

На правах рукописи

Жучков Владислав Александрович

Нанотела в качестве инструмента контроля развития вирусной инфекции

1.5.3 – Молекулярная биология

Автореферат диссертации на соискание ученой
степени кандидата биологических наук

Москва, 2026 г.

Работа выполнена в лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Чумаков Степан Петрович, кандидат биологических наук.

Официальные оппоненты:

Тиллиб Сергей Владимирович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук.

Тикунова Нина Викторовна, доктор биологических наук, главный научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре СО РАН.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится «25» ноября 2026 г. в 11:00 на заседании диссертационного совета 24.1.037.01 при ГНЦ ИБХ РАН по адресу: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и на сайте www.ibch.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2026 года.

Учёный секретарь диссертационного совета,
доктор физико-математических наук
Олейников В.А.



ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 переменные (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 тканепроницающая 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 в качестве 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 avidности, 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 IC₅₀ и усиление связывания с мишенью, а также подтверждена противоопухолевая активность тетрамерного комплекса *in vivo*. Полученные результаты экспериментально обосновывают перспективность подхода повышения avidности 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 псевдорцепторные 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.

Методы исследования

В работе использован комплекс современных молекулярно-биологических, биохимических и клеточных методов. Получение нанотел осуществляли методом фагового дисплея с последующим скринингом и отбором высокоаффинных клонов. Специфичность связывания и аффинность исследовали с использованием ИФА и биослойной интерферометрии. Для повышения функциональной активности применяли методы генно-инженерного конструирования и химической функционализации, включая создание мультимерных форм нанотел (димеров, тетрамеров, стрептавидин-зависимых комплексов). Нейтрализующую активность оценивали в системах с псевдотипированными лентивирусами, живыми вирусами, в клеточных моделях с использованием репортерных генов и проточной цитометрии. Исследования по ретаргетированию проводили с применением лентивирусных векторов, модифицированных гликопротеинов и биспецифических адаптерных конструкций. Функциональная активность и селективность оценивались на различных клеточных линиях, включая опухолевые, а также в смешанных культурах. Эксперименты *in vivo* выполняли на моделях вирусной инфекции у сирийских хомяков и ксенотрансплантатах опухолей у иммунодефицитных мышей с оценкой динамики заболевания и роста опухоли. Статистическую обработку данных проводили с использованием стандартных методов анализа и программного обеспечения GraphPad Prism 8.

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. Разработаны функционально активные молекулы 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 псевдорцептора 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.

Степень достоверности результатов

Степень достоверности полученных результатов обеспечивается использованием комплекса взаимодополняющих экспериментальных подходов, включающих молекулярно-биологические, биохимические, клеточные и *in vivo* методы. Все ключевые выводы подтверждены серией независимых экспериментов, проведённых с использованием положительных и отрицательных контролей. Связывающие и функциональные характеристики нанотел оценивались с применением валидированных методов (ИФА, биослойная интерферометрия, клеточные тесты с репортерными системами), что обеспечивает воспроизводимость и сопоставимость данных. Статистическая обработка данных проводилась с использованием общепринятых методов анализа, а выявленные различия подтверждены критериями значимости.

Апробация работы

Результаты диссертационной работы были представлены в виде стендового доклада и опубликованы в виде тезиса на XXXV зимней молодёжной научной школе «перспективные направления физико- химической биологии и биотехнологии» в 2023 г. Основные результаты работы опубликованы в 4-х статьях в рецензируемых научных изданиях и на результаты работы получен 1 патент.

Структура и объём диссертации

Текст диссертации изложен на 185 страницах, иллюстрирован 40 рисунками, 11 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, выводов, списка сокращений, списка литературы, включающего 190 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Отбор нанотел к шиповидному белку SARS-CoV-2

Были иммунизированы два взрослых альпака полноразмерным гомотримерным S-белком и RBD, что индуцировало специфический иммунный ответ для создания фаговой библиотеки VNN. Повышенные титры антител в ИФА позволили перейти к сборке библиотек. Из мононуклеарных клеток периферической крови выделили РНК, клонировали фрагменты VNN в pHEN2 и электропорацией ввели в *E. coli* TG1, получив 4 библиотеки (>50 млн колоний каждая). Для двух библиотек предварительно обогатили В-клеточную фракцию на S-белке. Провели по два раунда фаговой селекции: первый - на соответствующих антигенах, второй - перекрёстный (на S-белке и RBD) для повышения специфичности к нативному RBD и исключения неспецифичных клонов.

ИФА выявило обогащение библиотек по количеству и доле специфичных клонов (Рисунок 1А). Наибольшее разнообразие уникальных клонов наблюдалось в библиотеках 2R и 1S из обогащённых В-клеток, подтвердив эффективность предварительной селекции В-лимфоцитов и перекрёстного отбора для удаления нежелательных последовательностей.

Далее был проведён ИФА моноклональных фагов, для которого из каждой из восьми полученных селекционных библиотек было отобрано по 24 наиболее перспективных клон. В ходе этого эксперимента были выделены клоны, продемонстрировавшие высокий уровень сигнала, что указывает на их способность специфично связываться с целевым белком. Суммарно было отобрано 96 образцов: 44 образца из селектированных против S-белка во втором раунде, 52 – против RBD. Для облегчения дифференцирования клонов из разных библиотек, перед кодом рассматриваемого клон будут использоваться цифры, соответствующие белку, использованному во втором раунде селекции: 1 – S-белок, 2 – RBD.

После отбора мы провели рестрикционное картирование и секвенирование отдельных клонов. По результатам было сформировано окончательное распределение отобранных клонов в 13 семейств, с разным уровнем представленности в библиотеках. Из каждого семейства было отобрано по кандидатному варианту для дальнейшего тестирования: 1B6, 1H3, 2A7, 2C12, 2E6, 2F12, 1D10, 1G11, 2B4, 2F8, 1C8, 2B2, 2G11. Специфичность связывания у кандидатных вариантов была подтверждена ИФА.

Для получения чистого белкового препарата мы провели молекулярное клонирование кандидатных вариантов в экспрессионный вектор pET32b. В ходе работы 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. 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 1).

Таблица 1. Константы диссоциации отобранных нанотел при связывании с S-белком.

Нанотело	Иммуноген	Селекция (раунды 1/2)	Константа диссоциации (M)
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}

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.

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.

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 рецептором ACE2. Интенсивность изменения оптической плотности при разных концентрациях нанотел позволило количественно оценить их эффективность в блокировании взаимодействия вирусного белка с рецептором (Рисунок 1Б).

