

УДК 60

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-3-240-257>

EDN JHCZWL



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Разработка технологии культивирования клеточной линии, продуцирующей однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека

Д.М. Полянский^{1,2,*}, Е.И. Рябова^{1,3}, А.А. Деркаев¹, Н.С. Старков¹, И.С. Кашапова¹,
Д.В. Щепляков¹, А.П. Карпов¹, И.Б. Есмагамбетов¹

¹ Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, Министерство Здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

² МИРЭА — Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

³ Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии — МВА им. К.И. Скрябина, Москва, 109472 Россия

* Автор для переписки, e-mail: polanskiydmity15@gmail.com

Аннотация

Цели. Разработать эффективную технологию культивирования клеток яичников китайского хомячка (CHO), стабильно продуцирующих антитело GamP2C5, которое является компонентом I кандидатного препарата ГамКовиМаб для экстренной профилактики и терапии инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2; подобрать оптимальные параметры культивирования и масштабировать данную технологию на производстве.

Методы. Исследование проводилось на культуре клеток CHO GamP2C5 (клон 78), продуцирующей однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека GamP2C5; были использованы различные среды для культивирования и питательные добавки. Культивирование клеток проходило в колбах Эрленмейера, биореакторе с волновым типом перемешивания Biostat[®] RM 20 basic, минибиореакторах Ambr[®] 250, биореакторе с осевым типом перемешивания STR 200.

Результаты. При помощи молекулярно-генетических и биотехнологических методов был получен стабильный клон-продуцент антитела CHO GamP2C5 (клон 78), и отработана методика культивирования полученного клона-продуцента на различных питательных средах. Были выбраны наиболее подходящие режимы культивирования, питательная среда и оптимальные подпитки. Данная технология была отработана в лабораторных условиях в 10-литровом реакторе и успешно масштабирована на производстве в филиале «Медгамал» Национального исследовательского центра эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи.

Выводы. В данном исследовании показана принципиальная возможность разработки и масштабирования технологии культивирования для получения препарата на основе модифицированного однодоменного антитела с вируснейтрализующей активностью против различных штаммов вируса SARS-CoV-2.

Ключевые слова

моноклональные антитела, однодоменные антитела, тяжелоцепочечные антитела, культивирование, клетки CHO, масштабирование биопроцесса

Поступила: 12.12.2023
Доработана: 08.02.2024
Принята в печать: 17.04.2024

Для цитирования

Полянский Д.М., Рябова Е.И., Деркаев А.А., Старков Н.С., Кашапова И.С., Щебляков Д.В., Карпов А.П., Есмагамбетов И.Б. Разработка технологии культивирования клеточной линии, продуцирующей однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека. *Тонкие химические технологии*. 2024;19(3):240–257. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-3-240-257>

RESEARCH ARTICLE

Development of technology for culturing a cell line producing a single-domain antibody fused with the Fc fragment of human IgG1

Dmitry S. Polyansky^{1,2,✉}, Ekaterina I. Ryabova^{1,3}, Artem A. Derkaev¹, Nikita S. Starkov¹, Irina S. Kashapova¹, Dmitry V. Shcheblyakov¹, Andrey P. Karpov¹, Ilias B. Esmagambetov¹

¹ N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

² MIREA — Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

³ Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology — K.I. Skryabin MVA, Moscow, 109472 Russia

✉ Corresponding author; e-mail: polanskiydm15@gmail.com

Abstract

Objectives. To develop an effective technology for the cultivation of Chinese hamster ovary (CHO) cells stably producing GamP2C5 antibody which is a component I of the GamCoviMab candidate drug for emergency prevention and therapy of infection caused by SARS-CoV-2 virus; to select optimal cultivation parameters and to scale this technology in production.

Methods. The study was performed on CHO GamP2C5 (clone 78) cell culture, producing a single-domain antibody fused to the Fc fragment of human IgG1 GamP2C5. Different culture media and supplements were used. Cells were cultured in Erlenmeyer flasks, Biostat[®] RM 20 wave-mixed bioreactor, Ambr[®] 250 mini bioreactors, STR 200 stirred-tank bioreactor.

Results. Using molecular-genetic and biotechnological methods, a stable clone producer of CHO GamP2C5 antibody, clone 78, was obtained. Then a technique was worked out for the cultivation of the obtained clone producer on different culture media. The most suitable cultivation regimes, culture media, and optimal supplements were selected. This technology was tested in laboratory conditions in a 10-L reactor, and then successfully scaled up for production at the *MedGamal* Branch of the Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology.

Conclusions. This study demonstrates the fundamental feasibility of developing and scaling up a culture technology, in order to produce a drug based on a modified single-domain antibody with virus neutralizing activity against different strains of SARS-CoV-2 virus.

Keywords

monoclonal antibodies, single-domain antibodies, heavy chain antibodies, cultivation, CHO cells, bioprocess scaling

Submitted: 12.12.2023

Revised: 08.02.2024

Accepted: 17.04.2024

For citation

Polyansky D.S., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Starkov N.S., Kashapova I.S., Shcheblyakov D.V., Karpov A.P., Esmagambetov I.B. Development of technology for culturing a cell line producing a single-domain antibody fused with the Fc fragment of human IgG1. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2024;19(3):240–257. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-3-240-257>

ВВЕДЕНИЕ

В середине 1970-х гг. после разработки гибридомной технологии моноклональные антитела [1] стали исследоваться в качестве потенциальных средств терапии различных заболеваний [2]. За последнее десятилетие было разработано несколько десятков препаратов на основе антител (Адалимумаб, Пембролизумаб, Ниволумаб), некоторые из которых находятся на вершине рейтинга самых продаваемых лекарственных средств по всему миру [3]. Моноклональные антитела применяются для лечения широкого спектра человеческих заболеваний, в том числе различных видов онкозаболеваний [4]. Кроме того, терапевтические антитела эффективны для терапии рассеянного склероза [5], болезни Крона [6], ревматоидного артрита [7], а также бактериальных и вирусных инфекций [8].

Пандемия COVID-19 оказала огромное влияние на мобилизацию усилий вокруг получения лекарственных препаратов и вакцин и развитие стратегий по борьбе с инфекционными заболеваниями. Моноклональные антитела представляют собой самый большой и быстрорастущий класс фармацевтических соединений, которые показали терапевтический потенциал в лечении вирусных инфекций, в том числе против вируса SARS-CoV-2.

За последние годы количество препаратов на основе моноклональных антител против вирусных инфекций, особенно против хронических [9], заметно возросло. Моноклональные антитела могут быть использованы для подавления распространения инфекции посредством прямой вируснейтрализующей активности [10]. На сегодняшний день одобрено несколько противовирусных препаратов, имеющих высокую эффективность. Среди них препарат Касиривимаб/имдевимаб (REGEN-COV) — первый лекарственный препарат на основе моноклональных антител, который может применяться как для лечения, так и для экстренной профилактики COVID-19 [11].

Одним из частных случаев моноклональных антител являются тяжелоцепочечные антитела семейства верблюдовых, которые лишены легких цепей, а переменные фрагменты представлены одним доменом тяжелой цепи. Кроме того, переменные фрагменты тяжелой цепи могут применяться самостоятельно. Такие модификации носят название «nanobodies», или однодоменные антитела, или VHH [12].

Однодоменные антитела представляют собой относительно новый класс препаратов, которые обнаружили случайно во время анализа верблюжьей сыворотки. Благодаря своей структуре и свойствам

наноантитела способны эффективно связываться с труднодоступными для классических антител эпитопами антигенов, предотвращать взаимодействие рецепторов с лигандами или же доставлять к целевым клеткам вещества, выполняющие различные функции. В то же время, недостатки наноантител связаны с их быстрым выведением почками и отсутствием самостоятельной эффекторной функции вследствие отсутствия Fc-фрагмента. Существует множество работ, демонстрирующих успешное применение однодоменных антител и их модификаций для терапии и профилактики различных инфекционных заболеваний вирусной и невирусной этиологии [13–18]. Для улучшения фармакокинетических и эффекторных свойств наноантител, а также для увеличения их avidности за счет димеризации молекулы, применяется модификация Fc-фрагментом IgG человека [13, 15, 17].

В Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства Здравоохранения Российской Федерации (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России) получено однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина класса G1, обладающее широким спектром вируснейтрализующей активности в отношении вируса SARS-CoV-2 и являющееся компонентом I кандидатного препарата ГамКовиМаб для терапии инфекции COVID-19. Для производства данного препарата предстояла разработка масштабируемой технологии культивирования клеток и хроматографической очистки целевого антитела. В данной статье описаны полученные нами результаты по разработке стратегии подбора оптимальных параметров для процессов культивирования для производства однодоменного антитела, слитого с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина класса G. Также представлены данные по масштабированию в лабораторных условиях в 10 л реакторе и масштабированию на GMP производстве в биореакторе с осевым типом перемешивания с рабочим объемом 200 л.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Культура клеток яичников китайского хомячка (Chinese hamster ovary (CHO) cells) GamP2C5 (клон 78), продуцирующая однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека GamP2C5 получена в лаборатории иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России на основе клеток CHO-K1 (Коллекция культур и тканей НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России).

Среды для культивирования: ActiPro™ (Cytiva, США), Fujifilm BalanCD® CHO Growth A (Irvine Scientific, США), Cosmos (Flora Bio, Турция), SFM4CHO (Cytiva, США), Dynamis™ AGT™ (Thermo Fisher Scientific, США), Capricorn (Capricorn Scientific, Германия).

Питательные добавки: Cell Boost 6 Supplement (Cytiva, США), Cell Boost 5 Supplement (Cytiva, США), Cell Boost 7 A (Cytiva, США), Cell Boost 7 B (Cytiva, США), Cosmos Flora Bio Feed A (Flora Bio, Турция), Cosmos Flora Bio Feed B (Flora Bio, Турция), Capricorn's CHO Feed 1 (Capricorn Scientific, Германия), Capricorn's CHO Feed 2 (Capricorn Scientific, Германия). Биосенсоры «Protein A (ProA) Biosensors» (Forte Biosciences, США).

Емкости для культивирования: колбы Эрленмейера объемом 250 мл (Corning, США), одноразовые минибиореакторы для системы Ambr® 250 Disposable bioreactors (Sartorius, Германия), одноразовые культуральные мешки: Flexsafe® RM 20 opt (Sartorius, Германия), Flexsafe® STR 200 (Sartorius, Германия).

Оборудование

Автоматический счетчик клеток TC20 Cell Counter (Bio-Rad, США), шейкер-инкубатор Celltron (Infors HT, Швейцария), биореактор с волновым типом перемешивания Biostat® RM 20 basic (Sartorius, Германия), минибиореактор Ambr® 250 (Sartorius, Германия), биореактор с осевым типом перемешивания STR 200 (Sartorius, Германия), биоанализатор Cedex® Bio Analyzer (Roche, Швейцария), pH-метр Seven Compact S210 (METTLER TOLEDO, США), анализатор молекулярных взаимодействий Octet® RED 96 (Forte Biosciences, США).

Методы

Измерение клеточной плотности

Производили отбор 20 мкл суспензионной культуры клеток CHO. Смешивали полученную клеточную суспензию с раствором трипанового синего (кислый анилиновый краситель, применяемый при подсчете числа погибших клеток в суспензии, которые, в отличие от живых, окрашиваются в синий цвет) в соотношении 1 : 1. Общий объем окрашенной суспензии должен быть не менее 30 мкл для наполнения двух камер слайда. Перемещали окрашенную суспензию пипетированием. Набирали автоматической пипеткой 10 мкл окрашенной суспензии и, держа пипетку под углом 45°, плавно вносили суспензию в каждую из камер слайда. Слайды, полностью заполненные окрашенными клетками,

перемещались в автоматический счетчик клеток TC20 Cell Counter для измерения клеточной плотности.

Измерение концентрации антител

Количество антител в образцах определяли методом биослойной интерферометрии (BLI) с использованием системы Octet® RED96e (Forte Biosciences, США) и биосенсоров с иммобилизованным белком А (Forte Biosciences, США), согласно протоколу фирмы производителя. В качестве стандартных образцов с известными концентрациями использовали растворы антител GamP2C5, полученные ранее при помощи стабильной трансфекции и очищенные методом аффинной хроматографии на сорбенте Mabselect SuRe™ (Cytiva, США), как ранее описано [13, 15, 17].

Измерение остаточных метаболитов

Концентрацию основных нутриентов (глюкозы, глутамина и глутамата) и метаболитов (лактата и аммония) в образцах определяли при помощи биоанализатора Cedex® Bio Analyzer (Roche, Швейцария) согласно протоколу фирмы производителя.

Культивирование клеток

Клетки культивировали в колбах Эрленмейера, а также в биореакторах с волновым и осевым типом перемешивания. Для подбора оптимальных условий использовались питательные среды в комбинации с питательными добавками (табл. 1).

Культивирование клеток в колбах Эрленмейера

Суспензионную культуру клеток CHO GamP2C5 (клон 78) вели в колбах Эрленмейера с вентилируемой крышкой объемами 250 мл; начальный объем клеточной суспензии 30 мл; исходная концентрация 0.3 млн/мл. Начиная с третьего дня культивирования вносили питательные добавки в объеме, рекомендованном производителем. Культивирование проводили при 37°C, 80% влажности и 5% CO₂, со скоростью перемешивания платформы 110–130 об/мин при амплитуде 25 мм, глюкозу поддерживали на уровне 4.5–5.0 г/л. При необходимости поддерживали pH на уровне 6.9–7.4 с помощью 7.5% раствора бикарбоната натрия (Labochem International, Германия).

Культивирование клеток в волновом биореакторе Biostat® RM 20

Культивирование суспензии вели на биореакторе с волновым типом перемешивания с рабочим объемом до 10 л (табл. 2).

Таблица 1. План эксперимента**Table 1.** Plan of experiment

Номер эксперимента Experiment number	Питательная среда Media	Питательная добавка Supplement	Емкости и оборудование Containers and equipment	Объем, л Volume, L
1	SFM4CHO	Cell Boost 6	Колбы Эрленмейера Erlenmeyer flasks	0.25
2	ActiPro™	Cell Boost 7A	Колбы Эрленмейера Erlenmeyer flasks	0.25
			Биореактор Biostat® RM 20 Biostat® RM 20 bioreactor	10
			Минибиореактор Ambr® 250 Ambr® 250 mini bioreactor	0.20
			Биореактор STR 200 Bioreactor STR 200	200
3	BalanCD®	Cell Boost 7A	Колбы Эрленмейера Erlenmeyer flasks	0.25
		Cell Boost 7B	Биореактор Biostat® RM 20 Biostat® RM 20 bioreactor	10
4	Cosmos	Feed A	Биореактор Biostat® RM 20 Biostat® RM 20 bioreactor	0.25
		Feed B	Колбы Эрленмейера Erlenmeyer flasks	10
5	Capricorn	Feed 1	Колбы Эрленмейера Erlenmeyer flasks	0.25
		Feed 2	Биореактор Biostat® M 20 Biostat® RM 20 bioreactor	
6	Dynamis™ AGT™	Cell Boost 7A	Колбы Эрленмейера Erlenmeyer flasks	0.25
		Cell Boost 7B		

Таблица 2. Параметры процесса культивирования в волновом биореакторе RM 20**Table 2.** Parameters of the cultivation process in the Biostat® RM 20 wave-mixed bioreactor

Параметр Parameter	Значение Value
Температура Temperature	37.0 ± 1.0°C
Растворенный кислород, % Dissolved oxygen, %	Не ниже 40 No lower than 40
pH	6.8–7.5
Концентрация CO ₂ в газовой фазе, % CO ₂ concentration in the gas phase, %	5.0 ± 2.0
Угол наклона платформы, ° Platform tilt angle, °	6–10
Частота качания платформы, кач/мин Platform swing frequency, swing/min	14–30
Объемный расход газовой смеси, л/мин Volumetric flow rate of gas mixture, L/min	0.2–0.8

Начальные рабочие объемы составляли 25–30% от конечного объема, минимальная концентрация 0.3 млн/мл. На третий день культивирования разбавляли инокулят свежей питательной средой до 65–70% от конечного объема. Начиная с пятого дня культивирования вносилась питательная добавка в концентрации согласно инструкции производителя. Кроме того, регулировали pH (6.8–7.5), добавляя при необходимости бикарбонат натрия (*Labochem International*, Германия). Концентрация глюкозы поддерживалась на уровне 4.5–5.0 г/л, поэтому при необходимости использовали раствор глюкозы (*Merck*, США). Для получения максимального содержания целевого продукта применяли изменение температурного параметра и pH в момент стационарной фазы культивирования клеток (табл. 3).

