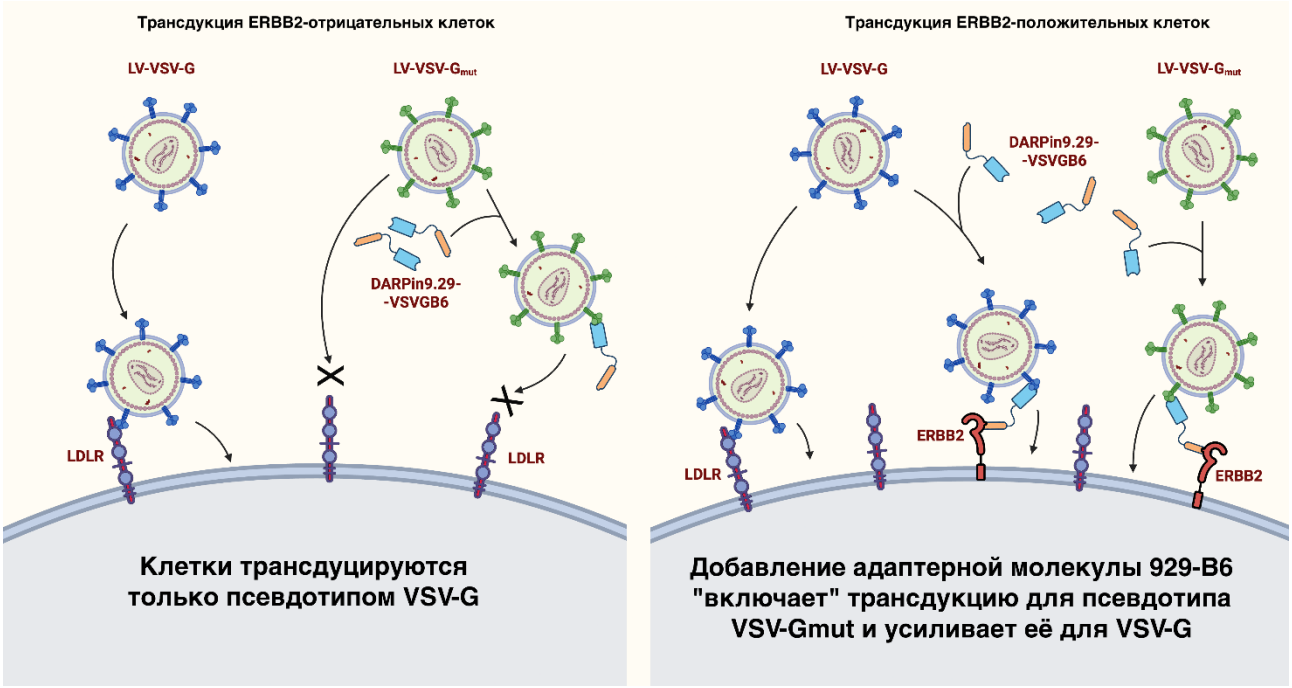

Рисунок 35. Общая схема предлагаемого подхода по использованию адаптерной конструкции для ретаргетирования [190].

Для реализации подхода получили нанотело к гликопротеину G вируса везикуляного стоматита методом фагового дисплея, аналогично описанному в разделе 4.1. Для получения специфичного нанотела конкретно к G-белку была модифицирована процедуру селекции: препарат VSV денатурировали, белки оболочки разделили электрофорезом, перенесли на PVDF-мембрану и выделили фрагмент именно с гликопротеином G. Полученный фрагмент мембраны использовали как сорбент с антигеном для отбора специфических антител.

Скрининг отдельных клонов позволил отобрать наиболее перспективное нанотело (VSVG-B6) с высокой специфичностью и эффективностью связывания. Избирательность его взаимодействия с белком VSV-Gmut без потери функциональной активности была оценена путём трансдукции клеточной линии, несущей нанотело в виде псевдорецептора.

В параллельных экспериментах были трансдуцированы клеточные линии с псевдорецептором и без него лентивирусом, псевдотипированным ослеплённым VSV-Gmut, с репортерным геном tagRFP (Рисунок 36).

Наблюдалось значимое усиление медианной интенсивности флуоресценции, а также увеличение доли трансдуцированных клеток на порядок в сравнении с линией без псевдорецептора (Рисунок 36А, Б). Кроме того, на целевой линии было отмечено образование синцитиев, опосредованное слиянием мембран, что подтверждает сохранность функциональной активности VSV-Gmut при связывании с VSV-G-B6 (Рисунок 36В).

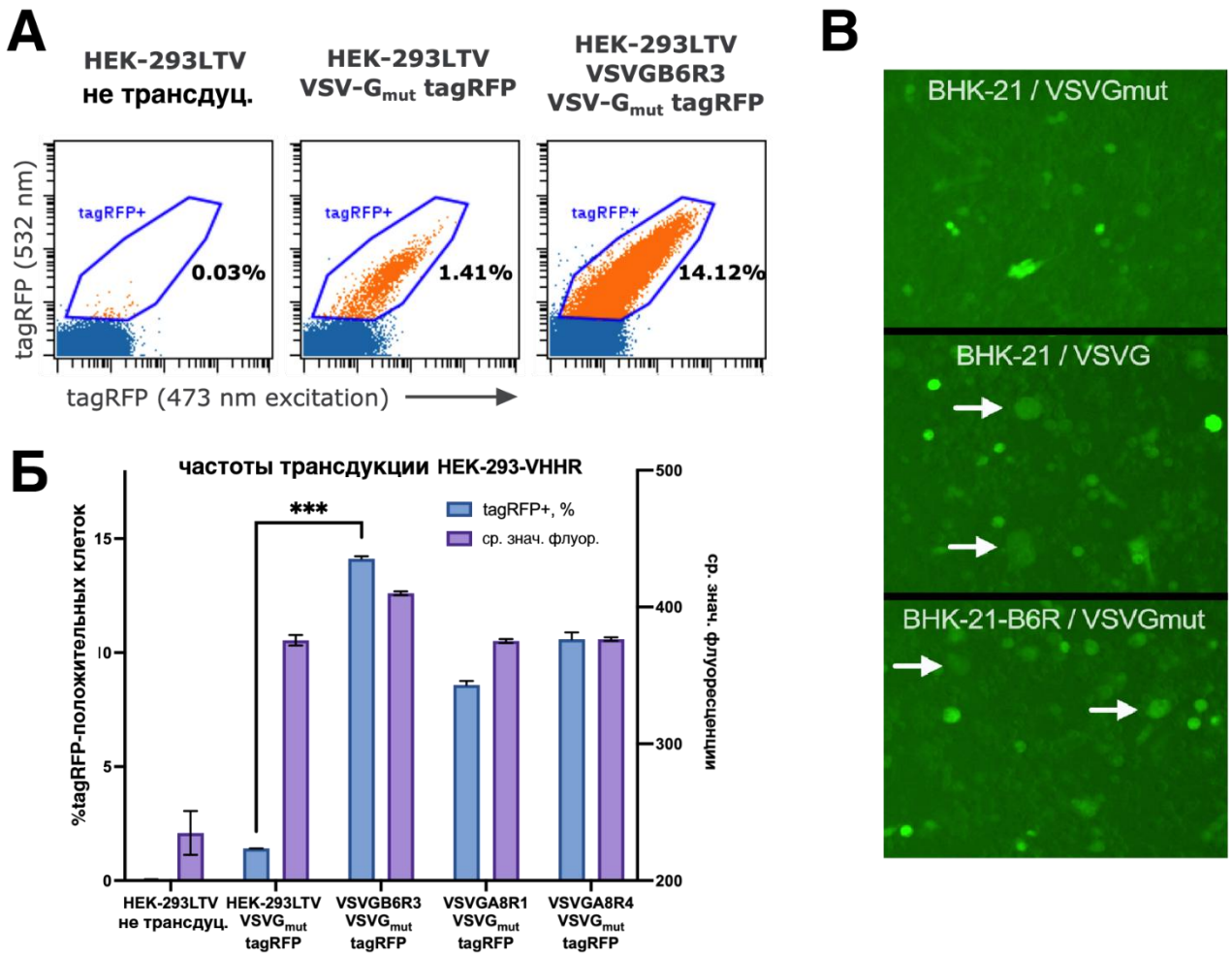

Рисунок 36. А - Проточная цитометрия трансдукции с помощью псевдорецептора VHH (VSVGB6R3) и без него (HEK-293LTV) с использованием лентивирусных векторов с псевдотипом VSV-G mut, несущих экспрессионную кассету tagRFP. Б - Частота трансдукции и средняя интенсивность флуоресценции популяций, положительных по tagRFP. В - Синцитии, образовавшиеся на клетках HEK-293LTV-VSVGB6R3 и HEK-293LTV после трансдукции с помощью pMD2Gmut и pLCMV-tagRFP. ***— p = 0,0002 [190].

Во второй домен биспецифического комплекса был включён высокоаффинный DARPin 9.29 к рецептору HER2 (ген ERBB2). DARPin 9.29 представляет собой искусственный белок на основе анкиринового повтора. Согласно структурным данным, DARPin 9.29 взаимодействует с доменом I HER2, формируя множественные контакты, включая водородные связи, π-стэкинг и гидрофобные взаимодействия, что обуславливает стабильность комплекса и высокую эффективность связывания. В отличие от антител, DARPin 9.29 не содержит иммуноглобулиновых доменов, что обеспечивает ему меньший размер, лучшую диффузионную доступность, а также более удобную инженерную модифицируемость при создании конъюгатов и таргетных систем доставки. Благодаря этим свойствам DARPin 9.29 рассматривается как эффективный таргетирующий модуль для селективного взаимодействия с HER2-позитивными клетками и для адресной доставки функциональных нагрузок.

