ТЕХНОЛОГИИ СОЗДАНИЯ ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ АНТИТЕЛ ЧЕЛОВЕКА НА ПРИМЕРЕ SARS-COV-2

В. П. Баклаушев^{1,2,3}✉, Е. М. Самойлова^{1,2}, С. М. Кузнецова¹, Е. В. Ермолаева², Г. М. Юсубалиева^{1,2}, В. А. Кальсин^{1,2}, А. В. Липатова², А. В. Троицкий¹

¹ Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

² Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт пульмонологии Федерального медико-биологического агентства, Москва, Россия

Моноклональные антитела (мАт) — самый перспективный и наиболее интенсивно пополняемый вид биоактивных фармпрепаратов. В настоящее время более 100 различных мАт одобрены FDA и другими регуляторами для терапии онкологических, инфекционных, системных, аутоиммунных и других заболеваний. Отдельным современным направлением является получение вируснейтрализующих антител к возбудителям социально значимых инфекций, таких как ВИЧ, вирусы гепатита, SARS-CoV-2. Пандемия новой коронавирусной инфекции показала, насколько актуально может быть наличие технологической платформы по производству полностью гуманизированных антител человека. Развитие технологии рекомбинантных ДНК и разработка фагового дисплея антител позволили создавать библиотеки антигенсвязывающих фрагментов и проводить скрининг с целевыми антигенами. В обзоре обсуждаются достоинства и недостатки фагового дисплея, в том числе с применением технологии однодоменных антител на основе варибельного домена тяжелой цепи. Представлены описание и практические результаты наиболее современной технологии получения антител человека путем сортировки и секвенирования генома отдельных В-клеток памяти на примере получения моноклональных вируснейтрализующих антител против SARS-CoV-2. Описаны перспективы дальнейшего развития технологии получения рекомбинантных антител человека, в частности — создание последовательностей варибельных фрагментов антител с помощью искусственного интеллекта.

Ключевые слова: COVID-19, SARS-CoV-2, вируснейтрализующие антитела, фаговый дисплей, В-клетки, NGS-секвенирование

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 075-15-2021-1086, контракт № RF----193021X0015, 15.ИП.21.0015).

✉ **Для корреспонденции:** Владимир Павлович Баклаушев
Ореховый бульвар, д. 28, г. Москва, 115682, Россия; baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru

Статья получена: 29.11.2022 **Статья принята к печати:** 20.12.2022 **Опубликована онлайн:** 30.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.049

NEUTRALIZING ANTIBODY CREATION TECHNOLOGIES: CASE OF SARS-COV-2

Baklaushev VP^{1,2,3}✉, Samoilova EM^{1,2}, Kuznetsova SM¹, Ermolaeva EV², Yusubaliev GM^{1,2}, Kalsin VA^{1,2}, Lipatova AV², Troitsky AV¹

¹ Federal Scientific and Clinical Center of Specialized Types of Medical Care and Medical Technologies, Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

² Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

³ Research Institute of Pulmonology, Federal Medical Biological Agency of Russia, Moscow, Russia

Monoclonal antibodies (mAbs) are the most promising and most intensively replenished type of bioactive pharmaceuticals. Currently, there are over 100 different mAbs approved by the FDA and other regulating agencies for treatment of oncological, infectious, systemic, autoimmune and other diseases. Design of antibodies neutralizing pathogens of socially significant infections, such as HIV, hepatitis viruses, SARS-CoV-2, is a separate direction. The SARS-CoV-2 pandemic has shown how urgent it is to have a technological platform enabling production of fully human antibodies. The development of recombinant DNA technology and antibody phage display enabled compilation of libraries of antigen-binding fragments and screening with target antigens. This review discusses the advantages and disadvantages of phage display, including use of single-domain antibody technology based on the heavy chain variable domain. We describe the state-of-the-art (and practical results of its application) technology enabling production of human antibodies by sorting and sequencing the genome of individual memory B cells, using monoclonal virus-neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 as an example. The prospects of further development of the recombinant human antibody production technology are discussed; in particular, we consider creation of sequences of variable fragments of antibodies with the help of artificial intelligence.

Keywords: COVID-19, SARS-CoV-2, neutralizing antibodies, phage display, B cells, NGS sequencing

Funding: the study was supported financially by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (contract #075-15-2021-1086, contract #RF----193021X0015, 15.IP.21.0015).

✉ **Correspondence should be addressed:** Vladimir P. Baklaushev
Orekhovyj bul'var, 28, g. Moscow, 115682, Russia; baklaushev.vp@fnkc-fmba.ru

Received: 29.11.2022 **Accepted:** 20.12.2022 **Published online:** 30.12.2022

DOI: 10.47183/mes.2022.049

Со времен открытия гибридной технологии получения моноклональных антител Келлером и Милстейном в 1975 г. [1] созданы, испытаны, зарегистрированы, применены и выведены из употребления сотни диагностических и терапевтических антител [2]. Первые зарегистрированные терапевтические антитела Muromonab-CD3 были получены гибридной технологией в мыши [3]. Следующим этапом развития технологии получения терапевтических антител стала гуманизация мышиных иммуноглобулинов — частичная или полная, ставшая возможной в результате прогресса технологии рекомбинантных ДНК [4]. Примерно в то же

время, когда на человеке испытывали первые мышиные терапевтические антитела, был создан фаговый дисплей — сначала пептидов [5], а потом и антител [6]. Этот метод стал, пожалуй, самым мощным инструментом создания и «улучшения» терапевтических антител, постепенно вытеснившим гибридную технологию [2, 7]. Альтернатива фаговому дисплею появилась в результате развития технологии секвенирования отдельных клеток, когда стало возможным получение моноклональных антител человека путем клонирования варибельных фрагментов антител из определенного клона плазматических клеток [8].

Одно из самых перспективных направлений медицинского применения моноклональных антител человека — получение терапевтических нейтрализующих антител (нАТ) и использование их для профилактики и лечения социально значимых инфекционных заболеваний. Особую актуальность приобрела разработка вируснейтрализующих антител против возбудителя новой коронавирусной инфекции в период пандемии COVID-19 [9]. С начала пандемии COVID-19 было разработано, испытано в клинических исследованиях и зарегистрировано в FDA и у других регуляторов более 20 различных нАТ. Появление новых вариантов SARS-CoV-2 привело к тому, что большинство нАТ потеряли свою эффективность, вместе с тем ряд нАТ показали широкую нейтрализующую активность в отношении наиболее распространенных вариантов Омикрона [8, 11]. Несмотря на существенное уменьшение доли тяжелого течения COVID-19, нАТ по-прежнему остаются самым эффективным средством этиотропной терапии, особенно актуальной в когорте онкогематологических пациентов и пациентов с другими первичными и вторичными иммунодефицитами [12].

Цель настоящего обзора — на примере разработки вируснейтрализующих антител против SARS-CoV-2 осветить современное состояние проблемы получения рекомбинантных антител человека.