Таблица 3. Параметры процесса культивирования в зависимости от эксперимента в волновом биореакторе RM 20

Table 3. Parameters of the cultivation process depending on the experiment in the Biostat® RM 20 wave-mixed bioreactor

Параметр Parameter	Эксперимент Experiment		
	1	2	3
Температура, °C Temperature, °C	37.0	33.0	37.0
Растворенный кислород, % Dissolved oxygen, %	40	40	40
pH	7.2	7.2	6.8
Концентрация CO ₂ в газовой фазе, % CO ₂ concentration in the gas phase, %	5.0	5.0	5.0
Угол наклона платформы, ° Platform tilt angle, °	7	7	7
Частота качания платформы, кач/мин Platform swing frequency, swing/min	15	15	15
Объемный расход газовой смеси, л/мин Volumetric flow rate of gas mixture, L/min	0.5	0.5	0.5

Культивирование клеток в минибиореакторах Ambr® 250

Культивирование суспензии вели в минибиореакторах с осевым типом перемешивания с рабочим объемом до 250 мл. Начальные рабочие объемы составляли 25–30% от конечного объема, минимальная концентрация 0.6 млн/мл. На третий день культивирования разбавляли инокулят свежей питательной

средой до 65–70% от конечного объема. Начиная с пятого дня культивирования вносилась питательная добавка в концентрации согласно инструкции производителя. Поддерживали pH (6.8–7.5), добавляя при необходимости бикарбонат натрия (*Labochem International*, Германия). Концентрация глюкозы поддерживалась на уровне 4.5–5.0 г/л, поэтому при необходимости использовали раствор глюкозы (*Merck*, США). Для получения максимального содержания целевого белка применяли изменение температурного параметра и pH в ходе культивирования (табл. 4).

Таблица 4. Параметры процесса культивирования в зависимости от эксперимента в минибиореакторе Ambr® 250

Table 4. Parameters of the cultivation process depending on the experiment in the Ambr® 250 mini bioreactor

Параметр Parameter	Эксперимент Experiment		
	1	2	3
Температура, °C Temperature, °C	37.0	33.0	37.0
Растворенный кислород, % Dissolved oxygen, %	40	40	40
pH	7.2	7.2	6.8
Концентрация CO ₂ в газовой фазе, % CO ₂ concentration in the gas phase, %	7.0	7.0	7.0
Обороты, об/мин Stirrer, rpm	300–500	300–500	300–500
Верхняя подача воздуха, мл/мин Air overlay, mLpm	4	4	4
Барботаж, мл/мин Air sparger, mL/min	4	4	4
Подача кислорода, мл/мин O ₂ sparger, mLpm	0–2	0–2	0–2

Культивирование клеток в биореакторе с осевым типом перемешивания STR 200

Культивирование суспензии вели на биореакторе с осевым типом перемешивания с рабочим объемом 200 л. Начальные рабочие объемы составляли 25–30% от конечного объема, минимальная концентрация 0.5 млн/мл. На третий день культивирования разбавляли инокулят свежей питательной средой

до 65–70% от конечного объема. Начиная с пятого дня культивирования вносилась питательная добавка в концентрации согласно инструкции производителя. Поддерживали pH (6.8–7.5), добавляя при необходимости бикарбонат натрия (*Labochem International*, Германия). Концентрация глюкозы поддерживалась на уровне 4.5–5.0 г/л, поэтому при необходимости использовали раствор глюкозы (*Merck*, США). Для получения максимального содержания целевого антитела применяли изменение температурного параметра в ходе культивирования (табл. 5).

Таблица 5. Параметры процесса культивирования в биореакторе с осевым типом перемешивания STR 200

Table 5. Parameters of the cultivation process in an STR 200 stirred-tank bioreactor

Параметр Parameter	Эксперимент 1 Experiment 1
Температура, °C Temperature, °C	37.0–33.0
Растворенный кислород, % Dissolved oxygen, %	40
pH	7.2
Концентрация CO ₂ в газовой фазе, % CO ₂ concentration in the gas phase, %	5.0
Обороты, об/мин Stirrer, rpm	60–110
Верхняя подача воздуха, л/мин Air overlay, Lpm	10
Барботаж, л/мин Air sparger, L/min	10
Подача кислорода, л/мин O ₂ sparger, Lpm	0–10

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В лаборатории иммунобиотехнологии НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России при помощи иммунизации двугорбого верблюда рекомбинантным рецептор-связывающим доменом (receptor-binding domain, RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2 и технологии фагового дисплея была получена панель однодоменных антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 [19]. Из полученной панели были отобраны несколько наиболее перспективных клонов, которые впоследствии были модифицированы путем слияния с Fc-фрагментом IgG1 человека. Далее эти формы были детально исследованы

различными методами *in vitro*, в том числе прямой вируснейтрализацией на живом вирусе SARS-CoV-2. В итоге получено однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека GamP2C5 (рис. 1).

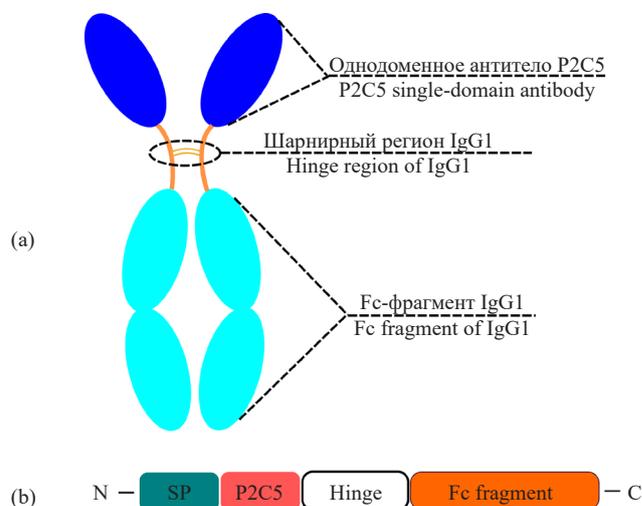


Рис. 1. (а) Схематичное изображение однодоменного антитела, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека GamP2C5; (б) структура однодоменного антитела, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека (SP — аминокислотная последовательность сигнального пептида тяжелой цепи IgG1; P2C5 — аминокислотная последовательность однодоменного антитела P2C5; Hinge — аминокислотная последовательность шарнирной области IgG1; Fc fragment — аминокислотная последовательность Fc-фрагмента IgG1)

Fig. 1. (a) Schematic representation of a single-domain antibody fused with the Fc fragment of human IgG1 GamP2C5; (b) structure of a single-domain antibody fused with the Fc fragment of human IgG1 (SP — amino acid sequence of the signal peptide of the heavy chain of IgG1; P2C5 — amino acid sequence of the P2C5 single-domain antibody; Hinge — amino acid sequence of the hinge region of IgG1; Fc fragment — amino acid sequence of the Fc fragment of IgG1)

Затем была разработана генетическая конструкция, позволяющая экспрессировать данное однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека. Сегодня большинство терапевтических антител производят в клетках млекопитающих, которые лучше всего подходят для продукции рекомбинантных антител, обладающих наибольшей степенью биологического сходства с антителами, вырабатываемыми в организме человека [20]. В данном исследовании были использованы клетки CHO. Далее с помощью методов трансфекции в клетки и нескольких раундов селекции был отобран клон, стабильно продуцирующий данное антитело. В итоге получена клеточная линия CHO GamP2C5 (клон 78), которая экспрессирует однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека GamP2C5.

