







scFv-фрагменты рекомбинантных антител к вирусу гриппа: получение и характеристика функциональной активности

М.А. Плотникова¹ , В.А. Топорова^{1,2} , Е.А. Романовская-Романько¹ ,
А.А. Шалджян¹ , С.А. Клотченко¹,  

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации, ул. Профессора Попова, д. 15/17, Санкт-Петербург, 197022, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, Москва, 117997, Российская Федерация

✉ Клотченко Сергей Анатольевич; fosfatik@mail.ru; sergey.klotchenko@influenza.spb.ru

РЕЗЮМЕ

ВВЕДЕНИЕ. Пассивная иммунотерапия с использованием антител широкого спектра действия является перспективным направлением разработки новых лекарственных средств для борьбы с гриппом. Однако технологии получения, очистки и хранения рекомбинантных антител, пригодных для клинического применения, по-прежнему сопряжены со значительными трудностями. scFv-фрагменты антител (одноцепочечные вариабельные фрагменты) являются более простой, надежной и гибкой альтернативой полноразмерным аналогам антител.

ЦЕЛЬ. Разработка экспрессионных конструкций для синтеза scFv-фрагментов рекомбинантных антител к вирусу гриппа А и В, получение белковых препаратов scFv и оценка их функциональной активности *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Экспрессионные конструкции, кодирующие scFv-фрагменты антител, получали методом ПЦР с использованием перекрывающихся праймеров и методами генной инженерии. Построение 3D-моделей разработанных scFv-фрагментов проводили по первичной аминокислотной последовательности на сервере AlfaFold. Нарботку антител проводили в клеточной линии НЕК293 в ходе транзientной экспрессии. Препараты антител очищали из культуральной жидкости методом металл-аффинной хроматографии. Иммуноферментный анализ (ИФА) использовали для изучения вирус-специфической активности антител. Вируснейтрализующую активность антител изучали на монослойной культуре клеток MDCK по цитопатическому действию и регистрировали в реакции гемагглютинации.

РЕЗУЛЬТАТЫ. На основе рекомбинантных антител, специфичных к вирусу гриппа А и В, был осуществлен дизайн и предсказана пространственная структура scFv-фрагментов, получены три генетические конструкции для экспрессии белков scFv в культуре эукариотических клеток. scFv-фрагменты были наработаны и очищены методом аффинной хроматографии с никелевым сорбентом в количестве не менее 0,5 мг и концентрации около 1 мг/мл каждого. Методом электрофореза белков в полиакриламидном геле было подтверждено соответствие выделенных scFv-фрагментов ожидаемому значению молекулярной массы — около 28 кДа. Методом ИФА было показано специфическое связывание scFv-фрагментов с различными штаммами вируса гриппа А и В. Установлено, что 50% вируснейтрализующая доза scFv-фрагмента антитела к поверхностному гемагглютинину вируса гриппа (170 нг/мл) сопоставима с нейтрализующей дозой для исходного полноразмерного антитела (179 нг/мл).

ВЫВОДЫ. Разработан дизайн и получены scFv-фрагменты двух антител, одного — обладающего широкой нейтрализующей активностью против вируса гриппа А, другого — специфичностью в отношении вируса гриппа В. Благодаря малым размерам scFv-фрагменты могут эффективно проникать через слизистые оболочки при интраназальном введении. Указанное свойство определяет потенциал использования scFv-фрагментов в экстренной профилактике и ранней терапии ОРВИ. Перспективным направлением для усиления нейтрализующей активности является создание биспецифических scFv-фрагментов, способных одновременно нацеливаться на два вирусных эпитопа.

Ключевые слова: рекомбинантные антитела; антитела широкого спектра действия; scFv-фрагменты; вирус гриппа; противовирусные препараты; пассивная иммунотерапия; вируснейтрализующая активность

Для цитирования: Плотникова М.А., Топорова В.А., Романовская-Романько Е.А., Шалджян А.А., Клотченко С.А. scFv-фрагменты рекомбинантных антител к вирусу гриппа: получение и характеристика функциональной активности. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-728>

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, соглашение № 24-25-00488. Название проекта: «Изучение противовирусного потенциала внутриклеточных scFv антител к гриппу» (руководитель — С.А. Клотченко). <https://rscf.ru/project/24-25-00488/>

Потенциальный конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Production and functional activity of scFv fragments obtained from recombinant antibodies against influenza virus

Marina A. Plotnikova¹ , Viktoriya A. Toporova^{1,2} , Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko¹ , Aram A. Shaldzhyan¹ , Sergey A. Klotchenko¹ ✉ 

¹ Smorodintsev Research Institute of Influenza, 15/17 Prof. Popov St., St. Petersburg 197022, Russian Federation

² Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, GSP-7, 16/10 Miklukho-Maklay St., Moscow 117997, Russian Federation

✉ Sergey A. Klotchenko; fosfatik@mail.ru; sergey.klotchenko@influenza.spb.ru

ABSTRACT

INTRODUCTION. Passive immunotherapy using broad-spectrum antibodies is a promising development vector of new drugs against influenza. However, production process, purification, and storage of clinically suitable recombinant antibodies still face significant challenges. Antibody scFv (single-chain variable fragments) represent a more reliable, flexible, and simpler alternative to full-length antibody analogues.

AIM. This study aimed to develop expression constructs used to synthesize scFv fragments of recombinant antibodies against influenza A and B viruses, produce scFv protein preparations, and evaluate their *in vitro* functional activity.

MATERIALS AND METHODS. Expression constructs encoding antibody scFv fragments were obtained by PCR using overlapping primers and genetic engineering methods. 3D models of the developed scFv fragments were constructed from the primary amino acid sequence using AlfaFold Server. Antibodies were produced in a HEK293 cell line via transient expression. Antibody preparations were purified from the culture fluid by metal affinity chromatography. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to study the virus-specific activity of the antibodies. Virus neutralising activity was studied in Madine-Darbi canine kidney (MDCK) cell monolayer culture based on cytopathic effect and recorded in a haemagglutination assay.

RESULTS. Based on recombinant antibodies specific to influenza A and B viruses, configuration of scFv fragments was designed and predicted, and three genetic constructs were obtained for

expression of scFv proteins in a eukaryotic cell culture. The scFv fragments were produced and purified by affinity chromatography using Ni sorbent (no less than 0.5 mg) at a concentration of about 1 mg/mL of each fragment. Protein polyacrylamide gel electrophoresis confirmed that the isolated scFv fragments matched the expected size of approximately 28 kDa. ELISA demonstrated specific binding of scFv fragments to various influenza A and B strains. It was established that a 50% virus neutralising dose of the scFv antibody fragment against the influenza virus surface haemagglutinin (170 ng/mL) is comparable to that of the original full-length antibody (179 ng/mL).

CONCLUSIONS. The scFv fragments have been designed and obtained for two antibodies; the one has broad neutralising activity against influenza A virus, the other is specific for influenza B virus. Due to their small size, scFv fragments can effectively penetrate mucous membranes upon intranasal administration. This makes scFv fragments potentially useful in the emergency prophylaxis and early therapy of acute respiratory viral infections. A promising decision for enhanced neutralising activity is to create bispecific scFv fragments capable of simultaneously targeting two viral epitopes.