Фаговый дисплей антител

Метод фагового дисплея антител был независимо разработан несколькими научными группами, первой из которых стала группа McCafferty из Кембриджского университета [6]. Суть метода заключается в создании фаговой библиотеки, содержащей все возможные варианты вариабельных участков иммуноглобулинов. Это достигается путем клонирования антигенсвязывающих последовательностей антител в последовательность поверхностного белка pIII филаментных бактериофагов M13, fd или f1, в результате чего создается некоторое количество уникальных клонов, каждый из которых презентует на своей поверхности вариабельный фрагмент определенной специфичности. Дальнейшие этапы технологии включают скрининг фагов и отбор по тому или иному полезному свойству, например по коэффициенту аффинности связывания с антигеном, иммобилизованным на твердой фазе с последующим клонированием отобранных последовательностей в векторы для экспрессии антител [6]. Фаговая библиотека может быть создана из вариабельных участков последовательности иммуноглобулинов иммунизированного животного или человека, а может представлять собой и случайный набор синтетических пептидов [13].

Преимуществом фагового дисплея, по сравнению с другими аналогичными технологиями, такими как рибосомный дисплей [14], дрожжевой дисплей [15] или дисплей в клетках млекопитающих [16], является то, что библиотеки с разнообразием уникальных клонов больше чем 10¹¹ могут быть созданы и продолжительно сохранены в состоянии, готовом для скрининга с любой панелью антигенов [7]. Вариабельные фрагменты антител в фаговых библиотеках могут существовать в нескольких форматах: в виде антиген-связывающих Fab-фрагментов [17] или однодоменных scFv-фрагментов (single chain fragment variable) [18, 19]. ScFv — моновалентные фрагменты антител, имеющие молекулярную массу 25–27 кДа и состоящие из вариабельных доменов тяжелой

(VH) и легкой (VL) цепей иммуноглобулинов, соединенных пептидным линкером [20]. Fab — относительно большие фрагменты иммуноглобулинов, состоящие из VH, VL, CL, и CH1 доменов. Преимущество scFv — в более высоком уровне экспрессии в фагах по сравнению с Fab, однако в формате scFv всегда существует некоторый риск потери аффинности при переводе в Fab или в полноразмерный IgG [7]. Среди других вариантов фаговых библиотек антител однодоменные антитела (человека VH, верблюдовых VHH и акул VNAR соответственно), которым ниже посвящен отдельный раздел.

Методом фагового дисплея антител были получены нАТ против ВИЧ [21], токсина сибирской язвы [22], клещевого энцефалита [23] и, конечно, против SARS-CoV-2 [24]. В последнем исследовании продемонстрировано, что высокоаффинные нейтрализующие антитела против S-белка SARS-CoV-2 с показателем ID₅₀ < 2 нг/мл могут быть получены методом фагового дисплея из полусинтетической библиотеки вариабельных фрагментов наивных антител. Создание правильной библиотеки CDR наивных В-клеток, таким образом, является ключевым параметром, обеспечивающим стабильное спаривание VH и VL доменов и, как следствие, получение высокоаффинных нейтрализующих антител [24]. Вместе с тем, следует отметить, что данная проблема успешно решается далеко не всеми и подавляющее большинство высокоактивных нАТ получено из образцов гипериммунных реконвалесцентов [8].

Из недостатков фагового дисплея канонических олигомерных антител следует отметить, что получаемые антитела, как правило, не соответствуют естественному репертуару, поскольку генерируются из случайных пар VH и VL. Одним из вариантов решения проблемы спаривания VH/VL доменов является использование фаговых библиотек однодоменных антител семейства верблюдовых — так называемых нанотел [25, 26].

Однодоменные антитела как платформа для создания терапевтических иммунопрепаратов методом фагового дисплея

Однодоменные антитела, или нанотела, — рекомбинантные вариабельные домены тяжелых цепей VHH, получаемые из неканонических иммуноглобулинов, Fab-фрагмент которых состоит только из укороченной тяжелой цепи, без легкой цепи. В норме такие антитела присутствуют у хрящевых рыб и представителей семейства верблюдовых (Camelidae) в дополнение к «классическим» иммуноглобулинам G, состоящим из двух тяжелых и двух легких цепей [25]. Основное преимущество нанотел заключается в том, что VHH-домен, представленный одной полипептидной последовательностью, может быть легко клонирован в прокариотической или дрожжевой системах экспрессии. Размер нанотела составляет 12–15 кДа, они хорошо растворимы и способны к рефолдингу после очистки в денатурирующих условиях [25]. Повышенная растворимость VHH связана с особенностями их аминокислотного состава. По сравнению с обычными антителами, у которых интерфейс, обеспечивающий спаривание VH и VL доменов обогащен остатками гидрофобных аминокислот, у VHH в гомологичных участках гидрофобные аминокислоты заменены на более гидрофильные, что повышает растворимость рекомбинантных продуктов за счет уменьшения склонности к агрегации [27].

Небольшой размер и однодоменная природа позволяют нанотелам проникать в структуры, недоступные

для полноразмерных антител и связывать эпитопы, стерически экранированные для обычных антител [25, 28–30]. Успешное преодоление стерических ограничений однодоменными антителами обусловлено еще и тем, что петля, содержащая CDR3 регион в VHH-домене, длиннее, чем у обычных антител, что позволяет первым связывать антигены, расположенные, например, в каталитических расщелинах ферментов или в трехмерных конгруэнтных участках лиганд-рецепторного взаимодействия [7]. Благодаря большей мобильности, в частности, у SARS-CoV-2, однодоменные антитела могут распознавать RBD S-белка в неактивной «down»-конформации и нарушать переход в открытую «up»-конформацию, делая S-белок нефункциональным [31] (см. далее).

Аффинность однодоменных антител находится в том же диапазоне, что и у обычных антител, состоящих из тяжелой и легкой цепей, но при этом нанотела, в отличие от классических антител, обладают высокой стабильностью в широком диапазоне ионных сил, pH и температуры [32]. Производство нанотел в бактериях обходится дешевле, чем производство классических антител. Вследствие высокой гомологии каркасных участков однодоменных VHH верблюдовых и VH доменов подкласса IgG3 человека, первые могут быть легко гуманизированы без потери функциональных свойств [25]. Все перечисленное создает предпосылки для исследований и применения рекомбинантных однодоменных антител как для целей диагностики, так и для терапии [33, 34].

Би- и триспецифические/валентные нанотела

Вследствие малого размера однодоменные антитела характеризуются быстрой кинетикой в системном кровотоке и элиминацией через почки в течение нескольких часов. С одной стороны, это является преимуществом, например, при создании радиоизотопных диагностических инструментов [26], с другой стороны, ограничивает применение нанотел в качестве профилактических и терапевтических агентов и требует дополнительных усилий по увеличению периода их полувыведения из кровотока. Проблема быстрой системной элиминации нанотел решается путем их олигомеризации и/или создания би- и триспецифических антител. С помощью гетеродимеризации и создания би- и тривалентных нанотел их фармакокинетика может быть существенно пролонгирована. В качестве примера можно привести гетеродимерное биспецифическое нанотело ALX-0061, полученное компанией Ablynx и состоящее из высокоаффинного VHH-домена, связывающего рецептор IL6 с коэффициентом аффинности 0,19 пМ, и VHH-домена, специфичного к сывороточному альбумину. За счет последнего обеспечивается период полувыведения гетеродимерного комплекса, равного 6,6 суток, при молекулярной массе первого 26 кДа [35], и это явно не предел. Столь высокая аффинность нанотела ALX-0061 — продукт «аффинного созревания», выполненного также с помощью фагового дисплея, в результате которого удалось получить 200-кратное увеличение аффинности, по сравнению с исходным VHH-доменом [35]. Еще один пример терапевтического антитела на основе гетероолигомеризации нанотел — препарат Ozoralizumab, представляющий собой гуманизированное биспецифичное тривалентное антитело, состоящее из двух VHH-доменов, связывающих TNF α , и одного

VHH-домена, связывающего сывороточный альбумин [36]. Введение в состав би- и тривалентных антител VHH-домена, связывающего сывороточный альбумин, можно считать одним из стандартных подходов по увеличению периода полувыведения рекомбинантных нанотел [37].