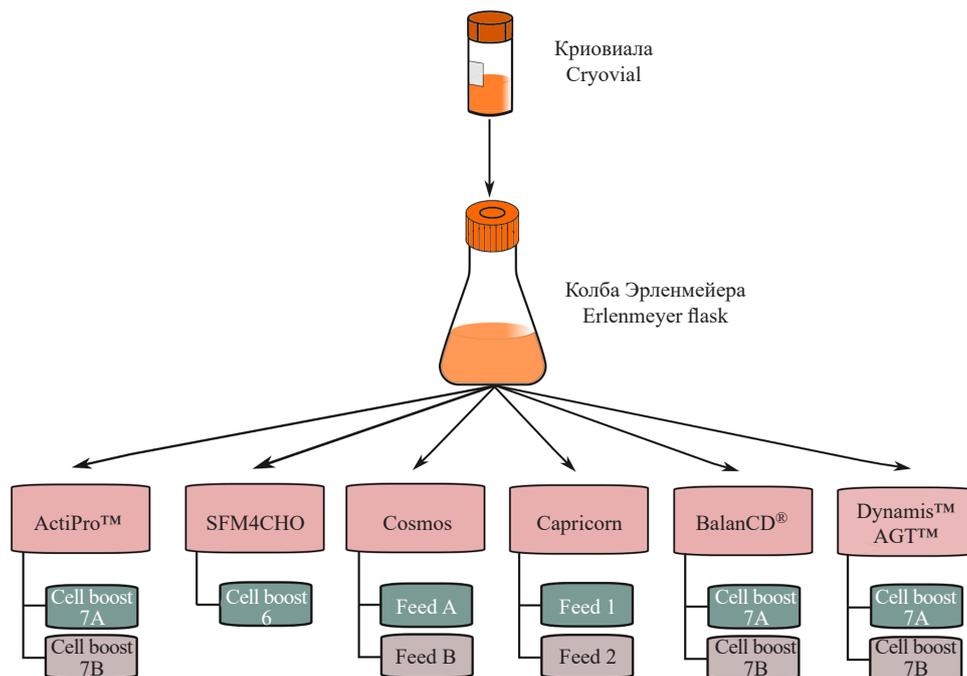


Рис. 2. Комбинация культуральных сред и подпиток при проведении разработки процесса культивирования

Fig. 2. Combination of culture media and supplement during the development of the cultivation process

Наиболее важным компонентом для разработки технологии культивирования является питательная среда, которая обеспечивает жизнеспособность и пролиферацию клеток. Состав питательной среды напрямую влияет на скорость производства и качество биофармацевтических препаратов. Поэтому исследователям, работающим с клеточными культурами, важно выбрать необходимую среду, которая подойдет для их целей [21]. Для подбора оптимальных условий культивирования, исходя из доступности и наличия, были проанализированы 6 базовых питательных сред и 7 питательных добавок (рис. 2).

Используя данные питательные среды и добавки, был проведен эксперимент в трех повторах по разработке процесса культивирования полученного клона в колбах с целью получения наибольшего содержания целевого продукта. Клетки культивировали с едиными исходными параметрами. Эксперимент

начинали с плотности клеток 0.3 млн/мл. Клетки культивировали в режиме fed-batch (способ периодического культивирования с подпиткой), с контролем уровня глюкозы и глутамина. Соотношения выживаемости и плотности культуры клеток на определенный день культивирования представлены на рис. 3.

Лидером по клеточной плотности оказалась питательная среда ActiPro™. Клетки на данной питательной среде достигли плотности 10 млн/мл. По наибольшей продолжительности культивирования наилучший результат показали питательные среды Cosmos и BalanCD®. На обеих средах культура клеток продемонстрировала высокую жизнеспособность на протяжении 15 дней. Самое большое содержание целевого антитела было зафиксировано на питательной среде ActiPro™. Содержание составило 671 мкг/мл (табл. 6).

Таблица 6. Содержание целевого антитела GamP2C5, определенное с помощью прибора Octet® RED 96

Table 6. Yield of the target antibody GamP2C5 determined using an Octet® RED 96 system

Питательная среда Culture media	SFM4CHO	ActiPro™	Cosmos	BalanCD®	Dynamis™ AGT™	Capricorn
Продуктивность, мкг/мл Product yield, µg/mL	364.8	671.0	478.0	580.0	284.0	220.0

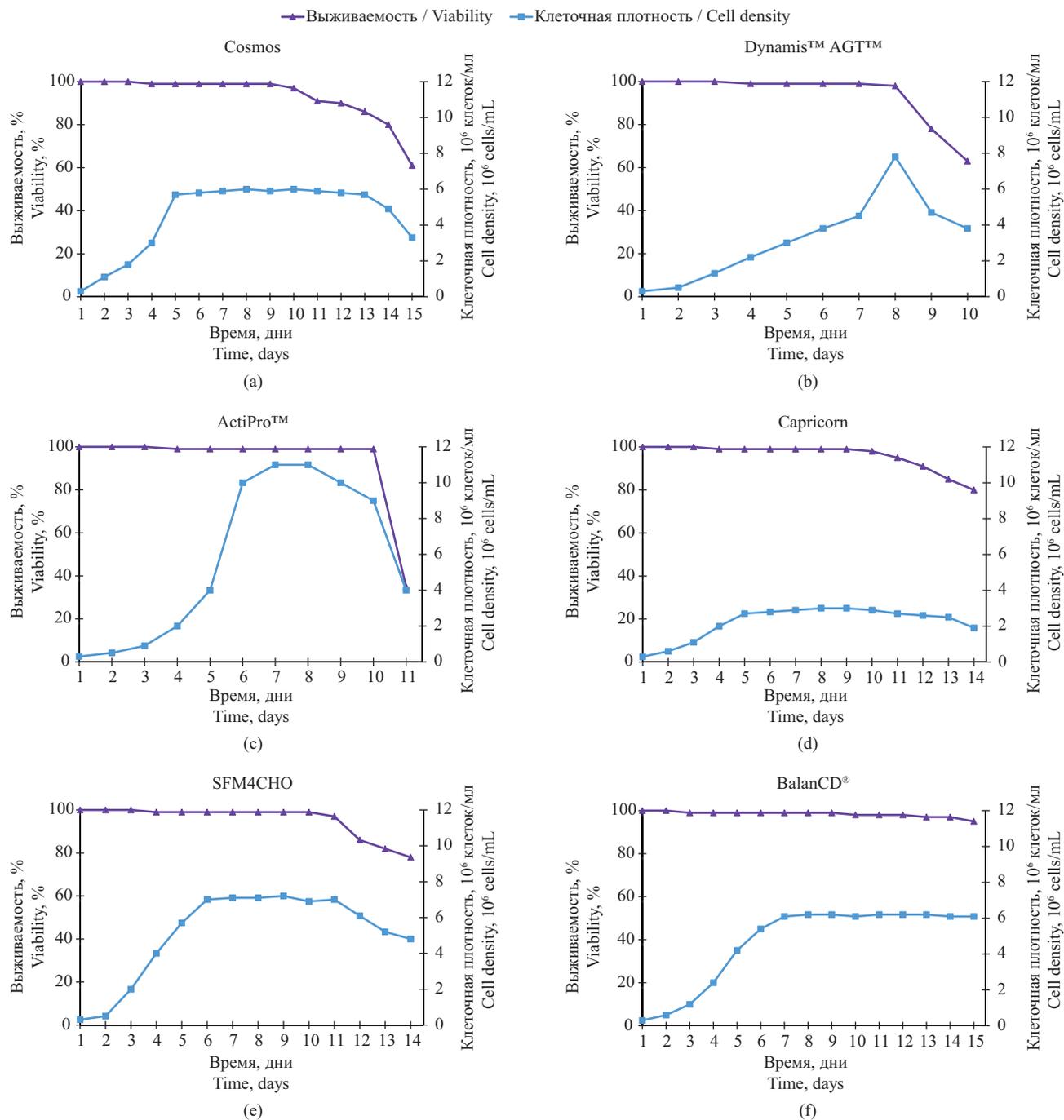


Рис. 3. Соотношение выживаемости и плотности культуры клеток CHO GamP2C5 (клон 78) в колбе Эрленмейера при культивировании на различных питательных средах: (a) Cosmos; (b) Dynamis™ AGT™; (c) ActiPro™; (d) Capricorn; (e) SFM4CHO; (f) BalanCD®