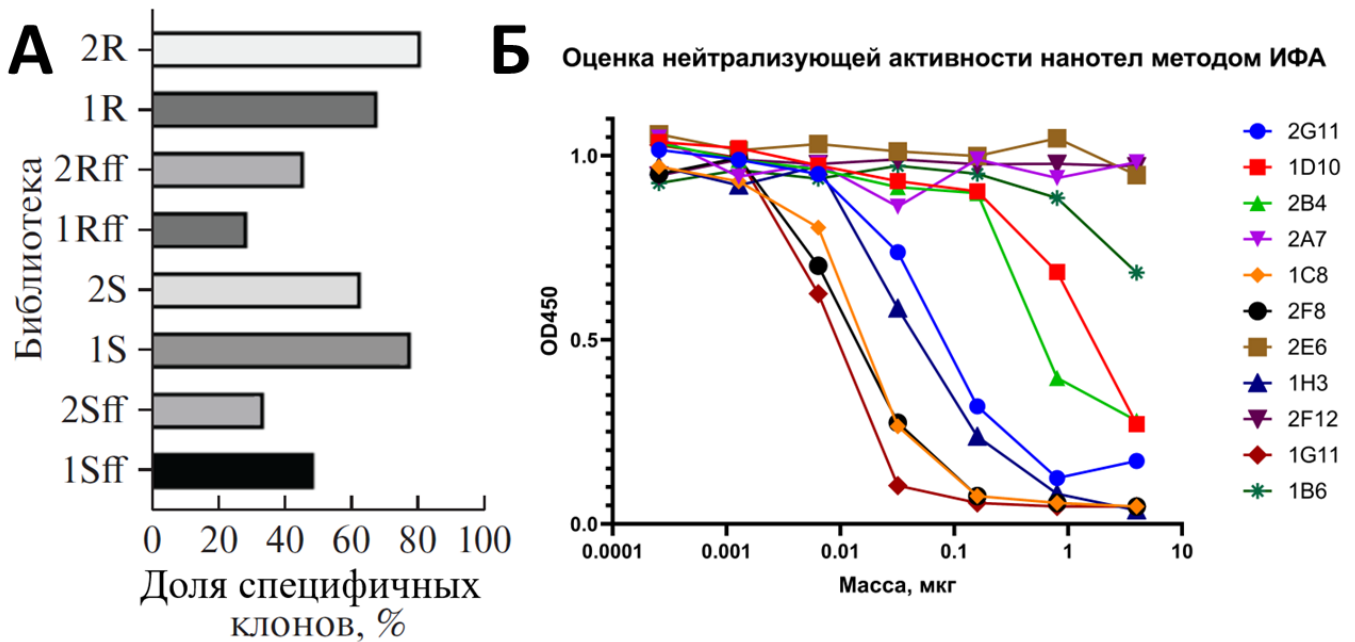


Рисунок 1. А - Оценка обогащения фаговых библиотек специфичными вариантами нанотел. Б - График нейтрализации S-белка нанотелами с использованием конкурентного ИФА.

По полученным данным 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.

Проверка нейтрализующей активности с использованием псевдотипированного лентивируса

Следующим этапом оценки стало тестирование нанотел на эукариотической клеточной линии с применением псевдотипированного S-белком SARS-CoV-2 лентивирусного вектора на линии НЕК-293Т, с введённой экспрессионной кассетой для презентации ACE2 на своей поверхности.

Несколько нанотел продемонстрировали 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 2, где наглядно показана их эффективность в подавлении связывания вируса с рецептором.

Таблица 2. Ранжирование нанотел по уровню нейтрализации.

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

Проверка нейтрализующей активности на живом вирусе варианта Ухань

Нанотела были протестированы в реакции с живым вирусом варианта Ухань. Уровень нейтрализации оценивали по возникновению ЦПЭ на лунках с Vero при разном разведении исследуемых нанотел. Данные представлены в Таблице 3, где активность препаратов выражена в виде 50% эффективной концентрации (EC₅₀).

Таблица 3. Оценка результатов нейтрализации вируса SARS-CoV-2 отобранными нанотелами.

№	Наименование	Исходная концентрация, мг/мл	Эксперимент 1		Эксперимент 2		EC ₅₀ (M±SD), мкг/мл
			Разведение	EC ₅₀ , мкг/мл	Разведение	EC ₅₀ , 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

Эффект нейтрализации вируса был зафиксирован для образцов 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.

Биннинг нейтрализующих нанотел

После подтверждения нейтрализующей активности некоторых вариантов нанотел произведена оценка перекрытия их эпитопов связывания. Для этого был проведен биннинг нейтрализующих нанотел 1H3, 2F8, 1D10, 2G11 и 2B4 с помощью прибора для биослойной интерферометрии BLITz.

В результате было обнаружено, что все нейтрализующие варианты нанотел специфически связываются именно с RBD. Полного перекрытия эпитопов связывания не наблюдается. Некоторые образцы, вероятно, имеют небольшие зоны перекрытия (2F8 с 2G11, 2B4 и 1D10, 1D10 и 1H3).

Экспрессия в слитом с Fc виде

Для изучения возможности усиления нейтрализующего эффекта за счет конверсии нанотел в формат полноразмерного тяжелцепочечного антитела был разработан модифицированный вариант на основе 1D10. В результате проведенных работ был получен чистый и стабильный белковый препарат, который использовался в последующих экспериментах для оценки его функциональных свойств и сравнения эффекта нейтрализации относительно мономерных вариантов.

Подтверждение нейтрализующей активности нанотел в отношении разных вариантов вируса

С появлением новых вариантов вируса стало необходимым провести проверку нейтрализующей активности отобранных нанотел в отношении изменённого S-белка. Было проведено тестирование образцов (1D10, 2F8 и 1H3) на разных вариантах SARS-CoV-2 (B.1.1 (Ухань), B.1.617.2 (Дельта), B.1.1.529 (Омикрон)) в постановке с псевдотипированным вектором и живым вирусом (Рисунок 2).