Создание би- и тривалентных антител путем олигомеризации VHH-доменов не только имеет значение для увеличения периода полувыведения этих антител, но и сопровождается повышением их функциональности за счет увеличения авидности таких антител [38]. Еще одним вариантом повышения полужизни и функциональной активности нанотел является создание белков слияния с Fc-фрагментом иммуноглобулинов человека. Модификация нанотел Fc-фрагментом существенно увеличивает период полужизни в кровотоке, а также способствует включению Fc-опосредованных эффекторных функций (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, комплемент-зависимая цитотоксичность и т. д.) [39, 40].

Вируснейтрализующие нанотела

В допандемическую эпоху разными группами исследователей были получены терапевтические нейтрализующие нанотела против респираторного синцитиального вируса [41], MERS-CoV [42], пандемических вариантов вируса гриппа: H1N1 [43], H5N1 [44], а также мультидоменные широконейтрализующие нанотела против вируса гриппа, связывающие гемагглютинин [45]. С началом пандемии SARS-CoV-2 эти технологические разработки были применены для создания нейтрализующих нанотел против нового возбудителя. Так, с помощью технологии дрожжевого дисплея [46] были получены синтетические нейтрализующие нанотела mNb6-tri против S-белка SARS-CoV-2. Показано, что эти нанотела, связываясь с S-тримером в «down»-конформации, стабилизируют его в этой неактивной форме и таким образом делают невозможным взаимодействие с ACE2 [31]. В результате генноинженерной оптимизации тривалентные антитела mNb6-tri приобрели фемтомолярную аффинность и пикомолярную концентрацию полной вирус-нейтрализации SARS-CoV-2. Данные антитела сохраняют функциональность после лиофилизации, нагревания, перевода в аэрозоль и могут быть применены в ингаляционной форме для вирус-нейтрализации в бронхоальвеолярном дереве [31].

Получена панель RBD-специфичных нанотел из библиотеки фаговых дисплеев VHH, созданных из В-клеток бактериального верблюда, иммунизированного рекомбинантным RBD [47]. С помощью теста вирус-нейтрализации *in vitro* были отобраны три клона (P2C5, P5F8 и P2G1), полностью подавлявшие цитопатический эффект SARS-CoV-2 при концентрациях 12–48 нМ. Для улучшения противовирусных свойств антител были получены гомодимерные и гетеродимерные формы клонов нанотел, показавшие в 100 и более раз высокую вируснейтрализующую активность, по сравнению с мономерами [47].

В свете возникновения новых вариантов SARS-CoV-2, характеризующихся повышенной способностью избегания вируснейтрализующих антител, очень актуальны подходы по созданию широконейтрализующих антител, связывающих все возможные варианты SARS-CoV-2. По крайней мере один подход реализован с помощью технологии однодоменных антител. Группа исследователей

иммунизировали ламу поочередно S-белком SARS-CoV-1 и MERS-CoV, после чего получили фаговую библиотеку переменных доменов антител и провели скрининг в том числе против S-белка SARS-CoV-2. В результате получено нанотело VHH72, характеризующееся высокой кросснейтрализующей активностью по отношению к SARS-CoV-1 и SARS-CoV-2. Авторы создали бивалентное антитело на основе VHH72 в виде белка слияния с Fc-фрагментом Ig человека и показали его перспективность в качестве кандидата для создания широконейтрализующего противовирусного препарата [48]. С помощью фагового дисплея и VHH получены и другие вируснейтрализующие нанотела, инактивирующие SARS-CoV-2 [49].

Таким образом, с помощью технологии однодоменных антител получен ряд перспективных гомо- и гетеродимерных нАт, которые являются многообещающими кандидатами для создания этиотропного препарата для лечения и профилактики COVID-19.

Получение рекомбинантных антител человека из отдельных В-клеток

Самый современный с исторической и методологической точек зрения подход к получению моноклональных антител человека заключается в прямом выделении специфических В-клеток с последующим секвенированием геномов отдельных клеток и идентификацией переменных фрагментов, продуцируемых ими мАт [50]. Этот подход имеет три варианта, различающихся методологией первого этапа (идентификация и наращивание антигенспецифического клона В-клеток). Например, с помощью гибридомной технологии можно получить гибридомы целевых В-клеток с миеломными клетками и провести селекцию на среде НАТ с последующим отбором гибридом нужной специфичности (1); либо выделить, культивировать и отобрать В-клетки памяти (2); либо напрямую выделить В-клетки памяти с целевым BCR, взаимодействующим с флуоресцентно или магнитно меченым антигеном, с последующим анализом репертуара специфических клонов В-клеток с помощью технологии single cell sequence (3). Последний вариант является самым современным и технологичным и позволяет за сравнительно короткое время получать панели специфических нАт [8]. Антиген-специфические В-клетки памяти могут быть получены из плазмы гипериммунных пациентов или от трансгенных мышей, несущих локусы иммуноглобулина человека и продуцирующих полностью человеческие антитела в ответ на иммунизацию целевым антигеном [51]. С целью сделать скрининг отдельных антителопродуцирующих клеток высокопроизводительным применяют различные технологические решения, например, микрофлюидную сортировку В-клеток с оценкой специфичности BCR с последующим бар-кодированием пар VH и VL и высокопроизводительным секвенированием [52].

Преимуществом новой технологии является то, что ее результат не зависит от разнообразия библиотеки переменных доменов, но при этом всегда является вариантом естественного репертуара антител, вследствие чего характеризуется приемлемым профилем безопасности и существенно меньшей вероятностью неспецифических (off-target) взаимодействий с собственными антигенными детерминантами [50]. Применение высокопроизводительных технологических решений наряду с NGS-секвенированием в формате единичных клеток позволяет одновременно анализировать

сотни различных клонов В-клеток памяти, секретирующих антитела заданной специфичности, и производить отбор по различным полезным признакам (аффинность, авидность, перекрывание антигенных эпитопов и пр.) [8, 52].

Подход, основанный на получении нАТ из отдельных клонов В-клеток путем single cell sequence, показал свою высокую эффективность при создании широконейтрализующих антител, блокирующих сайт связывания CD4 в областях V1/V2 и V3 gp120, а также gp41 ВИЧ [53, 54]. Кроме того, с помощью данной технологии были получены мАт против цитомегаловируса [55] S-антигена вируса гепатита В (HBsAg) [56] и большое количество нАТ против S-белка SARS-CoV-2 [57–60].