Fig. 3. The ratio of survival rate and cell culture density of CHO GamP2C5 (clone 78) in an Erlenmeyer flask when cultivated on various culture media: (a) Cosmos; (b) Dynamis™ AGT™; (c) ActiPro™; (d) Capricorn; (e) SFM4CHO; (f) BalanCD®

Исходя из графика роста клеточной суспензии на различных питательных средах и опираясь на полученные значения конечного содержания целевого белка, были выбраны три лучшие питательные среды — ActiPro™, BalanCD®, Cosmos — для разработки дальнейшего процесса культивирования в волновых биореакторах.

Для того чтобы изучить процесс культивирования полученного клона, необходимо было разработать процесс культивирования в волновых биореакторах с подбором различных условий. В данной работе были проведены эксперименты с тремя лучшими питательными средами. Эксперименты проводились в одинаковых условиях в биореакторе

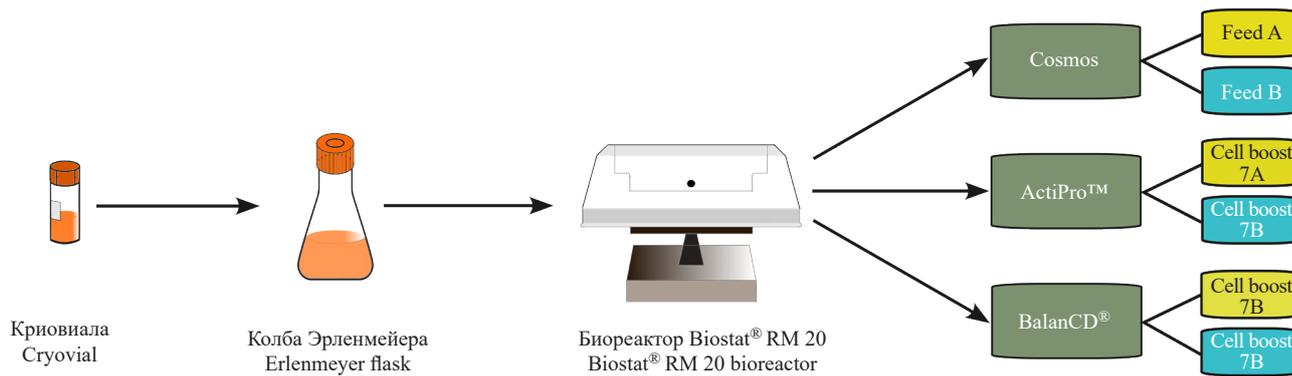


Рис. 4. Комбинации питательной среды и добавок для процесса культивирования в волновых биореакторах RM 20

Fig. 4. Combinations of culture medium and supplement for the cultivation process in Biostat® RM 20 wave bioreactors

с волновым типом перемешивания с рабочим объемом 10 л (рис. 4).

Начальная плотность клеток составляла 0.3 млн/мл. Соотношение выживаемости и плотности клеточной культуры на определенный день культивирования представлено на рис. 5.

В данном эксперименте лидером по основным показателям, таким как клеточная плотность, продолжительность культивирования, содержание целевого белка, была питательная среда ActiPro™. Клетки на данной питательной среде достигли плотности 10 млн/мл, культивировались в течение 10 дней,

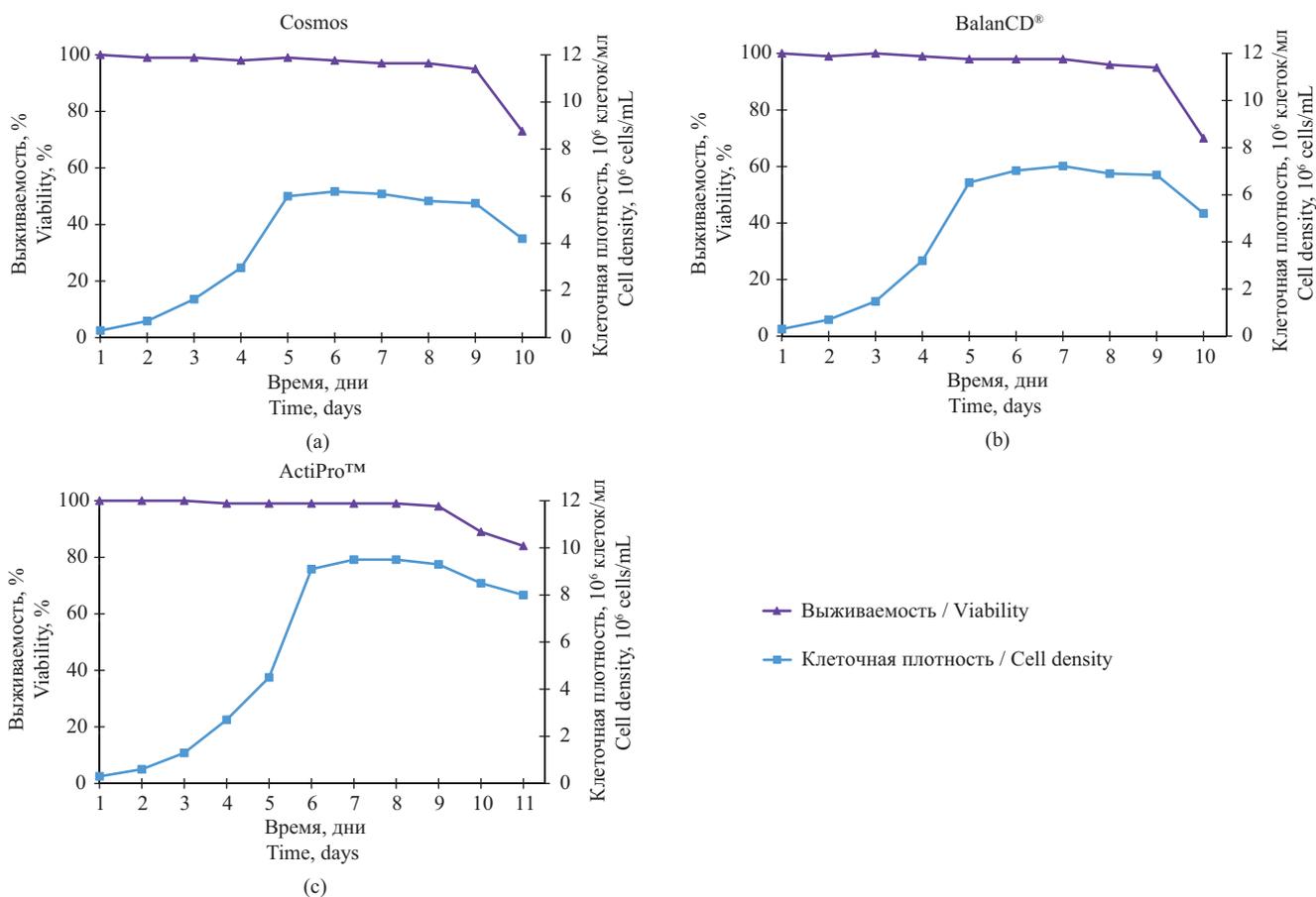


Рис. 5. Соотношение выживаемости и плотности культуры клеток CHO GamP2C5 (клон 78) в волновом биореакторе RM 20 при культивировании на различных питательных средах: (a) Cosmos; (b) BalanCD®; (c) ActiPro™