Слиянием генетических последовательностей обеих молекул через гибкий линкер была получена биспецифическая конструкция, обладающая тропизмом одновременно к VSV-G и ERBB2 – 929-B6. Для оценки активности полученной молекулы мы создали клеточную линию на основе HEK-293LTV, экспрессирующую поверхностный человеческий ERBB2. Проверка экспрессии рецептора проточной цитометрией подтвердила экспрессию на ~50% клеток.

Мы параллельно трансдуцировали линии HEK-293LTV и HEK-ERBB2 лентивирусом, псевдотипированным VSV-Gmut. В качестве репортера в данной системе была использована светлячковая люцифераза. Для сравнительного контроля использовали лентивирус, собранный на линии с VSV-G-B6 как псевдорецептором. Трансдукцию проводили с градиентом концентрации 929-B6 в среде (Рисунок 37). В данном эксперименте для сравнения был использован альтернативный подход ретаргетирования ослеплённого VSV, основанный на трансфекции клеточной линии, экспрессирующей на поверхности связывающий белок DARPin 9.29 (конструкция VSV-Gmut+929R). Указанный подход ранее был применён в разделе 4.2.7.

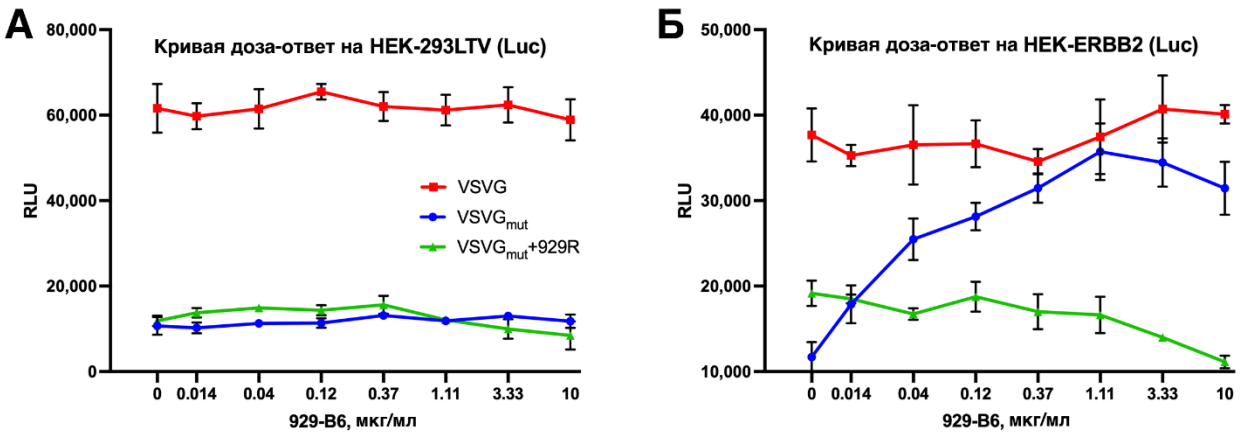

Рисунок 37. Кривые зависимости доза-ответ, измеренные на клетках HEK-293LTV, трансдуцированных лентивирусами, псевдотипированными VSV-G, VSV-Gmut и VSV-Gmut+929R, несущими кассету экспрессии люциферазы светлячка, и предварительно обработанных 929-B6 в указанных концентрациях [190].

По результатам эксперимента наблюдалось значительное усиление трансдукции псевдотипом VSV-Gmut при добавлении 929-B6, в то время как инфекционность немодифицированных лентивирусов оставалась практически на одном уровне в тестируемой и контрольной клеточных линиях. Максимальная активность люциферазы была достигнута при концентрации 929-B6 1,1 мкг/мл, после чего уровень сигнала постепенно снижался. Полученные результаты дополнительно подтверждены экспериментом с tagRFP (оптимальная концентрация 1,75 мкг/мл; Рисунок 38).

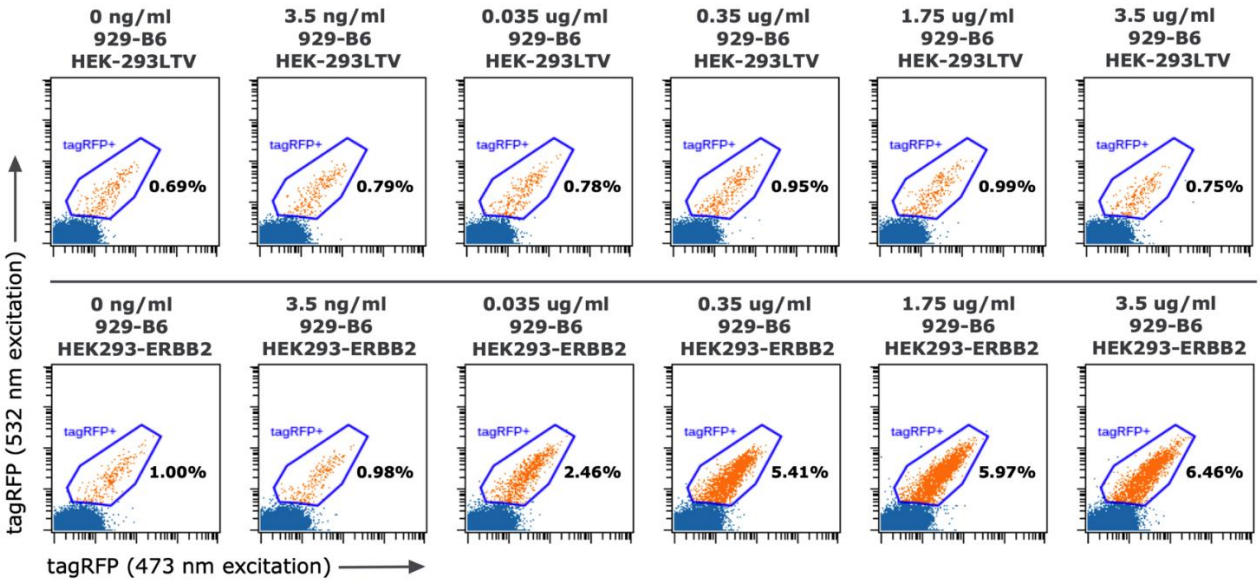

Рисунок 38. Проточные диаграммы теста зависимости доза-ответа от концентрации 929-B6 [190].

Мы подтвердили работоспособность разработанного подхода в модельных системах, после чего необходимо было повторить результат на опухолевых ERBB2-положительных клеточных линиях. В качестве экспериментальных линий отобрали три варианта – HCC1954, BT-474 и SKOV3, в качестве негативного контроля с низким уровнем экспрессии ERBB2– IMR-32 (Рисунок 39).

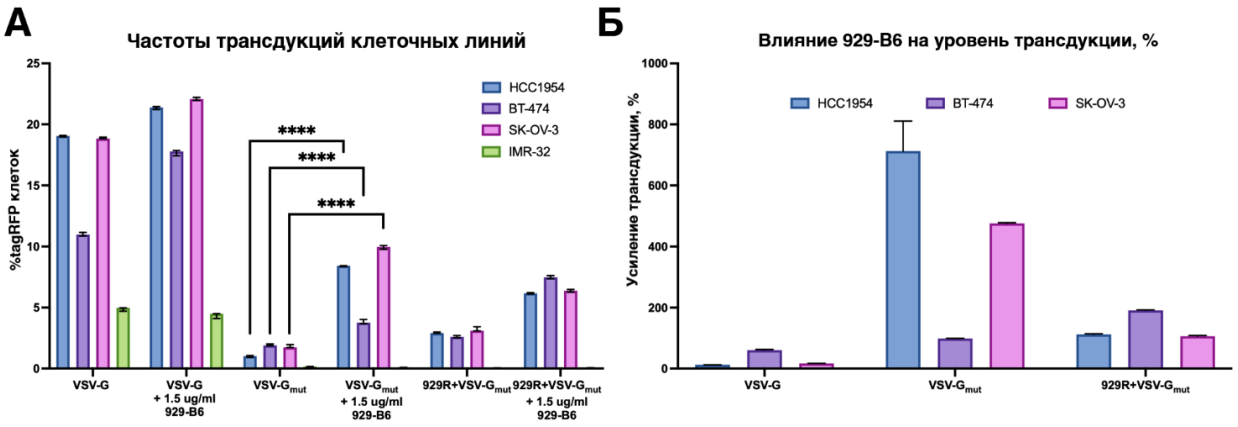

Рисунок 39. Трансдукция ERBB2$^+$ клеточных линий [190]. А - Частоты трансдукций ERBB2$^+$ линий и контрольной ERBB2$^-$ линии клеток IMR32. Б - Влияние 929-B6 на эффективность трансдукции ERBB2$^+$ линий клеток. ****— $p < 0{,}0001$.

Все линии клеток трансдуцировали псевдотипами VSV-G, VSV-Gmut и VSV-Gmut+929R с предварительной инкубацией с 929-B6 в концентрации 1,5 мкг/мл и без неё. Для немодифицированного VSV-G практически не наблюдалось изменения эффективности трансдукции. Умеренный эффект был зафиксирован для псевдотипа VSV-Gmut+929R, в то время как для VSV-Gmut наблюдалось восьмикратное усиление трансдукции. Для контрольной клеточной линии при добавлении 929-B6 не было отмечено изменений.

