

Кандидатный препарат на основе модифицированных однодоменных антител для терапии ботулизма, вызванного ботулиническим токсином типа А

А.А. Деркаев^{1,✉}, Е.И. Рябова^{1,2}, И.Б. Есмагамбетов¹, Д.В. Щепляков¹,
А.Н. Носков¹, И.Д. Виноградова¹, В.В. Прокофьев¹, Д.С. Полянский¹,
Д.Ю. Логунов¹, А.Л. Гинцбург¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Гамалеи, д. 18, Москва, 123098, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина», ул. Академика Скрябина, д. 23, Москва, 109472, Российская Федерация

✉ Деркаев Артем Алексеевич; derkaev.a@yandex.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Основным методом лечения ботулизма в настоящее время является применение антитоксина ботулинического, однако использование данного препарата вызывает ряд побочных эффектов, включая аллергические реакции. Перспективным направлением для лечения интоксикации ботулиническим токсином представляется разработка препаратов на основе моноклональных антител, а именно однодоменных, модифицированных Fc-фрагментом IgG1 человека.

ЦЕЛЬ. Оптимизация лабораторной технологии получения и доклинические исследования эффективности препарата на основе однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека (B11-Fc), для терапии и экстренной профилактики ботулизма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Для культивирования использовали клеточную линию СНО. Культивирование стабильного клона-продуцента В7 осуществляли в колбах Эрленмейера с использованием коммерчески доступных сред и подпиток. Для очистки препарата однодоменного антитела В11-Fc использовали многоступенчатую хроматографическую очистку (аффинная, анионообменная и мультимодальная), вирусную очистку и тангенциальную фильтрацию. Степень чистоты препарата оценивали с помощью ВЭЖХ и электрофореза. Гликановый профиль устанавливали с применением ВЭЖХ. Определение концентрации антител в культуральной жидкости, а также оценку равновесных констант диссоциации антитела с различными Fc-рецепторами проводили с использованием метода биослойной интерферометрии. Ботулинический токсин типа А (BoNT/A) получали путем культивирования штамма *Clostridium botulinum* A98 и дальнейшей хроматографической очистки токсина. Экспериментальные исследования *in vivo* проводили на мышах-самках линии BALB/c. BoNT/A вводили внутрибрюшинно (в/б) или внутривентрикулярно (в/ж), оценивали тяжесть токсических признаков. Препарат антител вводили внутримышечно (в/м) или внутривенно (при исследовании фармакокинетики). Проводили изучение эффективности препарата антител (по показателю выживаемости мышей) на различных моделях интоксикации и в разных режимах применения.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Проведена оптимизация условий культивирования клона-продуцента антитела В11-Fc. Разработанная технология очистки антитела В11-Fc обеспечивала высокий

выход антитела (0,5 г/л) с чистотой более 99%. Средний диаметр частиц в препарате — 7,85 нм. Проведена характеристика гликанового профиля препарата. Определены равновесные константы диссоциации антитела B11-Fc с различными Fc-рецепторами человека. Проведено моделирование интоксикации BoNT/A на мышах. Введение (в/м) препарата антител B11-Fc в дозе 0,6 мг/кг обеспечивало 100% протективный эффект при одновременном в/б введении BoNT/A в дозе 20 LD₅₀. Определены основные фармакокинетические параметры антитела B11-Fc. Продемонстрирована защитная эффективность препарата в профилактическом режиме применения — в течение 21 сут при в/б введении 5 LD₅₀ токсина. В терапевтическом режиме применения через 14 ч после в/ж введения токсина в дозе 12000 LD₅₀ (для в/б введения) антитело обеспечивало 100% защитный эффект.

ВЫВОДЫ. Проведена оптимизация лабораторной технологии получения кандидатного препарата на основе модифицированных однодоменных антител B11-Fc. В экспериментах *in vivo* на модели интоксикации ботулиническим токсином мышей показана высокая эффективность препарата для терапии и профилактики ботулизма. Полученные данные доклинических исследований позволили перейти к проведению фазы I клинических исследований на здоровых добровольцах.

Ключевые слова: ботулизм; ботулинический токсин типа A; BoNT/A; однодоменные антитела; VHH; однодоменные антитела, модифицированные Fc-фрагментом; терапия ботулизма; экстренная профилактика ботулизма; клетки CHO; модель интоксикации ботулиническим токсином

Для цитирования: Деркаев А.А., Рябова Е.И., Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Носков А.Н., Виноградова И.Д., Прокофьев В.В., Полянский Д.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Кандидатный препарат на основе модифицированных однодоменных антител для терапии ботулизма, вызванного ботулиническим токсином типа А. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение.* 2025;25(1):58–70. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591>

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России «Разработка и доклиническое исследование безопасности и эффективности препарата на основе однодоменных антител для терапии интоксикации, вызванной ботулотоксином» № АААА-А18-118032790102-6.

Потенциальный конфликт интересов. А.Л. Гинцбург и Д.Ю. Логунов являются членами редакционной коллегии журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» с 2021 и 2024 г. соответственно. Остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

A modified single-domain antibody candidate for the treatment of botulism caused by botulinum toxin type A

Artem A. Derkaev^{1,✉}, Ekaterina I. Ryabova^{1,2}, Ilias B. Esmagambetov¹, Dmitry V. Shcheblyakov¹, Anatoly N. Noskov¹, Irina D. Vinogradova¹, Vladimir V. Prokofiev¹, Dmitry S. Polyansky¹, Denis Y. Logunov¹, Alexander L. Gintsburg¹

¹ National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, 18 Gamaleya St., Moscow 123098, Russian Federation

² Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — MVA by K.I. Skryabin, 23 Academician Skryabin St., Moscow 109472, Russian Federation

✉ Artem A. Derkaev; derkaev.a@yandex.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Currently, the primary treatment method for botulism is the use of botulinum antitoxin, which causes a number of side effects, including allergic reactions. The development of medicinal products based on monoclonal antibodies (mAbs), in particular, single-domain mAbs fused to the human IgG1 Fc fragment, holds promise for the treatment of botulinum toxin poisoning.

AIM. This study aimed to optimise the technology for laboratory-scale production of a single-domain mAb fused to the human IgG1 Fc fragment (B11-Fc) for botulism treatment and post-exposure prophylaxis and to conduct a preclinical efficacy study of this mAb.

MATERIALS AND METHODS. The study used CHO cells. B7, a stable clone producing the B11-Fc single-domain mAb, was cultured in Erlenmeyer flasks using commercially available media and feeds. The B11-Fc mAb was purified using multistep chromatography (including affinity, anion exchange, and multimodal chromatography steps), virus elimination, and tangential flow filtration. The purity of the B11-Fc mAb was assessed by high-performance liquid chromatography (HPLC) and electrophoresis. The glycan profile was established by HPLC. Bio-layer interferometry was used to measure the mAb concentration in the culture fluid and to determine the equilibrium dissociation constants for the mAb and various Fc receptors. Botulinum toxin type A (BoNT/A) was produced by culturing the *Clostridium botulinum* A98 strain and purified by chromatography. *In vivo* experiments involved intraperitoneal and intragastric administration of BoNT/A to female BALB/c mice, with a subsequent assessment of the severity of toxic signs. The B11-Fc mAb was administered intramuscularly or intravenously (to study the pharmacokinetics). The efficacy of the B11-Fc mAb (in terms of mouse survival) was studied using various toxicity models and the prophylactic and therapeutic modes of administration.