С помощью технологии анализа отдельных В-клеток от иммунизированных гуманизированных мышей и реконвалесцентов после COVID-19 были получены одни из первых вируснейтрализующих антител REGN10933 (casirivimab) и REGN10897 (imdevimab) [58]. С помощью NGS-секвенирования и 3D-картирования антигенных эпитопов методом HDX-MS (от англ. hydrogen-deuterium exchange mass spectrometry) была проанализирована панель из более чем 200 вируснейтрализующих антител, из которых в итоге отобрано четыре антитела, характеризующихся неперекрывающимися эпитопами. Применение пар этих антител в коктейле позволило эффективно нейтрализовать все известные на тот момент варианты SARS-CoV-2.

В 2021 г. было проведено аналогичное исследование по созданию панели вируснейтрализующих антител против SARS-CoV-2 [8]. В результате NGS-секвенирования клонов В-клеток пациентов, тяжело перенесших COVID-19, получено 18 высокоаффинных антител к RBD с KD в диапазоне 0,47–13,3 нМ и обладающих вируснейтрализующей активностью, причем четыре из них характеризовались 100%-й вируснейтрализацией при концентрации ниже 16 нг/мл [8]. Далее проводили конкурентный анализ взаимодействия полученных антител с панелью коммерчески доступных нейтрализующих антител, для которых известна 3D-структура антигенного эпитопа. Кроме уже упомянутых REGN10933 (casirivimab) и REGN10897 (imdevimab) [58], можно назвать еще COVA2-15 [59] и COV2-2504 [60]. Результаты конкурентного анализа, а также серии экспериментов по вируснейтрализации RBD SARS-CoV-2 с известными точечными мутациями позволили достаточно точно идентифицировать антигенные эпитопы полученных ультранейтрализующих антител. Комбинирование взаимодополняющих антител позволило подобрать коктейли нАт, обеспечивающие эффективную нейтрализацию всех исследованных вариантов SARS-CoV-2. Этот опыт показывает, что получение из индивидуальных В-клеток памяти исчерпывающей панели широконейтрализующих антител, перекрывающей все возможные антигенные эпитопы и обеспечивающей избегание точечных мутаций, может позволить быстро подбирать эффективные вируснейтрализующие коктейли против любых новых вариантов SARS-CoV-2. При необходимости, панель широконейтрализующих антител может быть дополнена с помощью направленного мутагенеза антигенсвязывающих участков.

Создано несколько микрофлюидных платформ, значительно увеличивающих производительность клонирования и экспрессию отдельных антител. Одной из них является платформа 10x Genomics, в которой в микрофлюидном устройстве генерируются капли, содержащие по одной антителопродуцирующей клетке, а

также лизирующий буфер с микрошариками, покрытыми бар-кодированными праймерами, для кодирования кДНК конкретных нативных пар VH и VL доменов [61].

Недавно была разработана LIBRA-seq (от англ. linking B cell receptor to antigen specificity through sequencing) — технология высокопроизводительного скрининга BCR путем связывания В-лимфоцитов с баркодированными с помощью олигонуклеотидов антигенами с последующим NGS-секвенированием [62]. Она позволила провести скрининг антигенной специфичности нескольких тысяч В-клеток ВИЧ-инфицированных пациентов и подтвердить предсказанную специфичность для антител к ВИЧ, гриппу и SARS-CoV-2, включая известные и неизвестные нАТ.

Получаемые с помощью технологии single B-cell мАТ могут быть точно так же генноинженерно модифицированы, как и антитела, полученные фаговым дисплеем. Так, возможна модификация Fc-фрагмента для увеличения циркуляции антител в кровотоке. Среди наиболее продвинутых модифицированных антител против SARS-CoV-2 можно отметить антитело сотровимаб (известное так же как VIR-7831 и GSK4182136), разработанное Vir Biotechnology и GlaxoSmithKline, одобренное FDA в 2021 г. Fc-фрагмент сотровимаба включает аминокислотные замены M428L и N434S (модификация LS) для пролонгирования периода полувыведения [63]. Другим примером является AZD7442, коктейль из антител к SARS-CoV-2 нАТ tixagevimab (AZD8895) и Cilgavimab (AZD1061) [64], разработанный AstraZeneca. Оба нАТ в комбинации имеют сконструированные Fc-домены, включающие замены L234F/L235/P331S (модификация TM), что приводит к незначительному связыванию или его полному отсутствию с различными FcγRs или белком комплемента C1q и незначительной эффекторной функции *in vitro* [64] или ее отсутствию.

Применение искусственного интеллекта как перспектива дальнейшего развития технологий создания антител человека

На роль принципиально новой технологии получения антител человека уже сейчас может претендовать вычислительная технология прогнозирования структуры антител *in silico* с помощью искусственного интеллекта [65]. Созданная в 2021 г. нейросеть AlphaFold2 позволяет прогнозировать пространственную структуру белков по первичной последовательности с атомарной точностью [66]. AlphaFold2 — это первый успешный пример применения машинного обучения для моделирования третичной структуры белка. AlphaFold2 использует так называемое множественное выравнивание последовательностей MSA (от англ. multiple sequence alignment), анализируя информацию о спаривании аминокислотных остатков и структурные шаблоны для первичной последовательности [67].

Специально для предсказания 3D-структуры антител и антигенных эпитопов был разработан сервис AbAdapt, объединяющий структурное моделирование антител и антигенов с моделированием их взаимодействия. По умолчанию AbAdapt принимает первичные последовательности в качестве входных данных и использует Repertoire Builder [68] — высокопроизводительный сервис

моделирования структуры антител. В 2022 г. с помощью объединения AlphaFold и AbAdapt была разработана система AbAdapt-AF [69], более точно предсказывающая структуру паратопов и антигенных эпитопов, специфичных для антител. Авторы применили разработанный сервис для анализа вирус-нейтрализующего антитела к RBD домену SARS-CoV-2 и показали, что их система наилучшим образом моделирует антиген-антительное взаимодействие. Недавно созданные специализированные нейросети Ablooper [70] и DeepAb [71] показали большую производительность, чем сети Rosetta Antibody Benchmark и AlphaFold2.

В августе 2022 г. была представлена нейросеть NanoNet, оптимизированная для предсказания 3D-структуры VHH [72]. Ее архитектура состоит из сверхточной нейросети (CNN) с двумя дополнительными нейросетями (ResNet). Первая ResNet анализирует каркасы и гипервариабельные циклы CDR, а вторая воспринимает взаимодействия между аминокислотными остатками. Сравнение NanoNet с AlphaFold2 по предсказанию 3D-структуры известных 16 VHH, депонированных в PDB в 2021 г., т. е. отсутствующих в обучении AlphaFold2, продемонстрировала более высокую атомарную точность NanoNet. Таким образом, NanoNet представляет собой весьма многообещающий новый инструмент для моделирования структуры VHH, нашедший применение в том числе для оптимизации предсказаний структуры петель CDR3 нейтрализующих VHH против SARS-CoV-2 [73].