Keywords: recombinant antibodies; broad-spectrum antibodies; scFv fragments; influenza virus; antiviral drugs; passive immunotherapy; virus neutralizing activity

For citation: Plotnikova M.A., Toporova V.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Shaldzhyan A.A., Klotchenko S.A. Production and functional activity of scFv fragments obtained from recombinant antibodies against influenza virus. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-728>

Funding. The study was supported by the Russian Science Foundation, Agreement No. 24-25-00488, project title: Study of the Antiviral Potential of Intracellular scFv Antibodies against Influenza (Principal investigator – Sergey A. Klotchenko). <https://rscf.ru/project/24-25-00488/>
Disclosure. The authors declare no conflict of interest.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы гриппа ежегодно вызывают до 70% случаев сезонных респираторных инфекций и имеют крайне высокий пандемический потенциал [1]. Современная стратегия противодействия гриппу в значительной степени опирается на вакцинопрофилактику. Формирующиеся в ответ на вакцинный или инфекционный штамм антитела могут обеспечить полную иммунную защиту от повторного заражения тем же (гомосубтипичным) штаммом вируса гриппа [2]. Однако эволюционно выработанные вирусом гриппа механизмы, такие как высокая антигенная изменчивость и реассортация геномных сегментов, существенно затрудняют предсказание циркуляции эпидемически значимых штаммов гриппа, а ошибки в выборе вакцинных штаммов приводят к значительному снижению профилактической эффективности [3]. Пассивная иммунотерапия с использованием моноклональных антител широкого спектра действия является альтернативным подходом в борьбе с инфекциями, вызванными вирусами гриппа.

Модульная структура антител дает возможность создавать более компактные функциональные фрагменты, такие как антигенсвязывающие фрагменты (fragment antigen binding, Fab), одноцепочечные переменные фрагменты (single chain variable fragments, scFv), однодоменные антитела, а также кристаллизуемые фрагменты антитела (fragment crystallizable, Fc) [4].

Молекулы scFv представляют собой химерные рекомбинантные белки, состоящие из вариабельных участков тяжелой (VH) и легкой (VL) цепей полноразмерного антитела, которые соединены друг с другом гибким пептидным линкером [5, 6]. Вариабельные участки VH и VL, локализованные совместно, формируют вариабельный фрагмент, который непосредственно участвует в связывании антигена. scFv-фрагменты демонстрируют аффинность связывания, сравнимую с исходными полноразмерными антителами – иммуноглобулинами класса G (IgG). Производство scFv-фрагментов менее затратно благодаря компактным размерам; scFv-фрагменты лучше проникают в ткани и органы и достигают стерически скрытых и конформационно сложных эпитопов антигена [4]. scFv-фрагменты не содержат константные области Fc, которые есть в полноразмерных молекулах антител, поэтому scFv-фрагменты характеризуются сниженной иммуногенностью из-за отсутствия эффекторных функций [4, 7].

Для выделения scFv-фрагментов из культурального супернатанта не подходит стандартный для хроматографической очистки иммуноглобулинов Fc-рецепторный белок G *Streptococcus pyogenes*. Очистку и иммобилизацию scFv-фрагментов осуществляют с использованием белка L (взаимодействует с вариабельной областью легких κ-цепей), а в случае наличия в scFv-фрагменте человеческого домена VH3 –

с использованием белка А [8]. Наиболее распространенным подходом при конструировании является добавление к С-концу молекулы scFv последовательности из шести гистидинов (6×His-tag) для дальнейшей очистки методом металл-аффинной хроматографии [9, 10].

Использование scFv-фрагментов антител для лечения и профилактики острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) перспективно в силу ряда ключевых преимуществ. Малый размер scFv-фрагментов способствует лучшему проникновению через слизистые оболочки дыхательных путей при интраназальном введении препарата. Низкая иммуногенность и быстрое выведение из организма делают scFv-фрагменты идеальными кандидатными препаратами для экстренной профилактики во время эпидемий и терапии ОРВИ на ранних стадиях.

Наше научное исследование посвящено конструированию и созданию молекулярно-биологическими методами панели scFv-фрагментов высокоаффинных моноклональных антител, связывающих гемагглютинин (НА) и нуклеопротеин (NP) вируса гриппа А и В. Первый scFv-фрагмент был создан на основе человеческого иммуноглобулина G (IgG) FI6, который характеризуется широкой нейтрализующей активностью против штаммов вируса гриппа А (ВГА), относящихся к первой и второй филогенетическим группам [11]. Как установлено ранее, антитело FI6 взаимодействует с остатками пеп-

тида слияния и гидрофобной областью спирали НА ВГА, но не связывается с вирусом гриппа В (ВГВ) [11–13]. Другие два белковых варианта scFv были разработаны на основе моноклональных IgG мыши (клон 2/3), впервые полученных в ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России при инфицировании экспериментальных животных ВГВ. IgG 2/3 специфически связывают головной домен NP Ямагатской и Викторианской антигенных линий ВГВ, но не являются нейтрализующими и широко используются в диагностических тест-системах [14].

Цель работы — разработка экспрессионных конструкций для синтеза scFv-фрагментов рекомбинантных антител к вирусу гриппа А и В, получение белковых препаратов scFv и оценка их функциональной активности *in vitro*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Полимеразная цепная реакция

ПЦР с перекрывающимися геноспецифическими праймерами проводили с использованием высокоточной полимеразы Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, США) и специально разработанных четырех пар специфических праймеров (табл. 1), синтезированных ЗАО «Евроген» (Россия) в три этапа: получение первичных фрагментов, отжиг первичных фрагментов, достраивание до полноразмерного фрагмента и финальная амплификация [15]. Второй и третий этапы ПЦР

Таблица 1. Последовательности разработанных праймеров для получения scFv-фрагментов

Table 1. Sequences of the designed primers for amplification of scFv fragments

Праймеры <i>Primers</i>	Последовательности праймеров (5'→3') <i>Primer sequences (5'→3')</i>	Расчетная T _m , °C <i>Calculated melting temperature, °C</i>	Длина ПЦР-фрагмента, п.н. <i>PCR-restriction fragment length, base pairs</i>
F-scFv-SP-23-Clal	TGCGC ATCGAT GCCACCATGGACTTCCAGGTG*	68,23	467
R-scFv-in-23	<u>GGAGCCGCCGCCG</u> CCAGAACCAACCACCAGAACCAACCAC-CACCTTTCAGCTCCAGC**	80,88	
F-scFv-in-23	<u>GGCGGCCGCCG</u> GCTCCGGTGGTGGTGGATCCCAGGTTCACTGC	79,77	416
R-scFv-23-NotI	TTAG CGGCCGC CTAATGATGATGATGATGATGGCTCGAGACG	70,37	
F-scFv-SP-FI6-Clal	ATTAT CGAT GCCACCATGAAGTCACAGACCCAGGCT	64,40	453
R-scFv-in-FI6	<u>GGAGCCGCCGCCG</u> CCAGAACCAACCACCAGAACCAACCAC-CACCTTTCAGTTCCACCT	79,22	
F-scFv-in-FI6	<u>GGCGGCCGCCG</u> GCTCCGGTGGTGGTGGATCCCAGGTCAGCTG	80,13	449
R-scFv-FI6-NotI	TTAG CGGCCGC CTAATGATGATGATGATGATGGGAGCTCACG	70,37	

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

Примечание. п.н. — пары нуклеотидов, T_m — температура плавления.

* Жирным шрифтом выделены последовательности узнавания соответствующих эндонуклеаз рестрикции.

** Участки перекрывания первичных scFv-фрагментов выделены подчеркиванием.

Note. T_m, melting temperature.

* Restriction endonuclease recognition sites are highlighted in bold.

** Overlapping regions between primary scFv fragments are underlined.

с перекрывающимися праймерами проводили с использованием в качестве матрицы 20 нг первичных продуктов и 2 мкМ наружных прямого и обратного праймеров со следующими установками амплификатора Gentier 96E (Tianlong, Китай): 1) денатурация – 98 °C, 30 с; 2) 9 циклов: отжиг – 98 °C, 40 с; элонгация – 72 °C с понижением температуры на 0,5 °C на каждом следующем цикле, 25 с; 3) 15 циклов: денатурация – 98 °C, 15 с; отжиг – 65 °C, 15 с; элонгация – 72 °C, 25 с.