Для финальной оценки селективности было решено провести трансдукцию культуры с разным содержанием $ERBB2^+$ клеток. Чтобы избежать разницы эффективности трансдукции, опосредованной морфологическими особенностями клеток, была использована система с одной клеточной линией. Смеси HEK-293LTV/HEK-ERBB2 (10–45% $ERBB2^+$ клеток) трансдуцировали псевдотипами с/без 929-B6. (Рисунок 40).

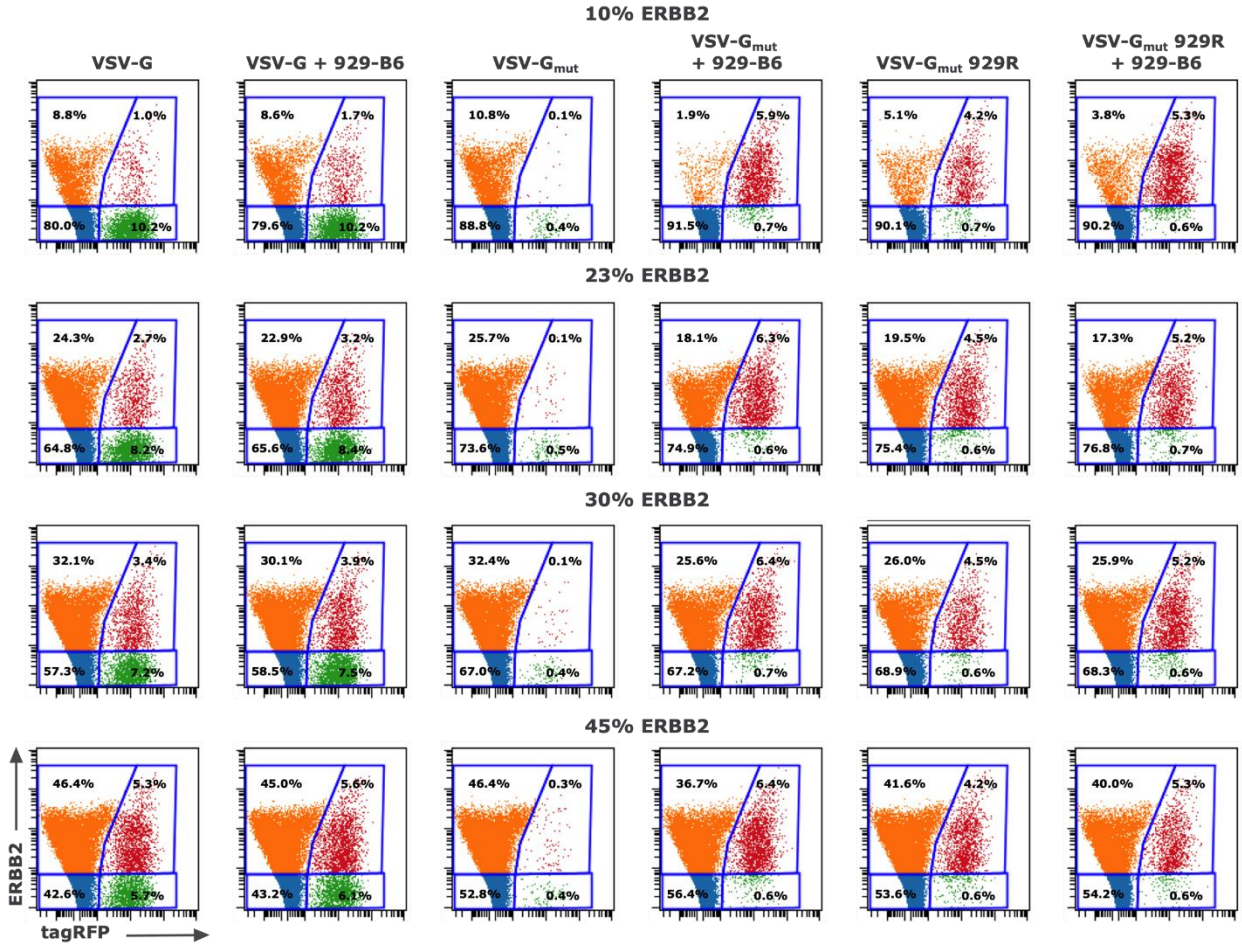

Рисунок 40. Проточные диаграммы смесей клеток, трансдуцированных лентивирусами, экспрессирующими tagRFP, с обработкой 929-B6 и без нее, окрашенные антителами к ERBB2. Синий: ERBB^{-}/tagRFP^{-}, оранжевый: ERBB^{+} /tagRFP^{-}, зеленый: ERBB^{-}/tagRFP^{+}, красный: ERBB^{+}/tagRFP^{+} [190].

Для всех псевдотипов лентивирусов было отмечено общее повышение эффективности трансдукции при проведении предварительной инкубации с 929-B6. Важно отметить, что усиление трансдукции наблюдалось в отношении преимущественно ERBB2^{+} клеток. В образцах VSV-Gmut, обработанных 929-B6, а также в вариантах VSV-Gmut+929R и VSV-Gmut+929R+929-B6 не выявлялось выраженной субпопуляции ERBB2^{-}/tagRFP^{+}, тогда как средняя интенсивность флуоресценции в этой области существенно возрастала по сравнению с необработанными VSV-Gmut-векторами. Сравнение коэффициентов селективности показало, что VSV-Gmut-псевдотипированные векторы, предварительно обработанные 929-B6, обеспечивают значительно более

высокую специфичную трансдукцию ERBB2^{+} клеток, чем VSV-Gmut+929R векторы без дополнительного адаптера.

Разработанный биспецифический адаптер обеспечивает быстрое и специфическое ретаргетирование лентивируса. Конструкция позволила обеспечить рецептор-специфичную трансдукцию лентивируса с «ослеплённым» гликопротеином G через рецептор ERBB2. Высокая специфичность и инфекционность на ERBB2^{+} клетках, минимальный эффект на ERBB2-, а также результаты на смешанных культурах в сравнении с другими системами перенацеливания демонстрируют превосходство над псевдорецепторными стратегиями по гибкости и эффективности. Ключевое преимущество описанной стратегии — возможность использовать единый лентивирусный штамм, перенацеливая его на различные рецепторы путём замены адаптера. Накопленный репертуар высокоаффинных модулей к различным рецепторам (DARPins, наноантитела, scFv) позволяет развивать эту концепцию для широкого спектра мишеней.

4. Выводы

1. В ходе селекции методом фагового дисплея нами была получена панель высокоаффинных нанотел, подтвердивших высокие уровни специфичности и эффективности (до 9.51×10^{-10} М) связывания с шиповидным белком вируса SARS-CoV-2 при проведении экспериментов в различных системах.

2. В различных модельных системах проведена оценка способности нанотел в мономерной форме ингибировать взаимодействие вирусного S-белка с рецептором ACE2. Установлено, что нанотела 1H3, 2F8 и 1D10 эффективно блокируют взаимодействие S-белка с ACE2 и сохраняют высокие уровни нейтрализующей активности в конкурентном ИФА, псевдовирусных люциферазных системах, а также в экспериментах с живым вирусом, включая варианты Ухань, Дельта и Омикрон (EC50 до 0,919 мкг/мл).

3. В рамках исследований были сконструированы, препаративно наработаны и протестированы различные структурно модифицированные конструкции на основе нанотел. Fc-слитые форматы нанотел обеспечивали усиление нейтрализующей активности как в клеточных тестах (1D10-Fc; снижение титра в 2,9 раза), так и в эксперименте in vivo (2F12-Fc) по сравнению с мономерными вариантами. Тетрамерные конструкции 1H3- и 2F8-PEG показали увеличение эффективности связывания для нанотел в 2 и 7 раз соответственно. У 2F8-PEG наблюдалось статистически значимое восстановление нейтрализующей активности в отношении варианта Омикрон (снижение титра в 1,8 раза). Димерные конструкции демонстрировали усиление связывания в диапазоне от 2 до 135 раз. Тетрамерный комплекс нанотела к CD47 на основе стрептавидина характеризовался 4-кратным снижением IC_{50} в ИФА относительно мономерной формы и ингибированием роста опухоли в модели на мышах ($P < 0,0021$).

4. Была проведена оценка подходов применения нанотел в виде псевдорецептора и адаптерной молекулы для ретаргетирования тропизма лентивируса. Интеграцией нанотела nb102c3 в рецептор-слепой белок H вируса

кори и оболочку ослеплённого VSV удалось добиться адресной трансдукции $PD1^+$ клеточной линии, а также, в случае кори, осуществить доставку кшРНК, направленной против транскрипционного фактора FOXP3 (P = 0,048) в Т-клетки. Была разработана и протестирована бифункциональная адаптерная молекула на основе нанотела к гликопротеину G VSV и DARPin 9.29, специфичному к HER2, что позволило осуществить адресную доставку трансгена в $HER2^+$ клетки. Данный подход позволил влиять на тропизм лентивируса путём внешнего воздействия и осуществлять трансдукцию более специфично чем система ретаргетирования VSV при помощи псевдорецептора.

5. Получены и протестированы конъюгаты нанотел с функционально активными молекулами. Конъюгаты с молекулой ARVI11 и различными типами линкеров демонстрировали статистически значимое усиление противовирусной активности, сопровождавшееся максимальным снижением вирусного титра в 2,4 раза. Расщепляемый линкер ValCitPAB при идентичной стратегии конъюгации (SPAAC) способствует повышению эффективности нейтрализации.

