

ОДНОДОМЕННОЕ АНТИТЕЛО ДЛЯ СВЯЗЫВАНИЯ КОНСЕРВАТИВНОГО ЭПИТОПА РЕЦЕПТОР-СВЯЗЫВАЮЩЕГО ДОМЕНА БЕЛКА SPIKE КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

П. О. Воробьев¹, С. В. Тиллиб^{1,2} ✉

¹ Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, Россия

В последние три года с помощью разных технологий были разработаны несколько вакцин против COVID-19, а также получено большое число вирус-нейтрализующих антител к коронавирусу SARS-CoV-2 с целью борьбы с пандемией. Однако применение этих препаратов для профилактики и потенциального лечения сталкивается с существенными проблемами из-за появления новых мутантных вариантов вируса, как более контагиозных, так и ускользающих от иммунной нейтрализации, что постоянно требует обновления вакцин и разработки новых терапевтических антител. Целью данного исследования было использовать технологию создания однодоменных антител (нанотел) для таргетирования наиболее консервативных эпитопов рецептор-связывающего домена (RBD) поверхностного S-белка (шипца, Spike) широкого спектра вариантов SARS-CoV-2. Рекombинантные белки, соответствующие RBD трех актуальных штаммов SARS-CoV-2, а также полноразмерному S-белку (Wuhan), были использованы в качестве антигенов для иммунизации верблюда с целью индукции образования соответствующих антител и/или в качестве иммобилизуемых белков для последующих перекрестных процедур селекции клонов нанотел с заданной специфичностью методом фагового дисплея. Из генерированной иммунной библиотеки было отобрано нанотело, обладающее свойством эффективно узнавать консервативный участок RBD S-белка широкого спектра вариантов пандемического коронавируса SARS-CoV-2, включая омикрон. Помимо традиционного использования в иммуноанализе и диагностике, полученное нанотело потенциально может быть использовано в качестве модуля мишень-специфичного связывания для задержки коронавируса в верхних дыхательных путях человека при разработке новых комбинированных противовирусных препаратов.

Ключевые слова: SARS-CoV-2, консервативный эпитоп, однодоменное антитело, нанотело, задержка вируса

Финансирование: работа была поддержана Министерством науки и высшего образования Российской Федерации (договор № 075-15-2021-1086, контракт № RF—193021X0015).

Благодарности: М. В. Рутовской из института Проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН за помощь в работе по иммунизации верблюда.

Вклад авторов: П. О. Воробьев — проведение молекулярного клонирования и последующей наработки рекомбинантных белков (антигенов для иммунизации); С. В. Тиллиб — разработка общей идеи и реализация этапов иммунизации, способа получения и первичного анализа полученных однодоменных антител, написание статьи.

Соблюдение этических стандартов: исследование одобрено этическим комитетом Института проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова РАН (протокол № 17 от 11 февраля 2018 г.); работы с животными проводили в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р 53434–2009.

✉ **Для корреспонденции:** Сергей Владимирович Тиллиб
ул. Вавилова, д. 34/5, г. Москва, 119334, Россия; tillib@genebiology.ru sergei.tillib@gmail.com

Статья получена: 19.12.2022 **Статья принята к печати:** 25.01.2023 **Опубликована онлайн:** 24.02.2023

DOI: 10.24075/vrgmu.2023.005

SINGLE-DOMAIN ANTIBODY FOR BINDING THE CONSERVED EPITOPE IN THE SARS-COV-2 SPIKE PROTEIN RECEPTOR-BINDING DOMAIN

Vorobyev PO¹, Tillib SV^{1,2} ✉

¹ Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

² Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

Several COVID-19 vaccines have been developed in the last three years using various techniques. Multiple virus-neutralizing antibodies against SARS-CoV-2 have been also obtained to combat the pandemic. However, the use of these medications for prevention and potential treatment faces significant challenges due to the emergence of new mutant virus variants, both more contagious and escaping neutralization by the immune system, that is why it is necessary to continuously renew the vaccines and develop new therapeutic antibodies. The study was aimed to use the technology of generating single-domain antibodies (nanobodies) to target the surface spike (S) protein RBD conserved epitope of the broad spectrum of SARS-CoV-2 variants. Recombinant proteins that corresponded to RBDs of three important SARS-CoV-2 strains and the full-length S protein (Wuhan) were used as antigens for immunization of a camel in order to induce production of appropriate antibodies and/or as immobilized proteins for further cross selection of the nanobody clones with pre-set specificity by the phage display. A nanobody capable of effectively recognizing the conservative region in the S protein RBDs of the broad spectrum of pandemic SARS-CoV-2 variants, including Omicron, was selected from the generated immune library. Along with conventional use in immunoassays and diagnosis, the generated nanobody can be potentially used as a module for target-specific binding used to trap coronavirus in human upper airways during the development of novel combination antiviral drugs.

Keywords: SARS-CoV-2, conserved epitope, single-domain antibody, nanobody, virus retention

Funding: the study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (agreement № 075-15-2021-1086, contract № RF—193021X0015).

Acknowledgements: the authors thank M.V. Rutovskaya, Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences, for assistance in immunization of the camel.

Author contribution: Vorobyev PO — molecular cloning and subsequent production of recombinant proteins (antigens for immunization); Tillib SV — developing general conception, carrying out immunization, developing the method for acquisition and primary analysis of the generated single-domain antibodies, manuscript writing.

Compliance with ethical standards: the study was approved by the Ethics Committee of the Severtsov Institute of Ecology and Evolution of the Russian Academy of Sciences (protocol № 17 of 11 February 2018); the animal was handled in strict compliance with the guidelines of the National Standard of the Russian Federation GOST R 53434–2009.

✉ **Correspondence should be addressed:** Sergei V. Tillib
Vavilov str., 34/5, Moscow, 119334, Russia; tillib@genebiology.ru sergei.tillib@gmail.com

Received: 19.12.2022 **Accepted:** 25.01.2023 **Published online:** 24.02.2023

DOI: 10.24075/brsmu.2023.005

Большинство вирус-нейтрализующих антител против актуальных мишеней, таких как SARS-CoV-2, связываются с белковыми эпитопами на поверхности вирусной частицы и предотвращают взаимодействие вируса с клеточным рецептором, что необходимо для его проникновения в клетку. В случае с SARS-CoV-2 основной мишенью нейтрализующих антител является поверхностный белок Spike (шип), или S-белок (1300 а. о.). S-белок образует гомотример на поверхности вириона. Во время сборки вируса этот белок расщепляется на N-концевую область (S1) и C-концевую область (S2), которая непосредственно участвует в слиянии с клеточной мембраной клетки хозяина. В области S1 был идентифицирован рецептор-связывающий домен (RBD, 319–541 а. о. или, в минимальном варианте, 333–527 а. о.), который в открытой конформации S-белка взаимодействует с входным для вируса SARS-CoV-2 рецептором на поверхности клетки-хозяина — ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2). Последний запускает перестройку S-белка, что приводит к слиянию мембран и проникновению вируса в клетку. RBD состоит из двух субдоменов ядра с центральным β -слоем и внешнего субдомена или мотива связывания с рецептором (RBM, с 438 по 506 а. о.), который соединен с двумя соседними β -тяжами сердечника; RBM становится самым удаленным от поверхности вируса участком S-белка в его открытой конформации, связывающей рецептор. RBD (и особенно RBM) является основным антигенным участком S-белка и основной мишенью вирус-нейтрализующих антител [1–3].