Клонирование

ScFv-фрагменты обрабатывали рестриктазами *Clal* и *NotI* (Сибэнзим, Россия) для клонирования в экспрессионный вектор pIRESneo3 (Clontech, США). Продукты реакции разделяли в 1% агарозном геле, содержащем 1x TAE-буфер (ЗАО «Евроген», Россия). Для выделения фрагментов нужной длины из геля применяли набор Cleanup S-Car (ЗАО «Евроген», Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Аналогичным образом обрабатывали рестриктазами вектор pIRESneo3 (Clontech, США), очищая его из реакционной смеси с использованием набора Cleanup S-Car. Затем проводили лигирование очищенных фрагментов и вектора в молярном соотношении 3:1 лигазой фага T4 (T4 DNA Ligase, Thermo Fisher Scientific, США) в объеме 20 мкл в течение 30 мин при 22 °C. Далее лигазную смесь сразу использовали для трансформации химически компетентных бактериальных клеток *Escherichia coli*, штамм HB101, по методу H. Inoue с соавт. [16].

Молекулярное моделирование

Построение 3D-моделей разработанных scFv-фрагментов проводили по первичной аминокислотной последовательности (транслированной из секвенограммы) на сервере AlphaFold Server 3 [17]. AlphaFold напрямую предсказывает локальную структуру белка (геометрию связей тяжелых атомов), используя в качестве входных данных первичную аминокислотную последовательность и известные структуры белков-гомологов. Моделирование проводили для стандартных шаблонов MSA (Multiple-Sequence Alignment), установленных по умолчанию, задавая в качестве типа объекта «protein»; аминокислотная последовательность белка была введена без сигнального пептида.

Получение scFv-фрагментов в эукариотических клеточных линиях

Клетки линии HEK293 культивировали в среде DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением 10%

эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, США) в CO₂-инкубаторе при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Для проведения трансфекции клетки засеивали в количестве 25×10⁶ клеток в культуральные флаконы площадью 175 см² (Jet Biofil, Китай) и на следующие сутки трансфицировали реагентом GenJect-39 (Molecta, Россия) согласно инструкции производителя из расчета 40 мкг плазмиды на один культуральный флакон и с использованием соотношения «ДНК:трансфекционный агент», равного 1:1 (масса/объем, мкг/мкл). Клетки после трансфекции культивировали в течение 12 сут, поддерживая концентрацию глюкозы не менее 4 г/л.

Уровень глюкозы в культуральной среде измеряли с использованием медицинского глюкометра Accu-Chek Active (Roche Diabetes Care, Германия) с соответствующими тест-полосками.

Получение стабильных клеток-продуцентов

Для получения стабильных продуцентов рекомбинантных белков использовали перевиваемую клеточную линию ExpiHEK293 (Thermo Fisher Scientific, США) и ростовую среду DMEM (ООО «БиолоТ», Россия) с добавлением сыворотки крупного рогатого скота до 5% (Gibco, США). Трансфекцию суточного монослоя клеток (~0,5×10⁶ клеток в лунке) проводили 1 мкг соответствующей генетической конструкции на основе вектора pIRESneo3 (Clontech, США) с использованием GenJect-39 (Molecta, Россия). Селекцию пулов-продуцентов проводили в течение 2 нед. с использованием антибиотика G418 (Gibco, США), вносимого в культуральную среду до конечной концентрации 150 мкг/мл. Продукцию scFv-фрагментов в супернатантах клеток оценивали каждые 3–5 сут методом иммуноферментного анализа (ИФА). Отбор стабильных клонов-продуцентов проводили методом предельных разведений, рассеивая пул стабильных продуцентов в лунки 96-луночного планшета из расчета одна клетка на лунку. Подсчет клеток проводили в автоматическом счетчике клеток TC-10 (Bio-Rad, США). Клоны, показавшие наибольшую продуктивность и жизнеспособность, были размножены и депонированы в Коллекцию ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Хроматографическая очистка

Очистку рекомбинантных антител из культуральной среды проводили с использованием метода металл-аффинной хроматографии на системе ÄKTA pure (Cytiva, Швеция) с колонкой Polac MC60-Ni Excel объемом 1 мл (Sepax, Китай). Элюцию scFv-фрагментов выполняли 15 мл (15 объемов

колонки) 100% элюирующего буфера (50 мМ трис-HCl, 500 мМ натрия хлорид, 500 мМ имидазол, pH 8,0) при скорости потока 5 мл/мин. Контроль элюции проводили по поглощению раствора при длине волны 280 нм. На этапе элюции на автоматическом коллекторе отбирали фракцию, соответствующую пику оптической плотности >0,05 AU. Далее материал переводили в фосфатно-солевой буфер обессоливанием при помощи картриджа Bio-Scale Mini Bio-Gel P-6 (Bio-Rad, США) объемом 10 мл согласно инструкции производителя. Полученный препарат фильтровали через шприцевой фильтр Sartorius (Германия) с размером пор 0,45 мкм. Очищенные препараты scFv концентрировали с использованием центрифужных концентраторов JetSpin 5 kDa (Jet Biofil, Китай) и стерилизовали фильтрацией через PES-мембрану с размером пор 0,22 мкм (Jet Biofil, Китай).

Концентрацию общего белка измеряли на флуориметре Qubit с использованием набора Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, США).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ)

Электрофорез белков в ПААГ выполняли по методике Лэммли [18] в восстанавливающих условиях с добавлением β-меркаптоэтанола. Применяли градиентный гель Any kD с 15 лунками (Кат. № 4568126, Bio-Rad, США). Образцы перед загрузкой в лунки смешивали с 4х буфером для образцов (Laemmli sample buffer) и денатурировали при 95 °C в течение 10 мин в термостате «Гном» (ООО «ДНК-Технология», Россия). Разделение белков осуществляли при постоянном токе 25 мА на гель в течение 45 мин в вертикальной камере Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). Гель окраши-

вали коллоидным раствором Кумасси по методу G. Candiano с соавт. [19]. Визуализацию окрашенного геля проводили на системе документирования Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, США).

Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ выполняли с использованием 96-луночных планшетов Microlopin High Binding (Greiner Bio-One, Германия) и термостатической бани MB100-4A (Allsheng, Китай). Для работы использовали вирусы гриппа из Коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Для иммобилизации в качестве антигена были подготовлены вирусные панели (табл. 2): вирусы гриппа А и В выращивали в 10-дневных куриных эмбрионах, очищали в градиенте сахарозы и далее хранили при -80 °C в аликвотах, содержащих 2–5 мг/мл общего белка. Вирусы сорбировали в концентрации 2–5 мкг на 100 мкл на поверхности лунок при 4 °C в течение 16 ч. Для блокирования неспецифического связывания использовали 5% раствор обезжиренного молока (Blotting-Grade Blocker, Кат. № 1706404, Bio-Rad, США) в фосфатно-солевом буфере pH 7,4 (ООО «ПанЭко», Россия) с 0,05% Твин-20 при 37 °C в течение 1 ч. Образцы scFv в концентрации 200 нг/мл инкубировали при 37 °C в течение 2 ч, затем добавляли конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к последовательности 6×His-tag (HyTest, Россия) в разведении 1:2000 (рекомендовано производителем) и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. Для выявления референсного образца IgG-F16 использовали антитела Goat Anti-Human IgG H&L, конъюгированные с пероксидазой хрена (Bio-Rad, США). После стандартной детекции с использованием тетраметилбензидина (ООО «Хема», Россия) и 1 Н серной кислоты измеряли оптическую плотность при длинах волн 450 и 655 нм на микропланшетном спектрофотометре Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, США). Статистический анализ первичных данных проводили в программных пакетах Microsoft Office Excel 2010 и GraphPad Prism 8.