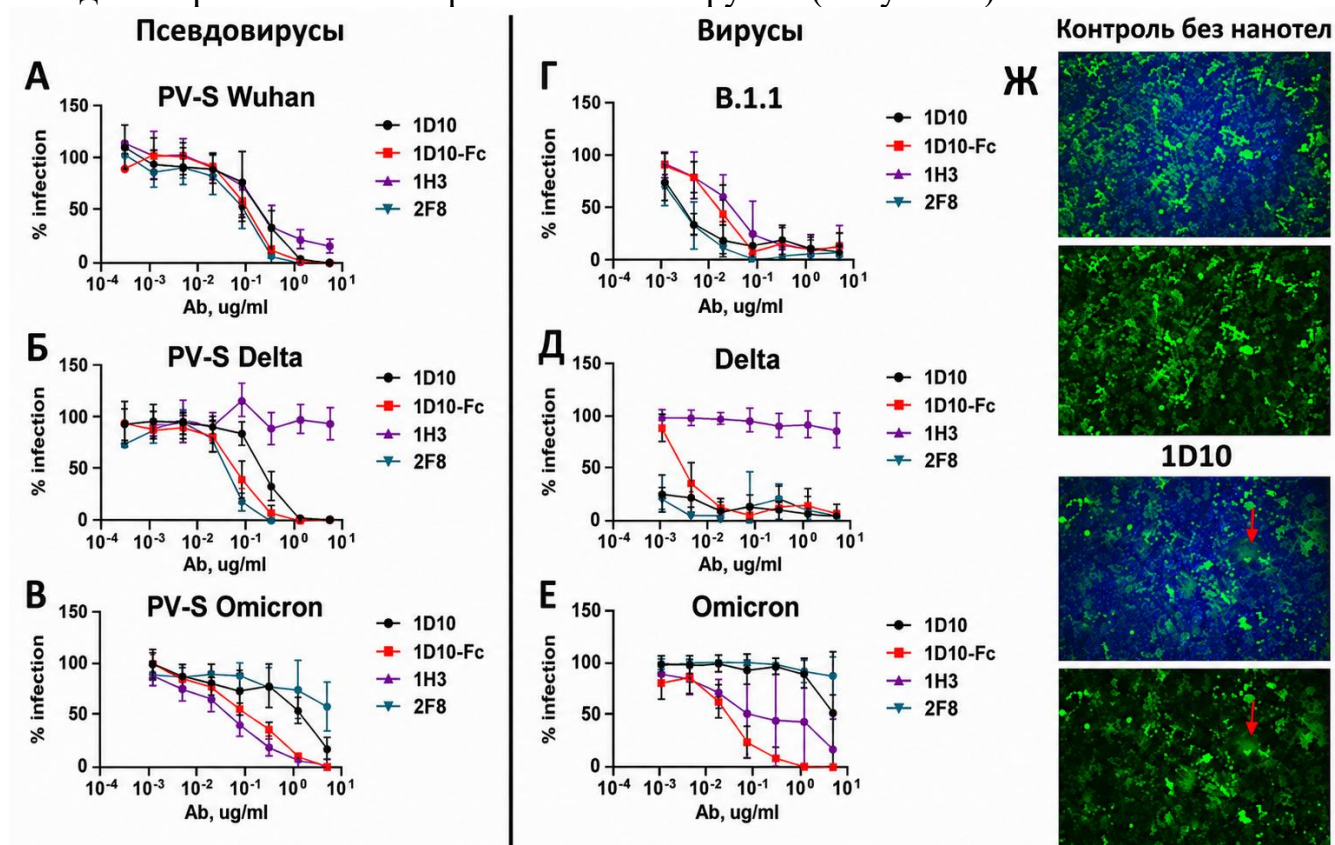


Рисунок 2. А – Е - Графики нейтрализации нанотелами различных вариантов вируса SARS-CoV-2. А-В – графики нейтрализации при использовании псевдотипированных лентивирусов. Г-Е – графики нейтрализации при использовании препаратов живого вируса. Ж – Образование синцитиев в присутствии 1D10.

У всех образцов нанотел была подтверждена нейтрализующая активность на варианте B.1.1. 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.

В дополнение, также провели оценку нейтрализующей активности нанотела 1D10 (в мономерном и тяжелоцепочечном виде) при использовании модели заражения, имитирующей передачу вируса (Ухань и Дельта) от инфицированной клетки к соседней здоровой через мембранные контакты. Мы установили, что нанотело 1D10 обладает способностью эффективно ингибировать не только заражение клеток свободными вирусными частицами, но и межклеточную передачу инфекции. Мономерный формат 1D10 превосходил тяжелоцепочечный аналог в способности препятствовать межклеточному распространению вируса.

Стимуляция образования синцитиев нанотелом 1D10

Интересным результатом экспериментов стало образование синцитиев при использовании нанотела 1D10 в концентрации ≥ 5 мкг/мл (Рисунок 2Ж), что не наблюдалось при обработке другими исследуемыми образцами и вызвало необходимость изучения механизма этого явления.

Основной гипотезой стало предположение о способности 1D10 усиливать протеолитическую активацию S-белка SARS-CoV-2 до формирующейся на клеточной поверхности S2'-формы, которая, согласно литературным данным, играет ключевую роль в слиянии мембран вируса и клетки и инициирует инфицирование. Анализ лизатов клеток показал значительное увеличение уровня S2'-субъединицы в присутствии 1D10, в том числе в условиях мутантного сайта расщепления фурина и при отсутствии ACE2-экспрессии на мишени. Литературные данные свидетельствуют, что взаимодействие S-белка с ACE2 и последующая протеолитическая обработка, включая образование S2', служат молекулярным «переключателем» слияния, хотя синцитиеобразование может происходить и при нарушении этой стадии. Ряд работ также показывает, что антитела и нанотела к S-белку способны модулировать его протеолитическую обработку и конформационную динамику, влияя на доступность участков, ответственных за связывание с рецептором и слияние мембран.

Полученные данные согласуются с литературой и указывают на то, что нанотело 1D10 усиливает протеолитическую активацию S-белка до S2', что способствует ускорению слияния клеточных мембран и образованию синцитиев. Дальнейшее исследование этого эффекта может расширить представления о механизмах функционирования SARS-CoV-2 и открыть перспективы разработки терапевтических стратегий, направленных на модуляцию слияния вируса с клеткой.

Экспрессия нанотел на поверхности клетки для оценки возникновения антителозависимого усиления инфекции

После выявления эффекта синцитиеобразования нанотелом 1D10 была проведена дополнительная оценка способности исследуемых нанотел индуцировать антителозависимое усиление инфекции (АЗУИ). Для этого были получены линии клеток НЕК-293Т, экспрессирующие различные варианты нанотел на поверхности, и проведён функциональный тест с псевдотипированным S-белком лентивирусом.

Установлено, что отдельные нанотела изменяли уровень вирусной инфекции. Наиболее выраженный эффект наблюдался для нанотел 1D10, 2A7 и 2F12, при этом 1D10 усиливало инфекцию более чем на 10 % по сравнению с отрицательным контролем (Рисунок 3Г). Полученные данные указывают на возможную способность данного нанотела опосредованно повышать эффективность проникновения вируса в клетки. Нанотела 2A7 и 2F12 вызывали лишь незначительное повышение уровня инфекции (менее 5 %). Такие исследования имеют важное значение при разработке нанотел в качестве терапевтических агентов, поскольку способность вызывать АЗУИ может ограничивать их клиническое применение.