Fig. 5. The ratio of survival rate and cell culture density of CHO GamP2C5 (clone 78) in the Biostat® RM 20 wave bioreactor when cultivated on various culture media: (a) Cosmos; (b) BalanCD®; (c) ActiPro™

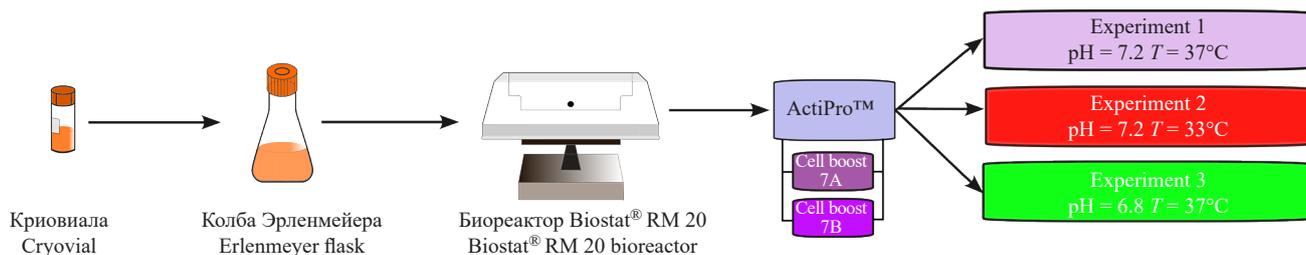


Рис. 6. Подбор оптимальных параметров для процесса культивирования в волновых биореакторах Biostat® RM 20

Fig. 6. Selection of optimal parameters for the cultivation process in Biostat® RM 20 bioreactors

содержание целевого белка составило 440 мкг/мл. Сравнение содержания целевого антитела GamP2C5 в зависимости от питательной среды описано в табл. 7.

После проведения анализа трех базовых питательных сред была выбрана среда ActiPro™, которая показала максимальный результат по продуктивности целевого продукта. Далее необходимо было подобрать оптимальные условия культивирования для дальнейшего масштабирования процесса (рис. 6).

В данном эксперименте были отработаны различные параметры культивирования в волновом биореакторе с рабочим объемом 10 л. В этой части работы сравнивали показатели продуктивности целевого белка после изменения температурного параметра и pH в ходе культивирования. Соотношение выживаемости и плотности клеточной культуры на определенный день культивирования представлены на рис. 7.

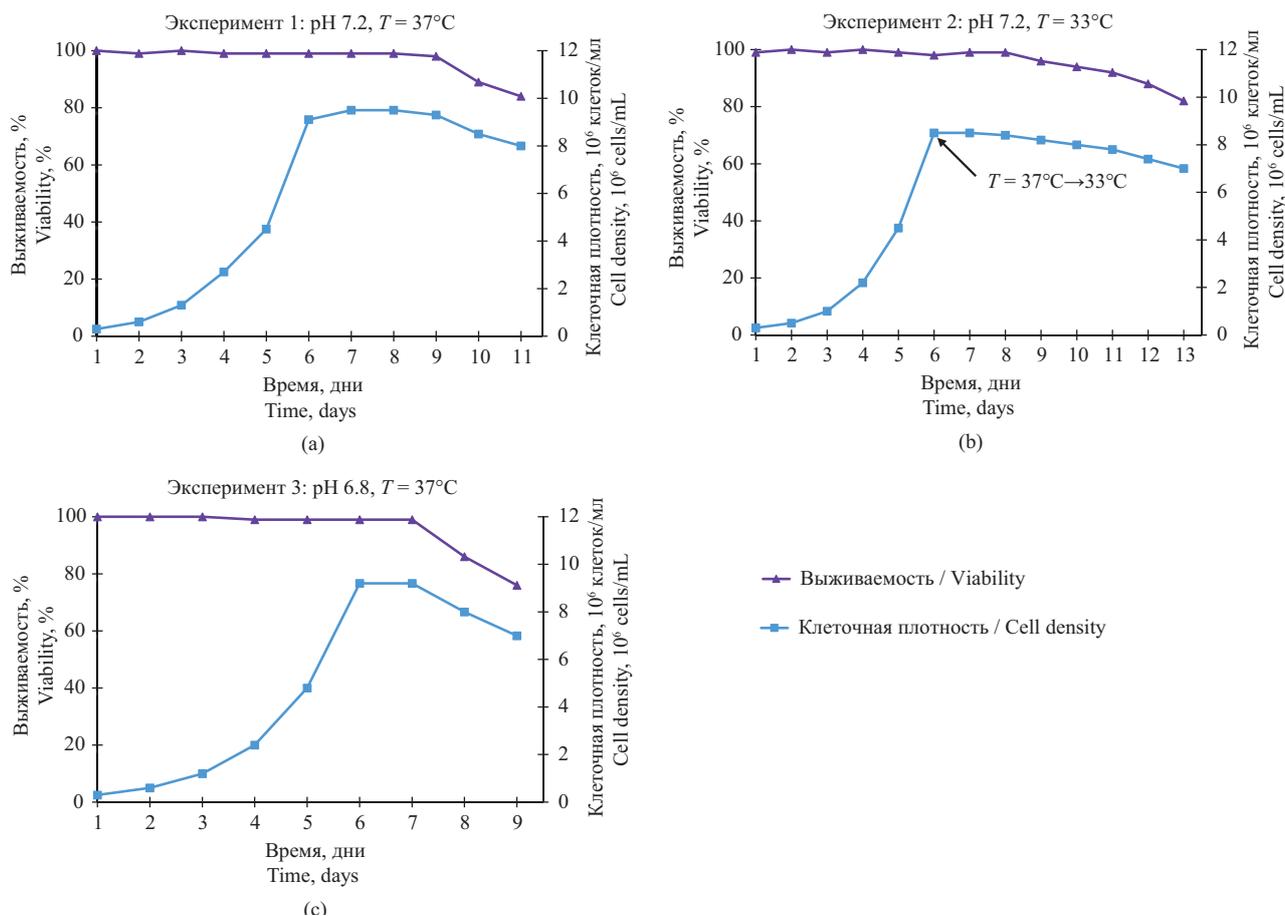


Рис. 7. Культивирование клеток CHO GamP2C5 (клон 78) при различных условиях культивирования в волновых биореакторах Biostat® RM 20: (а) эксперимент 1: pH 7.2, T = 37°C; (б) эксперимент 2: pH 7.2, T = 33°C; (с) эксперимент 3: pH 6.8, T = 37°C

Fig. 7. Cultivation of CHO GamP2C5 (clone 78) cells under various cultivation conditions in Biostat® RM 20 wave bioreactor: (a) experiment 1: pH 7.2, T = 37°C; (b) experiment 2: pH 7.2, T = 33°C; (c) experiment 3: pH 6.8, T = 37°C

Таблица 7. Содержание антитела GamP2C5, определенное с помощью прибора Octet® RED 96

Table 7. Yield of the target antibody GamP2C5 determined using an Octet® RED 96 system

Питательная среда Culture media	ActiPro™	Cosmos	BalanCD®
Продуктивность, мкг/мл Product yield, µg/mL	440	250	325

При понижении температуры до 33°C время культивирования увеличилось, но содержание целевого белка оказалось меньше, чем при температуре 37°C. Культивирование клеток при pH 6.8 показало меньший результат по содержанию целевого белка по сравнению с культивированием при pH 7.2. Температурный и pH «шифты» не продемонстрировали ожидаемый результат при использовании на биореакторах с волновым типом перемешивания RM 20. Наилучший результат по продуктивности был получен после культивирования при температуре 37°C и pH 7.2. Количество целевого антитела GamP2C5 приведено в табл. 8.

Таблица 8. Содержание целевого антитела GamP2C5, определенное с помощью прибора Octet® RED 96

Table 8. Yield of the target antibody GamP2C5 determined using an Octet® RED 96 system

Номер эксперимента Number of experiment	1	2	3
Продуктивность, мкг/мл Product yield, µg/mL	440	374	223

Таким образом, в результате проделанной работы на данном этапе нами был разработан процесс культивирования данного клона в волновом биореакторе в лабораторном масштабе (рабочий объем 10 л) со режимом культивирования, указанным в табл. 9.