Оценка вируснейтрализующей активности

Образцы объемом 50 мкл, содержащие scFv-фрагменты в концентрациях от 0,001 до 10 мкг/мл, смешивали с равным объемом образца, содержащего 100 ТЦД₅₀¹ вируса гриппа. Полученную смесь в объеме 100 мкл инкубировали при 37 °C в течение 1 ч, затем наносили на монослой клеток MDCK², предварительно промытый

Таблица 2. Штаммы вируса гриппа А и В, используемые в работе

Table 2. Influenza A and B virus strains used in the study

Номер Number	Штамм Strain	Подтип вируса Virus subtype
1	A/Brisbane/02/18	A/H1N1pdm
2	A/California/07/09	A/H1N1pdm
3	A/Texas/50/12	A/H3N2
4	A/СП6-НИИГ-310/23 A/Spb-NIIG-310/23	A/H3N2
5	A/California/MA	A/H2N2
6	B/Phuket/3073/13	B/Yamagata

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

¹ Тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя.

² Madin-Darby canine kidney cells, клетки почек собаки Мадина-Дарби.

фосфатно-солевым буфером pH 7,2, в 96-луночных планшетах для клеточных культур (NUNC, Дания). Планшеты помещали в CO₂-инкубатор при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, и инкубировали в течение 3 сут. Цитопатическое действие вирусов гриппа анализировали визуально и регистрировали в реакции гемагглютинации по стандартной методике [20]. Показатель IC₅₀ (полумаксимальная ингибирующая концентрация) рассчитывали по результатам построения 4-параметрической кривой «доза-эффект» с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 на основании трех независимых повторов. Статистический анализ первичных данных проводили в программных пакетах Microsoft Office Excel 2010 и GraphPad Prism 8.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Молекулярный дизайн и получение экспрессионных конструкций для scFv-фрагментов

Схематическое изображение предложенного нами дизайна scFv-фрагментов показано на рисунках 1A и 1B. N-конец scFv-фрагмента содержал сигнальный пептид для секреции белка во внеклеточное пространство. Далее к C-концу VL-участка IgG через пространственный линкер в направлении от N- к C-концу был добавлен VH-участок антитела, содержащий на C-конце последовательность 6×His-tag. Две линкерные последовательности, одна из которых состоит из тетрамера G₄S ((G₄S)₄), а другая – из гексамера G₄S ((G₄S)₆), были предложены для scFv-2/3; для scFv-FI6 в качестве линкера был использован только один олигопептид (G₄S)₄. В качестве сигнального пептида использована последовательность L1 MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC, обеспечивающая высокопродуктивную сборку рекомбинантных антител в эукариотических системах на основе клеточных линий CHO³ и HEK⁴ [21, 22].

Синтез последовательностей scFv был осуществлен с использованием ПЦР с перекрывающимися праймерами (табл. 1) в несколько стадий (рис. 1B). В качестве ДНК-матрицы использовали плазмидные конструкции, кодирующие тяжелую и легкую цепи антител 2/3 и FI6, разработанные нами ранее для получения рекомбинантных полноразмерных антител. На первой стадии была проведена независимая амплификация переменных участков легкой и тяжелой цепей, при этом 3'-конец ПЦР-продукта легкой цепи перекрывался с 5'-концом ПЦР-продукта тяжелой цепи [23, 24]. Как показано на рисунке 1C,

длины полученных переменных последовательностей соответствовали ожидаемым (показано для антитела FI6). Фрагменты выделяли из геля и использовали в качестве матрицы (в количестве 20 нг) во второй стадии ПЦР, затем добавляли наружные праймеры, содержащие сайты рестрикции *Clal* и *NotI*. Амплификация всех фрагментов осуществлялась высокоточной полимеразой PhusionTM.

Полученные scFv-фрагменты очищали из геля (рис. 1C) и клонировали методом рестрикции-лигирования (по сайтам узнавания эндонуклеаз рестрикции *Clal* и *NotI*) в векторе pIRESneo3 (Clontech, США). Полученные плазмидные конструкции были накоплены, очищены, в том числе от бактериального эндотоксина, и секвенированы методом Сэнгера в ЗАО «Евроген» (Россия). Нуклеотидная и транскрибированная аминокислотные первичные последовательности scFv-фрагментов полностью соответствовали ожидаемой структуре.

С использованием программного обеспечения AlphaFold 3 [17, 25] была предсказана пространственная структура всех трех разработанных scFv-фрагментов (рис. 1D). Согласно полученным нами результатам (рис. 1D), вторичная структура VL и VH участков в структуре scFv-фрагментов представляет собой бета-складчатые тяжи (pLDDT>90) подобно структуре, описанной для иммуноглобулинов [26]. Наименьшее качество прогнозирования (pLDDT<50) в структурах scFv-фрагментов было показано для сателлитных инженерных структур, особенно для линкерных областей, состоящих из аминокислотных остатков глицина и серина (рис. 1D). Таким образом, представлены модели 3D-структуры scFv-фрагментов. Наиболее вероятная доменная организация созданного химерного scFv-FI6 белка в целом отражает экспериментальные структуры, описанные для исходного полноразмерного антитела FI6 (PDB 3ZTN) [11].

Получение и характеристика белков scFv

Полученные плазмидные конструкции на основе pIRESneo3 (Clontech, США) были использованы для трансфекции клеток HEK293. Для определения продолжительности продукции, обеспечивающей максимальный выход рекомбинантных белков при временной трансфекции, исследовали кинетику накопления scFv-фрагментов в культуральной жидкости. Устойчивый прирост наблюдался в течение

³ Chinese hamster ovary cells, клетки яичника китайского хомячка.

⁴ Human embryonic kidney cells, клетки эмбриональной почки человека.

