

УДК 571.27

# Наноантитело широкого спектра к гемагглютинуину вируса гриппа А подтипа Н3

Д. В. Щебляков<sup>1</sup>, Д. В. Воронина<sup>1\*</sup>, И. А. Фаворская<sup>1</sup>, И. Б. Есмагамбетов<sup>1</sup>, И. А. Алексеева<sup>1</sup>, А. И. Коробкова<sup>1</sup>, Е. И. Рябова<sup>1,2</sup>, А. А. Деркаев<sup>1</sup>, В. Ю. Кан<sup>1</sup>, А. Ш. Джаруллаева<sup>1</sup>, А. И. Тухватулин<sup>1</sup>, А. С. Банделюк<sup>1</sup>, М. М. Шмаров<sup>1</sup>, Д. Ю. Логунов<sup>1</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098 Россия

<sup>2</sup>Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, Москва, 109472 Россия

\*E-mail: daryavoronin2009@yandex.ru

Поступила в редакцию 24.01.2024

Принята к печати 09.02.2024

DOI: 10.32607/actanaturae.27374

**РЕФЕРАТ** Моноклональные антитела (мАт) и их антигенсвязывающие фрагменты являются перспективным средством борьбы с инфекционными заболеваниями. Наноантитела (VНН), благодаря уникальной структуре своего паратопа, имеют ряд преимуществ перед классическими мАт, особенно в случае вирусных инфекций. Вирусы гриппа А (ВГА) остаются серьезной угрозой для общественного здравоохранения. Основным протективным и иммунодоминантным антигеном ВГА является белок гемагглютинин (НА). В данной работе выделены три наноантитела с широкой реактивностью (D9.2, E12.2 и D4.2) к различным штаммам гриппа Н3N2, а также получены и охарактеризованы слитые с Fc-фрагментом VНН (VНН-Fc). Эта модификация улучшила связывающую способность VНН и позволила взаимодействовать с более широким спектром штаммов. Антитело D9.2-Fc продемонстрировало 100% защиту мышей от летального исхода *in vivo*. Кроме того, показано, что протективная активность D9.2-Fc обусловлена Fc-FcγR-взаимодействием. Представленные результаты говорят о том, что антитело D9.2-Fc может применяться как препарат, эффективный против инфекции, вызванной Н3N2.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** наноантитела, однодоменные антитела, вирус гриппа, гемагглютинин, Fc-фрагмент.  
**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВГА – вирус гриппа А; НА – гемагглютинин; VНН – варибельный домен тяжелоцепочечных антител представителей семейства Camelidae, наноантитело; ИФА – иммуноферментный анализ; ЕС<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация; ЛД<sub>50</sub> – полулетальная доза; мАт – моноклональные антитела; Fc – кристаллизующийся фрагмент антитела; SDS-PAGE – электрофорез белков в полиакриламидном геле; НRP – пероксидаза хрена; ОП<sub>450 нм</sub> – оптическая плотность, измеренная при длине волны 450 нм; РТГА – реакция торможения гемагглютинации; РН – реакция нейтрализации; ДТТ – дитиотреитол; SEM – стандартная ошибка среднего.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирусы Н3N2 являются одними из возбудителей ежегодных сезонных эпидемий гриппа; представители данного подтипа ВГА циркулируют в человеческой популяции с 1968 г. [1]. Сезонную инфекцию Н3N2 в разные годы связывают с беспрецедентным увеличением количества госпитализаций пациентов с пневмонией в отделения интенсивной терапии [2], а также с высокой летальностью и частотой осложнений [3–5].

Вакцинация остается наиболее распространенной мерой борьбы с гриппом; однако ее эффективность сильно варьирует в различные эпидсезоны [6, 7].

Помимо низкой эффективности профилактических мер, активность современных противовирусных препаратов также снижается из-за растущей резистентности вируса [8, 9]. В связи с этим актуальна разработка новых универсальных противовирусных препаратов и терапевтических мАт против гриппа. Антигенсвязывающие фрагменты тяжелоцепочечных антител представителей семейства Camelidae (наноантитела, VНН) являются перспективным инструментом для ранней этиотропной терапии инфекционных заболеваний. VНН представляют собой полностью функциональный домен, который связывается с антигеном с высокой аффинностью

и специфичностью. Наноантитела также обладают выдающимися биохимическими характеристиками, такими, как хорошая растворимость и термическая/pH стабильность [10]. Более того, VHH кодируются одним полипептидом, поэтому их можно легко модифицировать, например, слить с Fc IgG [11, 12].

Основной мишенью иммунного ответа является гликопротеин HA; на сегодняшний день известно 18 различных вариантов HA [13, 14], образующих две филогенетические группы [15]. HA состоит из двух субъединиц – HA1 и HA2, играющих разную роль в инициации инфекционного процесса. Описано несколько антител, специфичных к HA подтипа H3 или всей филогенетической группе 2, с различными механизмами действия [16–27]. Одним из таких механизмов, вовлеченных в ликвидацию гриппозной инфекции, являются Fc-опосредованные функции антител [28, 29].

В данной работе мы выделили три H3-специфичных VHH, которые связываются с HA различных штаммов H3N2, выделенных в разные годы. Мы расширили спектр связывания и активность VHH путем их слияния с Fc-фрагментом. Наиболее перспективное антитело D9.2-Fc при профилактическом или терапевтическом введении защищает мышью от летальной инфекции, вызванной вирусом H3N2.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные линии

Клеточная линия CHO-S получена от Thermo Fisher Scientific, США (кат. № R80007), клеточные линии MDCK и Caco2 – из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург, Россия).

### Вирусы

Использовали адаптированный к мышам ВГА A/Aichi/2/68 (H3N2).

### Рекомбинантные белки

Список использованных в работе антигенов представлен в табл. 1.

### Иммунизация верблюда, получение иммунной библиотеки, селекция индивидуальных клонов, экспрессия и очистка VHH

Двугорбого верблюда пятикратно иммунизировали рекомбинантным HA H3 НК внутримышечно в дозе 100 мкг с гидроксидом алюминия в качестве адъюванта. Спустя 5 дней после последней иммунизации проводили отбор крови (50 мл) у животного для выделения фракции периферических лимфоцитов.

Конструирование библиотеки и специфический скрининг клонов проводили согласно [30] с использованием в качестве антигена инактивированного ВГА A/Aichi/2/68 (H3N2).

Экспрессию и очистку наноантител выполняли как описано ранее [30].