RESULTS. The study optimised culture conditions for the B11-Fc mAb producer clone and developed a mAb purification technology that ensured a high yield (0.5 g/L) and a purity of over 99%. The average particle size in the mAb preparation was 7.85 nm. The study characterised the glycan profile of the B11-Fc mAb and determined the equilibrium dissociation constants for the mAb and human Fc receptors. Poisoning with BoNT/A was modelled in mice. The intramuscular administration of the B11-Fc mAb at a dose of 0.6 mg/kg provided 100% protection from poisoning with BoNT/A that was simultaneously administered at a dose of 20 LD₅₀. The study determined the main pharmacokinetic parameters of the B11-Fc mAb. The experiments demonstrated that prophylactic administration of the B11-Fc mAb for 21 days had a protective effect against BoNT/A administered intraperitoneally at a dose of 5 LD₅₀, and therapeutic administration of the mAb 14 h after intragastric administration of the toxin at a dose of 12,000 intraperitoneal LD₅₀ provided 100% protection.

CONCLUSIONS. The authors optimised the technology for laboratory-scale production of the candidate modified single-domain mAb. *In vivo* experiments conducted using BoNT/A toxicity models demonstrated that the B11-Fc mAb is highly effective in botulism prevention and treatment. On the basis of preclinical data, phase I clinical trials have been initiated to study B11-Fc in healthy volunteers.

Keywords: botulism; botulinum toxin type A; BoNT/A; single-domain antibody; sdAb; variable heavy chain domain of a heavy chain antibody; VHH; Fc-fused single-domain antibody; botulism therapy; post-exposure botulism prophylaxis; CHO cells; botulism model

For citation: Derkaev A.A., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Prokofiev V.V., Polyansky D.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. A modified single-domain antibody candidate for the treatment of botulism caused by botulinum toxin type A. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(1):58–70. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591>

Funding. The study reported in this publication was carried out by the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya of the Ministry of Health of the Russian Federation as part of publicly funded research project No. AAAA-A18-118032790102-6 "Development and preclinical safety and efficacy study of a single-domain antibody product for the treatment of botulinum toxin poisoning".

Disclosure. A.L. Gintsburg and D.Y. Logunov have been members of the Editorial Board of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment* since 2021 and 2024, respectively. The other authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Ботулинические токсины (botulinum neurotoxin, BoNT) являются опасными природными токсинами, продуцируемыми бактериями рода *Clostridium*. Попадание BoNT в организм человека даже в небольших количествах (>0,5 нг/кг) вызывает ботулизм — тяжелое заболевание,

характеризующееся острым симметричным нисходящим вялым параличом¹. В случае развития ботулизма необходима своевременная диагностика и ранняя терапия. Ежегодно в мире регистрируется около 1000 случаев ботулизма, 10% из которых являются летальными [1]. Ежегодно в Российской Федерации выявляется

¹ <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/botulism>

около 100–200 случаев ботулизма². В 2024 г. в России произошла вспышка ботулизма (более 400 заболевших)³.

Несмотря на то что ботулизм является хорошо описанным заболеванием с известной клинической картиной, его ранняя диагностика затруднена из-за относительно редкой встречаемости, а также симптомов, схожих с другими заболеваниями. Вследствие этого имеются сложности с началом ранней терапии и экстренной профилактики существующими средствами.

Основной метод лечения ботулизма – применение антитоксина ботулинического для нейтрализации свободно циркулирующего ботулотоксина. Существующие в настоящее время препараты антитоксина в виде сыворотки противоботулинической лошадиной являются универсальным доступным средством терапии. Однако применение препаратов вызывает ряд побочных эффектов, включая аллергические реакции и сывороточную болезнь [2]. Кроме того, для препаратов сыворотки могут возникать проблемы, связанные с вариацией показателей качества между партиями, а также вирусной безопасностью. Таким образом, актуальной задачей является разработка эффективных антитоксинов против BoNT с применением современных биотехнологических подходов, в том числе моноклональных и однодоменных антител.

В течение последних двух десятилетий были разработаны терапевтические препараты на основе моноклональных антител [3–5]. Такие препараты имеют значительный потенциал для эффективной нейтрализации токсинов. В настоящее время существуют несколько препаратов антител против различных токсинов, например препараты актоксумаб и безлотксумаб, специфичные к токсинам бактерий *Clostridium difficile*.

Перспективным направлением является разработка препаратов однодоменных антител (variable heavy chain domain of a heavy chain antibody, VH), поскольку такие препараты характеризуются повышенной стабильностью, сниженной иммуногенностью, способностью связываться с труднодоступными эпитопами, а также проникать через гематоэнцефалический барьер [6, 7]. К недостаткам однодоменных антител можно отнести низкую длительность циркуляции. Использование различных модификаций антител, например связывание с человеческим Fc-фрагментом, позволяет улучшить фармакокинетические параметры антитела и обеспечить эффекторные функции

в организме [8, 9]. В связи с этим актуальным представляется создание препарата на основе однодоменных антител для эффективной защиты в отношении BoNT, включающее в себя этапы разработки оптимальной технологии получения препарата высокой чистоты и оценки качества, а также проведения доклинических исследований эффективности препарата.

Ранее авторами было получено однодоменное антитело B11, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека (B11-Fc) [10], а также клеточная линия CHO, стабильно продуцирующая антитело B11-Fc (клон B7). Описанный метод не предусматривал большой объем наработки препарата, в связи с чем потребовалась оптимизация процесса культивирования клона-продуцента и условий очистки антитела B11-Fc, которая проводилась в рамках данной работы.

Цель работы – оптимизация лабораторной технологии получения и доклинические исследования эффективности препарата на основе однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека (B11-Fc), для терапии и экстренной профилактики ботулизма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение однодоменного антитела B11-Fc

Получение модифицированного однодоменного антитела B11-Fc, специфичного к ботулиническому токсину типа A (botulinum neurotoxin type A, BoNT/A), а также клеточной линии, продуцирующей антитело B11-Fc, проводили, как описано ранее [10]. Подбор оптимальных условий культивирования выполняли на основе подхода, описанного ранее [11]. Для проведения культивирования использовали клетки линии CHO, полученной из коллекции ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Применяли питательные среды SFM4CHO и ActiPro (Cytiva, США), подпитки Cell Boost 5 и Cell Boost 7a/7b (Cytiva, США). Культивирование клеток осуществляли в колбах Эрленмейера различных объемов (Corning, США) при 37 °C, 5% CO₂ и постоянном перемешивании 85–100 об/мин в инкубаторе Multitron (Infors HT, Швейцария). Концентрацию клеток и их выживаемость анализировали с использованием счетчика клеток Cedex HiRes Analyzer

² Здравоохранение в России 2023. Статистический сборник. М.; 2023. <https://rosstat.gov.ru/storage/mediabank/Zdravoohran-2023.pdf>

³ https://www.rospotrebnadzor.ru/about/info/news/news_details.php?ELEMENT_ID=27998&sphrase_id=5493924

(Roche, Швейцария) в соответствии с инструкцией производителя.

Измерение концентрации антитела в культуральной жидкости на всех стадиях работы проводили с использованием системы биослойной интерферометрии (bio-layer interferometry, BLI) Octet RED96 (ForteBio, США) и биосенсоров Ni-NTA (ForteBio, США) в соответствии с протоколом производителя в режиме кинетического измерения. Метод BLI также использовали для установления равновесных констант диссоциации антитела с Fc-рецепторами. В ходе измерения определяли параметр «Baseline» (в течение 30 с) в кинетическом буфере (150 мМ NaCl, 20 мМ натрия фосфат, натрия азид, pH 7,2), далее белки FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b, γ RI загружали на сенсоры в концентрации 30 мкг/мл (в течение 60 с). Затем VHH-Fc вносили в различных молярных концентрациях (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 0 нМ) в кинетическом буфере на 300 с. Диссоциацию осуществляли в кинетическом буфере в течение 300 с. Анализ полученных данных выполняли с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis 10.0 (ForteBio, США).