Можно заключить, что уже сейчас существует теоретическая возможность создания высокоаффинных вариабельных доменов антител *in silico* — без использования В-клеток и иммунизации. Несомненно, в будущем подбор высокоаффинной последовательности к конкретным антигенным эпитопам с помощью машинного обучения станет рутинным методом получения антител человека.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технологии получения моноклональных вируснейтрализующих антител человека в настоящее время базируются на применении фагового дисплея антител и технологии получения антител из отдельных В-клеток. Каждая из технологий имеет свои преимущества и ограничения. С помощью фагового дисплея можно быстро осуществлять скрининг фаговых библиотек с последовательностями антигенсвязывающих участков по отношению к новым антигенам. Технология однодоменных антител VHH позволяет создавать би- и триспецифичные антитела, оптимизировать аффинность и вируснейтрализацию новых вариантов SARS-CoV-2. Технология получения антител из отдельных В-клеток, усиленная высокопроизводительным скринингом на основе микрофлюидики и NGS-секвенирования, сделала возможным создание панелей вируснейтрализующих антител, комбинирование которых способно «перекрывать» любые модификации RBD SARS-CoV-2. Перспективы развития технологии получения моноклональных антител включают применение нейросетей и машинного обучения для прогнозирования первичной структуры вариабельных доменов антител по третичной структуре целевого антигена.

Литература

- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1975; 256 (5517): 495–7.
- Frenzel A, Kügler J, Helmsing S, Meier D, Schirrmann T, Hust M, et al. Designing human antibodies by phage display. *Transfus Med Hemother*. 2017; 44 (5): 312–8.
- Emmons C, Hunsicker LG. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Iowa Med*. 1987; 77 (2): 78–82.
- Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev*. 2006; 58: 640–56.
- Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science*. 1985; 228: 1315–7.
- McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature*. 1990; 348 (6301): 552–4.
- Ledsgaard L, Ljungars A, Rimbault C, Sørensen CV, Tulika T, Wade J, et al. Advances in antibody phage display technology. *Drug Discov. Today*. 2022; 27 (8): 2151–69.
- Gorchakov AA, Kulemzin SV, Guselnikov SV, Baranov KO, Belovezhets TN, Mechetina LV, et al. Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern. *Cell Discov*. 2021; 7 (1): 96.
- Baklaushv VP, Kulemzin SV, Gorchakov AA, Lesnyak VN, Yusubaliyeva GM, Sotnikova AG. COVID-19. Aetiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Practice*. 2020; 11 (1): 7–20.
- Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. World Health Organization. 2021. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
- Баклаушев В. П., Юсубалиева Г. М., Бычинин М. В., Юсубалиева С. М., Кальсин В. А., Троицкий А. В. Рациональная стратегия поддержания противовирусного иммунитета к новым вариантам SARS-CoV-2. *Клиническая практика*. 2022; 13 (3): 43–55.
- Synowiec A, Szczepański A, Barreto-Duran E, Lie LK, Pyrc K. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a systemic infection. *Clin Microbiol Rev*. 2021; 34: e00133–20.
- Hoogenboom HR. Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol*. 2002; 178: 1–37.
- Hanes J, Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94 (10): 4937–42.
- Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*. 1997; 15 (6): 553–7.
- Beerli RR, Bauer M, Buser RB, Gwerder M, Muntwiler S, Maurer P, et al. Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (38): 14336–41.
- Hoet RM, Cohen EH, Kent RB, Rookey K, Schoonbroodt S, Hogan S, et al. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat Biotechnol*. 2005; 23: 344–8.
- Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol*. 1996; 14: 309–14.
- Chan CE, Chan AH, Lim AP, Hanson BJ. Comparison of the efficiency of antibody selection from semi-synthetic scFv and non-immune Fab phage display libraries against protein targets for rapid development of diagnostic immunoassays. *J Immunol Methods*. 201; 373 (1–2): 79–88.
- Li K, Zettlitz KA, Lipianskaya J, Zhou Y, Marks JD, Mallick P, et al. A fully human scFv phage display library for rapid antibody fragment reformatting. *Protein Eng Des Sel*. 2015; 28 (10): 307–16.
- Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science*. 1994; 266 (5187): 1024–7.
- Maynard JA, Maassen CB, Leppla SH, Brasky K, Patterson JL, Iverson BL, et al. Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat Biotechnol*. 2002; 20 (6): 597–601.
- Matveev AL, Kozlova IV, Stronin OV, Khlyusevich YA, Doroshchenko EK, Baykov IK, et al. Post-exposure administration of chimeric antibody protects mice against European, Siberian, and Far-Eastern subtypes of tick-borne encephalitis virus. *PLoS One*. 2019; 14 (4): e0215075.
- Ferrara F, Erasmus MF, D'Angelo S, Leal-Lopes C, Teixeira AA, Choudhary A, et al. A pandemic-enabled comparison of discovery platforms demonstrates a naive antibody library can match the best immune-sourced antibodies. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 462.
- Тиллиб С. В. Перспективы использования однодоменных антител в биомедицине. *Молекулярная биология*. 2020; 54 (3): 362–73.
- Iezzi ME, Policastro L, Werbach S, Podhajcer O, Canziani GA. Single-domain antibodies and the promise of modular targeting in cancer imaging and treatment. *Front Immunol*. 2018; 9: 273.
- Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyltermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem*. 2009; 284 (5): 3273–84.
- De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103 (12): 4586–91.
- Muyltermans S. Applications of nanobodies. *Annu Rev Anim Biosci*. 2021; 9: 401–21.
- Zavrtanik U, Lukan J, Loris R, Lah J, Hadži S. Structural basis of epitope recognition by heavy-chain camelid antibodies. *J Mol Biol*. 2018; 430 (21): 4369–86.
- Schoof M, Faust B, Saunders RA, Sangwan S, Rezelj V, Hoppe N, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science*. 2020; 370 (6523): 1473–9.
- Van der Linden RH, Frenken LG, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1431 (1): 37–46.
- Jovčevska I, Muyltermans S. The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs*. 2020; 34 (1): 11–26.
- Muyltermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82: 775–97.
- Van Roy M, Ververken C, Beirnaert E, Hoefman S, Kolkman J, Vierboom M, et al. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17 (1): 135.
- Ishiwatari-Ogata C, Kyuuma M, Ogata H, Yamakawa M, Iwata K, Ochi M, et al. Ozoralizumab, a humanized anti-TNF α NANOBODY® Compound, exhibits efficacy not only at the onset of arthritis in a human TNF transgenic mouse but also during secondary failure of administration of an anti-TNF α IgG. *Front Immunol*. 2022; 13: 853008.
- Van Faassen H, Ryan S, Henry KA, Raphael S, Yang Q, Rossotti MA, et al. Serum albumin-binding VH Hs with variable pH sensitivities enable tailored half-life extension of biologics. *FASEB J*. 2020; 34 (6): 8155–71.
- Saerens D, Ghassabeh GH, Muyltermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8 (5): 600–8.
- Godakova SA, Noskov AN, Vinogradova ID, Ugriumova GA, Solovyev AI, Esmagametov IB, et al. Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice. *Toxins (Basel)*. 2019; 11 (8): 464.
- Günaydin G, Yu S, Gräslund T, Hammarström L, Marcotte H. Fusion of the mouse IgG1 Fc domain to the VHH fragment (ARP1) enhances protection in a mouse model of rotavirus. *Sci Rep*. 2016; 6: 30171.
- Detalle L, Stohr T, Palomo C, Piedra PA, Gilbert BE, Mas V, et al. Generation and characterization of ALX-0171, a potent

- novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *antimicrob agents chemother.* 2015; 60 (1): 6–13.
42. Stalin Raj V, Okba NMA, Gutierrez-Alvarez J, Drabek D, van Dieren B, Widagdo W, et al. Chimeric camel/human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection. *Sci Adv.* 2018; 4 (8): eaas9667.
 43. Hufton SE, Risley P, Ball CR, Major D, Engelhardt OG, Poole S. The breadth of cross sub-type neutralisation activity of a single domain antibody to influenza hemagglutinin can be increased by antibody valency. *PLoS One.* 2014; 9 (8): e103294.
 44. Ibañez LI, De Filette M, Hultberg A, Verrips T, Temperton N, Weiss RA, et al. Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. *J Infect Dis.* 2011; 203 (8): 1063–72.
 45. Laursen NS, Friesen RHE, Zhu X, Jongeneelen M, Blokland S, Vermond J, et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science.* 2018; 362 (6414): 598–602.
 46. McMahon C, Baier AS, Pascolutti R, Wegrecki M, Zheng S, Ong JX, et al. Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nat Struct Mol Biol.* 2018; 25 (3): 289–96.
 47. Favorskaya IA, Shchelyakov DV, Esmagambetov IB, Dolzhikova IV, Alekseeva IA, Korobkova AI, et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Immunol.* 2022; 13: 822159.
 48. Wrapp D, De Vlieger D, Corbett KS, Torres GM, Wang N, Van Breedam W, et al. Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies. *Cell.* 2020; 181 (5): 1004–15.e15.
 49. Chen F, Liu Z, Jiang F. Prospects of Neutralizing Nanobodies Against SARS-CoV-2. *Front Immunol.* 2021; 12: 690742.
 50. Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol.* 2021; 42: 1143–58.
 51. Lee EC, Liang Q, Ali H, Bayliss L, Beasley A, Bloomfield-Gerdes T, et al. Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat Biotechnol.* 2014; 32 (4): 356–63.
 52. Gérard A, Woolfe A, Mottet G, Reichen M, Castrillon C, Menrath V, et al. High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics. *Nat Biotechnol.* 2020; 38 (6): 715–21.
 53. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature.* 2009; 458 (7238): 636–40.
 54. McCoy LE, Burton DR. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol Rev.* 2017; 275 (1): 11–20.
 55. Macagno A, Bernasconi NL, Vanzetta F, Dander E, Sarasini A, Revello MG, et al. Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J Virol.* 2010; 84 (2): 1005–13.
 56. Wang Q, Michailidis E, Yu Y, Wang Z, Hurley AM, Oren DA, et al. A combination of human broadly neutralizing antibodies against hepatitis B virus HBsAg with distinct epitopes suppresses escape mutations. *Cell Host Microbe.* 2020; 28 (2): 335–49.e6.
 57. Hartley GE, Edwards ESJ, Aui PM, Varese N, Stojanovic S, McMahon J, et al. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci Immunol.* 2020; 5 (54): eabf8891.
 58. Hansen J, Baum A, Pascal KE, Russo V, Giordano S, Wloga E, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science.* 2020; 369 (6506): 1010–4.
 59. Brouwer PJM, Caniels TG, van der Straten K, Snitselaar JL, Aldon Y, Bangaru S, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science.* 2020; 369 (6504): 643–50.
 60. Zost SJ, Gilchuk P, Case JB, Binshtein E, Chen RE, Nkolola JP, et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature.* 2020; 584 (7821): 443–9.
 61. Tanno H, McDaniel JR, Stevens CA, Voss WN, Li J, Durrett R, et al. A facile technology for the high-throughput sequencing of the paired VH:VL and TCR β :TCR α repertoires. *Sci Adv.* 2020; 6 (17): eaay9093.
 62. Setliff I, Shiakolas AR, Pilewski KA, Murji AA, Mapengo RE, Janowska K, et al. High-throughput mapping of B cell receptor sequences to antigen specificity. *Cell.* 2019; 179 (7): 1636–46.e15.
 63. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, Crespo Casal M, Moya J, Falci DR, et al. Early treatment for covid-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody sotrovimab. *N Engl J Med.* 2021; 385 (21): 1941–50.
 64. Loo YM, McTamney PM, Arends RH, Abram ME, Aksyuk AA, Diallo S, et al. The SARS-CoV-2 monoclonal antibody combination, AZD7442, is protective in nonhuman primates and has an extended half-life in humans. *Sci Transl Med.* 2022; 14 (635): eab18124.
 65. Vishwakarma P, Vattekatte AM, Shinada N, Diharce J, Martins C, Cadet F, et al. VHH structural modelling approaches: a critical review. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (7): 3721.
 66. Senior AW, Evans R, Jumper J, Kirkpatrick J, Sifre L, Green T, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature.* 2020; 577: 706–10.
 67. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021; 596 (7873): 583–9.
 68. Schrit D, Li S, Rozewicki J, Katoh K, Yamashita K, Volkmut W, et al. Repertoire Builder: high-throughput structural modeling of B and T cell receptors. *Mol Sys. Des Eng.* 2019; 4: 761–8.
 69. Xu Z, Davila A, Wilamowski J, Teraguchi S, Standley DM. Improved antibody-specific epitope prediction using AlphaFold and AbAdapt. *Chembiochem.* 2022; 23 (18): e202200303.
 70. Abanades B, Georges G, Bujotzek A, Deane CM. ABlooper: fast accurate antibody CDR loop structure prediction with accuracy estimation. *Bioinformatics.* 2022; 38 (7): 1877–80. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac016.
 71. Ruffolo JA, Sulam J, Gray JJ. Antibody structure prediction using interpretable deep learning. *Patterns (NY).* 2021; 3 (2): 100406. DOI: 10.1016/j.patter.2021.100406. PMID: 35199061; PMCID: PMC8848015.
 72. Cohen T, Halfon M, Schneidman-Duhovny D. NanoNet: Rapid and accurate end-to-end nanobody modeling by deep learning. *Front Immunol.* 2022; 13: 958584. DOI: 10.3389/fimmu.2022.958584.
 73. Sun D, Sang Z, Kim YJ, Xiang Y, Cohen T, Belford AK, et al. Potent neutralizing nanobodies resist convergent circulating variants of SARS-CoV-2 by targeting diverse and conserved epitopes. *Nat Commun.* 2021; 12: 4676.

References

1. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256 (5517): 495–7.
2. Frenzel A, Kügler J, Helmsing S, Meier D, Schirrmann T, Hust M, et al. Designing human antibodies by phage display. *Transfus Med Hemother.* 2017; 44 (5): 312–8.
3. Emmons C, Hunsicker LG. Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3): the first monoclonal antibody approved for therapeutic use. *Iowa Med.* 1987; 77 (2): 78–82.
4. Presta LG. Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Adv Drug Deliv Rev.* 2006; 58: 640–56.
5. Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985; 228: 1315–7.
6. McCafferty J, Griffiths AD, Winter G, Chiswell DJ. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature.* 1990; 348 (6301): 552–4.
7. Ledsgaard L, Ljungars A, Rimbault C, Sørensen CV, Tulika T,