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность своему научному руководителю Степану Петровичу Чумакову за ценные советы, внимательное руководство, поддержку и неоценимую помощь на всех этапах подготовки и написания данной работы. Благодаря его профессионализму, терпению и вовлечённости, работа над темой стала для меня не только важным этапом в обучении, но и вдохновляющим исследовательским опытом. Особую благодарность автор выражает Дееву Сергею Михайловичу за помощь в проведении исследований и поддержку интересных проектов. Также автор выражает отдельную благодарность Козловской Любови Игоревне за возможность проведения экспериментов, критически необходимых для завершения работы.

Диссертация выполнена при поддержке гранта Министерства науки и высшего образования РФ № 075-15-2024-536.

Список сокращений

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер;

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота;

ИПТГ - изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид;

ИФА – иммуноферментный анализ;

кДа – килодальтон;

КТ – компьютерная томография;

кшРНК – короткая шпилькообразующая РНК;

МРТ - магнитно-резонансная томография;

ОФЭКТ - однофотонная эмиссионная компьютерная томография;

ПСМА – простатспецифический мембранный антиген;

ПЦР – полимеразная цепная реакция;

ПЭГ – полиэтиленгликоль;

ПЭИ – полиэтиленимин;

ПЭТ - позитронно-эмиссионная томография;

РНК – рибонуклеиновая кислота;

ТЦД - тканевые цитопатогенные дозы;

ЦПЭ – цитопатический эффект;

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота;

ACE2 (англ. angiotensin-converting enzyme 2) - ангиотензинпревращающий фермент 2;

ACKR3 (англ. atypical chemokine receptor 3) - атипичный хемокиновый рецептор 3;

ADC (англ. antibody-drug conjugates) – конъюгаты антитело-лекарство;

BAD (англ. biotin acceptor domain) – биотин-акцепторный домен;

BCMA (англ. B cell maturation antigen) - В-клеточный антиген созревания:

BirA - это ген, кодирующий фермент биотинлигазу, играющую важную роль в биосинтезе биотина у бактерий;

BLAST (англ. basic local alignment search tool) - базовый инструмент поиска локальных выравниваний;

CAR (англ. chimeric antigen receptor) – химерный антигенный рецептор;

CCL (англ. C-C motif ligand 2) - цитокин, относящийся к группе CC-хемокинов (β-хемокинов);

CD (англ. cluster of differentiation) – кластер дифференцировки;

CDR (англ. complementarity-determining region) – участок, определяющий комплементарность;

CEA (англ. carcinoembryonic antigen) - раково-эмбриональный антиген;

CH (англ. constant heavy chain domain) – константный домен тяжелой цепи антитела;

CL (англ. constant light chain domain)- константный домен лёгкой цепи антитела;

COVID-19 (англ. coronavirus disease 2019) – коронавирусная инфекция 2019 года;

CRISPR/Cas9 (англ. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) - кластеризованные регулярно распределённые короткие палиндромные повторы, связанные с белком Cas9;

CTLA-4 (англ. cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4) - гликопротеин цитотоксических Т-лимфоцитов 4;

Cy5 (англ. cyanine5) – цианин 5;

DARPin (англ. Designed Ankyrin Repeat Proteins) - сконструированные белки на основе анкириновых повторов;

DMEM (англ. Dulbecco's modified Eagle medium) - модифицированная среда Дульбекко-Игла;

EC50 (англ. half maximal effective concentration) - полумаксимальная эффективная концентрация;

ECL (англ. electrochemiluminescence) – электрохемилюминесценция;

EGFR (англ. epidermal growth factor receptor) – рецептор эпидермального фактора роста;

Fab (англ. fragment antigen binding) - участок связывания антигена;

FBS (англ. fetal bovine serum) -фетальная бычья сыворотка;

Fc (англ. fragment crystallizable region) – кристаллизующийся фрагмент иммуноглобулина;

FDA (англ. food and drug administration) - управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США;

FDC (англ. antibody fragment-drug conjugates) – конъюгат фрагмента антитела с лекарством;

FOXP3 (англ. forkhead box P3) регулятор (транскрипционный фактор) развития и функционирования регуляторных Т-клеток;

FR (англ. framework region) – каркасный участок;

GPC (англ. glypican 2) – глипикан 2;

H5N1 - серотип вируса гриппа А;

HCAb (англ. heavy chain antibody) – тяжелоцепочечное антитело;

HER2 (англ. human epidermal growth factor receptor 2) - рецептор эпидермального фактора роста, тип 2;

HGF (англ. hepatocyte growth factor) – фактор роста гепатоцитов;

HIF (англ. hypoxia-inducible factor) - фактор, индуцируемые гипоксией;

HS (англ. hot start) – полимераза с «горячим стартом»;

IC50 (англ. half maximal inhibitory concentration) - полумаксимальная ингибирующая концентрация;

IFN (англ. interferon) – интерферон;

IgG (англ. immunoglobulin G) – иммуноглобулин G;

IL (англ. interleukin) – интерлейкин;

IMDM (англ. Iscove's modified Dulbecco's medium) - модифицированная среда Дульбекко по Искову;

LPETG – аминокислотная последовательность лейцин-пролин-глутамат-треонин-глицин;

MHC (англ. major histocompatibility complex) – главный комплекс гистосовместимости;

MMAE (англ. monomethyl auristatin E) – монометил ауристатин Е;

MMR (англ. macrophage mannose receptor) - рецептор маннозы макрофагов;

MPBS (англ. milk phosphate buffered saline) – фосфатно-солевой буфер с молоком;

MUC (англ. mucin) – муцин;

Nb (англ. nanobody) – нанотело;

NHS (англ. N-hydroxysuccinimide) - N-гидроксисукцинимид;

NIR (англ. near infrared) – ближний инфракрасный диапазон;

NIRF (англ. near-infrared fluorescence) флуоресценция в ближнем инфракрасном диапазоне;

NK (англ. natural killers) – натуральные киллеры;

NTA (англ. nitrilotriacetic acid) - нитрилотриуксусная кислота;

PBS (англ. phosphate buffered saline) – фосфатно-солевой буфер;

PD1 (англ. programmed cell death 1) – рецептор программируемой клеточной смерти 1;

PD-L1 (англ. programmed cell death ligand 1) – лиганд рецептора программируемой клеточной смерти 1;

PHA (англ. phytohemagglutinin) – фитогамагглютинин;

PMA (англ. phorbol 12-myristate 13-acetate) – форбол 12-мистрат 13-ацетат;

PVDF (англ. polyvinylidene difluoride) – поливинилиденфторид;

QPCR (англ. quantitative polymerase chain reaction) – количественная полимеразная цепная реакция;

RBD (англ. receptor-binding domain) – рецептор-связывающий домен;

RNA (англ. ribonucleic acid) – рибонуклеиновая кислота;

RPMI (англ. Roswell Park Memorial Institute) - питательная среда, используемая для культивирования клеток;

rSAP (англ. recombinant shrimp alkaline phosphatase) – рекомбинантная щелочная фосфатаза креветок;

SARS- CoV-2 (англ. severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) - коронавирус 2, связанный с тяжелым острым респираторным синдромом;

ScFv (англ. single-chain variable fragment) - рекомбинантный антителовый фрагмент, состоящий из двух вариабельных доменов, соединенных линкером;

SIRP (англ. signal regulatory protein α) – сигнально регуляторный белок альфа;

TAG (англ. tumor-associated glycoprotein) – гликопротеин, ассоциированный с опухолью;

TBE (англ. Tris-borate-EDTA buffer) - трис-борат-ЭДТА буфер;

TGF- β (англ. transforming growth factor beta) - трансформирующий фактор роста бета;

TMB (англ. 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine) - 3,3′,5,5′-тетраметилбензидиновый буффер;

TNF (англ. tumor necrosis factor) – фактор некроза опухоли;

TRAIL (англ. TNF-related apoptosis-inducing ligand) – лиганд, индуцирующий апоптоз, связанный с TNF;

Treg (англ. regulatory T-cells) - регуляторные Т-клетки;

VCAM (англ. Vascular cell adhesion protein) – белок адгезии сосудистых клеток;

VEGFR (англ. vascular endothelial growth factor) - фактор роста эндотелия сосудов;

VH (англ. variable heavy) - вариабельный домен тяжелой цепи антител;

VHH (англ. variable heavy chain domain) – вариабельный домен тяжелой цепи тяжелоцепочечного антитела;

VL (англ. variable light) – вариабельный фрагмент лёгкой цепи антитела;

V-NAR (англ. variable new antigen receptor) – вариабельный новый антигенный рецептор;

VSV (англ. vesicular stomatitis virus) – вирус везикулярного стоматита.

Список литературы

1. Kunz S. et al. NANOBODY((R)) Molecule, a Giga Medical Tool in Nanodimensions. // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24, № 17.

2. Hamers-Casterman C. et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. // Nature. 1993. Vol. 363, № 6428. P. 446-8.

3. Greenberg A. S. et al. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. // Nature. 1995. Vol. 374, № 6518. P. 168-73.

4. Alexander A. et al. gamma Heavy chain disease in man: cDNA sequence supports partial gene deletion model. // Proc Natl Acad Sci U S A. 1982. Vol. 79, № 10. P. 3260-4.

5. Lam A. Y. et al. Nanobody-aided structure determination of the EpsI:EpsJ pseudopilin heterodimer from Vibrio vulnificus. // J Struct Biol. 2009. Vol. 166, № 1. P. 8-15.