Хроматографическую очистку антител проводили в несколько стадий с использованием аффинной, анионообменной и мультимодальной хроматографии. Для аффинной хроматографии применяли хроматографическую систему ÄKTA Pure 25 (Cytiva, США) и колонку, содержащую сорбент MabSelect SuRe (Cytiva, США). В качестве связывающего буфера использовали раствор 150 мМ NaCl, 15 мМ Na_2HPO_4 , 5 мМ NaH_2PO_4 , 0,1% полисорбат 80, pH 7,2; в качестве элюирующего – раствор 200 мМ глицина (pH 2,5) с 0,1% полисорбатом 80. Для анионообменной хроматографии применяли колонку Sartobind Q Nano 3 мл (Sartorius, Германия). Очистку проводили в режиме проскока, в качестве буфера использовали раствор 150 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 6,8. Дополнительную очистку выполняли с помощью мультимодальной хроматографии с использованием керамического гидроксипатита СHT Type I (Bio-Rad, США). Для предварительного уравнивания сорбента использовали раствор, содержащий 75 мМ Na_2HPO_4 , 25 мМ NaH_2PO_4 , 6 ppm CaCl_2 , pH 7,5. Далее колонку уравнивали раствором, содержащим 150 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 6,8. Затем проводили нанесение образца (pH 6,8) и промывание раствором, содержащим 150 мМ NaCl, 20 мМ трис-HCl, pH 6,8. Элюирование целевых фракций осуществляли раствором, содержащим 150 мМ NaCl, 15 мМ Na_2HPO_4 , 5 мМ NaH_2PO_4 , pH 7,2.

Очистку препарата от вирусов проводили путем вирусной инактивации и фильтрации. Вирусную инактивацию выполняли после стадии аффинной очистки путем инкубирования фракций антител при комнатной температуре в течение 30 мин в элюирующем буфере (pH 3,0). Далее pH доводили до 7,2–7,4 раствором трис-HCl (1М, pH 9,0). После последней стадии хроматографической очистки антител проводили вирусную фильтрацию с помощью фильтров Virosart HF 200 см² (Sartorius, Германия).

Для концентрирования препарата выполняли тангенциальную фильтрацию с помощью картриджа Hollow Fiber 30 кДа 850 см² (GE Healthcare, США) в буфере 20 мМ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$, 0,01% полисорбат 80, 150 мМ NaCl, pH 7,2. Далее осуществляли конечную фильтрацию с использованием капсульных фильтров Sartopore 2, 0,2 мкм (Sartorius, Германия).

Степень чистоты образцов препарата антител после очистки анализировали с применением методов электрофореза и ВЭЖХ. Электрофорез в полиакриламидном геле проводили с использованием гелей Mini-Protean TGX Stain-Free Precast Gels (Bio-Rad, США). Денатурацию образцов осуществляли в буфере с 2-меркаптоэтанолом (Sigma, США) при 95 °С в течение 10 мин. ВЭЖХ проводили с использованием системы Vanquish Flex UHPLC Systems (Thermo Scientific, США) и колонки BioSep SEC-s3000 5 мкм (Phenomenex, США) в соответствии со стандартной методикой [12]. Пробу (20 мкл) наносили в изократическом режиме при скорости потока 0,5 мл/мин.

Изучение гликанового профиля осуществляли с помощью ВЭЖХ (колонка Accucore 150 Amide HILIC 2,5 мкм, 150 мм, Thermo Scientific, США) и стандартов гликанов AdvanceBio (Agilent, США).

Измерение размера частиц в растворе выполняли методом динамического светорассеяния с помощью оборудования Zetasizer Nano ZS (Malvern, Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя.

Исследование эффективности препарата однодоменного антитела B11-Fc in vivo

Эксперименты проводили на мышах-самках линии BALB/c (масса 18–20 г), ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, филиал «Андреевка». Исследования проводились в соответствии с протоколом, утвержденным на заседании биоэтической комиссии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 16 от 08.02.2019). Исследования выполняли согласно международным

и национальным требованиям⁴. Перед началом экспериментов предварительно стерилизовали воду, подстилку, корм и клетки. Животных содержали в условиях свободного доступа к корму и воде (*ad libitum*).

Ботулинический токсин типа А получали с помощью культивирования штамма *Clostridium botulinum* A98 и дальнейшей хроматографической очистки, как описано ранее [10].

Предварительно определяли LD₅₀ ВоNT/А при внутрибрюшинном (в/б) введении нескольких доз токсина (интервал между дозами – 1,2 раза). На основании установленного значения LD₅₀ рассчитывали дозы в последующих экспериментах. При расчете доз LD₅₀ ВоNT/А при внутривенном (в/ж) введении использовали значения доз, соответствующие LD₅₀ для в/б введения.

При моделировании интоксикации ВоNT/А клиническую картину у мышей устанавливали при в/б введении, *n*=5, или в/ж введении, *n*=10. Тяжесть токсических признаков оценивали по балльной шкале по следующим признакам: легкое (1 балл) или умеренное (2 балла) абдоминальное дыхание, тяжелое абдоминальное дыхание и/или агональное дыхание (3 балла); слюнотечение и вялость (1 балл), слабость (2 балла) или полный паралич тела (отсутствие рефлексов, 3 балла). Животных, набравших 12 баллов при последовательных наблюдениях, подвергали эвтаназии в случае, если гибель не происходила ранее.

Для исследования протективного действия антитела В11-Fc проводили распределение животных по группам (контрольные, опытные группы, *n*=5). Токсин ВоNT/А вводили в/б в дозах 5–100 LD₅₀. Антитело В11-Fc вводили внутримышечно (в/м) в дозах 0,03–1,2 мг/кг.

Для изучения фармакокинетики препарат В11-Fc вводили внутривенно (в/в) в дозе 0,6 мг/кг и оценивали его концентрацию через 1, 4, 24, 48, 72, 96, 168, 240, 336, 504, 672 ч в опытных группах мышей (*n*=3). Определение концентрации В11-Fc в образцах сыворотки крови мышей проводили с использованием набора IgG общий-ИФА-БЕСТ (АО «Вектор-Бест», Россия).

Для исследования специфической активности антитела В11-Fc распределяли животных по группам (контрольные, опытные группы, *n*=10). Токсин ВоNT/А вводили в/б и в/ж в дозах

5 LD₅₀ и 12000 LD₅₀ соответственно. Антитело В11-Fc вводили внутримышечно (в/м) в дозе 0,6 мг/кг.

Статистическая обработка результатов

Анализ данных проводили с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel 2010, GraphPad Prism 9.0 (США) и ELISA Master («АлкорБио», Россия). Для оценки межгрупповых различий значений титра антител, выживаемости животных и значений исследуемых характеристик использовали критерий Краскела – Уоллиса. Парное сравнение значений в экспериментальных группах с контрольными проводилось с использованием критерия Даннета. Достоверность отличий оценивали с помощью *t*-критерия и логарифмического рангового теста. Минимальный уровень значимости составлял 5% (*p*<0,05).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработка лабораторной технологии получения препарата однодоменного антитела В11-Fc

Оптимизация процесса культивирования клон-продуцента В7. Подбор условий для оптимизации культивирования клон-продуцента с целью увеличения выхода В11-Fc проводили в колбах Эрленмейера объемом 25 мл. Клетки линии СНО, предварительно адаптированные к питательным средам SFM4СНО или ActiPro, высевали в концентрации 1,0×10⁶ клеток/мл. При достижении плотности более 3,0×10⁶ клеток/мл проводили добавление подпиток CellBoost 5 или CellBoost 7a и 7b по схеме, представленной в таблице 1.