Оценка подхода модуляции тропизма вируса при помощи нанотела

Поскольку нанотела обладают не только способностью блокировать вирус, но и уникальными свойствами, мы рассмотрели их применение не 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 примере нанотела (Рисунок 3).

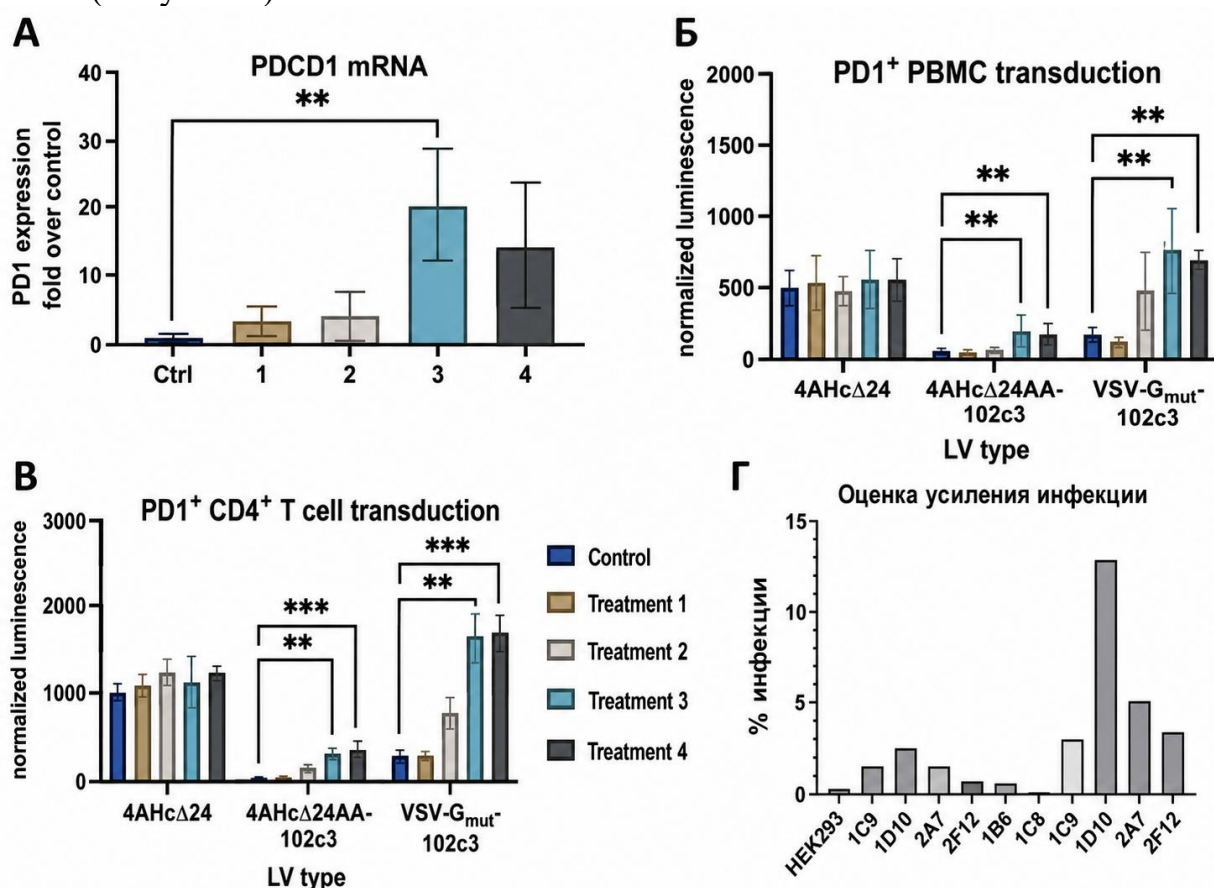


Рисунок 3. А – Количественный анализ уровня PDCD1 методом qPCR в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), культивированных с: IL-2 (контроль), IL-2 + РНА-М (1), РМА + иономицин + РНА-М (2), IL-2 + РНА-М + РМА + иономицин (3), и IL-2 + РНА-М + РМА + иономицин + IFN γ + IL-4 + IL-12 (4). Б - Уровни люминесценции panOLuc, нормализованные по количеству клеток, после трансдукции контрольными (4AhcΔ24) и таргетированными (4AhcΔ24AA-102c3, VSV-G_{mut}⁻-102c3) лентивекторами. В - Уровни люминесценции panOLuc в трансдуцированных CD4⁺ Т-клетках. Г - Оценка усиления инфекции при экспрессии нанотел на поверхности клеточной линии HEK-293Т. **Примечание:** ** - P < 0,0075, *** - P = 0,0005.

В рамках исследования, мы разработали 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. Мы интегрировали его в модифицированные гликопротеины вируса кори (рецептор-слепой (Y481A, R533A) белок Н из вируса кори с делецией 24 аминокислоты с N-конца - 4АНсΔ24АА-102с3) и VSV (с «ослепленным» рецептором), что позволило создать псевдотипированные лентивирусные векторы с избирательным тропизмом к PD1-положительным клеткам.

Эксперименты продемонстрировали высокую избирательность и эффективность ретаргетированной трансдукции активированных CD4⁺ Т-лимфоцитов и T_{reg}-лимфоцитов, экспрессирующих PD1, при использовании этих векторов (Рисунок 3). В частности, вариант с гликопротеином кори 4АНсΔ24АА-102с3 обеспечивал наиболее высокую специфичность, тогда как вариант с VSV-Gmut+102с3R давал более высокие инфекционные титры, но с меньшей избирательностью.

Анализ люминесценции показал, что эффективность трансдукции векторами с оболочками 4АНсΔ24АА-102с3 и VSVGmut+102с3R коррелирует с уровнем экспрессии PDCD1, чего не наблюдалось при использовании 4АНсΔ24 (Рисунок 3Б). При стимуляции клеток комбинацией IL-2, РНА-М, РМА и иономицина, а также с добавлением IFN γ , IL-4 и IL-12, наблюдалось достоверное увеличение сигнала у клеток, трансдуцированных указанными таргетированными векторами, по сравнению с контролем (Рисунок 3В). При этом наибольшую активность nanoLuc показали клетки, трансдуцированные векторами с VSVGmut+102с3R, 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 против FOXP3. В результате наблюдалось снижение экспрессии FOXP3 и уровня секреции TGF- β , что свидетельствует о функциональной супрессии Treg-фенотипа. 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. На основе этого подхода могут быть разработаны новые методы иммунотерапии.

Модификации нанотел

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 потенциал: конъюгация с полезной нагрузкой и мультимеризация (Рисунок 4).