- Wade J, et al. Advances in antibody phage display technology. *Drug Discov. Today*. 2022; 27 (8): 2151–69.
8. Gorchakov AA, Kulemzin SV, Gusel'nikov SV, Baranov KO, Belovezhets TN, Mechetina LV, et al. Isolation of a panel of ultra-potent human antibodies neutralizing SARS-CoV-2 and viral variants of concern. *Cell Discov*. 2021; 7 (1): 96.
 9. Baklaushv VP, Kulemzin SV, Gorchakov AA, Lesnyak VN, Yusubalieva GM, Sotnikova AG. COVID-19. Aetiology, pathogenesis, diagnosis and treatment. *Journal of Clinical Practice*. 2020; 11 (1): 7–20.
 10. Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. World Health Organization. 2021. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>.
 11. Baklaushv VP, Yusubalieva GM, Bychinin MV, Yusubalieva SM, Kalsin VA, Troickij AV. Racional'naya strategiya podderzhaniya protivovirusnogo immuniteta k novym variantam SARS-CoV-2. *Klinicheskaya praktika*. 2022; 13 (3): 43–55. Russian.
 12. Synowiec A, Szczepański A, Barreto-Duran E, Lie LK, Pyrc K. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2): a systemic infection. *Clin Microbiol Rev*. 2021; 34: e00133–20.
 13. Hoogenboom HR. Overview of antibody phage-display technology and its applications. *Methods Mol Biol*. 2002; 178: 1–37.
 14. Hanes J, Plückthun A. In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94 (10): 4937–42.
 15. Boder ET, Wittrup KD. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat Biotechnol*. 1997; 15 (6): 553–7.
 16. Beerli RR, Bauer M, Buser RB, Gwerder M, Muntwiler S, Maurer P, et al. Isolation of human monoclonal antibodies by mammalian cell display. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105 (38): 14336–41.
 17. Hoet RM, Cohen EH, Kent RB, Rookey K, Schoonbroodt S, Hogan S, et al. Generation of high-affinity human antibodies by combining donor-derived and synthetic complementarity-determining-region diversity. *Nat Biotechnol*. 2005; 23: 344–8.
 18. Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, et al. Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol*. 1996; 14: 309–14.
 19. Chan CE, Chan AH, Lim AP, Hanson BJ. Comparison of the efficiency of antibody selection from semi-synthetic scFv and non-immune Fab phage display libraries against protein targets for rapid development of diagnostic immunoassays. *J Immunol Methods*. 201; 373 (1–2): 79–88.
 20. Li K, Zettlitz KA, Lipianskaya J, Zhou Y, Marks JD, Mallick P, et al. A fully human scFv phage display library for rapid antibody fragment reformatting. *Protein Eng Des Sel*. 2015; 28 (10): 307–16.
 21. Burton DR, Pyati J, Koduri R, Sharp SJ, Thornton GB, Parren PW, et al. Efficient neutralization of primary isolates of HIV-1 by a recombinant human monoclonal antibody. *Science*. 1994; 266 (5187): 1024–7.
 22. Maynard JA, Maassen CB, Leppla SH, Brasky K, Patterson JL, Iverson BL, et al. Protection against anthrax toxin by recombinant antibody fragments correlates with antigen affinity. *Nat Biotechnol*. 2002; 20 (6): 597–601.
 23. Matveev AL, Kozlova IV, Stronin OV, Khlusevich YA, Doroshchenko EK, Baykov IK, et al. Post-exposure administration of chimeric antibody protects mice against European, Siberian, and Far-Eastern subtypes of tick-borne encephalitis virus. *PLoS One*. 2019; 14 (4): e0215075.
 24. Ferrara F, Erasmus MF, D'Angelo S, Leal-Lopes C, Teixeira AA, Choudhary A, et al. A pandemic-enabled comparison of discovery platforms demonstrates a naïve antibody library can match the best immune-sourced antibodies. *Nat Commun*. 2022; 13 (1): 462.
 25. Tillib SV. Perspektivy ispol'zovaniya odnodomennyx antitel v biomedicine. *Molekulyarnaya biologiya*. 2020; 54 (3): 362–73.
 26. Iezzi ME, Policastro L, Werbañh S, Podhajcer O, Canziani GA. Single-domain antibodies and the promise of modular targeting in cancer imaging and treatment. *Front Immunol*. 2018; 9: 273.
 27. Vincke C, Loris R, Saerens D, Martinez-Rodriguez S, Muyldermans S, Conrath K. General strategy to humanize a camelid single-domain antibody and identification of a universal humanized nanobody scaffold. *J Biol Chem*. 2009; 284 (5): 3273–84.
 28. De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, et al. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103 (12): 4586–91.
 29. Muyldermans S. Applications of nanobodies. *Annu Rev Anim Biosci*. 2021; 9: 401–21.
 30. Zavrtnik U, Lukan J, Loris R, Lah J, Hadži S. Structural basis of epitope recognition by heavy-chain camelid antibodies. *J Mol Biol*. 2018; 430 (21): 4369–86.
 31. Schoof M, Faust B, Saunders RA, Sangwan S, Rezelj V, Hoppe N, et al. An ultrapotent synthetic nanobody neutralizes SARS-CoV-2 by stabilizing inactive Spike. *Science*. 2020; 370 (6523): 1473–9.
 32. Van der Linden RH, Frenken LG, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, et al. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*. 1999; 1431 (1): 37–46.
 33. Jovčevska I, Muyldermans S. The therapeutic potential of nanobodies. *BioDrugs*. 2020; 34 (1): 11–26.
 34. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82: 775–97.
 35. Van Roy M, Ververken C, Beirnaert E, Hoefman S, Kolkman J, Vierboom M, et al. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody® ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther*. 2015; 17 (1): 135.
 36. Ishiwatari-Ogata C, Kyuuma M, Ogata H, Yamakawa M, Iwata K, Ochi M, et al. Ozoralizumab, a humanized anti-TNFα NANOBODY® Compound, exhibits efficacy not only at the onset of arthritis in a human TNF transgenic mouse but also during secondary failure of administration of an anti-TNFα IgG. *Front Immunol*. 2022; 13: 853008.
 37. Van Faassen H, Ryan S, Henry KA, Raphael S, Yang Q, Rossotti MA, et al. Serum albumin-binding VH Hs with variable pH sensitivities enable tailored half-life extension of biologics. *FASEB J*. 2020; 34 (6): 8155–71.
 38. Saerens D, Ghassabeh GH, Muyldermans S. Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol*. 2008; 8 (5): 600–8.
 39. Godakova SA, Noskov AN, Vinogradova ID, Ugriumova GA, Solovyev AI, Esmagambetov IB, et al. Camelid VHHs fused to human Fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin A in mice. *Toxins (Basel)*. 2019; 11 (8): 464.
 40. Günaydin G, Yu S, Gräslund T, Hammarström L, Marcotte H. Fusion of the mouse IgG1 Fc domain to the VHH fragment (ARP1) enhances protection in a mouse model of rotavirus. *Sci Rep*. 2016; 6: 30171.
 41. Detalle L, Stohr T, Palomo C, Piedra PA, Gilbert BE, Mas V, et al. Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *antimicrob agents chemother*. 2015; 60 (1): 6–13.
 42. Stalin Raj V, Okba NMA, Gutierrez-Alvarez J, Drabek D, van Dieren B, Widagdo W, et al. Chimeric camel/human heavy-chain antibodies protect against MERS-CoV infection. *Sci Adv*. 2018; 4 (8): eaas9667.
 43. Hufton SE, Risleby P, Ball CR, Major D, Engelhardt OG, Poole S. The breadth of cross sub-type neutralisation activity of a single domain antibody to influenza hemagglutinin can be increased by antibody valency. *PLoS One*. 2014; 9 (8): e103294.
 44. Ibañez LI, De Filette M, Hultberg A, Verrips T, Temperton N, Weiss RA, et al. Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. *J Infect Dis*. 2011; 203 (8): 1063–72.
 45. Laursen NS, Friesen RHE, Zhu X, Jongeneelen M, Blokland S, Vermond J, et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science*. 2018; 362 (6414): 598–602.
 46. McMahon C, Baier AS, Pascolutti R, Wegrecki M, Zheng S, Ong JX, et al. Yeast surface display platform for rapid discovery of conformationally selective nanobodies. *Nat Struct Mol Biol*. 2018; 25 (3): 289–96.
 47. Favorskaya IA, Shcheblyakov DV, Esmagambetov IB, Dolzhikova IV,