Проведенные исследования показали, что концентрация клеток СНО при использовании среды для культивирования ActiPro по сравнению со средой SFM4СНО была более высокой. При этом в случае применения комбинации среды ActiPro и подпиток CellBoost 7a и 7b показатели концентрации клеток, а также концентрации антитела в среде были максимальными – 14,9×10⁶ клеток/мл и 608 мкг/мл соответственно. В связи с этим данная комбинация среды и подпиток была выбрана для дальнейшего культивирования клон-продуцента антитела В11-Fc.

Достигнутые показатели культивирования коррелировали с данными, полученными авторами ранее [11], что указывает на оптимальные

⁴ ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. Европейская конвенция о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей. ETS N 123. Страсбург; 1986. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes.

Таблица 1. Схема культивирования клона-производителя В7 на различных средах и показатели динамики клеточного роста и продукции антитела В11-Fc

Table 1. Fed-batch culture scheme for the B7 producer clone using various media, with the time course of cell growth and B11-Fc antibody production

Среда / подпитка для культивирования <i>Culture media / feed</i>	Показатель <i>Parameter</i>	Срок культивирования, сут <i>Cultivation time, days</i>								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
SFM4CHO / CellBoost 5	Концентрация клеток, клеток/мл <i>Cell concentration, cells/mL</i>	3,2	7,2	9,4	9,9	9,9	9,8	9,6	8,8	–
	Выживаемость, % / <i>Viability, %</i>	99	100	100	99	98	96	93	84	–
	Объем подпитки, % / <i>Feed volume, %</i>	4	6	8	10	10	10	8	–	–
	Концентрация антитела, мкг/мл <i>Antibody concentration, µg/mL</i>	9	14	28	66	126	163	219	352	–
ActiPro / CellBoost 5	Концентрация клеток, клеток/мл <i>Cell concentration, cells/mL</i>	4,1	9,2	13,1	13,4	13,5	13,5	13,3	13,1	11,2
	Выживаемость, % / <i>Viability, %</i>	99	100	100	100	100	99	98	96	85
	Объем подпитки, % / <i>Feed volume, %</i>	4	6	8	10	10	10	8	7	–
	Концентрация антитела, мкг/мл <i>Antibody concentration, µg/mL</i>	7	12	27	67	152	188	256	397	447
SFM4CHO / CellBoost 7a + CellBoost 7b	Концентрация клеток, клеток/мл <i>Cell concentration, cells/mL</i>	3,2	7,7	9,9	11,1	11,3	11,4	11,2	10,6	8,4
	Выживаемость, % / <i>Viability, %</i>	99	100	100	100	99	97	95	90	83
	Объем подпитки, % / <i>Feed volume, %</i>	1	1	1,5	2	2,5	2,5	2,5	2	–
	Концентрация антитела, мкг/мл <i>Antibody concentration, µg/mL</i>	0,1	0,1	0,15	0,2	0,25	0,25	0,25	0,2	–
	Концентрация клеток, клеток/мл <i>Cell concentration, cells/mL</i>	7	11	25	51	154	203	331	437	516
ActiPro / CellBoost 7a + CellBoost 7b	Концентрация клеток, клеток/мл <i>Cell concentration, cells/mL</i>	4,1	10,5	14,6	14,8	14,9	14,8	14,6	13,2	11,9
	Выживаемость, % / <i>Viability, %</i>	99	100	100	99	100	99	97	93	86
	Объем подпитки, % / <i>Feed volume, %</i>	1	1	2	2,5	3	3	2,5	2,5	–
	Концентрация антитела, мкг/мл <i>Antibody concentration, µg/mL</i>	0,1	0,1	0,2	0,25	0,3	0,3	0,25	0,25	–
	Концентрация клеток, клеток/мл <i>Cell concentration, cells/mL</i>	8	13	28	59	181	237	370	534	608

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

свойства среды ActiPro для обеспечения высоких темпов роста клеток и продукции антител.

Оптимизация условий очистки антитела В11-Fc. Культивирование клона-производителя В7 проводили в соответствии с подобранной схемой в течение 9 сут. Стратегия очистки препарата антител включала в себя несколько этапов: аффинная, анионообменная и мульти-модальная хроматография. На первом этапе очистки антител применяли метод аффинной хроматографии с использованием сорбента MabSelect SuRe. Проводили подбор оптимального состава элюирующего буфера. Было установлено, что при элюировании антител с колонки буфером на основе 20 мМ цитрата натрия (рН 2,8) наблюдалась агрегация антител. При использовании в качестве элюента раствора 200 мМ глицина (рН 2,5) и 0,1% полисорбата 80 агрегация практически отсутствовала,

в связи с чем данный буфер был выбран в качестве элюирующего.

После этапа аффинной хроматографии осуществляли вирусную инактивацию путем выдерживания элюата при рН 3,0 в течение 30 мин.

Следующий этап хроматографической очистки В11-Fc проводили с использованием анионообменной хроматографии на мембранном адсорбере Sartobind Q Nano для удаления остаточных белков и ДНК клеток CHO, а также белка А. После этого этапа очистки выход очищенного антитела составил около 95% от первоначального уровня.

Дополнительный этап хроматографической очистки осуществляли с помощью керамического гидроксиапатита первого типа 40 мкм СНТ Type I. Использование хроматографии данного типа позволило достигнуть высокой чистоты препарата В11-Fc и избавиться от агрегатов

(рис. 1, опубликован на сайте журнала⁵). Выход очищенной фракции антитела составил 85% от исходного уровня.

После финальной стадии очистки проводили вирусную фильтрацию с использованием фильтров Virosart HF 200 см². Концентрирование препарата осуществляли до концентрации 3,0 мг/мл при помощи тангенциальной фильтрации с помощью картриджа Hollow Fiber 30 кДа 850 см². Далее проводили конечную фильтрацию с помощью капсульных фильтров Sartopore 2, 0,2 мкм.

Таким образом, в условиях оптимизации процесса культивирования клона-продуцента В7 удалось повысить выход однодоменного антитела В11-Fc, а разработка схемы многостадийной хроматографической очистки позволила увеличить конечный выход антитела до значений – 500 мкг с 1 мл культуральной жидкости.

Оценка степени чистоты и основных характеристик препарата однодоменного антитела В11-Fc

При оценке содержания примесей в препарате с использованием ВЭЖХ было показано наличие одного целевого пика, который соответствовал мономерной форме антитела В11-Fc (около 99%), а также отсутствовали пики примесных белков (рис. 2).

Определение размера частиц в растворе препарата антител проводили с использованием метода динамического светорассеяния, что позволяет не только определить размер молекул и наличие их олигомеров, но и детектировать более крупные агрегаты частиц, которые не определяются методом электрофореза, а также не могут быть обнаружены методом ВЭЖХ из-за их задержки на префильтрах хроматографической системы. Было показано присутствие одного основного пика, соответствующего молекулам со средним диаметром 7,85 нм, что согласуется со средним размером молекул VHH-Fc (рис. 3).

Изучение гликанового профиля препарата В11-Fc показало, что в зависимости от серии содержание высокоманнозилированных форм (Man5) составляло от 1 до 5% (табл. 2, опубликована на сайте журнала⁶). Указанный уровень значений показателя может свидетельствовать о возможности длительной циркуляции в организме [13]. Низкий уровень содержания высокогалактозилированных форм (G2+G2, 0%) позволяет предположить низкую иммуногенность препарата [14].

