

Наноантитела, распознающие и нейтрализующие SARS-CoV-2.

Научный руководитель – Някшин Александр Матвеевич

Солодков Павел Павлович

Студент (магистр)

Новосибирский государственный университет, Новосибирск, Россия

E-mail: p.solodkov@g.nsu.ru

Пандемия COVID-19, обусловленная коронавирусом, вызывающим тяжелый острый респираторный синдром 2 (SARS-CoV-2), уже более года оказывает негативное воздействие на социальные и экономические сферы. У пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, развиваются респираторные симптомы различной степени тяжести, способные привести к летальному исходу. К 24 февраля 2021 года число зарегистрированных случаев заболевания во всем мире превысило 112 млн, а число смертей - 2,5 млн. До недавнего времени данные показатели непрерывно росли, однако по официальным данным с каждым днем прирост заболевших снижается, но необходимость применения диагностических и терапевтических подходов еще существует.

Вирион SARS-CoV-2 состоит из спиралевидного капсида, сформированного белками нуклеокапсида (N), связанными с РНК-геномом. Нуклеокапсид окружён мембранными (M) белками, а белки оболочки (E) и белки тримерного шипа (S) составляют «корону». SARS-CoV-2 проникает в клетки человека с помощью рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка на поверхности вируса, RBD способен взаимодействовать с рецептором ангиотензин-превращающего фермента 2 (ACE2), который преимущественно экспрессируется на мембранах пневмоцитов 2 типа и кишечных эпителиальных клеток. Взаимодействие RBD-ACE2 отражает четкую терапевтическую мишень для нейтрализации вируса и предотвращения инфекции.

Данная работа направлена на получение и анализ однодоменных VHH антител (наноантител) ламы, распознающих эпитопы RBD и нейтрализующих взаимодействие RBD-ACE2.

После серии иммунизаций ламы с рекомбинантным RBD были выделены периферические В-лимфоциты и сконструирована кДНК-библиотека VHH-последовательностей представительностью 10^8 клонов. Скрининг библиотеки проводился методом фагового дисплея. По результатам иммуноферментного анализа и секвенирования было обнаружено 32 независимых клон, продукты экспрессии которых связывают RBD. Из них 3 наноантитела высоко аффинны ($K_D \sim 10^{-10}$ - 10^{-12} М) и нейтрализуют взаимодействие RBD-ACE2 с $IC_{50} \sim 30$ -100 нг/мл (2-6 нМ) при конкурентном ИФА и в псевдовиральной системе. Дальнейший анализ показал, что эти наноантитела распознают 2 различных эпитопа RBD. Комбинированное использование наноантител против различных эпитопов RBD может повысить эффективность нейтрализации в терапии и профилактике заболевания.

Последовательности, кодирующие высоко аффинные и нейтрализующие наноантитела, были клонированы в вектор для наработки VHH с Fc-фрагментом IgG человека. Данные VHH-Fc были использованы для оценки защитных свойств против SARS-CoV-2 на сирийских хомяках и обеспечили профилактический и терапевтический эффект в дозе 10 мг/кг веса при дозе инфекции 10^4 PFU. В ближайшее время планируется получить конструкции наноантител с Fc-фрагментом, содержащие VHH одновременно против разных эпитопов RBD, и проверить их нейтрализующую активность.