### Получение конструкций VHH-Fc, экспрессия и очистка модифицированных VHH

С помощью ПЦР получены последовательности генов D9.2-Fc, E12.2-Fc и D4.2-Fc, кодирующих соответствующее наноантитело, слитое с шарнирным участком и Fc человеческого IgG1 (GenBank: JQ666008.1). Полученные гены клонировали в вектор для эукариотической экспрессии pSEP4 (Thermo Fisher Scientific, США). Аналогичным образом получали плазмиду pSEP4-D9.2-mG2a, кодирующую наноантитело D9.2 с шарнирным участком и Fc IgG2a мыши (GenBank: V00798.1). Для создания

Таблица 1. Рекомбинантные белки HA, использованные в исследованиях *in vitro*

Подтип	Аббревиатура	Описание	Источник	Кат. №	№ в базе данных GenBank или GISAID
H3	H3 HA1 Swiz	HA1 A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Sino Biological	40497-V08H1	EPI541659
	H3 HA1 Vic	HA1 A/Victoria/210/2009 (H3N2)	Immune Technology	IT-003-00421p	EPI272062
	H3 Swiz	HA0 A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2)	Sino Biological	40497-VNAB	EPI541659
	H3 Aichi	HA0 A/Aichi/2/1968 (H3N2)	Sino Biological	11707-V08H	AAA43178.1
	H3 Perth	HA0 A/Perth/16/2009 (H3N2)	Sino Biological	40043-VNAB	ACS71642.1
	H3 Sing	HA0 A/Singapore/INFIMH-16-0019/2016 (H3N2)	Xema	-	EPI1341068
	H3 HK	HA0 A/Hong Kong/45/2019 (H3N2)	-	-	EPI1691930
H4	H4	HA0 A/mallard/Ohio/657/2002 (H4N6)	Sino Biological	11714-V08H1	ABI47995.1
H7	H7 Anhui	HA0 A/Anhui/1/2013 (H7N9)	Sino Biological	40103-V08H	EPI439507
H10	H10	HA0 A/Jiangxi-Donghu/346/2013 (H10N8)	Sino Biological	40359-VNAB	EPI497477

плазмидной конструкции pСЕР4-D9.2-mG2a LALA-PG в плазмиду pСЕР4-D9.2-mG2a с помощью сайт-направленного мутагенеза вносили точечные мутации [31]. Экспрессию и очистку антител проводили как описано в [32]. Чистоту антител определяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-PAGE) по Лэммли в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях.

Аналогичным образом получали и анализировали контрольное VHH-Fc – SD36-Fc, соответствующее наноантителу (SD36) к стеблевому домену (субъединица HA2) HA H3, аминокислотную последовательность которого брали согласно [33], слитому с Fc IgG1 человека.

### Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА выполняли согласно [32]. Для детекции антител в сыворотке крови верблюда использовали конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) anti-Llama IgG (Bethyl, A160-100P). HRP-конъюгированные вторичные антитела anti-c-Мус (ab1326, Abcam), anti-human IgG и anti-mouse IgG (A8667 и A9044, MilliporeSigma, США) использовали для выявления связавшихся с антигеном VHH и VHH-Fc с Fc-фрагментом человека и мыши соответственно. Значения полумаксимальной эффективной концентрации ( $EC_{50}$ ) рассчитывали с использованием четырехпараметрической логистической регрессии в GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США).

Для проведения конкурентного ИФА VHH последовательно разводили в блокирующем буфере со стартовой концентрацией 800 нМ (~10 мкг/мл). Конкурентные антитела в формате VHH-Fc (5 нМ) добавляли в равном объеме в лунки, содержащие VHH. Связавшиеся VHH-Fc детектировали с использованием anti-human IgG HRP (A8667, MilliporeSigma, США). Оптическую плотность ( $OP_{450\text{ нМ}}$ ) в лунках, содержащих только VHH-Fc, принимали за 100% уровень сигнала. Ингибирование выражали как процент снижения  $OP_{450\text{ нМ}}$  в лунках, содержащих смесь VHH/VHH-Fc, по сравнению с лунками без VHH.

### Вестерн-блоттинг

Белки разделяли с использованием 10% готовых гелей Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, США) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Amersham™ Hybond™ P (Cytiva, США). После блокировки мембраны добавляли VHH-Fc в конечной концентрации 1 мкг/мл. Далее вносили антитела anti-human IgG HRP (A8667, MilliporeSigma, США). Иммунодетекцию проводили с использованием субстрата Clarity™ Western ECL (Bio-Rad).

### Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

РТГА проводилась согласно [34].

### Реакция нейтрализации (РН) вируса

РН в формате микронейтрализации в 96-луночных культуральных планшетах проводили как описано ранее [35]. Не нейтрализованные вирусные частицы выявляли с использованием поликлональных антител кролика к белку NP и anti-Rabbit IgG HRP вторичные антитела (Cat: 11675-T62 и SSA003, Sino Biological, Китай).

Способность антител ингибировать выход вирусного потомства из клетки и уменьшать размер бляшек оценивали с помощью описанных методик [16].

### Оценка профилактической и терапевтической эффективности антител *in vivo*

Все эксперименты с животными, проведенные в соответствии с Директивой 2010/63/EU, рекомендациями FELASA [36], были одобрены этическим комитетом ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 19 от 2022 г.).

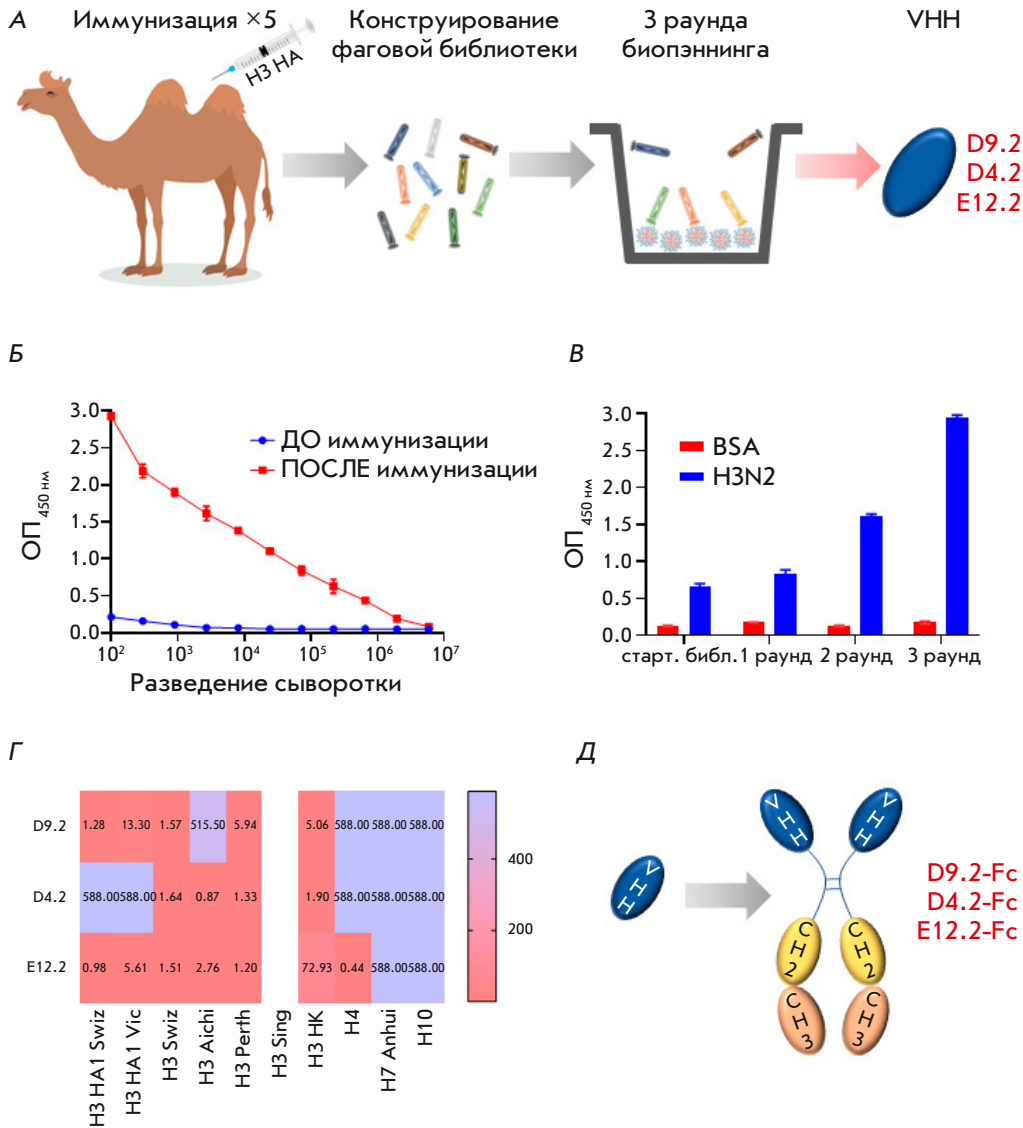
Во всех экспериментах использовали SPF мышей линии BALB/c в возрасте 6–8 недель, полученных из НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН. Животных интраназально инфицировали 5 ЛД<sub>50</sub> вируса A/Aichi/2/68 (H3N2), адаптированного к мышам. За животными наблюдали в течение 14 дней после заражения и ежедневно взвешивали, после чего эвтаназировали. Мышей, масса тела которых снизилась на 25% или более, эвтаназировали.