Поскольку препарат однодоменного антитела В11-Fc содержит Fc-фрагмент, необходимо изучение его взаимодействия с соответствующими рецепторами для оценки потенциальной роли в иммунологических реакциях [15]. Эти взаимодействия могут воздействовать на некоторые популяции иммунных клеток, а также влиять на поглощение, процессинг и представление антигена. Для изучения функциональной активности Fc-фрагмента проводили анализ взаимодействия с белками человека (FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b, γ RI), являющимися мишенями связывания с Fc-фрагментом человеческих иммуноглобулинов. Было показано, что антитело В11-Fc связывается с Fc-рецепторами человека с высокой аффинностью; значения K_D представлены в таблице 3. Указанные характеристики антител могут способствовать усилению фагоцитарной активности моноцитов и макрофагов [16]. Высокая аффинность В11-Fc к FcRn может свидетельствовать о возможности длительной циркуляции антитела в организме [17].

Исследование эффективности антитела В11-Fc in vivo

Моделирование интоксикации ботулиническим токсином типа А. На первом этапе исследования проводили оценку картины интоксикации при различных способах введения токсина BoNT/A. При в/б введении токсина мышам опытных групп ($n=5$) в дозах 5 или 10 LD₅₀ уже через 3 ч наблюдалась острая картина интоксикации с развитием симптомов умеренной тяжести (7 из 12 баллов) – абдоминальное и агональное дыхание, спазм диафрагмы и прилегающих мышц живота, что соответствовало

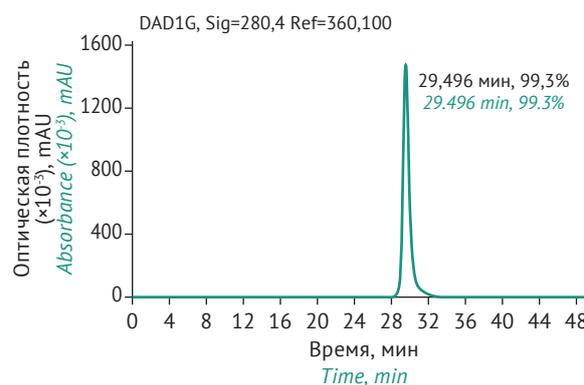


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 2. Оценка чистоты препарата однодоменного антитела В11-Fc методом ВЭЖХ.

Fig. 2. Purity evaluation of the B11-Fc antibody preparation by HPLC.

⁵ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591-fig1>

⁶ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591-table2>

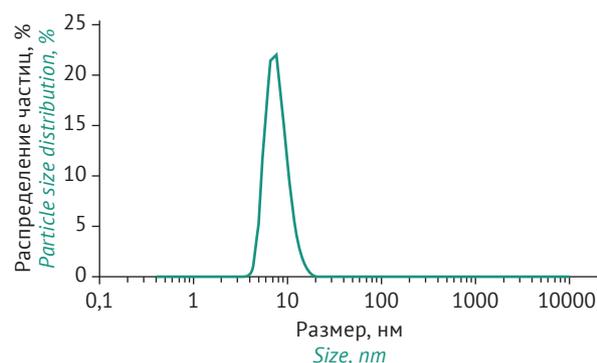


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 3. Оценка размера частиц препарата однодоменного антитела B11-Fc в растворе.

Fig. 3. Particle size evaluation of the B11-Fc single-domain antibody preparation in solution.

литературным данным [18]. Летальность регистрировали спустя 7–8 ч (рис. 4А, опубликован на сайте журнала⁷). Таким образом, при в/б введении токсина картина интоксикации развивалась стремительно, что не вполне соответствует длительности развития токсических симптомов у человека (12–36 ч после воздействия токсина)⁸.

Так как наиболее частой причиной интоксикации у людей являются пищевые отравления, то на следующем этапе работы проводили моделирование интоксикации у мышей ($n=10$) при в/ж введении VoNT/A в дозах 3000, 6000, 12000 и 18000 LD₅₀, выбранных в соответствии с литературными данными [18]. Показано, что при в/ж введении токсина в дозах 12000 и 18000 LD₅₀ летальность регистрировалась через 10 и 24 ч соответственно (рис. 4В, опубликован на сайте журнала⁹). При использовании более низких доз летального эффекта не наблюдали. Для оценки специфической активности антитела B11-Fc на модели интоксикации мышей при в/ж введении VoNT/A была выбрана доза 12000 LD₅₀.

Изучение протективного действия антитела B11-Fc. Для подбора протективной дозы

B11-Fc использовали острую модель интоксикации при в/б введении токсина. При дозе 10 LD₅₀ VoNT/A и последующем незамедлительном в/м введении антитела B11-Fc в различных концентрациях была показана полная защита мышей от летального эффекта токсина при дозах антитела, равных 1,2 и 0,6 мг/кг (рис. 5А). Для дальнейшей работы была выбрана доза антитела 0,6 мг/кг как минимальная для обеспечения полной защиты от летального токсического эффекта VoNT/A.

Для оценки протективного действия антитела B11-Fc в выбранной дозе, мышам опытных групп ($n=5$) вводили (в/б) 5, 10, 20, 50 и 100 LD₅₀ VoNT/A, после чего незамедлительно вводили (в/м) B11-Fc. Был показан 100% протективный эффект антитела B11-Fc при введении токсина в дозах 5, 10 и 20 LD₅₀, 60% – при дозе 50 LD₅₀ и 30% – при дозе 100 LD₅₀ (рис. 5В).

Таким образом, была подобрана оптимальная протективная доза антитела B11-Fc, равная 0,6 мг/кг, обеспечивающая защиту мышей от острой интоксикации VoNT/A.

Ранее авторами было показано, что в отсутствие модификации антитела Fc-фрагментом протективная активность препарата была ниже (>5 мг/кг) [10]. Следовательно, введение Fc-фрагмента приводит к повышению протективной активности, что может быть обусловлено увеличением avidности антитела.

Исследование фармакокинетики антитела B11-Fc. На первом этапе проводили изучение фармакокинетики B11-Fc, определяя концентрацию препарата в сыворотке крови после в/в введения дозы 0,6 мг/кг (рис. 6А). На основе фармакокинетической кривой были рассчитаны основные параметры фармакокинетики: максимальная концентрация, C_{max} – 1,22 мкг/мл; время достижения максимальной концентрации, T_{max} – 1,0 ч; площадь под фармакокинетической кривой «концентрация–время», AUC_{0-t} – 784,55 мкг/мл·ч; период полувыведения, $T_{1/2}$ – 46,4 ч.

Изучение специфической активности антитела B11-Fc в различных режимах применения. Исследование эффективности B11-Fc проводили

Таблица 3. Равновесные константы диссоциации однодоменного антитела B11-Fc с различными Fc-рецепторами человека
Table 3. Equilibrium dissociation constants for the B11-Fc antibody and various human Fc receptors

Показатель Parameter	Fc-рецептор Fc receptor					
	CD16a	CD16b	CD32a	CD32b	FcRn	γRI
K_D , М	$2,3 \times 10^{-8}$	$4,2 \times 10^{-9}$	$4,6 \times 10^{-8}$	$4,5 \times 10^{-8}$	$3,4 \times 10^{-8}$	$2,6 \times 10^{-8}$

Таблица составлена авторами по собственным данным / The table is prepared by the authors using their own data

⁷ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591-fig4>

⁸ Public health response to biological and chemical weapons: WHO guidance. WHO; 2004.