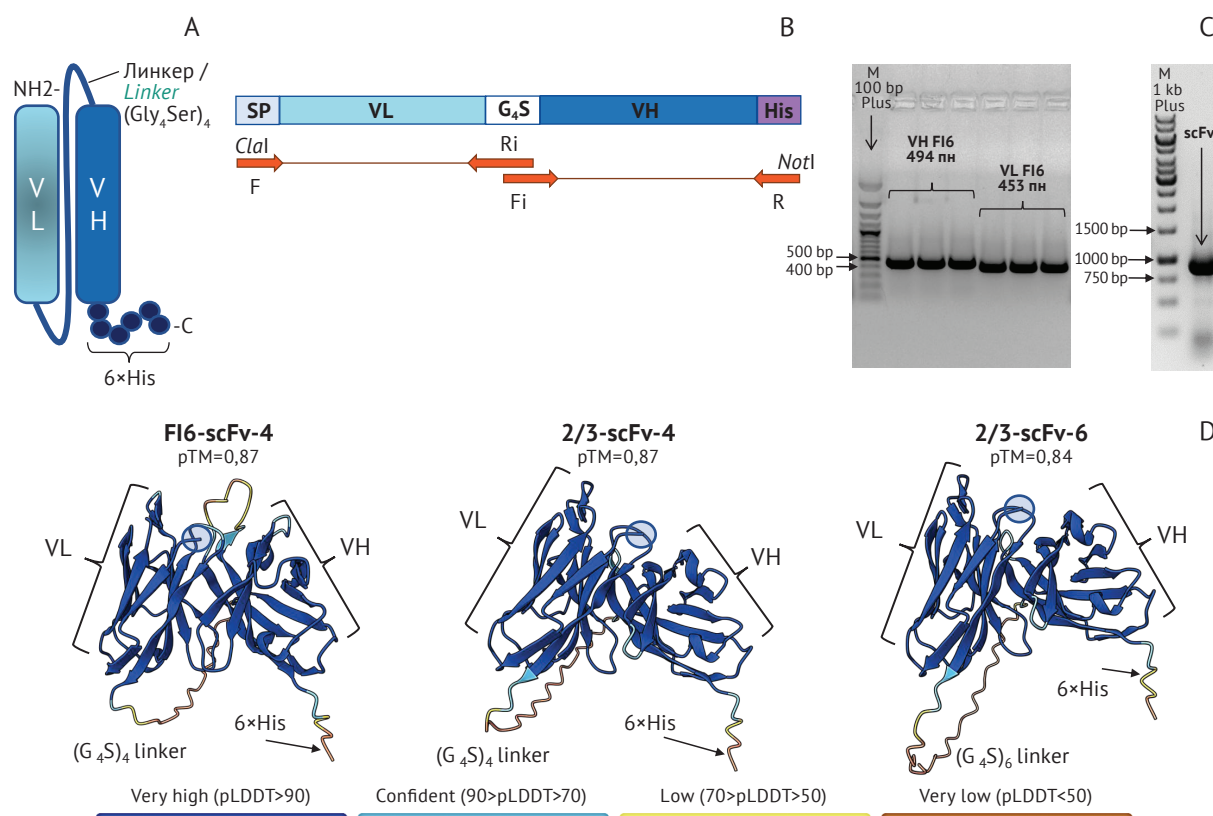


Рис. 1. Молекулярный дизайн и получение scFv-фрагментов рекомбинантных антител к вирусу гриппа А и В.

A – схема принципиального дизайна белковой молекулы scFv (секретируемая форма не содержит сигнального пептида). VL – вариабельный участок легкой цепи, VH – вариабельный участок тяжелой цепи, 6xHis – последовательность, состоящая из шести гистидинов.

B – схема нуклеотидной последовательности для получения scFv-фрагмента методом ПЦР с перекрывающимися праймерами. F/R – прямой и обратный наружные праймеры; Fi/Ri – внутренние перекрывающиеся праймеры.

C – электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов, кодирующих VL и VH фрагменты (показано слева для scFv-FI6). Амплифицированный scFv-фрагмент для клонирования в вектор pIRESneo3 (справа). M 100 bp и M 1 kb Plus – маркеры молекулярного веса (Fermentas, Латвия); bp – пары оснований.

D – молекулярное моделирование разработанных белковых молекул scFv-FI6-4 на основе антитела к гемагглюнину вируса гриппа А с линкером (G₄S)₄; scFv-2/3-4 и scFv-2/3-6 – на основе антитела к нуклеопротеину вируса гриппа В с линкерами (G₄S)₄ и (G₄S)₆, соответственно. pLDDT (local distance difference test) – оценка достоверности для каждого атома по шкале от 0 до 100 (показана внизу рисунка). pTM – рассчитанный показатель прогнозируемого моделирования шаблона; значение pTM>0,5 указывает на то, что общая прогнозируемая структура комплекса может быть похожа на истинную структуру.

Fig. 1. Molecular design and obtaining scFv fragments for recombinant antibodies against influenza A and B viruses.

A, schematic design of scFv protein molecule (the secreted form lacks a signal peptide). VL, variable light chain domain; VH, variable heavy chain domain; 6xHis, hexahistidine tag.

B, nucleotide sequence scheme for obtaining scFv fragment by overlap extension PCR. F/R, forward/reverse outer primers; Fi/Ri, forward inner/reverse inner overlapping primers.

C, electrophoretic separation of PCR products (shown for scFv-FI6) encoding VL and VH fragments (left), and the amplified scFv fragment for cloning into pIRESneo3 vector (right); M 100 bp and M 1 kb Plus, corresponding molecular weight markers (Fermentas, Latvia); bp, base pairs.

D, molecular modelling of the designed scFv-FI6-4 protein molecules (based on an anti-HA IAV antibody with a (G₄S)₄ linker); scFv-2/3-4 and scFv-2/3-6 (based on an anti-NP IBV antibody with (G₄S)₄ and (G₄S)₆ linkers, respectively). pLDDT (local distance difference test) – per-residue confidence score on a scale from 0 to 100 (shown at the bottom as a color scale). pTM, predicted Template Modeling score, is indicated below the protein name. pTM>0.5 suggests that the overall predicted structure of the complex may be similar to the true structure.

6 сут для scFv-FI6-4 и в течение примерно 8 сут для обоих фрагментов scFv-2/3 (рис. 2А). Были получены и сохранены стабильные линии клеток-продуцентов фрагментов scFv-FI6-4, scFv-2/3-4 и scFv-2/3-6 с использованием антибиотика G418 на основе клеточной культуры ExpiNEK293. Был проведен первый этап

селекции клеток-продуцентов, в результате которого удалось депонировать пул постоянных жизнеспособных продуцентов с первичной продуктивностью не менее 5 мкг/мл (результаты не представлены).

Для выделения и очистки scFv-фрагментов проводили транзientную продукцию в течение 10 сут.