6. Jindal V. et al. Current Status of Chimeric Antigen Receptor T-Cell Therapy in Multiple Myeloma. // Am J Clin Oncol. 2020. Vol. 43, № 5. P. 371-377.

7. Jang C. et al. The synergistic effect of folate and RGD dual ligand of nanographene oxide on tumor targeting and photothermal therapy in vivo. // Nanoscale. 2015. Vol. 7, № 44. P. 18584-94.

8. Liu X. et al. Development of a nanobody-alkaline phosphatase fusion protein and its application in a highly sensitive direct competitive fluorescence enzyme immunoassay for detection of ochratoxin A in cereal. // Anal Chem. 2015. Vol. 87, № 2. P. 1387-94.

9. Wang L. et al. Anti-EGFR Binding Nanobody Delivery System to Improve the Diagnosis and Treatment of Solid Tumours. // Recent Pat Anticancer Drug Discov. 2020. Vol. 15, № 3. P. 200-211.

10. Belanger K. et al. Single-Domain Antibodies as Therapeutic and Imaging Agents for the Treatment of CNS Diseases. // Antibodies (Basel). 2019. Vol. 8, № 2.

11. Kazemi-Lomedasht F. et al. Selection and Characterization of Specific Nanobody Against Human Immunoglobulin G. // Monoclon Antib Immunodiagn Immunother. 2015. Vol. 34, № 3. P. 201-5.

12. Vincke C. et al. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. // J Biol Chem. 2009. Vol. 284, № 5. P. 3273-3284.

13. Salvador J. P., Vilaplana L., Marco M. P. Nanobody: outstanding features for diagnostic and therapeutic applications. // Anal Bioanal Chem. 2019. Vol. 411, № 9. P. 1703-1713.

14. Saerens D. et al. Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing. // Anal Chem. 2005. Vol. 77, № 23. P. 7547-55.

15. Wang Y., Xianyu Y. Nanobody and Nanozyme-Enabled Immunoassays with Enhanced Specificity and Sensitivity. // Small Methods. 2022. Vol. 6, № 4. P. e2101576.

16. Li D. et al. Development of Improved Double-Nanobody Sandwich ELISAs for Human Soluble Epoxide Hydrolase Detection in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Diabetic Patients and the Prefrontal Cortex of Multiple Sclerosis Patients. // Anal Chem. 2020. Vol. 92, № 10. P. 7334-7342.

17. Yamagata M., Sanes J. R. Reporter-nanobody fusions (RANbodies) as versatile, small, sensitive immunohistochemical reagents. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2018. Vol. 115, № 9. P. 2126-2131.

18. Li H. et al. A nanobody-based electrochemiluminescent immunosensor for sensitive detection of human procalcitonin. // Analyst. 2014. Vol. 139, № 15. P. 3718-21.

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

20. Huang L. et al. Prostate-specific antigen immunosensing based on mixed self-assembled monolayers, camel antibodies and colloidal gold enhanced sandwich assays. // Biosens Bioelectron. 2005. Vol. 21, № 3. P. 483-90.

21. Gelkop S. et al. The Development and Validation of a Novel Nanobody-Based Competitive ELISA for the Detection of Foot and Mouth Disease 3ABC Antibodies in Cattle. // Front Vet Sci. 2018. Vol. 5. P. 250.

22. Morales-Yanez F. J. et al. An innovative approach in the detection of Toxocara canis excretory/secretory antigens using specific nanobodies. // Int J Parasitol. 2019. Vol. 49, № 8. P. 635-645.

23. Bever C. S. et al. VHH antibodies: emerging reagents for the analysis of environmental chemicals. // Anal Bioanal Chem. 2016. Vol. 408, № 22. P. 5985-6002.

24. Oliveira S. et al. Targeting tumors with nanobodies for cancer imaging and therapy. // J Control Release. 2013. Vol. 172, № 3. P. 607-17.

25. Debie P. et al. Size and affinity kinetics of nanobodies influence targeting and penetration of solid tumours. // J Control Release. 2020. Vol. 317. P. 34-42.

26. Rashidian M. et al. Noninvasive imaging of immune responses. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2015. Vol. 112, № 19. P. 6146-51.

27. Xavier C. et al. Synthesis, preclinical validation, dosimetry, and toxicity of 68Ga-NOTA-anti-HER2 Nanobodies for iPET imaging of HER2 receptor expression in cancer. // J Nucl Med. 2013. Vol. 54, № 5. P. 776-84.

28. Broisat A. et al. Nanobodies targeting mouse/human VCAM1 for the nuclear imaging of atherosclerotic lesions. // Circ Res. 2012. Vol. 110, № 7. P. 927-37.

29. Broisat A. et al. 99mTc-cAbVCAM1-5 imaging is a sensitive and reproducible tool for the detection of inflamed atherosclerotic lesions in mice. // J Nucl Med. 2014. Vol. 55, № 10. P. 1678-84.

30. Keyaerts M. et al. Phase I Study of 68Ga-HER2-Nanobody for PET/CT Assessment of HER2 Expression in Breast Carcinoma. // J Nucl Med. 2016. Vol. 57, № 1. P. 27-33.

31. Chakravarty R., Goel S., Cai W. Nanobody: the "magic bullet" for molecular imaging? // Theranostics. 2014. Vol. 4, № 4. P. 386-98.

32. Xing Y. et al. Early Phase I Study of a (99m)Tc-Labeled Anti-Programmed Death Ligand-1 (PD-L1) Single-Domain Antibody in SPECT/CT Assessment of PD-L1 Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. // J Nucl Med. 2019. Vol. 60, № 9. P. 1213-1220.

33. Vosjan M. J. et al. Facile labelling of an anti-epidermal growth factor receptor Nanobody with 68Ga via a novel bifunctional desferal chelate for immuno-PET. // Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2011. Vol. 38, № 4. P. 753-63.

34. Blykers A. et al. PET Imaging of Macrophage Mannose Receptor-Expressing Macrophages in Tumor Stroma Using 18F-Radiolabeled Camelid Single-Domain Antibody Fragments. // J Nucl Med. 2015. Vol. 56, № 8. P. 1265-71.

35. Debie P., Devoogdt N., Hernot S. Targeted Nanobody-Based Molecular Tracers for Nuclear Imaging and Image-Guided Surgery. // Antibodies (Basel). 2019. Vol. 8, № 1.

36. Oliveira S. et al. Rapid visualization of human tumor xenografts through optical imaging with a near-infrared fluorescent anti-epidermal growth factor receptor nanobody. // Mol Imaging. 2012. Vol. 11, № 1. P. 33-46.

37. He S. et al. Crucial breakthrough of second near-infrared biological window fluorophores: design and synthesis toward multimodal imaging and theranostics. // Chem Soc Rev. 2018. Vol. 47, № 12. P. 4258-4278.

38. Hu Z. et al. First-in-human liver-tumour surgery guided by multispectral fluorescence imaging in the visible and near-infrared-I/II windows. // Nat Biomed Eng. 2020. Vol. 4, № 3. P. 259-271.

39. Yu Z. et al. Anti-G250 nanobody-functionalized nanobubbles targeting renal cell carcinoma cells for ultrasound molecular imaging. // Nanotechnology. 2020. Vol. 31, № 20. P. 205101.

40. Li D. et al. First-in-human study of PET and optical dual-modality image-guided surgery in glioblastoma using (68)Ga-IRDye800CW-BBN. // Theranostics. 2018. Vol. 8, № 9. P. 2508-2520.

41. Senders M. L. et al. Nanobody-Facilitated Multiparametric PET/MRI Phenotyping of Atherosclerosis. // JACC Cardiovasc Imaging. 2019. Vol. 12, № 10. P. 2015-2026.

42. Zettlitz K. A. et al. A Dual-Modality Linker Enables Site-Specific Conjugation of Antibody Fragments for (18)F-Immuno-PET and Fluorescence Imaging. // J Nucl Med. 2019. Vol. 60, № 10. P. 1467-1473.

43. Kijanka M. et al. Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 VHHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery. // Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2013. Vol. 40, № 11. P. 1718-29.

44. Behdani M. et al. Generation and characterization of a functional Nanobody against the vascular endothelial growth factor receptor-2; angiogenesis cell receptor. // Mol Immunol. 2012. Vol. 50, № 1-2. P. 35-41.

45. Heukers R. et al. Targeting hepatocyte growth factor receptor (Met) positive tumor cells using internalizing nanobody-decorated albumin nanoparticles. // Biomaterials. 2014. Vol. 35, № 1. P. 601-10.

46. Sadeqzadeh E. et al. Combined MUC1-specific nanobody-tagged PEG-polyethylenimine polyplex targeting and transcriptional targeting of tBid transgene for directed killing of MUC1 over-expressing tumour cells. // J Control Release. 2011. Vol. 156, № 1. P. 85-91.

47. Cortez-Retamozo V. et al. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. // Cancer Res. 2004. Vol. 64, № 8. P. 2853-7.

48. Groot A. J. et al. Identification by phage display of single-domain antibody fragments specific for the ODD domain in hypoxia-inducible factor 1alpha. // Lab Invest. 2006. Vol. 86, № 4. P. 345-56.

49. Blanchetot C. et al. Neutralizing nanobodies targeting diverse chemokines effectively inhibit chemokine function. // J Biol Chem. 2013. Vol. 288, № 35. P. 25173-25182.