⁹ <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591-fig4>

в двух режимах его применения: профилактическом и терапевтическом.

Для оценки профилактического эффекта антитела мышам опытных групп ($n=5$) вводили в/м B11-Fc в дозе 0,6 мг/кг и далее через 7, 14, 21 и 28 сут вводили в/б токсин BoNT/A в дозе 5 LD₅₀. Показано наличие защитного профилактического эффекта B11-Fc при последующем введении токсина на 7, 14 и 21 сут (рис. 6B). Однако защитный эффект отсутствовал в случае введения токсина на 28 сут после применения B11-Fc, так же как и в контрольной группе (без введения B11-Fc).

Таким образом, полная защита мышей сохранялась до 21 сут достигалась при концентрации антитела в крови 0,088 мкг/мл. Полученные данные об эффективности препарата в профилактическом режиме обусловлены, по-видимому, модификацией антитела Fc-фрагментом и увеличением периода его полувыведения, поскольку, как было показано авторами ранее, однодоменное антитело B11 без Fc-фрагмента обладает более низкой протективностью и очень коротким периодом полувыведения (< 1 ч) [10].

Для оценки эффективности антитела B11-Fc в терапевтическом режиме применения мышам опытных групп ($n=10$) вводили в/б токсин BoNT/A в дозе 5 LD₅₀ и затем проводили в/м введение антитела B11-Fc (доза 0,6 мг/кг) через 0, 2, 4 и 6 ч. Было показано наличие защитного терапевтического эффекта B11-Fc при его использовании

одновременно с токсином (временная точка 0 ч) и спустя 2 ч (рис. 7A). В группе с применением B11-Fc через 4 ч после токсического воздействия показана 40% выживаемость мышей, а через 6 ч – защитный эффект отсутствовал.

Для изучения эффективности B11-Fc после в/ж введения токсина (доза 12000 LD₅₀) проводили в/м введение антитела в дозе 0,6 мг/кг через 12, 14, 16, 18 и 20 ч. В контрольной группе мышей (без лечения) умеренные симптомы интоксикации наблюдались через 14 ч, а летальность наступала спустя 24 ч после введения токсина. В группах мышей с введением B11-Fc через 12 и 14 ч после BoNT/A показана 100% выживаемость (рис. 7B). При использовании антитела через 16 и 18 ч выживаемость мышей в группах составила 60 и 50% соответственно. В группе с введением B11-Fc через 20 ч защитный эффект отсутствовал. Таким образом, показана возможность применения антитела B11-Fc для терапии интоксикации, вызванной воздействием токсина BoNT/A при его в/ж введении, до проявления симптомов ботулизма умеренной степени тяжести.

Представленные данные исследования позволяют заключить, что разработанный кандидатный препарат на основе модифицированных однодоменных антител обладает эффективностью в режимах терапии, экстренной профилактики и краткосрочной профилактики в течение 21 сут после введения.

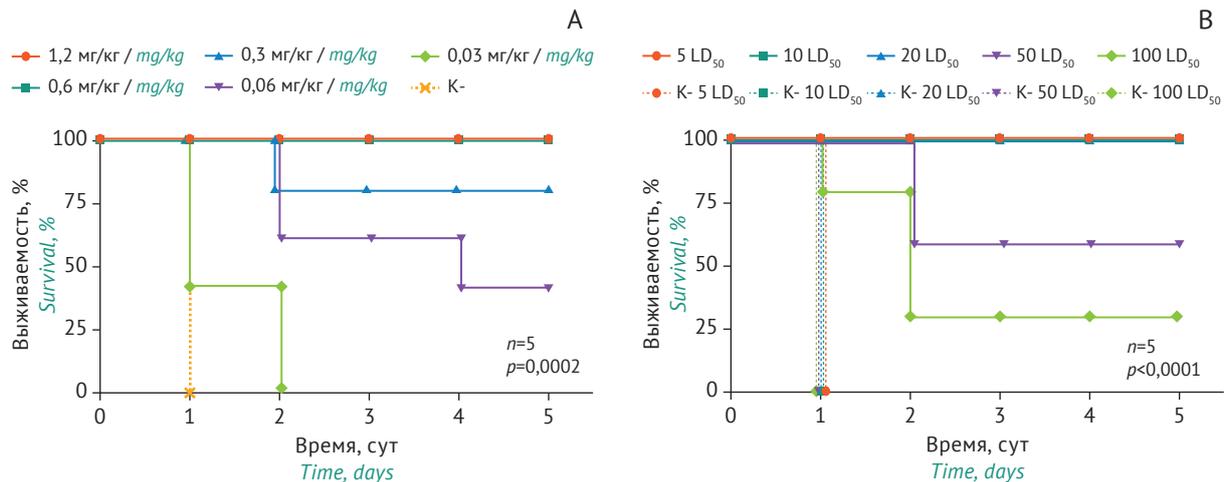


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 5. Динамика выживаемости мышей при внутримышечном (в/м) введении однодоменного антитела B11-Fc в дозах 0,03–1,2 мг/кг с последующим (незамедлительным) воздействием ботулинического токсина BoNT/A в дозе 10 LD₅₀ (A) и при в/м введении B11-Fc в дозе 0,6 мг/кг мышам, получившим токсин в дозах 5–100 LD₅₀ (B). Пунктиром обозначены данные в контрольных группах мышей (K-) с введением токсина, но без введения препарата антитела B11-Fc.

Fig. 5. Survival time course for mice after intramuscular (i.m.) administration of the B11-Fc single-domain antibody at doses of 0.03–1.2 mg/kg followed by (immediate) exposure to botulinum toxin type A (BoNT/A) at a dose of 10 LD₅₀ (A) and after i.m. administration of B11-Fc at a dose of 0.6 mg/kg to mice exposed to BoNT/A at doses of 5–100 LD₅₀ (B). The dotted lines indicate the data for the negative control mice (K-) that received BoNT/A but not B11-Fc.

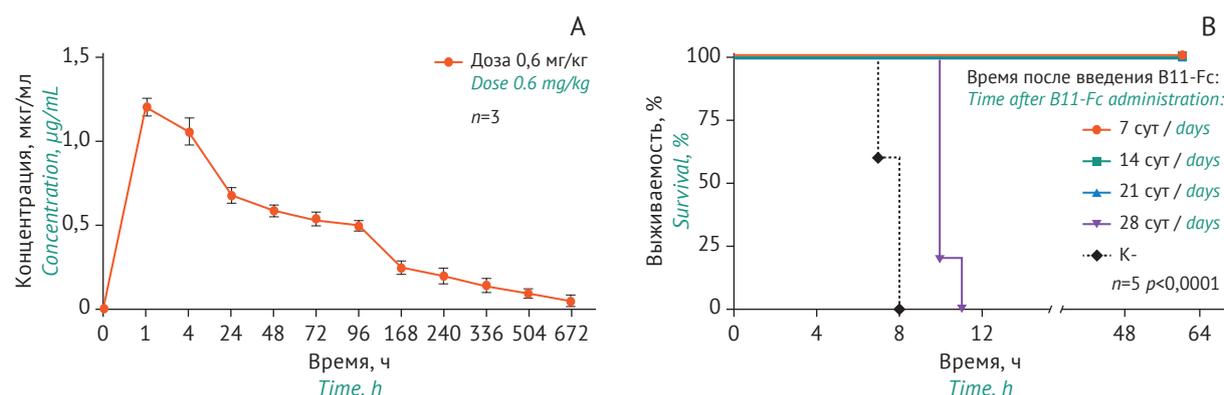


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 6. Динамика изменения концентрации однодоменного антитела В11-Fc в образцах сыворотки крови мышей (А) и динамика выживаемости мышей при использовании В11-Fc в режиме профилактического внутримышечного введения в дозе 0,6 мг/кг с последующим воздействием ботулинического токсина BoNT/A в дозе 5 LD₅₀ через 7, 14, 21 и 28 сут (В). Пунктиром обозначены данные в контрольной группе мышей (К-) с введением токсина, но без введения препарата антитела В11-Fc.