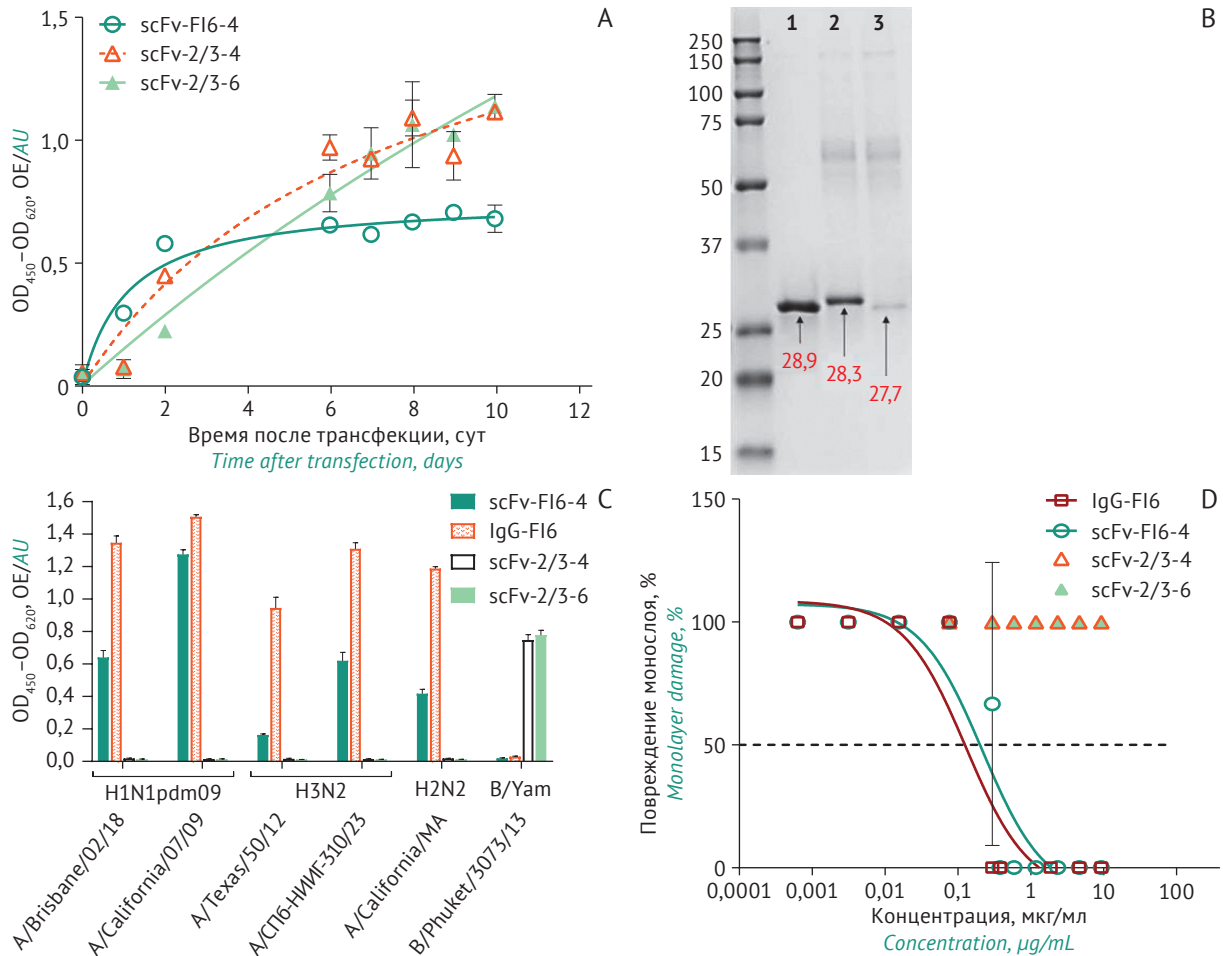


Рис. 2. Получение и характеристика белковых scFv-фрагментов рекомбинантных антител к вирусу гриппа А и В.

А — динамика накопления scFv-фрагментов в супернатантах трансфицированных клеток. Оценку уровня продукции проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА), по оси ординат показаны нормированные значения оптической плотности ввиду отсутствия референс-образца для построения калибровочной кривой. Точками показаны средние значения оптической плотности, вертикальными отрезками — стандартные отклонения для трех биологических повторов. OD — оптическая плотность.

В — электрофореграмма экспериментальных образцов scFv в восстанавливающих условиях: scFv-FI6-SP4 (1), scFv-2/3-SP6 (2), scFv-2/3-SP4 (3). Стрелками указаны полосы, соответствующие scFv-фрагментам; красные цифры — ожидаемые молекулярные массы scFv (кДа); крайняя дорожка слева — маркер молекулярных масс Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Bio-Rad, USA).

С — оценка специфического связывания полученных препаратов scFv и референсного препарата IgG-FI6 с вирусами гриппа методом ИФА. По оси абсцисс указаны названия сорбированных штаммов вирусов, сгруппированных по подтипам: вирус гриппа А (H1N1pdm, H3N2, H2N2); для вируса гриппа В указана генетическая линия вируса гриппа В/Yamagata, к которой относится используемый штамм.

Д — нейтрализующая активность полученного scFv-FI6-SP4 и исходного IgG-FI6 препаратов в отношении штамма вируса гриппа А/California/07/09 (H1N1pdm09). Определение титра нейтрализующих антител было выполнено в трех повторах, для каждой точки на графике представлено среднее значение процента повреждения ± стандартное отклонение.

Fig. 2. Preparation and parameters of scFv protein fragments of recombinant antibodies against influenza A and B viruses.

A, dynamics of scFv fragment accumulation in the supernatants of transfected cells. The production level was assessed by ELISA. The ordinate axis shows normalised optical density values due to the lack of a reference sample for constructing a calibration curve. The dots represent the mean optical density values, the vertical bars represent standard deviations for three biological replicates. OD, optical density.

B, electrophoregram of experimental scFv samples under reducing conditions. Band designations: scFv-FI6-SP4 (1), scFv-2/3-SP6 (2), scFv-2/3-SP4 (3). The arrows indicate bands corresponding to scFv fragments; the expected molecular masses of the scFv (kDa) are labeled in red below. Molecular weight marker Precision Plus Protein Kaleidoscope Standards (Bio-Rad, USA) is shown in the left band.

C, assessment of the specific binding of the obtained scFv preparations and the reference IgG-FI6 preparation to influenza viruses by ELISA. The names of the adsorbed virus strains are indicated at the bottom, grouped by subtype: for influenza A virus (H1N1pdm, H3N2, H2N2); for influenza B virus, the genetic lineage of the influenza virus B/Yamagata is indicated, where the used strain belongs.

D, neutralising activity of the obtained scFv-FI6-SP4 preparation and the original IgG-FI6 against the A/California/07/09 (H1N1pdm09) strain. The neutralisation antibody titer was determined in triplicate; for each data point on the graph, the mean percentage of damage value ± standard deviation is presented.

Далее препараты scFv-фрагментов, полученные в результате хроматографической очистки, анализировали методом электрофореза белков в ПААГ в восстанавливающих условиях (рис. 2В). Молекулярные массы полученных scFv-фрагментов соответствуют ожидаемым значениям, что следует из электрофореграммы.

Способность полученных нами образцов scFv к специфическому связыванию с HA ВГА и NP ВГВ изучали методом ИФА (рис. 2С). Для этого в качестве сорбирующих лигандов использовали панель ВГА, содержащих различные подтипы поверхностных HA, и ВГВ (табл. 2). В экспериментах использовали несколько штаммов ВГА: H1N1pdm09 и H3N2, наиболее широко распространенные в человеческой популяции, и ВГА подтипа H2N2; в качестве ВГВ использовали штамм B/Phuket/3073/13, относящийся к Ямагатской генетической линии.

Согласно полученным результатам, scFv-FI6-4 специфически связывал все штаммы ВГА, однако уровень детектируемого сигнала несколько варьировал. Предположительно, scFv-FI6 имеет наибольшее сродство к ВГА подтипа H1N1pdm, что согласуется с литературными данными [27, 28]. С ВГВ специфически связывались только scFv-фрагменты, полученные из антитела 2/3, что было ожидаемо. Уровни сигналов связывания scFv-2/3-4 и scFv-2/3-6 с ВГВ статистически не отличались.

Оценка вируснейтрализующей активности разработанных scFv-фрагментов *in vitro*

Значение показателя IC_{50} в отношении протестированного штамма рассчитали из кривой «доза-эффект» (рис. 2D) на основании трех независимых повторов. В качестве штамма ВГА использовали A/California/07/09 (H1N1pdm09), а ВГВ — B/Phuket/3073/13 (Yam). Для scFv-фрагментов на основе антитела 2/3, не обладающего нейтрализующими свойствами, так же, как и для исходного иммуноглобулина 2/3, было показано отсутствие протективного действия в отношении ВГВ (как и ВГА) (результаты не представлены).

Полученный нами препарат scFv-FI6-4 проявлял нейтрализующую активность в отношении эталонного штамма вируса гриппа. В качестве референсного препарата использовали рекомбинантный человеческий полноразмерный иммуноглобулин IgG-FI6, полученный нами ранее [29]. Константные области тяжелой и легкой цепей IgG-FI6 были идентичны аминокислотным последовательностям P01857 (IgG1)

и P01834 (κ-изотип) соответственно, согласно базе данных UniProt [30]; переменные области полностью совпадали с фрагментами в составе scFv-FI6-4. Среднее значение показателя IC_{50} , рассчитанного по трем сериям экспериментов для scFv-FI6-4, составило 170 нг/мл (130, 200 и 180 нг/мл в каждом из экспериментов); для референсного препарата (человеческий IgG-FI6) — 179 нг/мл (208, 160 и 169 нг/мл). Достоверные различия (тест Манна — Уитни для сравнения двух независимых выборок) между полученными значениями IC_{50} для исходного IgG-FI6 и scFv-FI6-SP4 отсутствовали.