С начала пандемии циркулирующие сегодня штаммы SARS-CoV-2 приобрели мутации по сравнению с исходным штаммом Wuhan (WA1). В частности, вариант B.1.617.2 (дельта) [4] и родственный ему B.1.617.1 (каппа) были первоначально идентифицированы в Индии и несут замены RBD L452R-T478K или L452R-E484Q соответственно, которые, вероятно, ответственны за их улучшенные характеристики контагиозности [4]. Идентифицированный в Южной Африке вариант B.1.1.529 (омикрон) содержит крайнюю эволюцию RBD с пятнадцатью заменами (например, G339D, S371L, S373P, S375F, K417N, N440K, G446S, S477N, T478K, E484A, Q493K, G496S, Q498R, N501Y, Y505H) [5]. Мутации RBD, обнаруженные в этих вариантах, увеличивают риск снижения эффективности современных вакцин и терапевтических антител человека, могут способствовать вирусной эволюции и отбору новых вариантов, которые избегают нейтрализации иммунной системой человека. Таким образом, создание вирус-нейтрализующих антител широкого действия против различных штаммов (сегодняшних и будущих) коронавируса SARS-CoV-2 является крайне сложной задачей [6–8].

Использование ингаляционных препаратов на основе антител — очень перспективный метод для мишень-специфического воздействия и противодействия респираторным инфекциям в месте их первичного проникновения в организм человека, в верхних воздушных дыхательных путях [9]. Ингаляция — многообещающая неинвазивная стратегия доставки антител для лечения респираторных заболеваний, потому что этот путь обеспечивает более высокие концентрации антител в дыхательных путях, преодолевая ограничения и неопределенности в количестве препарата в нужном месте при системном введении антител через кровоток. Назальный путь доставки лекарств — один из широкоисследованных способов введения, назальные спреи для ряда препаратов

были признаны успешными и разрешены для широкого использования. Респираторные вирусы, поражающие человека, попадают в организм через дыхательные пути в виде аэрозолей, образующихся при кашле или чихании, от других инфицированных людей. Большие аэрозольные частицы обычно задерживаются в носовых раковинах и пазухах, где они могут вызвать инфекции верхних дыхательных путей. Более мелкие частицы могут проникать в нижние дыхательные пути и вызывать более опасные инфекции в альвеолярных областях. Большинство вирусов, инфицирующих верхние дыхательные пути, вызывает острую инфекцию и заражают людей сезонно (например, респираторно-синцитиальный вирус (RSV), риновирус, вирусы парагриппа и гриппа А, аденовирус, метапневмовирус человека, бокавирус человека и коронавирус). Эпителиальные клетки слизистой оболочки — входные ворота для большинства респираторных вирусных инфекций. Вирус не сможет инициировать инфекцию, если его прикрепление к клетке заблокировать в месте проникновения. Было показано, что частицы вируса гриппа могут задерживаться в слизи дыхательных путей человека вне зависимости от связывания гемагглютинина с остатками сиаловых кислот на муцинах [10]. Скорее всего, наблюдаемая задержка происходила за счет присутствия антител, связывающих как вирус гриппа, так и компоненты муцинового геля. Связь антител с муциновым гелем, по-видимому, обеспечивается посредством множественных низкоаффинных взаимодействий Fc-фрагмента антитела с муцином. Важно отметить, что подобные адгезивные взаимодействия между антителами, связывающимися с патогенами, и компонентами слизи дыхательных путей могут обеспечивать универсальную стратегию комбинированной борьбы с патогенами в дыхательных путях. Местная доставка антител, связывающих возбудителей респираторных инфекций, потенциально может снизить вероятность заболевания, а также вирусную нагрузку на эпителий дыхательных путей.

Одним из многообещающих и привлекающих все большее внимание форматов моноклональных антител, в том числе для разработки новых средств борьбы с респираторными инфекциями, в последние годы является формат однодоменных антител.

Однодоменными антителами (нанотелами) называют рекомбинантные производные однодоменных антиген-связывающих фрагментов (VHH) особых антител HCAb (heavy-chain only antibodies), состоящих из димера укороченной тяжелой цепи при полном отсутствии легких цепей, которые присутствуют в норме в крови представителей семейства Camelidae и у некоторых видов хрящевых рыб в дополнение к классическим типам иммуноглобулинов [11–12]. Основные особенности нанотел — небольшие размеры (12–15 кДа, 4 × 2,5 нм), высокие растворимость, стабильность, специфичность и аффинность, тепловая и химическая стойкость, а также простота осуществления их всевозможных модификаций методами генной инженерии и возможность использования чрезвычайно эффективного метода фагового дисплея для селекции оптимальных вариантов нанотел. Нанотела способны формировать необычные паратопы и узнавать необычные для классических антител уникальные нативные эпитопы антигенов (преимущественно конформационные эпитопы, небольшие углубления, активные центры ферментов), что может привести к особо высокой специфичности узнавания заданных мишеней *in vivo*. Каркасные участки верблужьих нанотел

(VНН) имеют высокую гомологию (заметно выше, чем в случае с VН мыши) с каркасными участками вариабельных VН доменов иммуноглобулинов человека (подкласса IgG3). Производство нанотел в бактериях или любых иных системах экспрессии очень рентабельно, а нанотела могут быть легко использованы в качестве строительных блоков для многодоменных конструкций [13–14].

Уже были созданы перспективные противовирусные терапевтические препараты на основе нанотел. Например, получено несколько нанотел, специфично связывающих особенно консервативные участки гемагглютинина из разных подтипов вирусов гриппа [15]. Многодоменные конструкции, содержащие четыре различных нанотела, были встроены в вектор на основе аденоассоциированного вируса.