Fig. 6. Time courses of (A) B11-Fc concentration changes in mouse serum samples and (B) mouse survival after intramuscular administration of B11-Fc in the prophylactic mode at a dose of 0.6 mg/kg followed by exposure to botulinum toxin type A (BoNT/A) at a dose of 5 LD₅₀ in 7, 14, 21 and 28 days after the antibody. The dotted line indicates the data for the negative control mice (K-) that received BoNT/A but not B11-Fc.

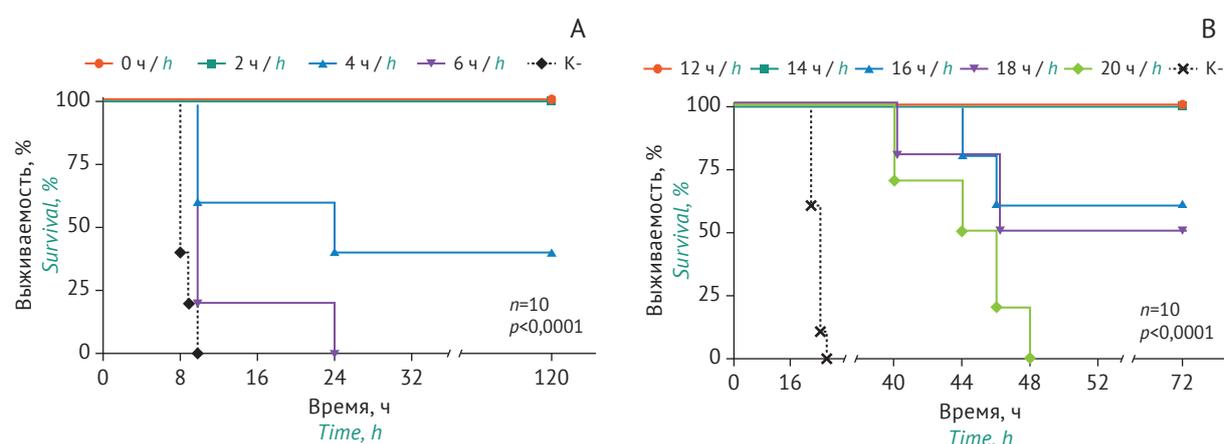


Рисунок подготовлен авторами по собственным данным / The figure is prepared by the authors using their own data

Рис. 7. Динамика выживаемости мышей при использовании однодоменного антитела В11-Fc в режиме терапевтического внутримышечного введения в дозе 0,6 мг/кг через 0–6 ч после внутрибрюшинного введения ботулинического токсина BoNT/A в дозе 5 LD₅₀ (А) и через 12–20 ч после внутрижелудочного введения токсина в дозе 12000 LD₅₀ (В). Пунктиром обозначены данные в контрольной группе мышей (К-) с введением токсина, но без введения препарата антитела В11-Fc.

Fig. 7. Time course of mouse survival after intramuscular administration of B11-Fc in the prophylactic mode at a dose of 0.6 mg/kg followed by (A) intraperitoneal administration of botulinum toxin type A (BoNT/A) at a dose of 5 LD₅₀ in 0–6 h after the antibody or (B) intragastric administration of BoNT/A at a dose of 12,000 LD₅₀ in 12–20 h after the antibody. The dotted lines indicate the data for the negative control mice (K-) that received BoNT/A but not B11-Fc.

ВЫВОДЫ

1. Проведена оптимизация условий культивирования клона-продуцента В7 и хроматографической очистки для получения кандидатного препарата для терапии ботулизма на основе модифицированного однодоменного антитела В11-Fc. Выход антител составил 0,5 г/л; степень чистоты – более 99%.
2. Изучение гликанового профиля В11-Fc показало содержание высокоманнозилированных форм от 1 до 5%, высокогалактозилированных

форм – 0%. Средний размер частиц в растворе препарата – 7,85 нм.

3. Показана функциональная активность Fc-фрагмента препарата антитела, реализуемая за счет связывания с высокой аффинностью с различными типами Fc-рецепторов человека (FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b, γ RI).
4. Продемонстрирована эффективность препарата В11-Fc на различных моделях интоксикации мышей ботулиническим токсином BoNT/A – при внутрибрюшинном и внутриже-

лудочном введении, а также при разных режимах применения препарата – в профилактическом и терапевтическом.

5. Рассчитаны основные параметры фармакокинетики В11-Fc у мышей: C_{\max} – 1,22 мкг/мл, T_{\max} – 1,0 ч, AUC_{0-t} – 784,55 мкг/мл×ч, $T_{1/2}$ – 46,4 ч. Концентрация антител, обеспечивающая защиту от 5 LD₅₀ ботулотоксина, составила 0,088 мкг/мл.
6. Показан защитный эффект препарата В11-Fc в дозе 0,6 мг/кг при использовании для краткосрочной (до 21 сут) профилактики ботулизма (при в/б введении мышам токсина в дозе

5 LD₅₀), что достигается благодаря наличию у однодоменного антитела Fc-фрагмента.

7. Применение препарата В11-Fc в дозе 0,6 мг/кг эффективно для экстренной профилактики интоксикации и терапии пищевого ботулизма (при в/ж введении мышам токсина в дозе 12000 LD₅₀) до проявления симптомов средней тяжести.
8. Полученные результаты доклинических исследований кандидатного препарата на основе модифицированных однодоменных антител позволили перейти к проведению фазы I клинических исследований для оценки безопасности и переносимости препарата на здоровых добровольцах.