50. D'Huyvetter M. et al. Targeted radionuclide therapy with A 177Lu-labeled anti-HER2 nanobody. // Theranostics. 2014. Vol. 4, № 7. P. 708-20.

51. D'Huyvetter M. et al. (131)I-labeled Anti-HER2 Camelid sdAb as a Theranostic Tool in Cancer Treatment. // Clin Cancer Res. 2017. Vol. 23, № 21. P. 6616-6628.

52. Krasniqi A. et al. Theranostic Radiolabeled Anti-CD20 sdAb for Targeted Radionuclide Therapy of Non-Hodgkin Lymphoma. // Mol Cancer Ther. 2017. Vol. 16, № 12. P. 2828-2839.

53. Deken M. M. et al. Nanobody-targeted photodynamic therapy induces significant tumor regression of trastuzumab-resistant HER2-positive breast cancer, after a single treatment session. // J Control Release. 2020. Vol. 323. P. 269-281.

54. van Driel P. et al. EGFR targeted nanobody-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy in a pre-clinical model of head and neck cancer. // J Control Release. 2016. Vol. 229. P. 93-105.

55. Fang T. et al. Structurally Defined alphaMHC-II Nanobody-Drug Conjugates: A Therapeutic and Imaging System for B-Cell Lymphoma. // Angew Chem Int Ed Engl. 2016. Vol. 55, № 7. P. 2416-20.

56. Bachran C. et al. The activity of myeloid cell-specific VHH immunotoxins is target-, epitope-, subset- and organ dependent. // Sci Rep. 2017. Vol. 7, № 1. P. 17916.

57. Kontermann R. E. Strategies for extended serum half-life of protein therapeutics. // Curr Opin Biotechnol. 2011. Vol. 22, № 6. P. 868-76.

58. Wu T. et al. Clustered nanobody-drug conjugates for targeted cancer therapy. // Chem Commun (Camb). 2020. Vol. 56, № 65. P. 9344-9347.

59. Blair H. A., Lyseng-Williamson K. A. Caplacizumab in acquired thrombotic thrombocytopenic purpura: a profile of its use. // Drugs & Therapy Perspectives. 2019. Vol. 35, № 6. P. 263-270.

60. Zhu D. et al. Novel application of anti-human Fc nanobody for screening high-producing CHO cells for monoclonal antibody. // Eng Life Sci. 2022. Vol. 22, № 10. P. 608-618.

61. Oliveira S. et al. Downregulation of EGFR by a novel multivalent nanobody-liposome platform. // J Control Release. 2010. Vol. 145, № 2. P. 165-75.

62. Talelli M. et al. Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy. // Biomaterials. 2013. Vol. 34, № 4. P. 1255-60.

63. Zou T. et al. Nanobody-functionalized PEG-b-PCL polymersomes and their targeting study. // J Biotechnol. 2015. Vol. 214. P. 147-55.

64. Xie Y. J. et al. Nanobody-based CAR T cells that target the tumor microenvironment inhibit the growth of solid tumors in immunocompetent mice. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2019. Vol. 116, № 16. P. 7624-7631.

65. Jutz G. et al. Ferritin: a versatile building block for bionanotechnology. // Chem Rev. 2015. Vol. 115, № 4. P. 1653-701.

66. Fan K. et al. Fenobody: A Ferritin-Displayed Nanobody with High Apparent Affinity and Half-Life Extension. // Anal Chem. 2018. Vol. 90, № 9. P. 5671-5677.

67. Liu M. et al. Nanobody-Ferritin Conjugate for Targeted Photodynamic Therapy. // Chemistry. 2020. Vol. 26, № 33. P. 7442-7450.

68. Bakhtiari S. H. et al. Anti-MUC1 nanobody can redirect T-body cytotoxic effector function. // Hybridoma (Larchmt). 2009. Vol. 28, № 2. P. 85-92.

69. Iri-Sofla F. J. et al. Nanobody-based chimeric receptor gene integration in Jurkat cells mediated by phiC31 integrase. // Exp Cell Res. 2011. Vol. 317, № 18. P. 2630-41.

70. Khaleghi S. et al. A caspase 8-based suicide switch induces apoptosis in nanobody-directed chimeric receptor expressing T cells. // Int J Hematol. 2012. Vol. 95, № 4. P. 434-44.

71. Kufe D. W. MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. // Oncogene. 2013. Vol. 32, № 9. P. 1073-81.

72. Sharifzadeh Z. et al. Genetically engineered T cells bearing chimeric nanoconstructed receptors harboring TAG-72-specific camelid single domain antibodies as targeting agents. // Cancer Lett. 2013. Vol. 334, № 2. P. 237-44.

73. Jamnani F. R. et al. T cells expressing VHH-directed oligoclonal chimeric HER2 antigen receptors: towards tumor-directed oligoclonal T cell therapy. // Biochim Biophys Acta. 2014. Vol. 1840, № 1. P. 378-86.

74. Albert S. et al. A novel nanobody-based target module for retargeting of T lymphocytes to EGFR-expressing cancer cells via the modular UniCAR platform. // Oncoimmunology. 2017. Vol. 6, № 4. P. e1287246.

75. Albert S. et al. From mono- to bivalent: improving theranostic properties of target modules for redirection of UniCAR T cells against EGFR-expressing tumor cells in vitro and in vivo. // Oncotarget. 2018. Vol. 9, № 39. P. 25597-25616.

76. Li N. et al. Therapeutically targeting glypican-2 via single-domain antibody-based chimeric antigen receptors and immunotoxins in neuroblastoma. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2017. Vol. 114, № 32. P. E6623-E6631.

77. Hassani M. et al. Construction of a chimeric antigen receptor bearing a nanobody against prostate a specific membrane antigen in prostate cancer. // J Cell Biochem. 2019. Vol. 120, № 6. P. 10787-10795.

78. Hassani M. et al. Engineered Jurkat Cells for Targeting Prostate-Specific Membrane Antigen on Prostate Cancer Cells by Nanobody-Based Chimeric Antigen Receptor. // Iran Biomed J. 2020. Vol. 24, № 2. P. 81-8.

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

80. Han L. et al. Safety and efficacy of CAR-T cell targeting BCMA in patients with multiple myeloma coinfected with chronic hepatitis B virus. // J Immunother Cancer. 2020. Vol. 8, № 2.

81. An N. et al. Anti-Multiple Myeloma Activity of Nanobody-Based Anti-CD38 Chimeric Antigen Receptor T Cells. // Mol Pharm. 2018. Vol. 15, № 10. P. 4577-4588.

82. De Munter S. et al. Rapid and Effective Generation of Nanobody Based CARs using PCR and Gibson Assembly. // Int J Mol Sci. 2020. Vol. 21, № 3.

83. De Munter S. et al. Nanobody Based Dual Specific CARs. // Int J Mol Sci. 2018. Vol. 19, № 2.

84. Safarzadeh Kozani P., Safarzadeh Kozani P., Rahbarizadeh F. CAR-T cell therapy in T-cell malignancies: Is success a low-hanging fruit? // Stem Cell Res Ther. 2021. Vol. 12, № 1. P. 527.

85. Mo F. et al. Nanobody-based chimeric antigen receptor T cells designed by CRISPR/Cas9 technology for solid tumor immunotherapy. // Signal Transduct Target Ther. 2021. Vol. 6, № 1. P. 80.

86. Behar G. et al. Isolation and characterization of anti-FcgammaRIII (CD16) llama single-domain antibodies that activate natural killer cells. // Protein Eng Des Sel. 2008. Vol. 21, № 1. P. 1-10.

87. Dong B. et al. A novel bispecific antibody, BiSS, with potent anti-cancer activities. // Cancer Biol Ther. 2016. Vol. 17, № 4. P. 364-70.

88. van Faassen H. et al. Incorporation of a Novel CD16-Specific Single-Domain Antibody into Multispecific Natural Killer Cell Engagers With Potent ADCC. // Mol Pharm. 2021. Vol. 18, № 6. P. 2375-2384.

89. Arvindam U. S. et al. A trispecific killer engager molecule against CLEC12A effectively induces NK-cell mediated killing of AML cells. // Leukemia. 2021. Vol. 35, № 6. P. 1586-1596.

90. Vallera D. A. et al. A HER2 Tri-Specific NK Cell Engager Mediates Efficient Targeting of Human Ovarian Cancer. // Cancers (Basel). 2021. Vol. 13, № 16.

91. You F. et al. A novel CD7 chimeric antigen receptor-modified NK-92MI cell line targeting T-cell acute lymphoblastic leukemia. // Am J Cancer Res. 2019. Vol. 9, № 1. P. 64-78.

92. Polgarova K. et al. Chimeric Antigen Receptor Based Cellular Therapy for Treatment Of T-Cell Malignancies. // Front Oncol. 2022. Vol. 12. P. 876758.

93. Najafi M. et al. Macrophage polarity in cancer: A review. // J Cell Biochem. 2019. Vol. 120, № 3. P. 2756-2765.

94. Wang Y. et al. mRNA Delivery of a Bispecific Single-Domain Antibody to Polarize Tumor-Associated Macrophages and Synergize Immunotherapy against Liver Malignancies. // Adv Mater. 2021. Vol. 33, № 23. P. e2007603.

95. Velliquette R. W. et al. Monoclonal anti-CD47 interference in red cell and platelet testing. // Transfusion. 2019. Vol. 59, № 2. P. 730-737.

96. Ma L. et al. Preclinical development of a novel CD47 nanobody with less toxicity and enhanced anti-cancer therapeutic potential. // J Nanobiotechnology. 2020. Vol. 18, № 1. P. 12.