Показано на мышинной модели, что экспрессирующиеся многодоменные антитела, нацеленные сразу на несколько консервативных эпитопов, с высокой эффективностью предотвращают заражение вирусами гриппа А и В. Эта же стратегия может быть использована для предотвращения заражения и другими вирусами/патогенами с высокой вариабельностью. Важно отметить, что подобного препарата не удалось пока получить с помощью классических моноклональных антител.

В ряде недавно опубликованных работ описано получение нанотел против рецептор-связывающего домена (RBD) белка SARS-CoV-2 Spike с целью блокировать его взаимодействие с ACE2 и тем самым нейтрализовать вирус [16–17]. Это удалось сделать для многих вариантов SARS-CoV-2, кроме сильно мутировавшего штамма омикрон.

Сообщается о получении нанотела (Nb6), связывающего и блокирующего S-белок в полностью неактивной конформации, что не позволяет вирусу связываться с ACE2 [18]. С помощью аффинного созревания *in vitro* и тримеризации высокоаффинного производного нанотела удалось получить препарат с пикомолярной нейтрализующей активностью против инфекции SARS-CoV-2. Этот препарат сохранял стабильность и функцию после аэрозольной, лиофилизационной и термической обработки. Авторы предполагают возможным опосредованную аэрозолем доставку этого мощного нейтрализатора непосредственно в эпителий дыхательных путей.

Целью данного исследования было использовать технологию создания однодоменных антител для отбора нанотела против консервативного эпитопа RBD S-белка для широкого спектра вариантов SARS-CoV-2, включая омикрон. Такое нанотело мы рассматриваем в качестве потенциального вирус-связывающего модуля будущего аэрозольного комбинированного задерживающего вирус препарата, в котором будет также якорный модуль для связи с мажорными компонентами секрета верхних дыхательных путей человека.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наработка рекомбинантных белков, соответствующих рецептор-связывающим доменам S-белка трех актуальных штаммов SARS-CoV-2, а также полноразмерного S-белка (Wuhan)

Наработку RBD вирусного штамма SARS-CoV-2 (Wuhan) проводили с помощью плазмиды NR-52309, предоставленной Краммером с соавторами [19] (сайт BEI Resources, NIAID, NIH), в эукариотических клетках HEK293T по прилагаемому на сайте протоколу и как описано ранее [20]. Указанный вектор для RBD из коронавируса SARS-CoV-2, Wuhan-Hu-1 (GenBank: MN908947), был получен путем слияния N-концевой сигнальной последовательности S-белка с RBD (аминокислоты с 319 по 541) и с С-концевой гексагистидиновой меткой. Плазмиду, кодирующую целевой RBD, трансфецировали методом кальций-фосфатной трансфекции в клетки HEK293T, через три дня супернатант, содержащий RBD-белок, собирали, центрифугировали при 4 °С и 1500 g в течение 10 мин, очищенный супернатант смешивали с 5 мл Ni-NTA-агарозы (Qiagen; США), уравновешенной в фосфатно-солевом буфере, после чего инкубировали при постоянном перемешивании на орбитальном шейкере (Biosan; Латвия) в течение часа при комнатной температуре. Суспензию наносили на колонку, следом промывали промывочным буфером (NaH₂PO₄·H₂O 57 mM, NaCl 135 mM, Imidazol 20 mM), затем смывали RBD с помощью элюирующего буфера (NaH₂PO₄·H₂O

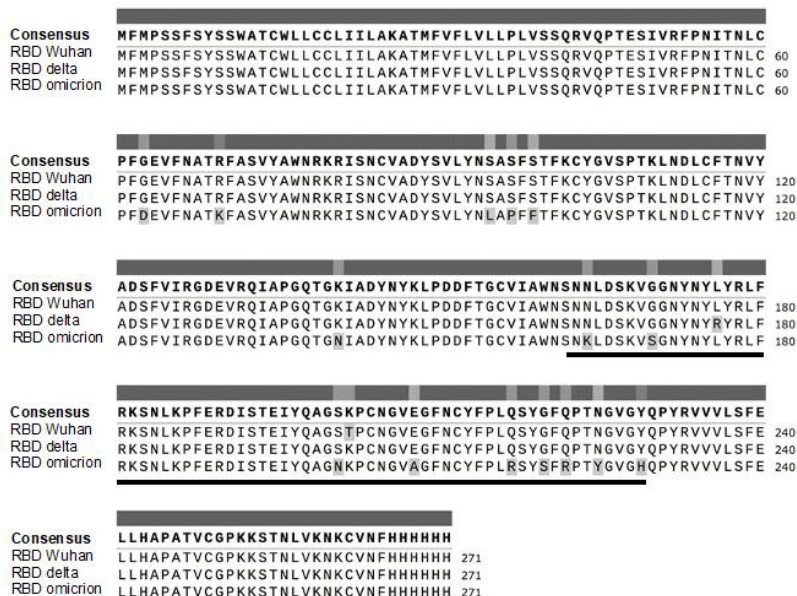


Рис. 1. Схема выравненных аминокислотных последовательностей RBD трех мутантных вариантов S-белка коронавируса SARS-CoV-2 (исходный RBD Wuhan, RBD delta и наиболее мутировавший вариант — RBD omicron). Выделены серым места мутаций аминокислотных остатков. Жирной линией обозначено положение рецептор-связывающего мотива (RBM), который непосредственно взаимодействует с ACE2-рецептором

57 mM, NaCl 135 mM, Imidazol 235 mM). Полученный белок диализовали с использованием диализной мембраны с порами 5 кДа (Merck; США) в фосфатно-солевом буфере. Очищенный белок анализировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле. Концентрацию белка определяли с помощью нормирования на известные концентрации бычьего сывороточного альбумина (BSA), а также с помощью Pierce BCA protein assay (ThermoFisher; США), оценку интенсивности поглощения проводили с использованием планшетного ридера CLARIOstar (BMG Labtech; США).

С целью получения RBD штаммов SARS-CoV-2 delta и omicron нами были внесены соответствующие точечные замены нуклеотидов (выделено на рис. 1) в исходную последовательность, кодирующую RBD, в составе вышеупомянутой плазмиды. Замены проводили с помощью специально синтезированных олигонуклеотидов методом безлигационного клонирования с помощью синтеза промежуточных перекрывающихся ПЦП-продуктов с использованием термоциклера T100 Thermal cycler (Bio-rad; США). После амплификации соответствующих фрагментов с помощью полимеразы Phusion™ high-fidelity DNA polymerase (ThermoFisher; США) амплифицированные фрагменты подвергали электрофорезу в 1%-м агарозном геле и вырезанные фрагменты выделяли с помощью набора Cleanup Standart («Евроген»; Россия). Амплифицированный вектор и вставку инкубировали в течение 3 мин при 37 °C с T4-полимеразой, после чего T4-полимеразу инактивировали при 75 °C в течение 15 мин, инкубировали 1 мин во льду, затем полученную смесь использовали для проведения трансформации компетентных клеток TOP10. Экспрессию и очистку RBD проводили, как описано ранее [20].