Подробная информация о схемах введения антител представлена в разделе «Результаты».

Выживаемость анализировали с использованием теста Мантела–Кокса в GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения наноантител, связывающихся с HA подтипа H3, двугорбого верблюда (*Camelus bactrianus*) иммунизировали рекомбинантным полноразмерным белком HA0 H3 НК, ранее полученным в клетках CHO-S (рис. 1А). Мониторинг уровня HA-специфических антител в сыворотке крови верблюда осуществляли методом ИФА (рис. 1Б). Иммуная сыворотка, полученная после всего цикла иммунизаций, проявляла, в отличие от контрольной, специфическую активность в отношении белка H3 НК с титром связывания более 1:1 500 000. Фаговую библиотеку размером  $1.4 \times 10^7$  конструировали из кДНК, кодирующей последовательности VHH, выделенные из В-клеток. VHH, специфичные для HA H3, были отобраны методом фагового дисплея в ходе трех раундов биоэнтинга против инактивированного



**Рис. 1.** Схема получения VHH, оценка связывающей способности выбранных VHH и схема их модификации: А – стратегия иммунизации животного и отбора VHH; Б – ИФА, показывающий уровень H3-специфичных антител в сыворотке крови верблюда до и после пятой иммунизации; В – результаты поликлонального фагового ИФА. BSA – бычий сывороточный альбумин, H3N2 – инактивированный ВГА A/Aichi/2/1968, старт. библи. – стартовая библиотека; Г – активность отобранных VHH в ИФА в отношении HA филогенетической группы 2 подтипов H3, H4, H7 и H10, выраженная в EC<sub>50</sub> (нМ); Д – схема повышения эффективности VHH – модификация Fc-фрагментом

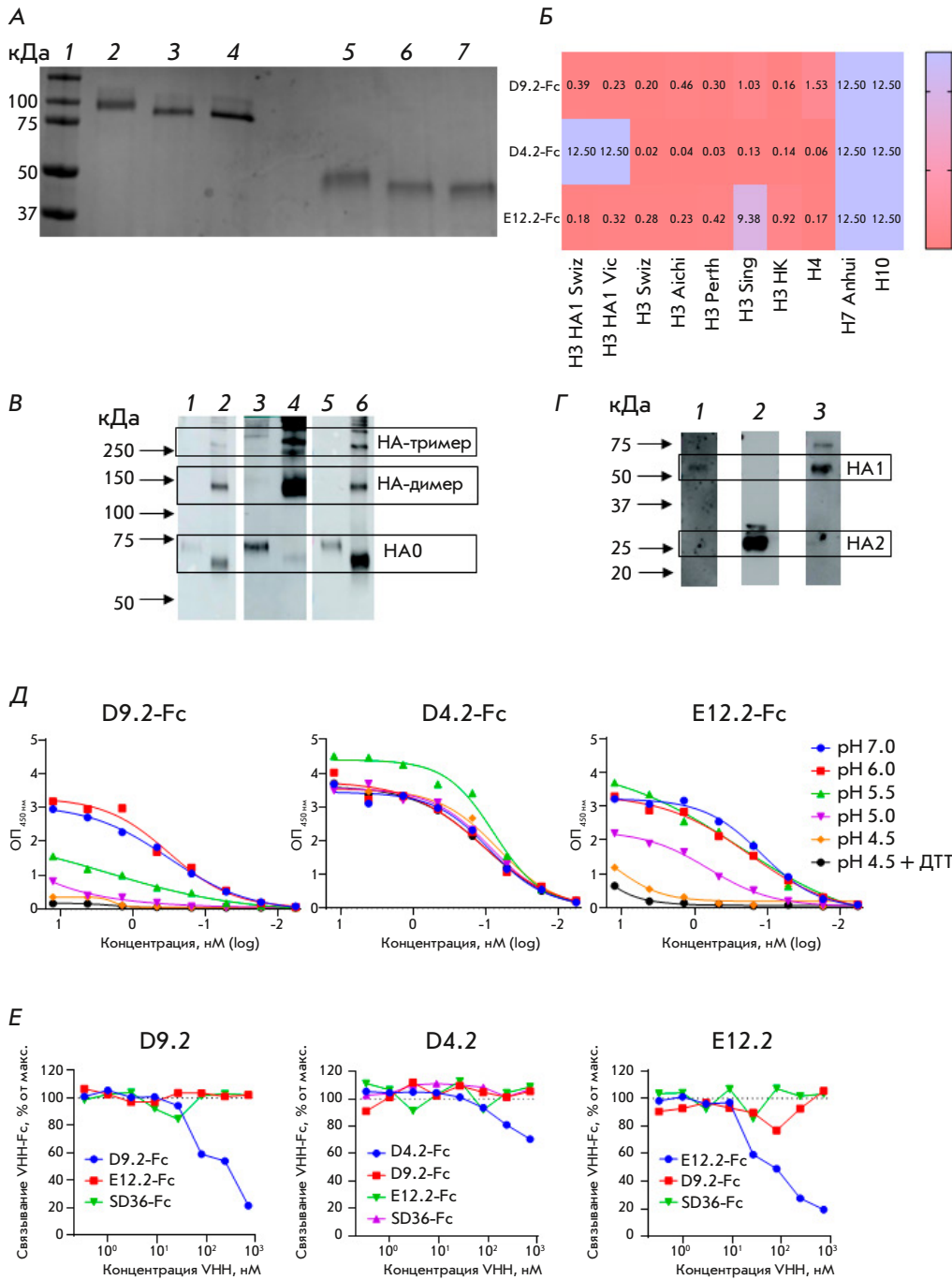
вируса A/Aichi/2/68 (H3N2) (рис. 1А). После третьего раунда пэннинга наблюдали значительное обогащение специфичными VHH к вирусу H3N2 (рис. 1В). Из полученной панели антител для дальнейших исследований отобрали три VHH (D4.2, D9.2 и E12.2), которые связывались с H3 НК (рис. 1А).