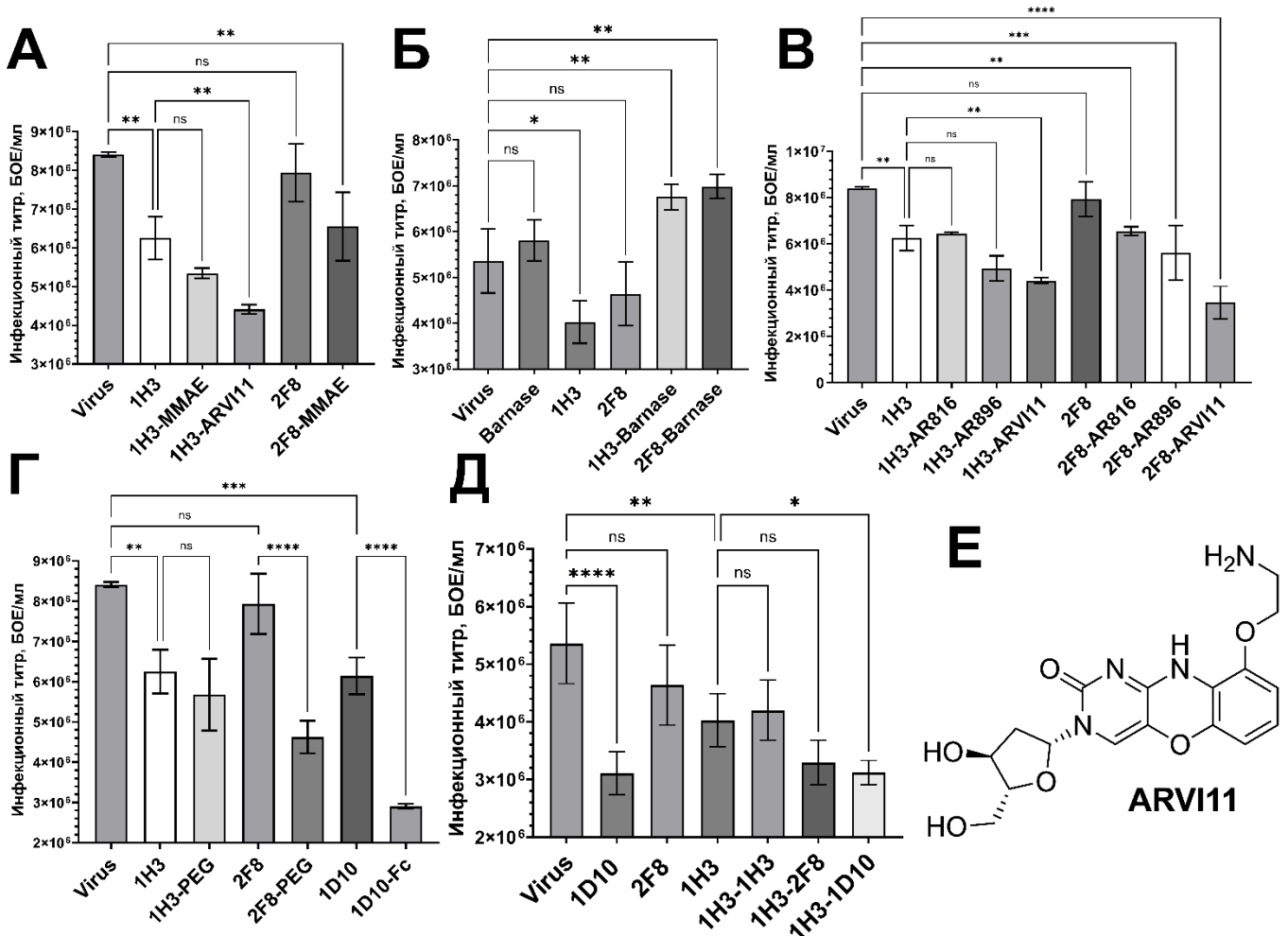


Рисунок 4. Результаты клеточных тестов по оценке изменения уровня нейтрализации при использовании модифицированных конструкций нанотел. А – Конъюгаты с полезной нагрузкой. Б – конъюгаты с барназой. В -конъюгаты с ARVI11 с различными типами линкера. Г – тетрамерные и тяжелоцепочесные конструкторы. Д – димеры нанотел. Е – Химическая структура ARVI11. **Примечание:** * - $P < 0.05$; ** - $P < 0.01$; *** - $P < 0.001$; **** - $P < 0.0001$.

Конъюгация с полезной нагрузкой

Подход по конъюгации нанотел с полезной нагрузкой, основан на использовании высокоактивных цитотоксических или противовирусных соединений для избирательного воздействия на инфицированные клетки, предотвращая тем самым дальнейшую репликацию вируса. Использование нанотел, несущих цитотоксический или противовирусный агент, может позволить значительно повысить эффективность нейтрализации вируса.

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. Было отобрано 3 потенциально применимых

в данной области соединения: бактериальная рибонуклеаза – барназа (цитотоксическое действие), монометилауристин Е (ММАЕ, цитотоксическое действие), ARVI11 - производное 1,3-диаза-2-оксофеноксазина (цитотоксическое и противовирусное действие, Рисунок 4Е).

Тестирование 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 ММАЕ было опосредовано функционализацией нанотела DBCO, после чего проводили конъюгацию методом клик-химии (использовали расщепляемый линкер Val-Cit-PAB). Далее была проведена оценка активности всех полученных вариантов модифицированных молекул в клеточном тесте. Для эксперимента был выбран вариант В.1.1. 529 (Омикрон).

Эксперименты с химически синтезированными конъюгатами не выявили снижения нейтрализующей активности нанотел (Рисунок 4А). Конъюгация с ММАЕ не усиливала нейтрализацию в сочетании с нанотелом 1Н3, однако позволяла восстановить нейтрализующий эффект для 2F8. Вероятно, различия в эффективности связаны с низкой скоростью клеточного цикла, снижающей действие цитотоксической нагрузки. Наиболее выраженный эффект был получен при конъюгации нейтрализующего нанотела 1Н3 с противовирусной нагрузкой ARVI11, что сопровождалось статистически значимым усилением нейтрализации. Данный тип полезной нагрузки был определён как наиболее перспективный для дальнейших исследований. Предполагается, что использование ферментативно расщепляемого линкера может дополнительно повысить эффективность нейтрализации.

При тестировании конъюгатов с барназой наблюдалось статистически значимое усиление инфекции (Рисунок 4Б). Вероятно, такие конъюгаты усиливают взаимодействие вирусных частиц с клеточной мембраной за счёт неспецифического связывания или изменения поверхностного заряда вируса. Таким образом, конъюгат «нанотело–барназа» может функционировать как адаптер, обеспечивающий неспецифическое прикрепление вирусных частиц к клеткам.