Используемые для мутагенеза олигонуклеотиды представлены в табл. 1 (координаты соответствуют тем, что

даны на рис. 1). В случае варианта RBD delta воспроизводили мутации L176R, T202K. Для синтеза последовательности, кодирующей RBD штамма SARS-CoV-2 omicron в исходную плазмиду, кодирующую RBD штамма SARS-CoV-2, были внесены нуклеотидные замены, соответствующие мутациям G63D, R70K, S95L, S97P, S99F, K141N, N164K, G170S, S201N, T202K, E208A, Q217R, G220S, Q222R, N225Y, Y229H.

Полученные в результате клонирования последовательности проверяли методом секвенирования по Сенгеру с помощью олигонуклеотидов RBD new flanc for 53 или CAG seq (табл. 1).

Экспрессию и очистку полноразмерного белка Spike SARS-CoV-2 проводили в соответствии с опубликованным ранее протоколом [19, 20], как описано выше, с тем отличием, что экспрессировали Spike вместо RBD (с использованием плазмидной ДНК pSFHT pCAGGS-wt Spike-Trb-T4-HT, предоставленной Краммером). Нарработку и очистку проводили так же, как описано для RBD [20].

Проведение иммунизации и получение библиотеки кДНК-последовательностей, кодирующих нанотела

Работу с верблюдом, содержащимся в просторном вальере, с регулярным выгуливанием и питанием, в Центре коллективного пользования «Живая коллекция диких видов млекопитающих» на научно-экспериментальной базе «Черноголовка» института Проблем экологии и эволюции имени А. Н. Северцова РАН, проводили в строгом соответствии с рекомендациями Национального стандарта Российской Федерации ГОСТ Р 53434–2009. Двугорбого верблюда *Camelus bactrianus* последовательно иммунизировали пять раз (через четыре недели после первой инъекции, а затем каждый последующий этап инъекций проводили через 10–14 дней) путем подкожного введения антигенного материала, смешанного с равным

Таблица 1. Олигонуклеотиды (праймеры) для точечного мутагенеза

Название праймера	Нуклеотидная последовательность 5'–3'
<i>Для RBD delta</i>	
RBD delta for 63	atctgaagcccttcgagcgggacatctccaccgagatctatcagccggcagcaaaccttg
RBD flanc rev 63	tctgctagctcgagtcgagc
Vector for 59	atcttaagtgcgactcgcgac
Vector rev 59	gtcggccacgcaattgc
RBD new rev 55	gtggagatgtcccgtcgaagggcttcagattggacttccggaacagccggtatctgtaattg
RBD new flanc for 53	gtggagatgtcccgtcgaagggcttcagattggacttccggaacagccggtatctgtaattg
<i>Для RBD omicron</i>	
LIC ins for II 65	ccccttcGACgaggtgttcaatgccaccAAGttcgctctg
LIC ins omi I for 61	ctgtacaacCTCgccCCGttcTTTaccctcaagtgcacggcgtgtcccc
LIC ins omi I for 63	gggctgATGccccacgccGTAtgtgggCCGaaaACTgtaggaTCGcagtgGGAAG
LIC ins omi II rev 65	ttgaagccTGccacgccgttacaaggAAAGTTgccggcctgatag
LIC vec omi I for 58	CaTACggcgtgggcCacagccc
LIC vec omi I rev 59	AAAGaaCGGggcGAGgttgcacgacgagtagctg
LIC vec omi II for 63	ttgtaacggcgtgGCAggcttcaactgc
LIC vec omi II rev 65	attgaacacctcGTCgaaggggcacagattg
SDM II omi for 55	gtggcaactacaattacAGAtaccggctgtcc
SDM II omi rev 56	TgactttggagtcagTTTgttgctg
SDM omi for 54	atatcggcagctacaactac
SDM omi for 55	tgctgtctgtccagg
CAG seq for rbd	tcctgggcaacgtgctgg
CAG seq rev rbd	agatgctcaaggggc

объемом полного (при первой инъекции) или неполного (при остальных инъекциях) адьюванта Фройнда. В качестве антигенного материала для иммунизации использовали 0,5 мг смеси рекомбинантных белков, соответствующих RBD Wuhan и RBD delta. Взятие крови (150 мл) проводили через пять дней после последней инъекции. Для предотвращения свертывания взятой крови добавляли 50 мл стандартного фосфатно-солевого раствора (PBS), содержащего гепарин (100 ед./мл) и ЭДТА (3 мМ). Кровь разводили в 2 раза раствором PBS, содержащим 1 мМ ЭДТА, и 35 мл разбавленного раствора крови наслаивали на ступеньку объемом 15 мл специальной среды (Histopaque-1077; Sigma-Aldrich, США) с плотностью 1,077 г/мл; проводили центрифугирование в течение 20 мин при 800 g. Мононуклеарные клетки (лимфоциты и моноциты) отбирали из интерфазной зоны плазма/Histopaque, после чего промывали раствором PBS, содержащим 1 мМ ЭДТА. Суммарную РНК из В-лимфоцитов выделяли с помощью реагента TRIzol (Thermo Fisher Scientific; США). Затем, на колонке с олиго(dT)-целлюлозой из тотальной РНК очищали поли(А)-содержащую РНК. Концентрацию РНК определяли с помощью биофотометра (Eppendorf; Германия) и проверяли качество выделенной РНК с помощью электрофореза в 1,5%-м агарозном геле с формальдегидом. Реакцию обратной транскрипции проводили с помощью обратной транскриптазы Maxima (Thermo Fisher Scientific; США) и праймера олиго(dT)18 в качестве затравки. Продукты обратной транскрипции использовали в качестве матрицы в двухступенчатой полимеразной цепной реакции и полученные продукты амплификации клонировали по сайтам NcoI(PstI) и NotI в фагмидный вектор, как описано ранее [21]. Для клонирования использовали экспрессионный вектор pHEN4 [22], любезно предоставленный профессором S. Muyldermans (Vrije Universiteit Brussel, Belgium).

Селекция клонов нанотел, связывающихся с RBD; форматирование, продукция и анализ отобранных анти-RBD нанотел

Последующие процедуры селекции, базирующиеся на методе фагового дисплея, в котором в качестве фага-помощника использовали бактериофаг M13KO7 (New England Biolabs; США), проводили в основном аналогично указанным выше [21].