97. Dougan M. et al. Targeting Cytokine Therapy to the Pancreatic Tumor Microenvironment Using PD-L1-Specific VHHs. // Cancer Immunol Res. 2018. Vol. 6, № 4. P. 389-401.

98. Bolli E. et al. Targeted Repolarization of Tumor-Associated Macrophages via Imidazoquinoline-Linked Nanobodies. // Adv Sci (Weinh). 2021. Vol. 8, № 10. P. 2004574.

99. Van Heeke G. et al. Nanobodies(R) as inhaled biotherapeutics for lung diseases. // Pharmacol Ther. 2017. Vol. 169. P. 47-56.

100. Wang S. M. et al. A novel nanobody specific for respiratory surfactant protein A has potential for lung targeting. // Int J Nanomedicine. 2015. Vol. 10. P. 2857-69.

101. Stanimirovic D. B., Sandhu J. K., Costain W. J. Emerging Technologies for Delivery of Biotherapeutics and Gene Therapy Across the Blood-Brain Barrier. // BioDrugs. 2018. Vol. 32, № 6. P. 547-559.

102. Abulrob A. et al. The blood-brain barrier transmigrating single domain antibody: mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. // J Neurochem. 2005. Vol. 95, № 4. P. 1201-14.

103. Caljon G. et al. Using microdialysis to analyse the passage of monovalent nanobodies through the blood-brain barrier. // Br J Pharmacol. 2012. Vol. 165, № 7. P. 2341-53.

104. Li T. et al. Cell-penetrating anti-GFAP VHH and corresponding fluorescent fusion protein VHH-GFP spontaneously cross the blood-brain barrier and specifically recognize astrocytes: application to brain imaging. // FASEB J. 2012. Vol. 26, № 10. P. 3969-79.

105. van de Water J. A. et al. Therapeutic stem cells expressing variants of EGFR-specific nanobodies have antitumor effects. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2012. Vol. 109, № 41. P. 16642-7.

106. Sarker S. A. et al. Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: a randomized placebo-controlled trial. // Gastroenterology. 2013. Vol. 145, № 4. P. 740-748 e8.

107. Cunningham S. et al. Nebulised ALX-0171 for respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection in hospitalised children: a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 2b trial. // Lancet Respir Med. 2021. Vol. 9, № 1. P. 21-32.

108. Maeda R. et al. A panel of nanobodies recognizing conserved hidden clefts of all SARS-CoV-2 spike variants including Omicron. // Commun Biol. 2022. Vol. 5, № 1. P. 669.

109. Cunha-Santos C. et al. Inhibition of HIV replication through siRNA carried by CXCR4-targeted chimeric nanobody. // Cell Mol Life Sci. 2020. Vol. 77, № 14. P. 2859-2870.

110. Gaiotto T. et al. Nanobodies mapped to cross-reactive and divergent epitopes on A(H7N9) influenza hemagglutinin using yeast display. // Sci Rep. 2021. Vol. 11, № 1. P. 3126.

111. King M. T. et al. Structural basis of V(H)H-mediated neutralization of the food-borne pathogen Listeria monocytogenes. // J Biol Chem. 2018. Vol. 293, № 35. P. 13626-13635.

112. Bernedo-Navarro R. A. et al. Structural Basis for the Specific Neutralization of Stx2a with a Camelid Single Domain Antibody Fragment. // Toxins (Basel). 2018. Vol. 10, № 3.

113. Dietrich M. H. et al. Nanobodies against Pfs230 block Plasmodium falciparum transmission. // Biochem J. 2022. Vol. 479, № 24. P. 2529-2546.

114. Ben Abderrazek R. et al. Development of Cys38 knock-out and humanized version of NbAahII10 nanobody with improved neutralization of AahII scorpion toxin. // Protein Eng Des Sel. 2011. Vol. 24, № 9. P. 727-35.

115. Richard G. et al. In vivo neutralization of alpha-cobratoxin with high-affinity llama single-domain antibodies (VHHs) and a VHH-Fc antibody. // PLoS One. 2013. Vol. 8, № 7. P. e69495.

116. Bailon Calderon H. et al. Development of Nanobodies Against Hemorrhagic and Myotoxic Components of Bothrops atrox Snake Venom. // Front Immunol. 2020. Vol. 11. P. 655.

117. Shramova E. I. et al. Genetically encoded BRET-activated photodynamic therapy for the treatment of deep-seated tumors. // Light Sci Appl. 2022. Vol. 11, № 1. P. 38.

118. Friedel T. et al. Receptor-targeted lentiviral vectors are exceptionally sensitive toward the biophysical properties of the displayed single-chain Fv. // Protein Eng Des Sel. 2015. Vol. 28, № 4. P. 93-106.

119. Lipatova A. V. et al. Multi-Omics Analysis of Glioblastoma Cells' Sensitivity to Oncolytic Viruses. // Cancers (Basel). 2021. Vol. 13, № 21.

120. Machulkin A. E. et al. Synthesis, Characterization, and Preclinical Evaluation of a Small-Molecule Prostate-Specific Membrane Antigen-Targeted Monomethyl Auristatin E Conjugate. // J Med Chem. 2021. Vol. 64, № 23. P. 17123-17145.

121. Lin K. Y. et al. Improved Stabilities of Labeling Probes for the Selective Modification of Endogenous Proteins in Living Cells and In Vivo. // Chem Asian J. 2021. Vol. 16, № 8. P. 937-948.

122. Anderson R. J. et al. NKT cell-dependent glycolipid-peptide vaccines with potent anti-tumour activity. // Chem Sci. 2015. Vol. 6, № 9. P. 5120-5127.

123. Kozlovskaya L. I. et al. Antiviral activity spectrum of phenoxazine nucleoside derivatives. // Antiviral Res. 2019. Vol. 163. P. 117-124.

124. Wilkins M. R. et al. Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. // Methods Mol Biol. 1999. Vol. 112. P. 531-52.

125. Jiang W. et al. Small but Mighty: Nanobodies in the Fight Against Infectious Diseases. // Biomolecules. 2025. Vol. 15, № 5.

126. Liu M. et al. Nanobody-A versatile tool for cancer diagnosis and therapeutics. // Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2021. Vol. 13, № 4. P. e1697.

127. Amanat F. et al. A serological assay to detect SARS-CoV-2 seroconversion in humans. // medRxiv. 2020. 10.1101/2020.03.17.20037713.

128. Жучков В. А. и др. Получение серии нейтрализующих нанотел к S-белку SARS-CoV-2. // Молекулярная биология. 2023. Vol. 57, № 3. P. 505-516.

129. Fathi-Roudsari M., Akhavian-Tehrani A., Maghsoudi N. Comparison of Three Escherichia coli Strains in Recombinant Production of Reteplase. // Avicenna J Med Biotechnol. 2016. Vol. 8, № 1. P. 16-22.

130. Bates T. A. et al. Biolayer interferometry for measuring the kinetics of protein-protein interactions and nanobody binding. // Nat Protoc. 2025. Vol. 20, № 4. P. 861-883.

131. Zhang Y., Zhang H., Zhang W. SARS-CoV-2 variants, immune escape, and countermeasures. // Front Med. 2022. Vol. 16, № 2. P. 196-207.

132. Chen K. K., Tsung-Ning Huang D., Huang L. M. SARS-CoV-2 variants - Evolution, spike protein, and vaccines. // Biomed J. 2022. Vol. 45, № 4. P. 573-579.

133. Jackson C. B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. // Nat Rev Mol Cell Biol. 2022. Vol. 23, № 1. P. 3-20.

134. Shang J. et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2020. Vol. 117, № 21. P. 11727-11734.

135. Yu S. et al. SARS-CoV-2 spike engagement of ACE2 primes S2' site cleavage and fusion initiation. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2022. Vol. 119, № 1.

136. Shi W. et al. Effect of the S2' site cleavage on SARS-CoV-2 spike. // Nat Commun. 2025. Vol. 16, № 1. P. 11675.

137. Yu S. et al. Antibody-mediated spike activation promotes cell-cell transmission of SARS-CoV-2. // PLoS Pathog. 2023. Vol. 19, № 11. P. e1011789.

138. Lusvarghi S. et al. Capture of fusion-intermediate conformations of SARS-CoV-2 spike requires receptor binding and cleavage at either the S1/S2 or S2' site. // PLoS Pathog. 2025. Vol. 21, № 4. P. e1012808.

139. Hurlburt N. K. et al. Structural basis for potent neutralization of SARS-CoV-2 and role of antibody affinity maturation. // Nat Commun. 2020. Vol. 11, № 1. P. 5413.

140. Nakamura T. et al. Antibody-targeted cell fusion. // Nat Biotechnol. 2004. Vol. 22, № 3. P. 331-6.

141. Palomares K. et al. Nipah virus envelope-pseudotyped lentiviruses efficiently target ephrinB2-positive stem cell populations in vitro and bypass the liver sink when administered in vivo. // J Virol. 2013. Vol. 87, № 4. P. 2094-108.

142. Morizono K. et al. Antibody-directed targeting of retroviral vectors via cell surface antigens. // J Virol. 2001. Vol. 75, № 17. P. 8016-20.

143. Funke S. et al. Targeted cell entry of lentiviral vectors. // Mol Ther. 2008. Vol. 16, № 8. P. 1427-36.

144. Munch R. C. et al. DARPins: an efficient targeting domain for lentiviral vectors. // Mol Ther. 2011. Vol. 19, № 4. P. 686-93.