- Alekseeva IA, Korobkova AI, et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front Immunol.* 2022; 13: 822159.
48. Wrapp D, De Vlieger D, Corbett KS, Torres GM, Wang N, Van Breedam W, et al. Structural basis for potent neutralization of betacoronaviruses by single-domain camelid antibodies. *Cell.* 2020; 181 (5): 1004–15.e15.
 49. Chen F, Liu Z, Jiang F. Prospects of Neutralizing Nanobodies Against SARS-CoV-2. *Front Immunol.* 2021; 12: 690742.
 50. Pedrioli, A, Oxenius, A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol.* 2021; 42: 1143–58.
 51. Lee EC, Liang Q, Ali H, Bayliss L, Beasley A, Bloomfield-Gerdes T, et al. Complete humanization of the mouse immunoglobulin loci enables efficient therapeutic antibody discovery. *Nat Biotechnol.* 2014; 32 (4): 356–63.
 52. Gérard A, Woolfe A, Mottet G, Reichen M, Castrillon C, Menrath V, et al. High-throughput single-cell activity-based screening and sequencing of antibodies using droplet microfluidics. *Nat Biotechnol.* 2020; 38 (6): 715–21.
 53. Scheid JF, Mouquet H, Feldhahn N, Seaman MS, Velinzon K, Pietzsch J, et al. Broad diversity of neutralizing antibodies isolated from memory B cells in HIV-infected individuals. *Nature.* 2009; 458 (7238): 636–40.
 54. McCoy LE, Burton DR. Identification and specificity of broadly neutralizing antibodies against HIV. *Immunol Rev.* 2017; 275 (1): 11–20.
 55. Macagno A, Bernasconi NL, Vanzetta F, Dander E, Sarasini A, Revello MG, et al. Isolation of human monoclonal antibodies that potently neutralize human cytomegalovirus infection by targeting different epitopes on the gH/gL/UL128-131A complex. *J Virol.* 2010; 84 (2): 1005–13.
 56. Wang Q, Michailidis E, Yu Y, Wang Z, Hurley AM, Oren DA, et al. A combination of human broadly neutralizing antibodies against hepatitis B virus HBsAg with distinct epitopes suppresses escape mutations. *Cell Host Microbe.* 2020; 28 (2): 335–49.e6.
 57. Hartley GE, Edwards ESJ, Aui PM, Varese N, Stojanovic S, McMahon J, et al. Rapid generation of durable B cell memory to SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins in COVID-19 and convalescence. *Sci Immunol.* 2020; 5 (54): eabf8891.
 58. Hansen J, Baum A, Pascal KE, Russo V, Giordano S, Wloga E, et al. Studies in humanized mice and convalescent humans yield a SARS-CoV-2 antibody cocktail. *Science.* 2020; 369 (6506): 1010–4.
 59. Brouwer PJM, Caniels TG, van der Straten K, Snitselaar JL, Aldon Y, Bangaru S, et al. Potent neutralizing antibodies from COVID-19 patients define multiple targets of vulnerability. *Science.* 2020; 369 (6504): 643–50.
 60. Zost SJ, Gilchuk P, Case JB, Binshtein E, Chen RE, Nkolola JP, et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature.* 2020; 584 (7821): 443–9.
 61. Tanno H, McDaniel JR, Stevens CA, Voss WN, Li J, Durrett R, et al. A facile technology for the high-throughput sequencing of the paired VH:VL and TCR β :TCR α repertoires. *Sci Adv.* 2020; 6 (17): eaay9093.
 62. Setliff I, Shiakolas AR, Pilewski KA, Murji AA, Mapengo RE, Janowska K, et al. High-throughput mapping of B cell receptor sequences to antigen specificity. *Cell.* 2019; 179 (7): 1636–46.e15.
 63. Gupta A, Gonzalez-Rojas Y, Juarez E, Crespo Casal M, Moya J, Falci DR, et al. Early treatment for covid-19 with SARS-CoV-2 neutralizing antibody sotrovimab. *N Engl J Med.* 2021; 385 (21): 1941–50.
 64. Loo YM, McTamney PM, Arends RH, Abram ME, Aksyuk AA, Diallo S, et al. The SARS-CoV-2 monoclonal antibody combination, AZD7442, is protective in nonhuman primates and has an extended half-life in humans. *Sci Transl Med.* 2022; 14 (635): eabl8124.
 65. Vishwakarma P, Vattekatte AM, Shinada N, Diharce J, Martins C, Cadet F, et al. VHH structural modelling approaches: a critical review. *Int J Mol Sci.* 2022; 23 (7): 3721.
 66. Senior AW, Evans R, Jumper J, Kirkpatrick J, Sifre L, Green T, et al. Improved protein structure prediction using potentials from deep learning. *Nature.* 2020; 577: 706–10.
 67. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature.* 2021; 596 (7873): 583–9.
 68. Schrott D, Li S, Rozewicki J, Katoh K, Yamashita K, Volkmut W, et al. Repertoire Builder: high-throughput structural modeling of B and T cell receptors. *Mol Sys. Des Eng.* 2019; 4: 761–8.
 69. Xu Z, Davila A, Wilamowski J, Teraguchi S, Standley DM. Improved antibody-specific epitope prediction using AlphaFold and AbAdapt. *Chembiochem.* 2022; 23 (18): e202200303.
 70. Abanades B, Georges G, Bujotzek A, Deane CM. ABlooper: fast accurate antibody CDR loop structure prediction with accuracy estimation. *Bioinformatics.* 2022; 38 (7): 1877–80. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac016.
 71. Ruffolo JA, Sulam J, Gray JJ. Antibody structure prediction using interpretable deep learning. *Patterns (NY).* 2021; 3 (2): 100406. DOI: 10.1016/j.patter.2021.100406. PMID: 35199061; PMCID: PMC8848015.
 72. Cohen T, Halfon M, Schneidman-Duhovny D. NanoNet: Rapid and accurate end-to-end nanobody modeling by deep learning. *Front Immunol.* 2022; 13: 958584. DOI: 10.3389/fimmu.2022.958584.
 73. Sun D, Sang Z, Kim YJ, Xiang Y, Cohen T, Belford AK, et al. Potent neutralizing nanobodies resist convergent circulating variants of SARS-CoV-2 by targeting diverse and conserved epitopes. *Nat Commun.* 2021; 12: 4676.