Для наращивания культур бактериальных клеток использовали инкубаторы-шейкеры Excella E24 и E25 (New Brunswick Scientific; США). Для центрифугирования использовали центрифуги 5810R и 5415R с охлаждением (Eppendorf; Германия). Рекомбинантные белки, получение которых описано выше, были иммобилизованы в лунках иммунологического планшета Maxisorp (Nunc; Denmark).

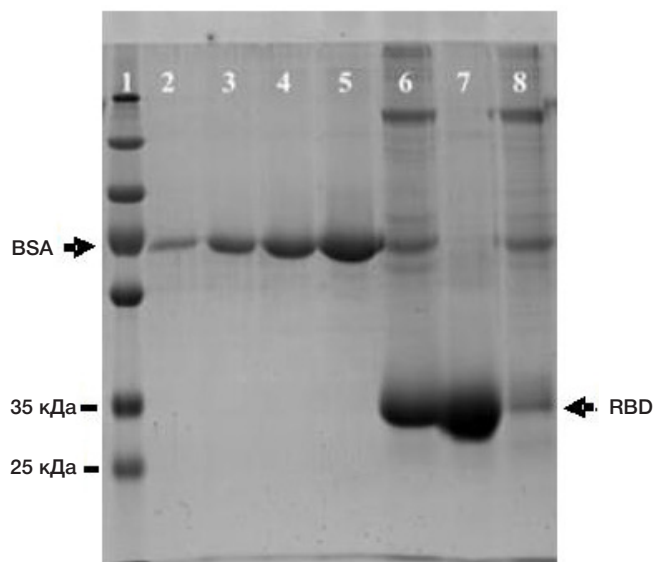


Рис. 2. Электрофореграмма SDS-полиакриламидного геля с наработанными (с помощью клонированной кодирующей последовательности) и затем очищенными рекомбинантными RBD трех штаммов (6 — RBD delta, 7 — RBD Wuhan, 8 — RBD omicron). Слева — дорожка с маркерными белками (Thermo Scientific PageRuler Plus Prestained Protein Ladder, размером 10–250 кДа). Для определения количества наработанного белка в дорожках 2–5 нанесены разные количества маркерного белка BSA (в количестве 0,25, 0,5, 1,0 и 2,0 мг соответственно)

Лунки блокировали в 1% БСА (бычий сывороточный альбумин) в 1× PBS или в казеиновом блокирующем буфере (Sigma-Aldrich; США). В последовательных селекциях использовали чередование как антигенов, так и блокирующих белков. Отбираемые клоны последовательностей, кодирующих нанотела, группировали согласно идентичности из NMR-фингерпринт-подобных образов и проверяли активность экспрессируемых нанотел (с НА-тагом на С-конце) в составе периплазматических экстрактов [21]. Перспективные клоны переклонировали, добавляя на 3'-конец последовательности, кодирующей нанотело, дополнительные последовательности длинного шарнирного участка особых антител верблюда (в качестве линейного гибкого линкера), а также НА-таг и His-таг для детекции и эффективной очистки нанотела, как описано ранее [23]. Все экспрессионные конструкции содержали лидерную последовательность pelB для периплазматической экспрессии нанотела, что позволяет эффективно выделять нанотело методом осмотического шока, не разрушая собственно бактериальные клетки. Нанотела экспрессировали в клетках *E. coli* (штамм XL1). Экспрессию белка в экспоненциально растущих клетках индуцировали добавлением 0,2–1 мМ ИПТГ (изопрропил-β-D-1-тиогактопиранозид) и клетки инкубировали при интенсивном перемешивании в течение 5 ч при 30 °С

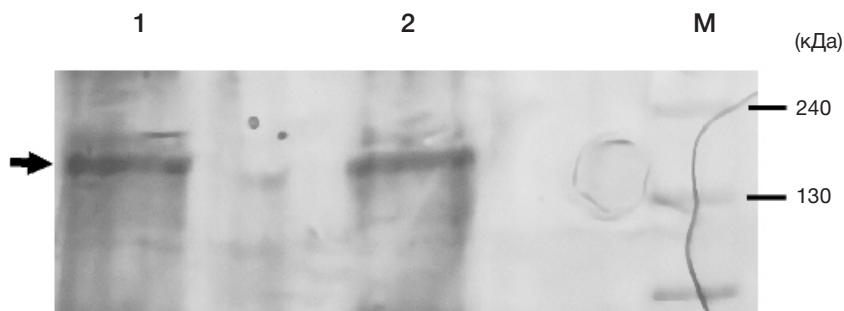


Рис. 3. Электрофореграмма SDS-полиакриламидного геля с наработанным рекомбинантным S-белком (Spike) SARS-CoV-2 (Wuhan). Белок выявляли в цитоплазматической фракции (1) и во фракции осадка (2). Справа нанесен маркер молекулярного веса полипептидов

или в течение ночи при 28 °С. Рекомбинантные белки выделяли из периплазматического экстракта с помощью аффинной хроматографии на Ni-NTA-агарозе (Qiagen; США) в соответствии с рекомендациями производителя. Периплазматический экстракт, содержащий нанотело с НА-тагом на С-конце, или аффинно очищенное адаптированное нанотело применяли для оценки специфичности и эффективности связывания нанотела с препаратом иммобилизованного в иммунологической плашке антигена с помощью традиционного иммуноферментного анализа (ИФА). В качестве вторичных антител к НА-тагу использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-НА-моноклональные антитела (H6533, Sigma-Aldrich; США). Активность пероксидазы хрена определяли, используя в качестве хромогенного субстрата 1-Step™ Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific; США). Оптическую плотность измеряли после добавления равного объема серной кислоты (2 M) при длине волны 450 нм с помощью планшетного флуориметра Microplate Reader Multiscan EX (Thermo Labsystems; США). Контрольные лунки не содержали антиген, но далее были блокированы и процессированы параллельно с экспериментальными ячейками (с антигеном). Для конкурентного анализа нанотел использовали коммерческие препараты: вирус-нейтрализующее моноклональное мышинное нантитело XR19 («Хема»; Россия), которое в настоящее время проходит регистрацию и выпускается как опытная партия, а также антитела кролика к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой («ИМТЕК»; Россия). Измерения проводили трижды и результаты ИФА представляли как средние значения со стандартным отклонением, которое было не более 10%.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На начальном этапе работы были проклонированы, а затем наработаны рекомбинантные белки, соответствующие рецептор-связывающим доменам S-белка трех актуальных штаммов SARS-CoV-2 (рис. 2). Выход нарабатываемых белков в расчете на 10^8 клеток: RBD delta — 2200 нг, RBD Wuhan — 2446 нг, RBD omicron — 300 нг, мембрано-ассоциированный полноразмерный S-белок Wuhan (рис. 3) — 75 нг. Если рекомбинантные белки, соответствующие RBD delta и RBD Wuhan, нарабатывались достаточно эффективно, то в случае RBD omicron воспроизводимо получали существенно меньше белка. Возможно, это связано с особенностями вторичной структуры белка, которая может хуже в случае RBD omicron образовываться в данной системе экспрессии. Когда мы начинали эту работу, еще не было информации о последовательности RBD omicron, поэтому для иммунизации верблюда была взята смесь белков RBD delta и RBD Wuhan. RBD omicron позднее использовали на стадии селекции.