Иммунореактивность VHH анализировали с помощью ИФА на рекомбинантных HA, принадлежащих к подтипам H3, H4, H7 и H10 (рис. 1Г). Все VHH прочно связывались с иммобилизованными HA разных штаммов H3N2, включая изоляты 2009, 2013 и 2019 гг. Кроме того, E12.2 и D4.2 связывали HA штамма A/Aichi/2/1968. E12.2 также взаимодействовал с HA подтипа H4. И D9.2, и E12.2 узнавали субъединицу HA1 белка HA. В свою очередь, D4.2 не связывался с HA1, но взаимодействовал с полноразмерными HA0.

Для того чтобы повысить активность выбранных нанокантител посредством естественной димеризации, увеличить период полувыведения из сыворотки и добавить Fc-опосредованные эффекторные функции, мы модифицировали VHH Fc-фрагментом (рис. 1Д). Последовательности выбранных VHH были слиты с шарнирной областью и Fc-доменом IgG1 человека. Таким образом получали конструкции VHH-Fc: D9.2-Fc, D4.2-Fc и E12.2-Fc. Димеризацию VHH-Fc подтверждали с помощью электрофореза (рис. 2А). Полоса с молекулярной массой примерно 80–90 кДа в невозстанавливающих условиях соответствует димерной форме VHH-Fc.

Широту связывающей способности VHH-Fc изучали в непрямом ИФА с использованием рекомбинантных белков HA0 и HA1 разных штаммов ВГА (рис. 2Б). Введение Fc-фрагмента в структуру мо-





**Рис. 2.** Получение VNN-Fc и их характеристика *in vitro*: **А** – SDS-PAGE очищенных VNN-Fc в невосстанавливающих (2–4) и восстанавливающих (5–7) условиях: маркер молекулярных масс (1), D9.2-Fc (2, 5), E12.2-Fc (3, 6) и D4.2-Fc (4, 7); **Б** – спектр связывания VNN-Fc с различными HA филогенетической группы 2 по результатам ИФА, выражен в EC<sub>50</sub> (нМ); **В** – вестерн-блот-анализ специфичности антител D9.2-Fc (1, 2), D4.2-Fc (3, 4) и E12.2-Fc (5, 6) к HA0 H3 Swiz в восстанавливающих (1–3) и невосстанавливающих (4–6) условиях; **Г** – вестерн-блот-анализ специфичности VNN-Fc к HA1 или HA2 субъединице HA: инaktivированный ВГА A/Aichi/2/1968 в восстанавливающих условиях, детектированный D9.2-Fc (1), D4.2-Fc (2) или E12.2-Fc (3); **Д** – результаты непрямого ИФА, показывающие связывание VNN-Fc с H3 Aichi, обработанным трипсином-TPСК и инкубированным в буферах с различным pH или ДТТ; **Е** – конкурентный ИФА для определения эпипотной специфичности VNN-Fc

лекулы VNN повышало эффективность связывания каждого выбранного VNN-Fc, но в разной степени. Наиболее заметное увеличение аффинности продемонстрировало D4.2-Fc: его значение EC<sub>50</sub> для H3 Swiz составило 22 пМ, в то время как EC<sub>50</sub> мономера – 1642 пМ. Мономерная форма D9.2 едва могла связываться с H3 Aichi, в то время как EC<sub>50</sub> Fc-слитой формы для этого штамма составила 0.46 нМ. И D9.2-Fc, и D4.2-Fc также получили способность связывать HA подтипа H4. Наименее выражен-

ный эффект модификация Fc-фрагментом оказала на E12.2.

Оценка специфичности VNN-Fc в вестерн-блот-анализе показала, что все отобранные антитела распознают как мономерную, так и ди- и тримерную формы HA (рис. 2B). Также с помощью иммуноблотинга показано, что антитела D9.2-Fc и E12.2-Fc специфически связываются с субъединицей HA1, в то время как D4.2-Fc – с субъединицей HA2 (рис. 2Г). Далее мы определяли, разрушают-

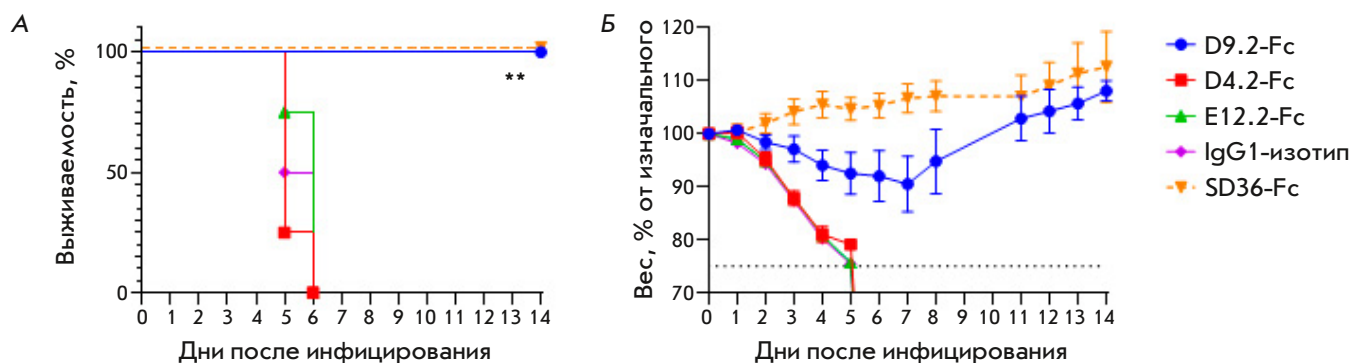


Рис. 3. Профилактическая эффективность VNH-Fc *in vivo*: А – кривые выживаемости, показано различие между контрольной и группой D9.2-Fc (\*\* $p=0.002$ ); Б – кривые изменения массы тела выживших мышей, данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM

ся ли распознаваемые нашими антителами эпитопы при снижении pH (рис. 2Д). Как известно, в процессе слияния мембран НА претерпевает значительные конформационные изменения, вызванные понижением pH в эндосомах клетки-хозяина. Несмотря на то, что субъединица HA1 не претерпевает таких серьезных перестроек, как HA2 [37, 38], активность связывающих HA1 антител (D9.2-Fc и E12.2-Fc) уменьшалась с уменьшением pH и полностью терялась при добавлении ДТТ, поскольку он удаляет субъединицу HA1 из НА. Однако D4.2-Fc одинаково связывалось с НА при различных значениях pH, как и с НА, обработанным ДТТ, что подтверждает нахождение его эпитопа именно в субъединице HA2.

По результатам конкурентного ИФА показано, что три отобранных клон VNH-Fc узнают различные не перекрывающиеся эпитопы на поверхности НА (рис. 2Е). Связывающее субъединицу HA2 антитело D4.2-Fc не конкурировало с контрольным VNH-Fc к HA2, SD36-Fc.