Оценка влияния линкеров на конъюгацию и нейтрализующий эффект в клеточных тестах

Для оценки влияния линкера, используемого при конъюгации полезной нагрузки с нанотелом, и оптимизации конъюгации соединение ARVI11 было синтезировано в трёх разных модификациях: 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. Далее были проведены тесты по оценке изменения нейтрализующей противовирусной активности полученных конъюгатов на Омикрон варианте вируса.

Эксперимент показал, что тип используемого линкера оказывает значительное влияние на биологическую активность конечного конъюгата (Рисунок 4В). Наибольшую нейтрализующую активность проявил варианты, функционализованные 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 1НЗ-AR816 противовирусное действие было сопоставимо с исходным, немодифицированным 1НЗ. Учитывая схожую эффективность конъюгации у препаратов с AR896 и AR816, а также принимая во внимание, что теоретически активность 1НЗ/2F8-AR816 должна была быть близка к показателям 1НЗ/2F8-ARVI11, полученные результаты свидетельствуют о том, что использование расщепляемых линкеров, таких как Val-Cit-PAB, существенно повышает противовирусную активность феноксазин-содержащих антители-лекарственных конъюгатов.

Мы продемонстрировали, что связывание аналога нуклеозида с двойной противовирусной и цитотоксической активностью с нанотелами через расщепляемый линкер может существенно усилить нейтрализующую активность. Наши результаты предоставляют доказательство концепции для будущей разработки противовирусных конъюгатов с использованием полезных нагрузок.

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 - объединении четырёх нанотел в составе одной молекулы, что потенциально способствует более прочному и стабильному связыванию с мишенью за счёт мультвалентного взаимодействия. 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.

Тетрамер на основе ПЭГ

В данной работе была использована схема конъюгации четырех молекул нанотела с центральным звеном на основе разветвленного ПЭГ, содержащего четыре свободных азидных группы. Тетрамерные конструкции нанотел 1НЗ и 2F8 и были протестированы для оценки изменения эффективности их связывания с целевым белком путём измерения константы диссоциации.

В результате измерения константы диссоциации было обнаружено усиление связывания для тетрамерных комплексов. Было зафиксировано усиление связывания в 20,5 раз в случае комплекса на основе 1НЗ 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. Затем была проведена серия клеточных тестов с живым вирусом варианта Омикрон.

По результатам проведённого эксперимента не наблюдалось снижения нейтрализующей активности ни для одного из тестируемых препаратов (Рисунок 4Г).

Мономерное нанотело 2F8 не проявляло нейтрализующей активности в отношении варианта Омикрон. Однако его тетрамеризованный вариант обеспечивал статистически значимое повышение уровня нейтрализации. Мономерное нанотело 1H3, напротив, уже обладало выраженной нейтрализующей активностью. Тетрамерная конструкция на его основе сохраняла данный эффект, однако не приводила к его значимому усилению. Для нанотела 1D10 были исследованы мономерный и Fc-слитый (1D10-Fc) форматы. Оба варианта демонстрировали статистически значимую нейтрализующую активность, при этом для формата 1D10-Fc наблюдалось её достоверное усиление по сравнению с мономером.

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.

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. Исследование проводилось на модели инфекции SARS-CoV-2 у сирийских хомяков с целью оценки протективных свойств нанотел. Животных инфицировали интраназально и ежедневно наблюдали, фиксируя изменения массы тела и общее состояние. В первом эксперименте тестировали два варианта нанотел (1D10 и 1H3 в мономерном и тетрамерном формате), однако в экспериментальных группах динамика снижения массы тела и признаки интоксикации соответствовали негативному контролю. Протективного эффекта выявлено не было, несмотря на отсутствие летальности.

Во втором эксперименте расширили панель образцов и добавили положительный контроль - тяжелоцепочечное антитело scFvFc#7, представляющее собой формат нанотела 2F12 ($K_d \approx 1.01 \times 10^{-9}$), ранее отобранного методом фагового дисплея и показавшего высокую нейтрализующую активность, в том числе *in vivo*. Только этот контрольный образец продемонстрировал выраженные протективные свойства: состояние животных и динамика болезни были близки к интактной группе. При этом нанотела на основе 1H3 не показали значимого улучшения течения инфекции, что, вероятно, связано с их коротким временем циркуляции и проблемами стабильности тетрамерных форм.

В целом, наиболее перспективным оказался тяжелоцепочечный формат антител благодаря высокой стабильности, наличию двух эпитопов связывания и более длительной циркуляции в организме. Для повышения эффективности других форм нанотел необходима оптимизация способов введения (например, ингаляционного) и

совершенствование процессов их получения, что позволит увеличить биодоступность и расширить возможности применения *in vivo*.

Тетрамер на основе стрептавидина

В работе был рассмотрен подход тетрамеризации нанотел с использованием стрептавидина и образованием стабильного комплекса - стрептабоди. Метод имеет ограничения, связанные с потенциальной иммуногенностью стрептавидина *in vivo* и возможной дестабилизацией комплекса из-за конкуренции с эндогенным биотином. В связи с этим подход не применяли для SARS-CoV-2, а протестировали на модели с нанотелом к CD47 с использованием иммунодефицитных мышей Balb/c nude.

Из панели нанотел к CD47 наиболее эффективным оказался клон 47VНН1Н4, обладающий высокой специфичностью и наномолярным сродством ($K_d \approx 30$ нМ), а также превосходящий референсное антитело В6Н12.2 по способности блокировать взаимодействие CD47 с SIRP α . Для усиления его активности была получена биотинилированная форма (47VНН1Н4В) и тетрамерный комплекс (стрепто-47VНН1Н4В). В конкурентном ИФА тетрамер продемонстрировал более чем четырёхкратное снижение IC_{50} по сравнению с мономером. Эффективность комплекса была подтверждена *in vivo* на модели ксенотрансплантата опухоли U937 (Рисунок 5).