Тогда же на стадии селекции и проверочного ИФА использовали наработанный рекомбинантный белок, соответствующий полной последовательности S-белка SARS-CoV-2 (Wuhan) (рис. 3).

В результате иммунизации двугорбого верблюда титр IgG, связывающих RBD delta и RBD Wuhan, в иммунной сыворотке по сравнению с преиммунной заметно вырос (примерно в 40 раз). На основе мРНК из лимфоцитов периферической крови иммунизированного верблюда мы проклонировали в фагмидном экспрессионном векторе рHEN4 кДНК-последовательности, кодирующие

весь репертуар однодоменных антиген-узнающих последовательностей (VHH, однодоменные антитела, нанотела) особых антител верблюда, состоящих из гомодимера укороченных (без СН1-домена) тяжелых цепей при отсутствии легких цепей. Полученную библиотеку VHH-кДНК-последовательностей перевели с использованием фага-помощника M13KO7 в формат фаговых частиц и использовали для перекрестных селекций с тремя вариантами наработанных RBD. Для селекции последовательно использовали лунки иммунологического планшета с высокой сорбцией (Nunc Maxisorp) с иммобилизованными в PBS в концентрации 10 мкг/100 мкл рекомбинантными белками (RBD Wuhan, RBD delta и RBD omicron). Для блокировки использовали 1% БСА (Sigma-Aldrich; США) в PBS или казеиновый блокирующий буфер (Sigma-Aldrich; США). Процедуру селекции и последующей амплификации отбираемых фаговых частиц (содержащих ген однодоменного нанотела внутри, а экспрессирующееся однодоменное нанотело — в составе поверхностного фагового белка pIII) повторяли, как правило, последовательно три раза, параллельно используя разную последовательность инкубации с каждым из трех вариантов иммобилизованных антигенов. Если первые два варианта RBD были использованы для иммунизации, и к ним не составляло труда отобрать нанотела, то ожидаемо оказалось непросто отобрать нанотело, эффективно связывающее и RBD omicron. Последовательности клонов отобранных нанотел группировали согласно схожести их фингерпринтов, получаемых при электрофоретическом разделении продуктов гидролиза амплифицированных последовательностей однодоменных нанотел параллельно тремя рестрикционными эндонуклеазами (HinfI, MspI, RsaI). Для оценки специфичной активности отобранных нанотел, представляющих каждую из групп, проводили микроиндукцию синтеза нанотел в периплазме бактерий и выделяли периплазматический экстракт, в котором содержались нарабатываемые нанотела. Эти периплазматические экстракты с нанотелами, содержащими на С-конце НА-таг (антигенная детерминанта, фрагмент из 9 аминокислот YPYDVPDYA), использовали в иммуноферментном анализе (ИФА) для выявления наиболее перспективных вариантов нанотел. В качестве вторичных антител к НА-тагу использовали конъюгированные с пероксидазой хрена анти-НА-моноклональные антитела (H6533, Sigma-Aldrich; США). В результате проделанных селекций и ИФА нам удалось отобрать девять различных вариантов (групп) клонов нанотел. Из них сразу выделим одно наиболее перспективное нанотело, названное aRBDce1 (anti-RBD conserved epitope 1), удовлетворившее всем основным требованиям, которые были нами исходно поставлены.

Отобранные клонированные последовательности, кодирующие нанотела, адаптировали для более эффективной наработки в бактериальной системе экспрессии и последующей эффективной очистки нанотела, как описано ранее [23]. Получаемые нанотела содержат на С-конце длинную линкерную последовательность (из 28 аминокислот длинного варианта шарнирного участка неканонического верблюжьего антитела), после которой идут два пептидных фрагмента: НА-таг, позволяющий детектировать нанотело с помощью коммерческих антител к этому пептиду, и последовательность из шести остатков гистидина (His)₆-тэг, позволяющая эффективно очищать содержащий ее белок с помощью металл-хелатной аффинной хроматографии на Ni²⁺-NTA-агарозе. Выделенные адаптированные нанотела тестировали

на их функциональную активность. Первоначальное тестирование проводили с помощью ИФА, в котором проверяли эффективность связывания полученными нанотелами консервативного эпитопа RBD S-белка для трех разных мутантных вариантов коронавируса SARS-CoV-2. На рис. 4 представлен результат иммуноферментного анализа, из которого следует, что нанотело aRBDce1 (в концентрации 1 мкг/мл) высокоэффективно и лучше других параллельно отобранных вариантов нанотел связывается с иммобилизованными в лунках планшета рекомбинантными белками Spike, RBD Wuhan (W-RBD), RBD delta (Δ -RBD) и Omicron RBD, но практически не связывается с контрольной лункой. В качестве контроля использовали лунки с иммобилизованным белком БСА (бычий сывороточный альбумин). Интенсивность сигнала отражает эффективность связывания нанотел. По сравнению с другими полученными нами ранее и охарактеризованными нанотелами к другим мишеням, можно предполагать высокую аффинность связывания нанотела aRBDce1 с RBD (в нижнем наномолярном диапазоне); aRBDce1 — пока единственное нами отобранное нанотело, эффективно связывающее все используемые варианты RBD, в том числе RBD omicron и полноразмерный S-белок.