145. Levy C., Verhoeyen E., Cosset F. L. Surface engineering of lentiviral vectors for gene transfer into gene therapy target cells. // Curr Opin Pharmacol. 2015. Vol. 24. P. 79-85.

146. Bender R. R. et al. Receptor-Targeted Nipah Virus Glycoproteins Improve Cell-Type Selective Gene Delivery and Reveal a Preference for Membrane-Proximal Cell Attachment. // PLoS Pathog. 2016. Vol. 12, № 6. P. e1005641.

147. Rasbach A. et al. The receptor attachment function of measles virus hemagglutinin can be replaced with an autonomous protein that binds Her2/neu while maintaining its fusion-helper function. // J Virol. 2013. Vol. 87, № 11. P. 6246-56.

148. Aguilar H. C. et al. Paramyxovirus Glycoproteins and the Membrane Fusion Process. // Curr Clin Microbiol Rep. 2016. Vol. 3, № 3. P. 142-154.

149. Strebinger D. et al. Cell type-specific delivery by modular envelope design. // Nat Commun. 2023. Vol. 14, № 1. P. 5141.

150. Mao X. et al. Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. // Mol Cancer. 2021. Vol. 20, № 1. P. 131.

151. Yi M. et al. Regulation of PD-L1 expression in the tumor microenvironment. // J Hematol Oncol. 2021. Vol. 14, № 1. P. 10.

152. Stark M. C., Joubert A. M., Visagie M. H. Molecular Farming of Pembrolizumab and Nivolumab. // Int J Mol Sci. 2023. Vol. 24, № 12.

153. Sun L., Yi S. N., Chen L. [Effects of Foxp3 knockdown on the functions of human regulatory T cells]. // Zhonghua Yi Xue Za Zhi. 2011. Vol. 91, № 30. P. 2124-8.

154. Colbeck E. J. et al. Treg Depletion Licenses T Cell-Driven HEV Neogenesis and Promotes Tumor Destruction. // Cancer Immunol Res. 2017. Vol. 5, № 11. P. 1005-1015.

155. Kalinin R. S. et al. Engineered Removal of PD-1 From the Surface of CD19 CAR-T Cells Results in Increased Activation and Diminished Survival. // Front Mol Biosci. 2021. Vol. 8. P. 745286.

156. Zhuchkov V. A. et al. PD1-Targeted Transgene Delivery to Treg Cells. // Viruses. 2024. Vol. 16, № 12.

157. Deonarain M. P. et al. Small-Format Drug Conjugates: A Viable Alternative to ADCs for Solid Tumours? // Antibodies (Basel). 2018. Vol. 7, № 2.

158. de Bruin R. C. G. et al. A bispecific nanobody approach to leverage the potent and widely applicable tumor cytolytic capacity of Vgamma9Vdelta2-T cells. // Oncoimmunology. 2017. Vol. 7, № 1. P. e1375641.

159. Moliner-Morro A. et al. Picomolar SARS-CoV-2 Neutralization Using Multi-Arm PEG Nanobody Constructs. // Biomolecules. 2020. Vol. 10, № 12.

160. Cloutier S. M. et al. Streptabody, a high avidity molecule made by tetramerization of in vivo biotinylated, phage display-selected scFv fragments on streptavidin. // Mol Immunol. 2000. Vol. 37, № 17. P. 1067-77.

161. Edelweiss E. et al. Barnase as a new therapeutic agent triggering apoptosis in human cancer cells. // PLoS One. 2008. Vol. 3, № 6. P. e2434.

162. Best R. L. et al. Microtubule and tubulin binding and regulation of microtubule dynamics by the antibody drug conjugate (ADC) payload, monomethyl auristatin E (MMAE): Mechanistic insights into MMAE ADC peripheral neuropathy. // Toxicol Appl Pharmacol. 2021. Vol. 421. P. 115534.

163. Castellino S. M. et al. Brentuximab Vedotin with Chemotherapy in Pediatric High-Risk Hodgkin's Lymphoma. // N Engl J Med. 2022. Vol. 387, № 18. P. 1649-1660.

164. Sehn L. H. et al. Polatuzumab Vedotin in Relapsed or Refractory Diffuse Large B-Cell Lymphoma. // J Clin Oncol. 2020. Vol. 38, № 2. P. 155-165.

165. Kozlovskaya L. I. et al. Phenoxazine nucleoside derivatives with a multiple activity against RNA and DNA viruses. // Eur J Med Chem. 2021. Vol. 220. P. 113467.

166. Imbiakha B. et al. Novel nanobody drug conjugate as a prophylactic or therapeutic against SARS-CoV-2 infection in mice. // Biochem Biophys Res Commun. 2025. Vol. 753. P. 151480.

167. Ulyanova V., Vershinina V., Ilinskaya O. Barnase and binase: twins with distinct fates. // FEBS J. 2011. Vol. 278, № 19. P. 3633-43.

168. Jovcevska I., Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. // BioDrugs. 2020. Vol. 34, № 1. P. 11-26.

169. Mustafa M. I., Mohammed A. Revolutionizing antiviral therapy with nanobodies: Generation and prospects. // Biotechnol Rep (Amst). 2023. Vol. 39. P. e00803.

170. Xu C. et al. TROP2-directed nanobody-drug conjugate elicited potent antitumor effect in pancreatic cancer. // J Nanobiotechnology. 2023. Vol. 21, № 1. P. 410.

171. Sun Z. et al. Preclinical assessment of a novel human antibody VH domain targeting mesothelin as an antibody-drug conjugate. // Mol Ther Oncolytics. 2023. Vol. 31. P. 100726.

172. Fan J. et al. A multivalent biparatopic EGFR-targeting nanobody drug conjugate displays potent anticancer activity in solid tumor models. // Signal Transduct Target Ther. 2021. Vol. 6, № 1. P. 320.

173. Panda M. et al. Nanobody-peptide-conjugate (NPC) for passive immunotherapy against SARS-CoV-2 variants of concern (VoC): a prospective pan-coronavirus therapeutics. // Mol Divers. 2023. Vol. 27, № 6. P. 2577-2603.

174. Liu X. et al. A monoclonal anti-hemagglutinin stem antibody modified with zanamivir protects against both influenza A and B viruses. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2025. Vol. 122, № 15. P. e2424889122.

175. Liu X. et al. An armed anti-immunoglobulin light chain nanobody protects mice against influenza A and B infections. // Sci Immunol. 2023. Vol. 8, № 84. P. eadg9459.

176. Paulik M. et al. Drug-antibody conjugates with anti-HIV activity. // Biochem Pharmacol. 1999. Vol. 58, № 11. P. 1781-90.

177. Pincus S. H. et al. Conjugation of anti-HIV gp41 monoclonal antibody to a drug capable of targeting resting lymphocytes produces an effective cytotoxic anti-HIV immunoconjugate. // J Virol. 2024. Vol. 98, № 10. P. e0064724.

178. Gavrilyuk J. et al. Antibody conjugation approach enhances breadth and potency of neutralization of anti-HIV-1 antibodies and CD4-IgG. // J Virol. 2013. Vol. 87, № 9. P. 4985-93.

179. Singh S. et al. Sortase-click strategy for defined protein conjugation on a heptavalent cyclodextrin scaffold. // PLoS One. 2019. Vol. 14, № 5. P. e0217369.

180. Leung M. K. et al. Bio-click chemistry: enzymatic functionalization of PEGylated capsules for targeting applications. // Angew Chem Int Ed Engl. 2012. Vol. 51, № 29. P. 7132-6.

181. Dundas C. M., Demonte D., Park S. Streptavidin-biotin technology: improvements and innovations in chemical and biological applications. // Appl Microbiol Biotechnol. 2013. Vol. 97, № 21. P. 9343-53.

182. Valadon P. et al. Designed auto-assembly of nanostreptabodies for rapid tissue-specific targeting in vivo. // J Biol Chem. 2010. Vol. 285, № 1. P. 713-22.

183. Ratnikova N. M. et al. A Novel Anti-CD47 Nanobody Tetramer for Cancer Therapy. // Antibodies (Basel). 2024. Vol. 13, № 1.

184. de Sousa-Pereira P., Woof J. M. IgA: Structure, Function, and Developability. // Antibodies. 2019. Vol. 8, № 4. P. 57.

185. Finkelshtein D. et al. LDL receptor and its family members serve as the cellular receptors for vesicular stomatitis virus. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2013. Vol. 110, № 18. P. 7306-11.

186. Vongpunsawad S. et al. Selectively receptor-blind measles viruses: Identification of residues necessary for SLAM- or CD46-induced fusion and their localization on a new hemagglutinin structural model. // J Virol. 2004. Vol. 78, № 1. P. 302-13.

187. Enkirch T. et al. Targeted lentiviral vectors pseudotyped with the Tupaia paramyxovirus glycoproteins. // Gene Ther. 2013. Vol. 20, № 1. P. 16-23.

188. Argaw T. et al. In vivo targeting of lentiviral vectors pseudotyped with the Tupaia paramyxovirus H glycoprotein bearing a cell-specific ligand. // Mol Ther Methods Clin Dev. 2021. Vol. 21. P. 670-680.

189. Nikolic J. et al. Structural basis for the recognition of LDL-receptor family members by VSV glycoprotein. // Nat Commun. 2018. Vol. 9, № 1. P. 1029.

190. Zhuchkov V. A. et al. Switchable Retargeting of Lentiviral Vectors Through a VSV-G-Binding Adapter Molecule. // Viruses. 2025. Vol. 17, № 12.