Протективную активность VNH-Fc *in vivo* изучали с использованием летальной мышинной модели (рис. 3). Мышам BALB/c интраназально вводили 1 мг/кг VNH-Fc за 1 ч до инфицирования. Животным контрольной группы вводили изотип IgG1 – нерелевантное VNH-Fc к S-белку вируса SARS-CoV-2; положительным контролем служило антитело SD36-Fc.

Антитело D9.2-Fc защищало 100% животных от летального исхода, потеря веса в данной группе в среднем не превышала 10%, к концу эксперимента вес мышей превышал изначальный. В свою очередь, ни E12.2-Fc, ни D4.2-Fc не показали протективной активности, поэтому D9.2-Fc было выбрано для дальнейшего исследования *in vivo*.

Далее мы оценили профилактическую эффективность системного введения D9.2-Fc в отноше-

нии летальной инфекции H3N2 (рис. 4А,Б). Мышам вводили антитела в дозе 10 мг/кг внутривентально за 24 ч до заражения ВГА. У животных, получавших D9.2-Fc, не наблюдалось признаков заболевания, потеря веса отсутствовала или была незначительной, в то время как контрольные мыши пали спустя 7 суток.

Для определения терапевтической эффективности D9.2-Fc мышам вводили внутривентально 40 мг/кг D9.2-Fc спустя 24 ч после инфицирования (рис. 4В,Г). Мыши из контрольной группы пали к 9 дню после заражения. Из животных, получивших D9.2-Fc, 80% выжили; изменение массы тела не превышало 15%, к концу наблюдения вес всех мышей вернулся к начальным значениям.

Чтобы изучить механизм противовирусного действия D9.2-Fc, мы оценивали активность VNH-Fc в РТГА и различных вариантах РН. Данное антитело не тормозило гемагглютинирующую активность ВГА в реакции микронеutralизации, и в реакции neutralизации бляшкообразования D9.2-Fc не обладало вируснейтрализующей активностью. При определении способности VNH-Fc ингибировать выход вируса из клетки антитело D9.2-Fc также не показало нейтрализующих свойств.

Поскольку D9.2-Fc не обладало способностью нейтрализовать ВГА, мы предположили, что эффективность данного антитела *in vivo* опосредована Fc-зависимыми эффекторными функциями. Поэтому были получены две дополнительные формы D9.2: VNH с Fc IgG2a мыши (D9.2-mG2a), а также D9.2-mG2a LALA-PG, в которой в Fc внесены мутации L234A, L235A и P329G (рис. 5). Комплекс мутаций LALA-PG ингибирует связывание с FcγR и C1q, в то время как взаимодействие с FcRn и стабильность Fc не затрагиваются [39]. С помощью ИФА показано, что эти мутации не влияют на связывание D9.2 с НА (рис. 5Б). Для оценки и сравнения

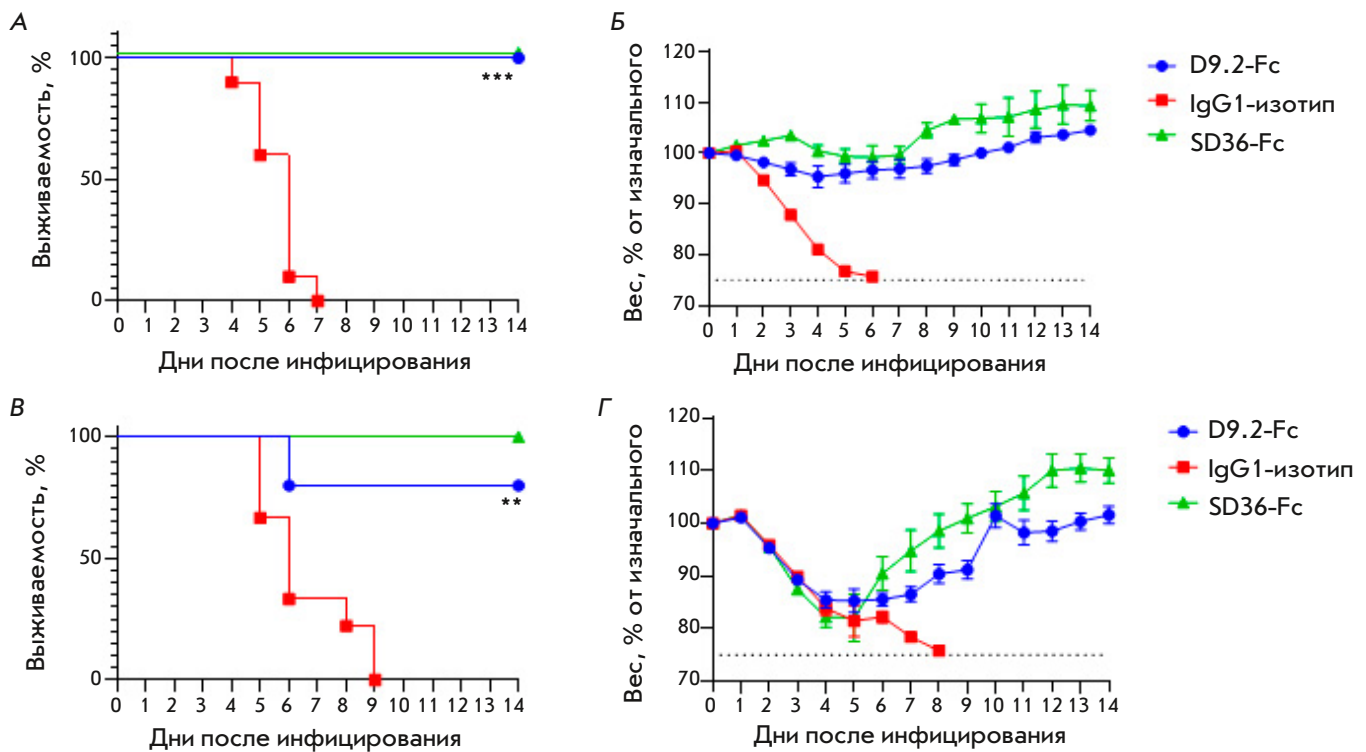


Рис. 4. Эффективность D9.2-Fc *in vivo* в режиме профилактического (А и Б) и терапевтического (В и Г) введения: А и В – кривые выживаемости (\*\* $p = 0.0002$ , \*\* $p = 0.0021$ ); Б и Г – кривые изменения массы тела выживших мышей, данные представлены как средние значения  $\pm$  SEM