ОБСУЖДЕНИЕ

Несмотря на значительные достижения в создании противовирусных препаратов, гриппозная инфекция по-прежнему представляет серьезную проблему для общественного здравоохранения [31]. Сравнительно новым узконаправленным терапевтическим подходом является использование антител широкого спектра действия. Тем не менее существуют определенные трудности, связанные с высокопроизводительным получением и очисткой стабильных рекомбинантных иммуноглобулинов [32].

В нашей работе описан доступный и воспроизводимый способ получения scFv-фрагментов на основе антител. Наличие переменных фрагментов исходного полноразмерного антитела в структуре scFv обеспечивает необходимый функционал и высокоспецифическое связывание с мишенью, однако иммуногенность таких терапевтических агентов значительно снижена из-за отсутствия в их составе Fc-фрагмента [4]. Кроме того, получение рекомбинантных scFv-фрагментов происходит с использованием моноплазмидной системы, что помогает избежать проблем с неправильным сочетанием легких и тяжелых цепей [33, 34]. В настоящее время на биофармацевтическом рынке представлено более 30 наименований терапевтических продуктов на основе scFv-фрагментов⁵.

Для получения scFv-фрагментов мы применяли метод ПЦР с перекрывающимися праймерами и в качестве матрицы использовали плазмидные конструкции, кодирующие тяжелую и легкую цепи рекомбинантного антитела. Получение scFv-фрагментов молекулярно-биологическими методами является достаточно простым, дешевым и эффективным способом.

Первичная структура scFv может быть выполнена в ориентации VL-линкер-VH или VH-линкер-VL, а линкер может состоять из разного количества

⁵ WHO Drug Information. WHO; 2025. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240112650>

повторов G₄S. Предпочтительная ориентация scFv зависит от аминокислотной последовательности, и в разных публикациях отмечены разные подходы [35]. В нашей работе для всех scFv была реализована ориентация VL-линкер-VH. Комбинация гибких и гидрофильных аминокислотных остатков линкеров предотвращает образование вторичных структур и снижает вероятность того, что линкеры будут препятствовать сворачиванию и функционированию белковых доменов [36]. Поскольку было неизвестно, как повлияет на активность одноцепочечных антител длина линкера между доменами, для одной из конструкций (scFv-2/3) использовали два типа линкеров с 4 и 6 повторами G₄S. Эксперименты показали, что длина линкера не влияет на продукцию клетками scFv-фрагментов антитела 2/3 и их функциональные свойства. Сигналы взаимодействия очищенных scFv-2/3-4 и scFv-2/3-6 со специфическим антигеном статистически значимо не отличались.

К недостаткам некоторых рекомбинантных антител относятся низкая стабильность, а также сложность их наработки и очистки [37, 38]. В частности, получение и очистка используемого нами в качестве исходного антитела полноразмерного иммуноглобулина Fl6 были крайне трудоемкими [12, 13]. Нейтрализующая активность полученного нами scFv-Fl6-4 была сопоставима с активностью IgG-Fl6, но получение и очистка scFv были менее трудоемкими.

Наряду с дизайном первичной аминокислотной последовательности было проведено молекулярное моделирование для предсказания 3D-структуры разработанных нами молекул. Известно, что переменные домены иммуноглобулина состоят из β -тяжей, которые соединяются между собой стабилизирующей дисульфидной связью [26]. По данным моделирования, наиболее вероятная структура укладки переменных участков тяжелой и легкой цепей в разработанных нами scFv-фрагментах представляет собой антипараллельные β -нити, что в целом сходно с переменным фрагментом полноразмерного иммуноглобулина.

Таким образом, мы выполнили дизайн и описали подходы к получению scFv-фрагментов антител, обладающих широкой нейтрализующей активностью в отношении HA ВГА и высокой специфичностью к NP ВГВ (не являются нейтрализующими). Описана динамика экспрессии и характеристика очищенных scFv-фрагментов. Продemonстрировано, что полученные scFv-фрагменты специфически

связываются с заявленными антигенами (гемагглютинином ВГА и нуклеопротеином ВГВ). При этом scFv-Fl6-4 проявляет функциональную активность, сопоставимую с исходным IgG-Fl6, и дозозависимо нейтрализует ВГА в экспериментах *in vitro*.

Применение scFv-фрагментов для профилактики и лечения ОРВИ представляет особый интерес благодаря ряду преимуществ. Малый размер scFv-фрагментов способствует их эффективному проникновению через слизистые оболочки при интраназальном введении. Это приводит к формированию не только местного иммунного барьера в носоглотке, но и оказывает системный противовирусный эффект, предотвращающий распространение возбудителя по организму. Низкая иммуногенность и короткий период полувыведения снижают риск нежелательных иммунных реакций, что особенно важно для экстренной профилактики и своевременной терапии ОРВИ. В будущем данная стратегия может быть значительно усилена за счет создания биспецифических scFv-фрагментов. Такие конструкции, нацеленные на два эпитопа одновременно, могут обеспечить беспрецедентную эффективность блокирования вируса и преодолеть ограничения моноспецифических антител.

ВЫВОДЫ

1. На основе рекомбинантных антител, специфичных к вирусу гриппа А и В, осуществлен дизайн и предсказана пространственная структура scFv-фрагментов.
2. Получены три генетические конструкции для экспрессии белков scFv в культуре эукариотических клеток.
3. scFv-фрагменты наработаны и очищены методом аффинной хроматографии с никелевым сорбентом в количестве не менее 0,5 мг и концентрации около 1 мг/мл каждого.
4. Методом электрофореза белков в ПААГ подтверждено соответствие выделенных scFv-фрагментов ожидаемому значению молекулярной массы (~28 кДа).
5. Методом ИФА показано специфическое связывание scFv-фрагментов с различными штаммами вируса гриппа А и В.
6. Установлено, что 50% вируснейтрализующая доза scFv-фрагмента антитела к поверхностному гемагглюнину вируса гриппа (170 нг/мл) сопоставима с 50% вируснейтрализующей дозой исходного полноразмерного антитела (179 нг/мл).