Таблица 9. Параметры культивирования для клеток CHO на среде ActiPro™ в волновом биореакторе RM 20

Table 9. Cultivation parameters for CHO cells on ActiPro™ medium in the Biostat® RM 20 wave bioreactor

Параметр Parameter	Значение Value
Температура, °C Temperature, °C	37.0
Растворенный кислород, % Dissolved oxygen, %	40
pH	7.2
Концентрация CO ₂ в газовой фазе, % CO ₂ concentration in the gas phase, %	5.0
Угол наклона платформы, ° Platform tilt angle, °	7
Частота качания платформы, кач/мин Platform swing frequency, swing/min	15
Объемный расход газовой смеси, л/мин Volumetric flow rate of gas mixture, L/min	0.5
Начало добавления подпитки, день Start adding supplement, day	5

После проведения анализа процесса на среде ActiPro™ с тремя различными условиями культивирования были подобраны параметры, которые показали максимальный результат по продуктивности целевого антитела. Затем перед нами стояла задача провести масштабирование в биореактор с осевым типом перемешивания STR 200. Для данного процесса было необходимо подобрать оптимальные условия культивирования клеток с учетом изменения типа перемешивания. Для проведения экспериментов была использована система минибиореакторов Ambr® 250 (рис. 8).

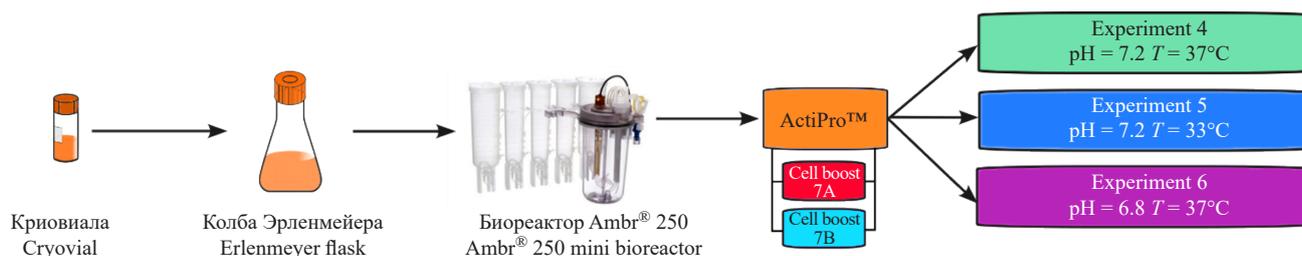


Рис. 8. Подбор оптимальных параметров для процесса культивирования в минибиореакторах Ambr® 250

Fig. 8. Selection of optimal parameters for the cultivation process in Ambr® 250 mini bioreactors

Для процессов в минибиореакторах нами была использована питательная среда ActiPro™ в комбинации с питательными добавками 7А и 7В, которая после эксперимента в колбах показала наилучший результат по выходу целевого антитела (671 мкг/мл), а также на данной среде была зафиксирована самая большая клеточная плотность (10 млн/мл). Кроме того, после отработки условий на биореакторах с волновым типом перемешивания RM 20, питательная среда ActiPro™ также показала лучший результат по содержанию целевого антитела, который составил 440 мкг/мл.

В экспериментах в минибиореакторах Ambr® 250 сравнивались показатели продуктивности целевого белка после изменения температурного параметра и pH в ходе культивирования. Соотношение выживаемости и плотности клеточной культуры на определенный день культивирования представлены на рис. 9.

В данных экспериментах было установлено, что при понижении температуры до 33°C время культивирования и содержание целевого белка оказалось больше, чем при температуре 37°C. Культивирование клеток при pH 6.8 показало меньший выход целевого белка по сравнению с культивированием при pH 7.2. Эксперимент с изменением pH не продемонстрировал ожидаемых результатов, как и при проведении эксперимента в биореакторе с волновым типом перемешивания RM 20, хотя изменение температуры в данном эксперименте показало наилучший результат по содержанию целевого белка. Количество целевого антитела GamP2C5 представлено в табл. 10.

Таблица 10. Содержание антитела GamP2C5, определенное с помощью прибора Octet® RED 96

Table 10. Yield of the target antibody GamP2C5 determined using an Octet® RED 96 system

Номер эксперимента Number of experiment	4	5	6
Продуктивность, мкг/мл Product yield, µg/mL	382	456	240

С учетом полученных результатов по экспериментам на минибиореакторах Ambr® 250 были подобраны параметры процесса для биореактора с осевым типом перемешивания STR 200 (рис. 10).

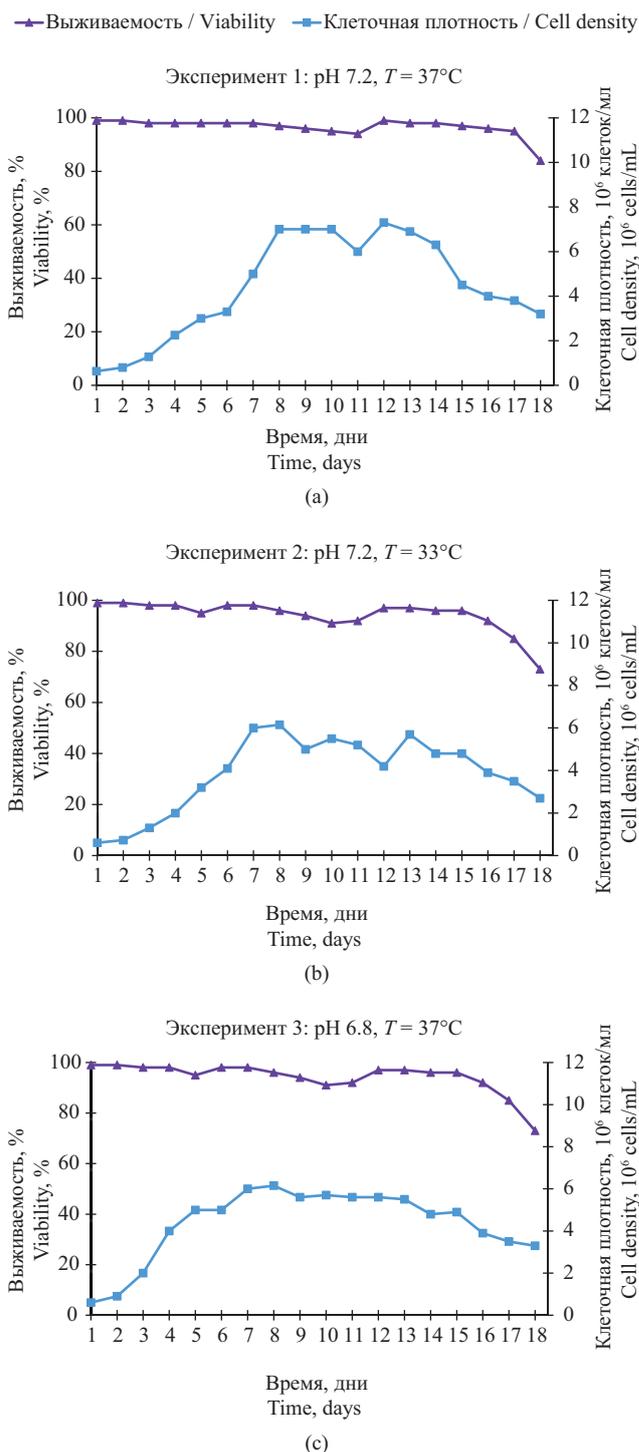


Рис. 9. Культивирование клеток CHO GamP2C5 (клон 78) при различных условиях культивирования в минибиореакторах Ambr® 250:
 (a) эксперимент 1: pH 7.2, T = 37°C;
 (b) эксперимент 2: pH 7.2, T = 33°C;
 (c) эксперимент 3: pH 6.8, T = 37°C