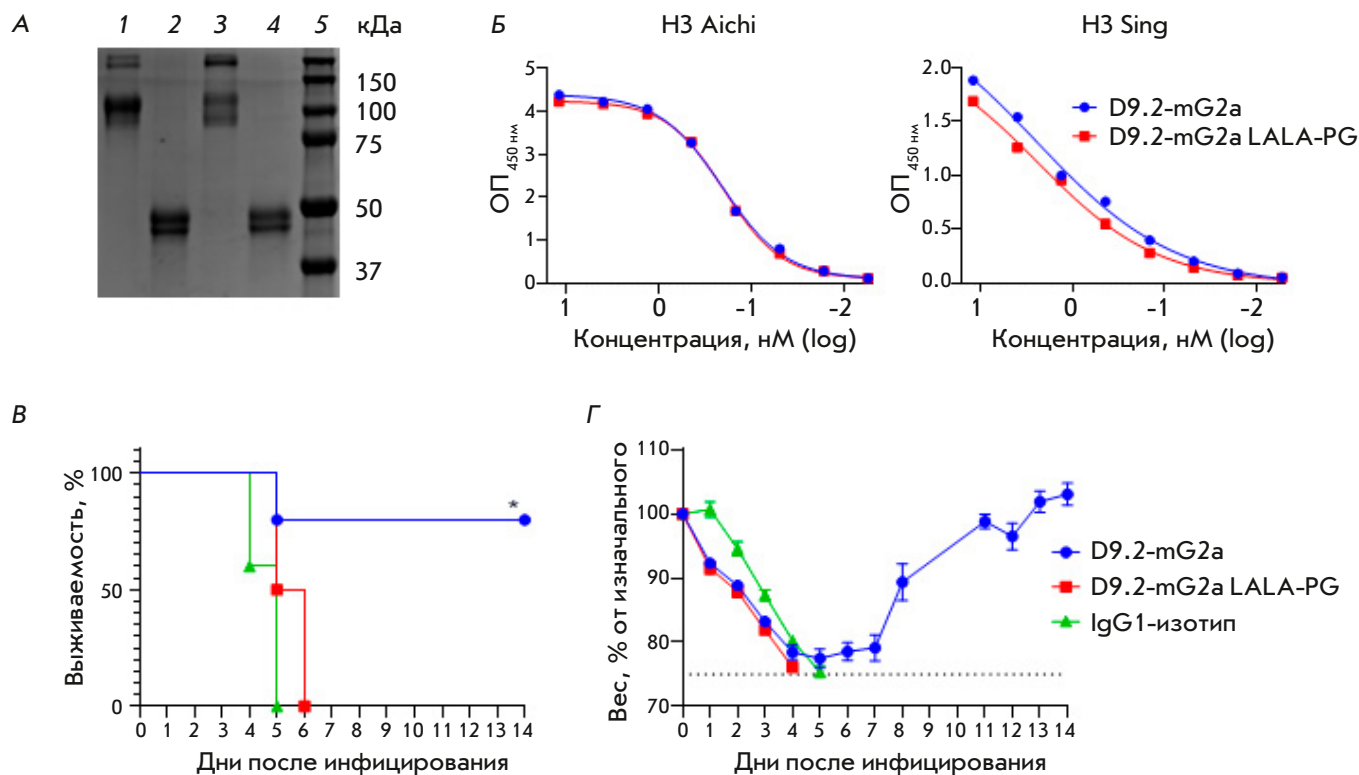
протективных свойств полученных конструкций мышам вводили внутрибрюшинно антитела в дозе 5 мг/кг за 24 ч до заражения (рис. 5В,Г). Мыши (4 из 5), получавшие антитело D9.2-mG2a, были защищены от летального исхода, тогда как все мыши, получавшие антитело LALA-PG, пали к 6 дню, как и мыши контрольной группы. Следовательно, взаимодействие Fc-Fc $\gamma$ R необходимо для защиты животных *in vivo* с помощью ненейтрализующего антитела D9.2.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время одним из перспективных направлений в медицине является использование мАт для профилактики и лечения инфекций. В частности, наноантитела (VНН) рассматриваются как практичная и эффективная альтернатива классическим IgG. В последнее время активно изучается возможность использования VНН в качестве антибактериальных [40, 41] или противовирусных антител [32, 42, 43]. VНН, состоящие из одного полипептида, могут успешно использоваться для пассивной иммунизации в составе аденовирусных векторов [44, 45], аденоассоциированных вирусных векторов [46, 47] или мРНК [48]. В данной работе нами выделены три VНН: D9.2, D4.2 и E12.2, специфичные к разным

эпитопам молекулы HA вируса H3N2. D9.2 и E12.2 связываются с субъединицей HA1, тогда как D4.2 взаимодействует с субъединицей HA2. Полученные VНН узнают HA различных штаммов H3N2. Кроме того, E12.2 в формате мономера может связывать HA подтипа H4.

Ранее сообщалось об усилении противовирусного действия VНН путем мультимеризации. Например, димеризация VНН P2C5 приводила к 200-кратному увеличению нейтрализующей активности против SARS-CoV-2 [49], в то время как димер другого анти-S VНН Fu2 в 10 раз эффективнее нейтрализовал вирус в отличие от его мономерной формы [50]. Согласно данным Hultberg A. и соавт., можно получить 4000-кратное усиление активности VНН, что и было показано для бивалентной формы VНН, нейтрализующего респираторно-синцитиальный вирус [12]. Аналогичное наблюдение сделано для молекул VНН, слитых с Fc, так как через Fc-фрагмент происходит естественная димеризация [51, 52]. Более того, показано расширение спектра связывания некоторых VНН в результате мультимеризации. Например, противогриппозный VНН R1a-B6 в бивалентном формате приобрел способность нейтрализовать вирусы H2N2 [53], а G2.3, слитый с Fc-фрагментом, подтипы H5N2 и H9N2 [32]. Fc-



**Рис. 5.** Протективность D9.2 *in vivo* зависит от Fc-Fc $\gamma$ R-взаимодействий. А – SDS-PAGE-анализ полученных конструкций в невосстанавливающих (1, 3) и восстанавливающих (2, 4) условиях: D9.2-mG2a (1, 2) и D9.2-mG2a LALA-PG (3, 4), маркер молекулярных масс (5). Б – результаты ИФА, отражающие связывание указанных антител с HA H3 Aichi и H3 Sing. В – кривые выживаемости (различия между группами D9.2-mG2a и IgG1: \* $p = 0.0361$ ; между группами D9.2-mG2a и LALA-PG – \* $p = 0.0116$ ). Г – кривые изменения массы тела выживших мышей, представлены средние значения  $\pm$  SEM

слитая форма VHN, активного в отношении SARS-CoV-1, демонстрировала перекрестную реактивность с SARS-CoV-2 [54]. Кроме того, модификация с помощью Fc позволяет задействовать эффекторные функции, включая активацию комплемента и/или антителозависимую клеточную цитотоксичность и фагоцитоз, которые имеют решающее значение при гриппозной инфекции [29]. Поэтому мы объединили наши VHN с Fc IgG1 человека, и опосредованная Fc димеризация привела к увеличению связывающей активности наряду с появлением способности реагировать с белком HA подтипа H4 (для VHN D9.2 и D4.2). Однако модификация E12.2 привела к минимальному (по сравнению с другими VHN) улучшению связывающей способности, что позволяет предположить, что потенциал увеличения эффективности и ширины спектра связывания антитела за счет мультимеризации зависит от его эпитопа.

Мы исследовали эффективность выбранных антител *in vivo* и показали, что D9.2-Fc при его интраназальном введении за 1 ч до заражения полностью

защищает животных от летального исхода, тогда как D4.2-Fc и E12.2-Fc не смогли обеспечить защиту животных. Учитывая эти результаты, D9.2-Fc отобрали для дальнейшей оценки его профилактических и терапевтических свойств *in vivo*. При системном введении D9.2-Fc за 24 ч до заражения наблюдали 100% протективность данного антитела, в то время как при введении через сутки после инфицирования выживало 80% животных, получивших D9.2-Fc.