Литература/References

1. Fleck-Derderian S, Shankar M, Rao AK, Chatham-Stephens K, Adjei S, Sobel J, et al. The epidemiology of foodborne botulism outbreaks: A systematic review. *Clin Infect Dis*. 2018;66(1):S73–S81. <https://doi.org/10.1093/cid/cix846>
2. Black RE, Gunn RA. Hypersensitivity reactions associated with botulinum antitoxin. *Am J Med*. 1980;69(4):567–70. [https://doi.org/10.1016/0002-9343\(80\)90469-6](https://doi.org/10.1016/0002-9343(80)90469-6)
3. Anniballi F, Lonati D, Fiore A, Auricchio B, De Medici D, Locatelli CA. New targets in the search for preventive and therapeutic agents for botulism. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(9):1075–86. <https://doi.org/10.1586/14787210.2014.945917>
4. Rossetto O, Pirazzini M, Lista F, Montecucco C. The role of the single interchains disulfide bond in tetanus and botulinum neurotoxins and the development of antitetanus and antibotulism drugs. *Cell Microbiol*. 2019;21(11):e13037. <https://doi.org/10.1111/cmi.13037>
5. Shcheblyakov D, Esmagambetov I, Simakin P, Kostina L, Kozlov A, Tsibezov V. Development and characterization of two GP-specific monoclonal antibodies, which synergistically protect non-human primates against Ebola lethal infection. *Antiviral Res*. 2019;172:104617. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.104617>
6. Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: The superfluous luxury of paired domains. *Trends Biochem Sci*. 2001;26(4):230–5. [https://doi.org/10.1016/s0968-0004\(01\)01790-x](https://doi.org/10.1016/s0968-0004(01)01790-x)
7. Есмагамбетов ИБ, Щебляков ДВ, Егорова ДА, Воронина ОЛ, Деркаев АА, Воронина ДВ и др. Нанокандидат – потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола. *Acta Naturae*. 2021;13(4):53–63. Esmagambetov IB, Shcheblyakov DV, Egorova DA, Voronina OL, Derkaev AA, Voronina DV, et al. Nanobodies are potential therapeutic agents for the Ebola virus infection. *Acta Naturae*. 2021;13(4):53–63 (In Russ.). <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11487>
8. Kontermann RE. Strategies to extend plasma half-lives of recombinant antibodies. *BioDrugs*. 2009;23(2):93–109. <https://doi.org/10.2165/00063030-200923020-00003>
9. Danquah W, Danquah W, Meyer-Schwesinger C, Rissiek B, Pinto C, Serracant-Prat A, Amadi M, et al. Nanobodies that block gating of the P2X7 ion channel ameliorate inflammation. *Sci Transl Med*. 2016;8(366):366ra162. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaf8463>
10. 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. <https://doi.org/10.3390/toxins11080464>
11. Полянский ДС, Рябова ЕИ, Деркаев АА, Старков НС, Кашапова ИС, Есмагамбетов ИБ. Разработка технологии культивирования клеточной линии, продуцирующей однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека. *Тонкие химические технологии*. 2024;19(3):240–57. Polyansky DS, Ryabova EI, Derkaev AA, Starkov NS, Kashapova IS, Shcheblyakov DV, Karpov AP, Esmagambetov IB. Development of technology for culturing a cell line producing a single-domain antibody fused with the Fc fragment of human IgG1. *Fine Chemical Technologies*. 2024;19(3):240–57 (In Russ.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-3-240-257>
12. Mant CT, Chen Y, Yan Z, Popa TV, Kovacs JM, Mills JB, et al. HPLC analysis and purification of peptides. *Methods Mol Biol*. 2007;386:3–55. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-430-8_1
13. Keck R, Nayak N, Lerner L, Raju S, Ma S, Schreitmuller T, et al. Characterization of a complex glycoprotein whose variable metabolic clearance in humans is dependent on terminal N-acetylglucosamine content. *Biologicals*. 2008;36(1):49–60. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2007.05.004>
14. Newkirk MM, Novick J, Stevenson MM, Fournier MJ, Apostolakis P. Differential clearance of glycoforms of IgG in normal and autoimmune-prone mice. *Clin Exp Immunol*. 1996;106(2):259–64. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.1996.d01-847.x>
15. Beck A, Haew JF, Wurch T, Goetsch L, Bailly C, Corvaia N. The next generation of antibody-drug conjugates comes of age. *Discov Med*. 2010;10(53):329–39.
16. Jiang XR, Song A, Bergelson S, Arroll T, Parekh B, May K, et al. Advances in the assessment and control of the effector functions of therapeutic antibodies. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(2):101–11. <https://doi.org/10.1038/nrd3365>
17. Reichert JM. Antibody-based therapeutics to watch in 2011. *MAbs*. 2011;3(1):76–99. <https://doi.org/10.4161/mabs.3.1.13895>
18. Rossetto O, Montecucco C. Tables of toxicity of botulinum and tetanus neurotoxins. *Toxins (Basel)*. 2019;11(12):686. <https://doi.org/10.3390/toxins11120686>

Дополнительная информация. На сайте журнала «БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение» размещены рисунки 1, 4 и таблица 2.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591-fig1>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591-fig4>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591-table2>

Additional information. Figure 1, Figure 4, and Table 2 are published on the website of *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*.

<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591-fig1>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591-fig4>
<https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591-table2>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **А.А. Деркаев** — получение клона-продуцента антитела B11-Fc, анализ качества препарата, проведение биослойной интерферометрии, исследование эффективности препарата *in vivo*, интерпретация результатов, написание текста рукописи; **Е.И. Рябова** — оптимизация условий культивирования клона-продуцента, анализ качества препарата, исследование эффективности препарата; **И.Б. Есмагамбетов** — концепция и дизайн исследования, интерпретация результатов, редактирование текста рукописи; **Д.В. Щебляков** — дизайн генетической конструкции, экспрессирующей однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом, руководство исследованиями; **А.Н. Носков** — концепция исследования, получение и очистка ботулинического токсина А; **И.Д. Виноградова** — концепция исследования, изучение активности токсина; **В.В. Прокофьев** — оптимизация хроматографической очистки антитела, анализ качества препарата; **Д.С. Полянский** — культивирование клона-продуцента, оптимизация условий культивирования; **Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург** — руководство исследованиями, окончательное утверждение версии статьи для публикации.

Соответствие принципам этики. Исследования проводились в соответствии с протоколом, утвержденным на заседании биоэтической комиссии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России (протокол № 16 от 08.02.2019).

Благодарности. Коллектив авторов выражает благодарность коллегам из ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, оказавшим помощь в выполнении исследования.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **A.A. Derkaev** obtained a stable B11-Fc antibody producer clone, analysed the quality of the preparation, performed bio-layer interferometry, studied the efficacy of the preparation *in vivo*, interpreted the results, and drafted the manuscript. **E.I. Ryabova** optimised culture conditions for producer clone generation, analysed the quality of the preparation, and studied the efficacy of the preparation. **I.B. Esmagambetov** conceptualised and designed the study, interpreted the results, and edited the manuscript. **D.V. Shchablyakov** designed the genetic construct expressing the Fc-fused single-domain antibody, and managed the experiments. **A.N. Noskov** conceptualised the study and produced and purified botulinum toxin A. **I.D. Vinogradova** conceptualised the study and studied the activity of the toxin. **V.V. Prokofiev** optimised chromatographic purification of the antibody and analysed the quality of the preparation. **D.S. Polyansky** generated the producer clone and optimised culture conditions for producer clone generation. **D.Y. Logunov** and **A.L. Gintsburg** managed the experiments and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was approved by the Bioethics Committee, National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Ministry of Health of the Russian Federation (Protocol No. 16 of 8 February 2019).

Acknowledgements. The authors express gratitude to their colleagues at the National Research Center for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya for assistance with the study.

Об авторах / Authors

Деркаев Артем Алексеевич / Artem A. Derkaev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3776-3856>

Рябова Екатерина Игоревна / Ekaterina I. Ryabova

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>

Есмагамбетов Ильяс Булатович, канд. биол. наук / Ilias B. Esmagambetov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Щебляков Дмитрий Викторович, канд. биол. наук / Dmitry V. Shchablyakov, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

Носков Анатолий Николаевич, д-р биол. наук / Anatoly N. Noskov, Dr. Sci. (Biol.)

Виноградова Ирина Дмитриевна, канд. биол. наук / Irina D. Vinogradova, Cand. Sci. (Biol.)

Прокофьев Владимир Владимирович / Vladimir V. Prokofiev

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>

Полянский Дмитрий Сергеевич / Dmitry S. Polyansky

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0792-7063>

Логунов Денис Юрьевич, д-р биол. наук, академик РАН / Denis Y. Logunov, Dr. Sci. (Biol.), Acad. RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Гинцбург Александр Леонидович, д-р биол. наук, проф., академик РАН / Alexander L. Gintsburg, Dr. Sci. (Biol.), Prof., Acad. RAS

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

Поступила 28.05.2024

После доработки 05.11.2024

Принята к публикации 23.12.2024

Online first 07.02.2025

Received 28 May 2024

Revised 5 November 2024

Accepted 23 December 2024

Online first 7 February 2025