На рис. 5 представлен результат ИФА, в котором иммобилизованный RBD (Wuhan) вначале связывали/блокировали повышенными концентрациями индивидуальных вариантов отобранных нанотел (20 мкг/мл), затем промывали лунки и добавляли коммерческое вирус-нейтрализующее моноклональное мышинное нантитело XR19 («Хема»; Россия) в концентрации 1 мкг/мл (все антитела растворяли в PBS с 0,1% БСА). Затем после промывки добавляли антитела кролика к иммуноглобулинам мыши, конъюгированные с пероксидазой, и проводили определение связавшейся пероксидазы, как описано выше. Можно видеть, что нанотело aRBDce1 совсем не конкурирует за связывание с этим «вирус-нейтрализующим» (по данным фирмы-производителя) антителом. На основании полученных результатов можно с высокой вероятностью предполагать, что нам удалось выполнить поставленную задачу и получить однодоменное

антитело, с высокой эффективностью связывающее консервативный поверхностный (легко доступный) эпипептид RBD S-белка коронавируса SARS-CoV-2. На рис. 6 приведена аминокислотная последовательность полученного нанотела aRBDce1, а также показано, как выглядит это адаптированное очищенное нанотело при фракционировании в 14%-м SDS-полиакриламидном геле. Полученные данные легли в основу недавно поданной патентной заявки (рег. № 2022132017).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В соответствии с поставленной задачей в данной работе с помощью технологии генерирования нанотел с заданной специфичностью и последующего их эффективного отбора методом фагового дисплея было получено нанотело, связывающее один из консервативных антигенных эпипептидов RBD S-белка, который присутствует у трех разных вариантов коронавируса SARS-CoV-2, включая наиболее мутантный вариант омикрон. Таким образом, мы продемонстрировали подход, который позволяет получать подобные нанотела. Принципиальным отличием нашего подхода от многих подобных исследований (некоторые из них упомянуты во введении [16–18]) является то, что мы не фокусируемся на вирус-нейтрализующих вариантах нанотел, а стремимся получить нанотела к наиболее консервативным и при этом наиболее доступным (на поверхности вируса) эпипептидам поверхностных вирусных белков. Известно, что в случае Spike-белка наиболее консервативные эпипептиды находятся в его С-концевой области (S2), которая непосредственно участвует в слиянии с клеточной мембраной клетки хозяина. Однако наши собственные неопубликованные данные о нанотелах к подобной области белка гемагглютинина у вируса гриппа указывают на возможные пространственные затруднения для нанотела достичь такие эпипептиды *in vivo*. RBD-участок S-белка содержит наиболее доступные для связывания эпипептиды, причем в нем есть районы с относительно небольшой частотой мутагенеза [6–8]. Мы выбрали в качестве первоначальной мишени этот RBD-участок как потенциально наиболее доступный

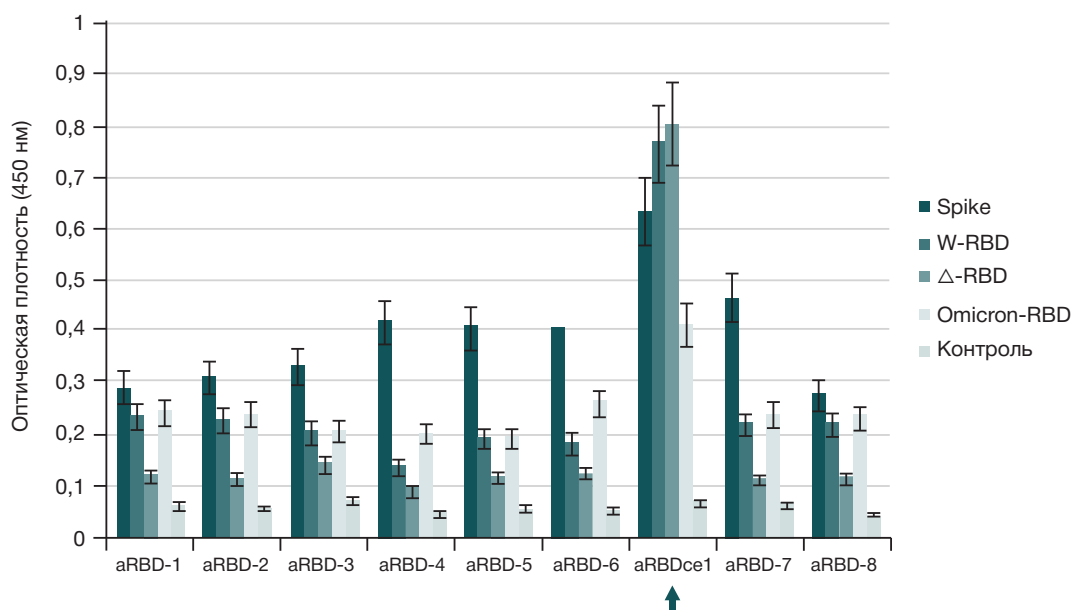


Рис. 4. Результат иммуноферментного анализа связывания девяти отобранных вариантов нанотел (aRBD-1 – aRBD-8 и aRBDce1) с иммобилизованными рекомбинантными белками, соответствующими (слева направо) Spike, RBD Wuhan (W-RBD), RBD delta (Δ -RBD) и Omicron RBD, и с контрольной лункой, без антигена, но блокированной с 1% БСА (как и все другие лунки). Величины оптической плотности отражают эффективность связывания нанотел. Даны средние значения трех независимых экспериментов с обозначением стандартного отклонения

Литература

- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020; 181 (2): 271–80.
- Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020; 181 (2): 281–92.
- Zhou T, Tsybovsky Y, Gorman J, Rapp M, Cerutti G, Chuang G-Y, et al. CryoEM Structures of SARS-CoV-2 Spike Without and With ACE2 Reveal a pH Dependent Switch to Mediate Endosomal Positioning of Receptor-Binding Domains. *Cell Host Microbe*. 2020; 28 (6): 867–79.e5.
- Dhawan M, Sharma A, Priyanka S, Thakur N, Rajkhowa TK, Choudhary OP. Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions. *Hum Vaccin Immunother*. 2022; 18 (5): 2068883.
- Mannar D, Saville JW, Zhu X, Srivastava SS, Berezhuk AM, Tuttle KS, et al. SARS-CoV-2 Omicron Variant: Antibody Evasion and Cryo-EM Structure of Spike Protein-ACE2 Complex. *Science*. 2022; 375 (6582): eabn7760.
- Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 Variants, Spike Mutations and Immune Escape. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19 (7): 409–21.
- Starr TN, Greaney AJ, Dingens AS, Bloom JD. Complete Map of SARS-CoV-2 RBD Mutations That Escape the Monoclonal Antibody LY-CoV555 and its Cocktail With LY-Cov016. *Cell Rep. Med*. 2021; 2 (4): 100255.
- Rees-Spear C, Muir L, Griffith SA, Heaney J, Aldon Y, Snitselaar JL, et al. The Effect of Spike Mutations on SARS-CoV-2 Neutralization. *Cell Rep*. 2021; 34 (12): 108890.
- Paray HA, Shukla S, Perween R, Khatri R, Shrivastava T, Singh V, et al. Inhalation monoclonal antibody therapy: a new way to treat and manage respiratory infections. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021; 105 (16–17): 6315–32.
- Wang YY, Harit D, Subramani DB, Arora H, Kumar PA, Lai SK, et al. Influenza-binding antibodies immobilise influenza viruses in fresh human airway mucus. *Eur Respir J*. 2017; 49: 1601709.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Bajana Songa E, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993; 363: 446–8.
- Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*. 2010; 11: 47–59.
- Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 77: 13–22.
- Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem*. 2013; 82: 775–97.
- 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.
- Güttler T, Aksu M, Dickmanns A, Stegmann KM, Gregor K, Rees R, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutation-tolerant nanobodies. *The EMBO Journal*. 2021; 40: e107985. DOI: 10.15252/emj.2021107985.
- Casasnovas JM, Margolles Y, Noriega MA, Guzmán M, Arranz R, Melero R, et al. Nanobodies protecting from lethal SARS-CoV-2 infection target receptor binding epitopes preserved in virus variants other than omicron. *Front Immunol*. 2022; 13: 863831.
- 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.
- Krammer F, Amanat F, Strohmeier S. Vector pCAGGS Containing the SARS-Related Coronavirus 2, Wuhan-Hu-1 Spike Glycoprotein Receptor Binding Domain (RBD), NR-52309. Available from: <https://www.beiresources.org/Catalog/BEIPlasmidVectors/NR-52309.aspx>.
- Stadlbauer D, Amanat F, Chromikova V, Jiang K, Strohmeier S, Arunkumar GA, et al. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: a detailed protocol for a serological assay, antigen production, and test setup. *Curr Protoc Microbiol*. 2020; 57 (1): e100.
- Тиллиб С. В., Иванова Т. И., Васильев Л. А. Фингерпринтный анализ селекции «нанотел» методом фагового дисплея с использованием двух вариантов фагов-помощников. *Acta Naturae*. 2010; 2 (3): 100–8.
- Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett*. 1997; 414 (3): 521–6. DOI: 10.1016/S0014-5793(97)01062-4. PMID: 9323027.
- Tillib S, Ivanova TI, Vasilev LA, Rutovskaya MV, Saakyan SA, Gribova IY, et al. Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2). *Antiviral Research*. 2013; 97: 245–54.