Мы оценили также вируснейтрализующую активность D9.2-Fc *in vitro*. Однако D9.2-Fc не обладает способностью нейтрализовать вирус H3N2, поэтому мы предположили, что его протективные свойства *in vivo* зависят от Fc-опосредованных эффекторных функций антитела. Как известно, Fc-фрагмент IgG1 человека способен связывать Fc $\gamma$ R мыши [55]. Тем не менее, в определенных случаях подтип IgG играет решающую роль в протективности мАТ на летальной мышинной модели. Например, показано, что связывающиеся с субъединицей HA2, а также и нацеленные на интерфейс HA варианты мАТ



с константной областью тяжелой цепи IgG2a мыши улучшают защиту *in vivo* по сравнению с исходным субтипом IgG. Причиной этого является более высокое сродство Fc-фрагмента субтипа IgG2a к FcγR по сравнению с IgG1 [56, 57]. Несмотря на различия в представлениях ученых о том, до какой степени противовирусный эффект *in vivo* мАт, специфичных к HA1, зависит от Fc-опосредованных функций, опубликованы данные, подтверждающие по крайней мере частичную зависимость протективности анти-HA1 мАт от Fc-FcγR-взаимодействия [19, 25, 26, 58]. Мы сравнили протективные свойства *in vivo* D9.2, слитого с Fc IgG2a мыши (D9.2-mG2a), и D9.2 с мутациями LALA-PG (D9.2-mG2a LALA-PG) и показали, что D9.2-mG2a обеспечивало выживаемость 80% животных, в то время как вся группа мышей, получавших LALA-PG, пала. Таким образом установлено, что D9.2-Fc защищает животных благодаря Fc-FcγR-взаимодействию.

## ВЫВОДЫ

В данной работе мы идентифицировали три клонна VHH, узнающие неперекрывающиеся эпитопы в структуре HA и активные в отношении HA различных штаммов вируса гриппа H3N2. Мы расширили спектр их связывания, модифицировав VHH Fc-фрагментом. Из трех отобранных VHH-Fc только D9.2-Fc продемонстрировало протективную активность *in vivo* на мышинной модели гриппозной инфекции. Несмотря на отсутствие нейтрализующей активности в отношении ВГА H3N2, D9.2-Fc способно обеспечивать эффективную защиту *in vivo* с помощью Fc-опосредованных механизмов. ●

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

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cockburn W.C., Delon P.J., Ferreira W. // Bull. W. Hlth Organ. 1969. V. 41. P. 345–348.
- Burrell A., Huckson S., Pilcher D.V. // N. Engl. J. Med. 2018. V. 378. № 22. P. 2138–2139.
- Huang S.Y., Huang W.C., Chen Y.C., Tsai C.Y., Lee I.K. // Am. J. Trop. Med. Hygiene. 2017. V. 97. № 6. P. 1945–1951.
- Nateghian A., Gouya M.M., Nabavi M., Soltani H., Mousavi S.V., Agah E., Erfani H., Parchami P., Dadras M., Robinson J.L. // J. Clin. Virol. 2020. V. 124. P. 104281.
- Tekin S., Keske S., Alan S., Batirel A., Karakoc C., Tasdelen-Fisgin N., Simsek-Yavuz S., Isler B., Aydin M., Kapmaz M., et al. // Inter. J. Infect. Dis. 2019. V. 81. P. 6–9.
- Darvishian M., van den Heuvel E.R., Bissielo A., Castilla J., Cohen C., Englund H., Gefenaite G., Huang W.T., la Bastide-van Gemert S., Martinez-Baz I., et al. // Lancet Respir. Med. 2017. V. 5. № 3. P. 200–211.
- Lewnard J.A., Cobey S. // Vaccines (Basel). 2018. V. 6. № 2. P. 28.
- Hayden F.G., Sugaya N., Hirotsu N., Lee N., de Jong M.D., Hurt A.C., Ishida T., Sekino H., Yamada K., Portsmouth S., et al. // N. Eng. J. Med. 2018. V. 379. № 10. P. 913–923.
- Stephenson I., Democratis J., Lackenby A., McNally T., Smith J., Pareek M., Ellis J., Birmingham A., Nicholson K., Zambon M. // Clin. Infect. Dis. 2009. V. 48. № 4. P. 389–396.
- Huang K., Ying T., Wu Y. // Viruses. 2022. V. 14. № 6. P. 1162.
- Hoefman S., Ottevaere I., Baumeister J., Sargentini-Maier M.L. // Antibodies. 2015. V. 4. № 3. P. 141–156.
- Hultberg A., Temperton N.J., Rosseels V., Koenders M., Gonzalez-Pajuelo M., Schepens B., Ibañez L.I., Vanlandschoot P., Schillemans J., Saunders M., et al. // PLoS One. 2011. V. 6. № 4. P. e17665.
- Ferrara F., Molesti E., Temperton N. // Future Virol. 2015. V. 10. № 6. P. 731–749.
- Wu Y., Wu Y., Tefsen B., Shi Y., Gao G.F. // Trends Microbiol. 2014. V. 22. № 4. P. 183–191.
- Tong S., Zhu X., Li Y., Shi M., Zhang J., Bourgeois M., Yang H., Chen X., Recuento S., Gomez J., et al. // PLoS Pathog. 2013. V. 9. № 10. P. e1003657.
- Bangaru S., Lang S., Schotsaert M., Vandervlen H.A., Zhu X., Kose N., Bombardi R., Finn J.A., Kent S.J., Gilchuk P., et al. // Cell. 2019. V. 177. № 5. P. 1136–1152.e18.
- Benjamin E., Wang W., McAuliffe J.M., Palmer-Hill F.J., Kallewaard N.L., Chen Z., Suzich J.A., Blair W.S., Jin H., Zhu Q. // J. Virol. 2014. V. 88. № 12. P. 6743–6750.
- DiLillo D.J., Palese P., Wilson P.C., Ravetch J.V. // J. Clin. Invest. 2016. V. 126. № 2. P. 605–610.
- Henry Dunand C.J., Leon P.E., Huang M., Choi A., Chromikova V., Ho I.Y., Tan G.S., Cruz J., Hirsh A., Zheng N.Y., et al. // Cell Host Microbe. 2016. V. 19. № 6. P. 800–813.
- Iba Y., Fujii Y., Ohshima N., Sumida T., Kubota-Koketsu R., Ikeda M., Wakiyama M., Shirouzu M., Okada J., Okuno Y., et al. // J. Virol. 2014. V. 88. № 13. P. 7130–7144.
- Kubota-Koketsu R., Mizuta H., Oshita M., Ideno S., Yunoki M., Kuhara M., Yamamoto N., Okuno Y., Ikuta K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2009. V. 387. № 1. P. 180–185.
- Lee J., Boutz D.R., Chromikova V., Joyce M.G., Vollmers C., Leung K., Horton A.P., DeKosky B.J., Lee C.H., Lavinder J.J., et al. // Nat. Med. 2016. V. 22. № 12. P. 1456–1464.
- McCarthy K.R., Watanabe A., Kuraoka M., Do K.T., McGee C.E., Sempowski G.D., Kepler T.B., Schmidt A.G., Kelsoe G., Harrison S.C. // Immunity. 2018. V. 48. № 1. P. 174–184.e9.
- Son S., Ahn S. Bin, Kim G., Jang Y., Ko C., Kim M., Kim S.J. // Antiviral Res. 2023. V. 213. P. 105591.
- Tan G.S., Leon P.E., Albrecht R.A., Margine I., Hirsh A., Bahl J., Krammer F. // PLoS Pathog. 2016. V. 12. № 4. P. e1005578.
- Watanabe A., McCarthy K.R., Kuraoka M., Schmidt A.G., Adachi Y., Onodera T., Tonouchi K., Caradonna T.M., Bajic G., Song S., et al. // Cell. 2019. V. 177. № 5. P. 1124–1135.e16.
- Yoon A., Yi K.S., Chang S.Y., Kim S.H., Song M., Choi J.A., Bourgeois M., Hossain M.J., Chen L.M., Donis R.O., et al. // PLoS One. 2015. V. 10. № 10. P. e0141312.
- Gao R., Sheng Z., Sreenivasan C.C., Wang D., Li F. // Viruses. 2020. V. 12. № 3. P. 276.
- Boudreau C.M., Alter G. // Front. Immunol. 2019. V. 10. P. 440.
- Voronina D.V., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Derkaev A.A., Popova O., Shcherbinin D.N. // Acta Naturae. 2021. V. 13. № 4. P. 33–41.