Литература/References

1. Batool S, Chokkakula S, Song MS, et al. Influenza treatment: Limitations of antiviral therapy and advantages of drug combination therapy. *Microorganisms*. 2023;11(1):183. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11010183>
2. Baumgarth N, Carroll MC, Gonzalez S. Antibody-mediated immunity. In: Webster RG, Monto AS, Braciale TJ, eds. *Textbook of influenza*. 2nd ed. J. Wiley & Sons; 2013. P. 283–97. <https://doi.org/10.1002/9781118636817.ch18>
3. Biswas M, Yamazaki T, Chiba J, et al. Broadly neutralizing antibodies for influenza: passive immunotherapy and intranasal vaccination. *Vaccines*. 2020;8(3):424. <https://doi.org/10.3390/vaccines8030424>
4. Bates A, Power CA. David vs. Goliath: The structure, function, and clinical prospects of antibody fragments. *Antibodies*. 2019;8(2):28. <https://doi.org/10.3390/antib8020028>
5. Ahmad ZA, Yeap SK, Ali AM, et al. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol*. 2012;2012:980250. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>
6. Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, Plueckthun A. A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv fragments. *Biochemistry*. 1990;29(6):1362–7. <https://doi.org/10.1021/bi00458a002>
7. Tiller KE, Tessier PM. Advances in antibody design. *Annu Rev Biomed Eng*. 2015;17:191–216. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071114-040733>
8. Potter KN, Li Y, Pascual V, et al. Staphylococcal protein: A binding to VH3 encoded immunoglobulins. *Int Rev Immunol*. 1997;14(4):291–308. <https://doi.org/10.3109/08830189709116521>
9. Helfrich W, Haisma H, Magdolen V, et al. A rapid and versatile method for harnessing scFv antibody fragments with various biological effector functions. *J Immunol Methods*. 2000;237(1–2):131–45. [https://doi.org/10.1016/S0022-1759\(99\)00220-3](https://doi.org/10.1016/S0022-1759(99)00220-3)
10. Urushibata Y, Itoh K, Ohshima M, Seto Y. Generation of Fab fragment-like molecular recognition proteins against staphylococcal enterotoxin B by phage display technology. *Clin Vaccine Immunol*. 2010;17(11):1708–17. <https://doi.org/10.1128/CVI.00229-10>
11. Corti D, Voss J, Gamblin SJ, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*. 2011;333(6044):850–6. <https://doi.org/10.1126/science.1205669>
12. Aliev TK, Dement'yeva IG, Toropova VA, et al. Development and properties of recombinant proteins based on the broadly neutralizing antibody to influenza A virus. *Moscow Univ Biol Sci Bull*. 2016;71(2):87–92. <https://doi.org/10.3103/S0096392516020012>
13. Argentova VV, Aliev TK, Toropova VA, et al. Studies on the influence of different designs of eukaryotic vectors on the expression of recombinant IgA. *Moscow Univ Biol Sci Bull*. 2017;72(2):63–8. <https://doi.org/10.3103/S0096392517020018>
14. Zhang P, Vemula SV, Zhao J, et al. A highly sensitive europium nanoparticle-based immunoassay for detection of influenza A/B virus antigen in clinical specimens. *J Clin Microbiol*. 2014;52(12):4385–7. <https://doi.org/10.1128/JCM.02635-14>
15. Hilgarth RS, Lanigan TM. Optimization of overlap extension PCR for efficient transgene construction. *MethodsX*. 2020;7:100759. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2019.12.001>
16. Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*. 1990;96(1):23–8. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-P](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-P)
17. Abramson J, Adler J, Dunger J, et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. *Nature*. 2024;630(8016):493–500. <https://doi.org/10.1038/s41586-024-07487-w>
18. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–5. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
19. Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*. 2004;25(9):1327–33. <https://doi.org/10.1002/elps.200305844>
20. Killian ML. Hemagglutination assay for influenza virus. In: Spackman E, ed. *Animal influenza virus*. NY: Springer; 2014. P. 3–9. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0758-8_1
21. Haryadi R, Ho S, Kok YJ, et al. Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116878. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116878>
22. Myhrinder G. *Optimizing signal peptides for expression of recombinant antibodies in HEK293 cells*. Linköpings universitet; 2020.
23. Bryksin A, Matsumura I. Overlap extension PCR cloning. In: Polizzi K, Kontoravdi C, eds. *Synthetic biology*. Totowa, NJ: Humana Press; 2013. P. 31–42. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-625-2_4
24. Burmester J, Plückthun A. Construction of scFv fragments from hybridoma or spleen cells by PCR assembly. In: Kontermann R, Dübel S, eds. *Antibody engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2001. P. 19–40. https://doi.org/10.1007/978-3-662-04605-0_2
25. Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583–9. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
26. de Sousa-Pereira P, Woof JM. IgA: structure, function, and developability. *Antibodies (Basel)*. 2019;8(4):57. <https://doi.org/10.3390/antib8040057>
27. Kallewaard NL, Corti D, Collins PJ, et al. Structure and function analysis of an antibody recognizing all influenza A subtypes. *Cell*. 2016;166(3):596–608. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.073>
28. Morgan SB, Holzer B, Hemmink JD, et al. Therapeutic administration of broadly neutralizing F16 antibody reveals lack of interaction between human IgG1 and pig Fc receptors. *Front Immunol*. 2018;9:865. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00865>
29. Argentova VV, Aliev TK, Zarubaev VV, et al. *In vitro* antiviral activity of recombinant antibodies of IgG and IgA isotypes to hemagglutinin of the influenza A virus. *Mol Biol*. 2017;51(6):804–12. <https://doi.org/10.1134/S0026893317060024>
30. Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, et al. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Suppl_1):D154–9. <https://doi.org/10.1093/nar/gki070>
31. Li Y, Huo S, Yin Z, et al. Retracted and republished from: “The current state of research on influenza antiviral drug development: drugs in clinical trial and licensed drugs”. *mBio*. 2024;15(5):e0017524. <https://doi.org/10.1128/mbio.00175-24>
32. Tsumoto K, Isozaki Y, Yagami H, Tomita M. Future perspectives of therapeutic monoclonal antibodies. *Immunotherapy*. 2019;11(2):119–27. <https://doi.org/10.2217/imt-2018-0130>
33. Harkins K. Antibody purification methods. In: Howard GC, Bethell DR, eds. *Basic methods in antibody production and characterization*. Boca Raton: CRC Press; 2000. P. 141–68. <https://doi.org/10.1201/9781420036534.ch11>
34. Lu RM, Hwang YC, Liu JJ, et al. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *J Biomed Sci*. 2020;27(1):1. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0592-z>
35. Sandomenico A, Sivaccumar JP, Ruvo M. Evolution of *Escherichia coli* expression system in producing antibody

- recombinant fragments. *Int J Mol Sci.* 2020;21(17):6324. <https://doi.org/10.3390/ijms21176324>
36. van Rosmalen M, Krom M, Merkx M. Tuning the flexibility of glycine-serine linkers to allow rational design of multi-domain proteins. *Biochemistry.* 2017;56(50):6565–74. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b00902>
37. Ewert S, Honegger A, Plückthun A. Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods.* 2004;34(2):184–99. <https://doi.org/10.1016/j.jymeth.2004.04.007>
38. Wörn A, Plückthun A. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol.* 2001;305(5):989–1010. <https://doi.org/10.1006/jmbi.2000.4265>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **М.А. Плотникова** — подготовка и проведение экспериментов, обработка и анализ данных, визуализация, написание и редактирование текста рукописи; **В.А. Топорова** — получение генно-инженерных конструкций, концептуализация, редактирование текста рукописи; **Е.А. Романовская-Романько** — подготовка и проведение экспериментов, обработка и анализ данных, визуализация; **А.А. Шалджян** — проведение хроматографической очистки, визуализация; **С.А. Клотченко** — концептуализация, общее руководство проектом, привлечение финансирования, рецензирование и редактирование текста рукописи, утверждение окончательной версии статьи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **M.A. Plotnikova** prepared and conducted the experiments, processed and analysed the data, visualised, drafted, and edited the manuscript. **V.A. Toporova** obtained gene-engineered constructs, conceptualised, and edited the manuscript. **E.A. Romanovskaya-Romanko** prepared and executed the experiments, processed, analysed, and visualised data. **A.A. Shaldzhyan**, performed chromatographic purification and visualisation. **S.A. Klotchenko** conceptualised, supervised the overall project, fundraised, reviewed and edited the manuscript, and approved the final version for publication.

Об авторах / Authors

Плотникова Марина Александровна, канд. биол. наук / **Marina A. Plotnikova**, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8196-3156>

Топорова Виктория Александровна / **Viktoriya A. Toporova**
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7450-7096>

Романовская-Романько Екатерина Андреевна, канд. биол. наук / **Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko**, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-7560-398X>

Шалджян Арам Арутюнович / **Aram A. Shaldzhyan**
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8646-6252>

Клотченко Сергей Анатольевич, канд. биол. наук / **Sergey A. Klotchenko**, Cand. Sci. (Biol.)
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0289-6560>

Поступила 21.09.2025

После доработки 08.11.2025

Принята к публикации 12.12.2025

Online first 26.12.2025

Received 21 September 2025

Revised 8 November 2025

Accepted 12 December 2025

Online first 26 December 2025