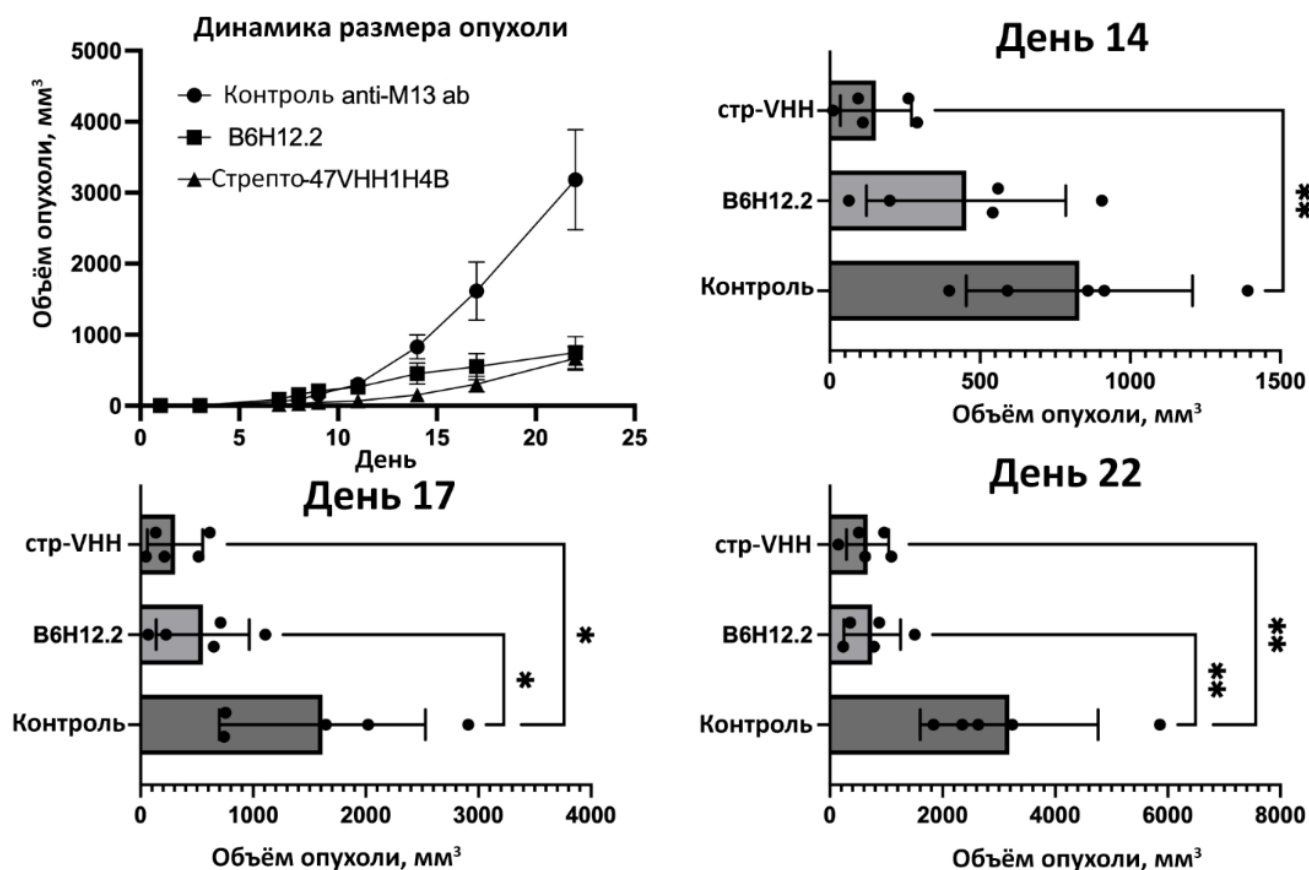


Рисунок 5. Динамика роста ксенотрансплантата опухоли U937 у мышей Balb/c nude, получавших лечение В6Н12.2, стрепто-47VНН1Н4В или контрольным антителом против М13, *— $P < 0,033$, **— $P < 0,0021$.

Лечение стрепто-47VНН1Н4В вызывало уменьшение объёма опухоли уже с 8-го дня, а к 14-му дню различия с контролем становились статистически значимыми.

К завершению эксперимента объём опухоли в обеих терапевтических группах (стрепто-47VНН1Н4В и В6Н12.2) был примерно в три раза меньше по сравнению с контролем, при этом тетрамер демонстрировал сопоставимую или немного более высокую эффективность.

Полученные результаты указывают, что тетрамеризация нанотел с использованием стрептавидина позволяет существенно повысить их функциональную активность и, вероятно, увеличивает время циркуляции в организме. Отсутствие значимых различий между препаратами может быть связано с особенностями модели (низкое сродство SIRP α мыши к человеческому CD47). В целом, подход подтверждает свою перспективность для усиления терапевтического потенциала нанотел за счёт мультивалентности.

Димерные конструкции нанотел

В качестве альтернативного усиления активности нанотел, были получены их димеризованные формы (≈ 35 кДа). Мы получили димерные белковые молекулы с различными комбинациями нанотел: 1НЗ-1НЗ, 1НЗ-2F8 и 1НЗ-1D10. Полученные конструкторы были протестированы на предмет связывающей способности и биологической активности. Аналогично тетрамерным комплексам, было произведено сравнительное измерение константы диссоциации у мономеров и димеров нанотел.

Результаты исследования димеризованных конструкций белков варьировались (Рисунок 4Д). В случае гомодимера 1НЗ-1НЗ наблюдалось усиление связывания в 2 раза. При исследовании гетеродимера 1НЗ-2F8 наблюдалось усиление в 41 раз относительно варианта 2F8 и в 21 раз относительно 1НЗ. В случае гетеродимера 1НЗ-1D10 при сравнении с мономерным вариантом 1D10 связывание усилилось в 135 раз, а с 1НЗ – в 13,3 раза. В целом полученные результаты свидетельствуют об увеличении функциональной avidности для всех димерных конструкторов. Положительные результаты эксперимента позволили нам перейти к клеточным тестам для оценки влияния димеризации на нейтрализующий эффект.

Не было зафиксировано ни значимого ослабления нейтрализации, ни её усиления. Кроме того, интересным наблюдением являлось то, что димеризованные конструкции сохраняли эффект нейтрализации в соответствии с наиболее сильным нейтрализующим нанотелом, присутствующим в паре. Результаты опыта показали, что нанотела сохраняют функциональную активность, находясь в составе димерной белковой молекулы и в N-концевом, и в C-концевом положении.

Адаптерная конструкция на основе нанотела для модуляции вирусного тропизма

Далее был испытан альтернативный метод влияния на тропизм вирусов с использованием адаптерной конструкции на основе нанотела. Была разработана 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.

Для реализации подхода получили нанотело к гликопротеину G вируса везикулярного стоматита (VSVG-B6) с высокой специфичностью и эффективностью связывания. Во второй домен биспецифического комплекса мы включили высокоаффинный DARPIn 9.29 к рецептору HER2 (ген ERBB2). Слиянием генетических последовательностей обеих молекул через гибкий линкер мы получили биспецифическую конструкцию, обладающую 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.