31. Saunders K.O. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 1296.
32. Voronina D.V., Shcheblyakov D.V., Favorskaya I.A., Esmagambetov I.B., Dzhharullaeva A.S., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Popova O., Kan V.Y., Bandelyuk A.S., et al. // *Viruses.* 2022. V. 14. № 11. P. 2485.
33. Laursen N.S., Friesen R.H.E., Zhu X., Jongeneelen M., Blokland S., Vermond J., van Eijgen A., Tang C., van Diepen H., Obmolova G., et al. // *Science.* 2018. V. 362. № 6414. P. 598–602.
34. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Govorkova E.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Krylov P.S., Webster R.G. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 23. P. 12911–12917.
35. He W., Mullarkey C.E., Miller M.S. // *Methods.* 2015. V. 90. P. 95–100.
36. Mähler M., Berar M., Feinstein R., Gallagher A., Illgen-Wilcke B., Pritchett-Corning K., Raspa M. // *Lab. Anim.* 2014. V. 48. № 3. P. 178–192.
37. Benhaim M.A., Prasad V.M., Garcia N.K., Guttman M., Lee K.K. // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 18. P. eaaz8822.
38. Benton D.J., Gamblin S.J., Rosenthal P.B., Skehel J.J. // *Nature.* 2020. V. 583. № 7814. P. 150–153.
39. Mausser E., Nador E., Politch J.A., Pauly M.R., Marathe J.G., Moench T.R., Zeitlin L., Whaley K.J., Anderson D.J. // *PLoS One.* 2023. V. 18. № 3. P. e0282147.
40. Cawez F., Mercuri P.S., Morales-Yáñez F.J., Maalouf R., Vandevenne M., Kerff F., Guérin V., Mainil J., Thiry D., Saulmont M., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2023. V. 67. № 4. P. e01499-22.
41. Kumar S., Athreya A., Gulati A., Nair R.M., Mahendran I., Ranjan R., Penmatsa A. // *Commun. Biol.* 2021. V. 4. № 1. P. 836.
42. Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Egorova D.A., Voronina O.L., Derkaev A.A., Voronina D.V., Popova O., Ryabova E.I., Shcherbinin D.N., Aksenova E.I., et al. // *Acta Naturae.* 2021. V. 13. № 4. P. 53–63.
43. Wang R., Zhang H., Peng C., Shi J., Zhang H., Gong R. // *Virol. Sin.* 2021. V. 36. № 6. P. 1600–1610.
44. Burmistrova D.A., Tillib S.V., Shcheblyakov D.V., Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Zubkova O.V., Ivanova T.I., Tukhvatulin A.I., Shmarov M.M., Logunov D.Y., et al. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 3. P. e0150958.
45. Tutykhina I.L., Sedova E.S., Gribova I.Y., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., et al. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. № 3. P. 318–328.
46. Derkaev A.A., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Godakova S.A., Vinogradova I.D., Noskov A.N., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. // *Front Microbiol.* 2022. V. 13. P. 960937.
47. Esmagambetov I.B., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Shcheblyakov D.V., Dolzhikova I.V., Favorskaya I.A., Grousova D.M., Dovgiy M.A., Prokofiev V.V., Gosudarev A.I., et al. // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1129245.
48. Panova E.A., Kleymenov D.A., Shcheblyakov D.V., Bykonina E.N., Mazunina E.P., Dzhharullaeva A.S., Zolotar A.N., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Sorokin I.I., et al. // *Front. Immunol.* 2023. V. 14. P. 1098302.
49. Favorskaya I.A., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Dolzhikova I.V., Alekseeva I.A., Korobkova A.I., Voronina D.V., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Kovyrshina A.V., et al. // *Front Immunol.* 2022. V. 13. P. 822159.
50. Hanke L., Das H., Sheward D.J., Perez Vidakovic L., Urgard E., Moliner-Morro A., Kim C., Karl V., Pankow A., Smith N.L., et al. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 155.
51. Liu H., Wu L., Liu B., Xu K., Lei W., Deng J., Rong X., Du P., Wang L., Wang D., et al. // *Cell Rep. Med.* 2023. V. 4. № 2. P. 100918.
52. Schepens B., van Schie L., Nerinckx W., Roose K., Fijalkowska D., Devos S., Weyts W., De Cae S., Vanmarcke S., Lonigro C., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2021. V. 13. № 621. P. eabi7826.
53. Hufton S.E., Risley P., Ball C.R., Major D., Engelhardt O.G., Poole S. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 8. P. e103294.
54. Wrapp D., De Vlieger D., Corbett K.S., Torres G.M., Wang N., van Breedam W., Roose K., van Schie L., Hoffmann M., Pöhlmann S., et al. // *Cell.* 2020. V. 181. № 5. P. 1004–1015.e15.
55. Derebe M.G., Nanjunda R.K., Gilliland G.L., Lacy E.R., Chiu M.L. // *Immunol. Lett.* 2018. V. 197. P. 1–8.
56. DiLillo D.J., Tan G.S., Palese P.R.J.V. // *Nat. Med.* 2014. V. 20. № 2. P. 143–151.
57. Bruhns P. // *Blood.* 2012. V. 119. № 24. P. 5640–5649.
58. Ko Y.A., Yu Y.H., Wu Y.F., Tseng Y.C., Chen C.L., Goh K.S., Liao H.Y., Chen T.H., Cheng T.J.R., Yang A.S., et al. // *PLoS Pathog.* 2021. V. 17. № 8. P. e1009724.