References

- Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*. 2020; 181 (2): 271–80.
- Walls AC, Park Y-J, Tortorici MA, Wall A, McGuire AT, Veesler D. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020; 181 (2): 281–92.
- Zhou T, Tsybovsky Y, Gorman J, Rapp M, Cerutti G, Chuang G-Y, et al. CryoEM Structures of SARS-CoV-2 Spike Without and With ACE2 Reveal a pH Dependent Switch to Mediate Endosomal Positioning of Receptor-Binding Domains. *Cell Host Microbe*. 2020; 28 (6): 867–79.e5.
- Dhawan M, Sharma A, Priyanka S, Thakur N, Rajkhowa TK, Choudhary OP. Delta variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2: Mutations, impact, challenges and possible solutions. *Hum Vaccin Immunother*. 2022; 18 (5): 2068883.
- Mannar D, Saville JW, Zhu X, Srivastava SS, Berezhuk AM, Tuttle KS, et al. SARS-CoV-2 Omicron Variant: Antibody Evasion and Cryo-EM Structure of Spike Protein-ACE2 Complex. *Science*. 2022; 375 (6582): eabn7760.
- Harvey WT, Carabelli AM, Jackson B, Gupta RK, Thomson EC, Harrison EM, et al. SARS-CoV-2 Variants, Spike Mutations and Immune Escape. *Nat Rev Microbiol*. 2021; 19 (7): 409–21.
- Starr TN, Greaney AJ, Dingens AS, Bloom JD. Complete Map of SARS-CoV-2 RBD Mutations That Escape the Monoclonal Antibody LY-CoV555 and its Cocktail With LY-Cov016. *Cell Rep. Med*. 2021; 2 (4): 100255.
- Rees-Spear C, Muir L, Griffith SA, Heaney J, Aldon Y, Snitselaar JL, et al. The Effect of Spike Mutations on SARS-CoV-2 Neutralization. *Cell Rep*. 2021; 34 (12): 108890.
- Paray HA, Shukla S, Perween R, Khatri R, Shrivastava T, Singh V, et al. Inhalation monoclonal antibody therapy: a new way to treat and manage respiratory infections. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2021; 105 (16–17): 6315–32.
- Wang YY, Harit D, Subramani DB, Arora H, Kumar PA, Lai SK, et al. Influenza-binding antibodies immobilise influenza viruses in fresh human airway mucus. *Eur Respir J*. 2017; 49: 1601709.
- Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Bajana Songa E, et al. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*. 1993; 363: 446–8.
- Flajnik MF, Kasahara M. Origin and evolution of the adaptive immune system: genetic events and selective pressures. *Nat Rev Genet*. 2010; 11: 47–59.
- Harmsen MM, De Haard HJ. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007; 77: 13–22.

14. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu Rev Biochem.* 2013; 82: 775–97.
15. 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.
16. Güttler T, Aksu M, Dickmanns A, Stegmann KM, Gregor K, Rees R, et al. Neutralization of SARS-CoV-2 by highly potent, hyperthermostable, and mutationtolerant nanobodies. *The EMBO Journal.* 2021; 40: e107985. DOI: 10.15252/embj.2021107985.
17. Casasnovas JM, Margolles Y, Noriega MA, Guzmán M, Arranz R, Melero R, et al. Nanobodies protecting from lethal SARS-CoV-2 infection target receptor binding epitopes preserved in virus variants other than omicron. *Front Immunol.* 2022; 13: 863831.
18. 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.
19. Krammer F, Amanat F, Strohmeier S. Vector pCAGGS Containing the SARS-Related Coronavirus 2, Wuhan-Hu-1 Spike Glycoprotein Receptor Binding Domain (RBD), NR-52309. Available from: <https://www.beiresources.org/Catalog/BEIPlasmidVectors/NR-52309.aspx>.
20. Stadlbauer D, Amanat F, Chromikova V, Jiang K, Strohmeier S, Arunkumar GA, et al. SARS-CoV-2 Seroconversion in Humans: a detailed protocol for a serological assay, antigen production, and test setup. *Curr Protoc Microbiol.* 2020; 57 (1): e100.
21. Tillib SV, Ivanova TI, Vasilev LA. Fingerprinyj analiz selekcii «nanotel» metodom fagovogo displeya s ispol'zovaniem dvux variantov fagov-pomoshnikov. *Acta Naturae.* 2010; 2 (3): 100–8. Russian.
22. Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, Muyldermans S. Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett.* 1997; 414 (3): 521–6. DOI: 10.1016/s0014-5793(97)01062-4. PMID: 9323027.
23. Tillib S, Ivanova TI, Vasilev LA, Rutovskaya MV, Saakyan SA, Gribova IY, et al. Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2). *Antiviral Research.* 2013; 97: 245–54.