Мы параллельно трансдуцировали линии HEK-293LTV и HEK-ERBB2 лентивирусом, псевдотипированным VSV-Gmut. Для сравнительного контроля использовали лентивирус, собранный на линии с VSV-G-B6 как псевдорецептором. Трансдукцию проводили с градиентом концентрации 929-B6 в среде (Рисунок 6А, Б). 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).

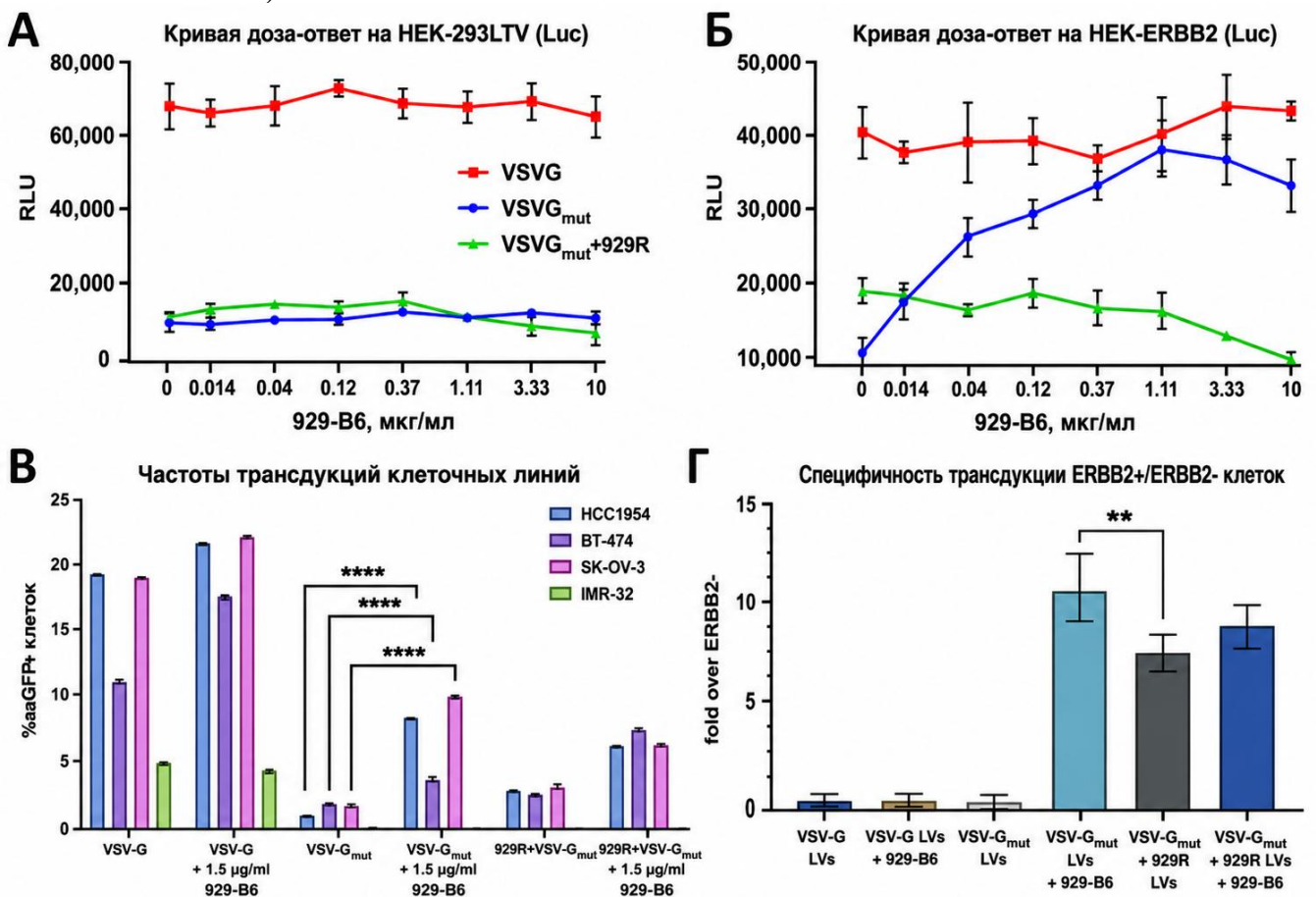


Рисунок 6. А-Б - Кривые зависимости доза-ответ, измеренные на клетках HEK-293LTV, трансдуцированных лентивирусами, псевдотипированными VSV-G, VSV-Gmut и VSV-Gmut+929R, несущими кассету экспрессии люциферазы светлячка, и предварительно обработанных 929-B6 в указанных концентрациях. В - Частоты трансдукций ERBB2+ линий и контрольной ERBB2- линии клеток IMR32. Г - Специфические соотношения трансдукции (ERBB2+/ERBB2-) соответствующих псевдотипов лентивирусных векторов при различных режимах обработки 929-B6.

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 5). Работоспособность разработанного подхода была подтверждена в модельных системах, после чего необходимо было повторить результат на опухолевых ERBB2-положительных клеточных линиях. В качестве экспериментальных линий мы отобрали три варианта – HCC1954, BT-474 и SKOV3, в качестве негативного контроля с низким уровнем экспрессии ERBB2 – IMR-32.

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 (Рисунок 6B). 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 мы решили провести трансдукцию культуры с разным содержанием ERBB2⁺ клеток. Смеси HEK-293LTV/HEK-ERBB2 (10–45% ERBB2⁺ клеток) трансдуцировали псевдотипами с/без 929-B6.

Для всех псевдотипов лентивирусов было отмечено общее повышение эффективности трансдукции при проведении предварительной инкубации с 929-B6 (Рисунок 6Г). 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. 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 (DARPs, наноантитела, scFv) позволяет развивать эту концепцию для широкого спектра мишеней.

1. 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} M) 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, псевдовиральных люциферазных системах, а также в экспериментах с живым вирусом, включая варианты Ухань, Дельта и Омикрон (EC_{50} 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 N 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 ValCitPAВ при идентичной стратегии конъюгации (SPAAC) способствует повышению эффективности нейтрализации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи в рецензируемых научных журналах:

1. **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. — DOI: 10.31857/S0026898423030230.
2. 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. — DOI: 10.3390/antib13010002.
3. **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. — DOI: 10.3390/v16121940. — PMID: 39772246; PMCID: PMC11680301.
4. **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. — DOI: 10.3390/v17121563.

Патенты РФ:

1. Патент № 2794141 С2 Российская Федерация, МПК С07К 16/10, А61К 39/42. Однодоменные наноантитела против шиповидного белка вируса SARS-CoV-2: № 2021117171: заявл. 11.06.2021: опубл. 11.04.2023 / С. П. Чумаков, **В. А. Жучков**. — EDN WLQICN.

Тезисы докладов:

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.