Fig. 9. Cultivation of CHO GamP2C5 (clone 78) cells under various cultivation conditions in Ambr® 250 mini bioreactors:
 (a) experiment 1: pH 7.2, T = 37°C;
 (b) experiment 2: pH 7.2, T = 33°C;
 (c) experiment 3: pH 6.8, T = 37°C

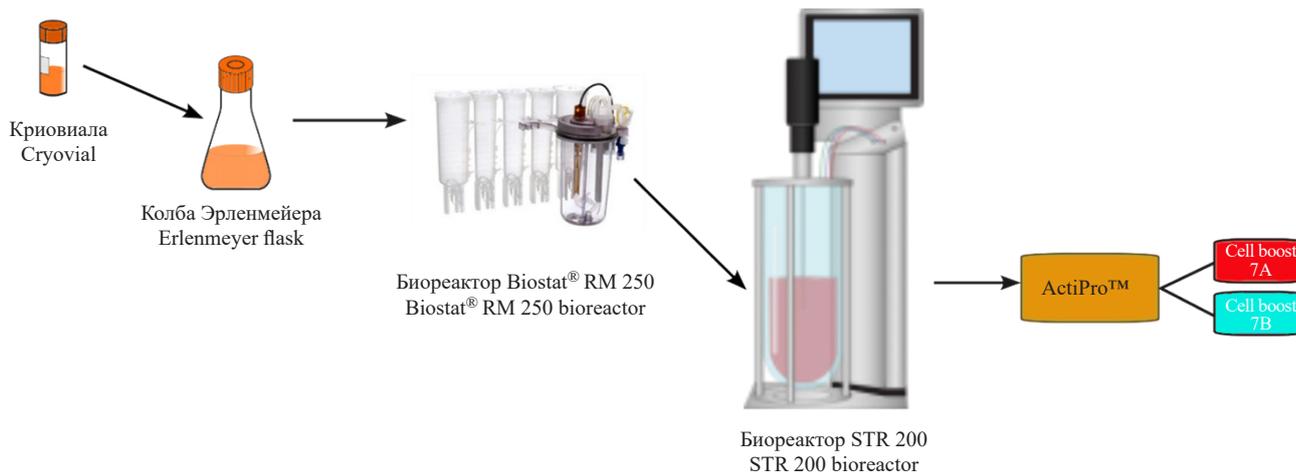


Рис. 10. Схема масштабирования для процесса культивирования до биореактора с осевым типом перемешивания STR 200 с рабочим объемом 200 л

Fig. 10. Scaling diagram for the cultivation process to an STR 200 stirred-tank bioreactor with a working volume of 200 L

После проведения ряда экспериментов с использованием минибиореакторов Ambr[®] 250 на питательной среде ActiPro[™] в комбинации с питательными добавками 7А и 7В были подобраны условия по оптимальному рН и температуре, которые показали максимальный результат по продуктивности целевого антитела. Для работы в биореакторе с осевым типом перемешивания STR 200 с рабочим объемом 200 л использовались параметры, полученные в результате процессов в минибиореакторе Ambr[®] 250. Для масштабирования параметров процесса с минибиореакторов Ambr[®] 250 в биореактор STR 200 было проведено моделирование с помощью программного обеспечения Sartorius¹, которое производит перенос параметров процессов культивирования с биореактора малого объема в больший с сохранением масс-обменных характеристик. Обычно одним из используемых безразмерных коэффициентов масштабирования для увеличения/уменьшения масштаба биореакторных процессов является объемный расход (vvm , где v — объем воздуха в литрах, v — объем среды в литрах, t — время в минутах, в течение которого происходит обменный процесс (аэрация)) [22]. С учетом этого параметра было проведено масштабирование (данные не представлены). Кроме того, для обеспечения продолжительной пролиферации и блокировки апоптоза клеток при внесении питательных добавок с пятого дня культивирования проводились измерения по остаточным метаболитам (глюкоза, глутамин, глутамат, лактат, аммоний) (табл. 11).

Соотношение выживаемости и плотности клеточной культуры на определенный день культивирования представлены на рис. 11.

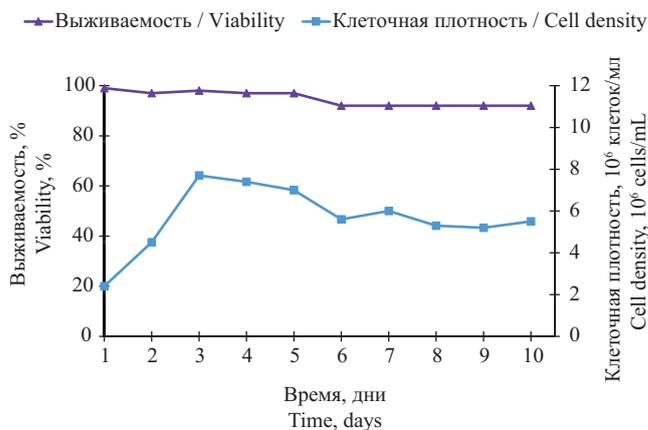


Рис. 11. Культивирование клеток CHO GamP2C5 (клон 78) на среде ActiPro[™] в биореакторе с осевым типом перемешивания STR 200

Fig. 11. Cultivation of CHO GamP2C5 (clone 78) cells in ActiPro[™] medium in an STR 200 stirred-tank bioreactor

После проведения процесса в биореакторе с осевым типом перемешивания STR 200 с режимами культивирования, подобранными с помощью минибиореактора Ambr[®] 250, количество целевого продукта антитела GamP2C5 составило 564.4 мкг/мл. Данное значение превышает исходное (456 мкг/мл), полученное в результате культивирования в минибиореакторе Ambr[®] 250.

¹ <https://www.sartogsm.ru/>. Дата обращения: 01.06.2022. / Accessed June 01, 2022.

Таблица 11. Данные остаточных метаболитов по прибору Cedex® Bio Analyzer**Table 11.** Data of residual metabolites according to the Cedex® Bio Analyzer device

День Days	Глюкоза, мг/л Glucose, mg/L	Глютамин, мМ/л Glutamine, mM/L	Глютамат, мг/л Glutamate, mg/L	Лактат, мг/л Lactate, mg/L	Аммоний, мМ/л Ammonium, mM/L	Добавление Addition
5	2000.74	0.32	381.32	2345.45	7.920	1.0% 7A, 0.1% 7B, 1 г/л глюкозы 1.0% 7A, 0.1% 7B, 1 g/L glucose
6	3343.45	0.15	598.39	1806.77	10.148	1.50% 7A, 0.15% 7B, 200 мМ глютамина, 2 г/л глюкозы 1.50% 7A, 0.15% 7B, 200 mM glutamine, 2 g/L glucose
7	1721.22	0.48	972.53	2065.86	11.544	2.0% 7A, 0.2% 7B, 200 мМ глютамина, 3 г/л глюкозы 2.0% 7A, 0.2% 7B, 200 mM glutamine, 3 g/L glucose
8	6158.21	1.23	1320.79	300.88	8.311	2.50% 7A, 0.25% 7B
9	3891.29	0.59	1402.18	650.86	10.032	3.0% 7A, 0.3% 7B
10	2191.10	0.52	1410.47	873.21	9.716	1.50% 7A, 0.15% 7B
11	2272.02	0.11	584.63	727.05	3.759	2.0% 7A, 0.2% 7B
12	323.82	0.21	609.07	257.12	3.258	2.50% 7A, 0.25% 7B, 4 г/л глюкозы 2.50% 7A, 0.25% 7B, 4 g/L glucose
13	3783.16	0.21	1021.88	242.33	3.358	2 г/л глюкозы 2 g/L glucose
14	4548.37	0.89	1101.30	323.79	8.285	–

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Произведена работа по подбору оптимальных параметров процесса культивирования для наработки компонента I кандидатного препарата ГамКовиМаб. Компонент I кандидатного препарата ГамКовиМаб представляет собой антитело GamP2C5 (культура клеток СНО, клон 78). Для данного клона оптимальные параметры процесса культивирования были достигнуты в биореакторе с осевым типом перемешивания при pH 7.2 с использованием понижения температуры с 37 до 33°C, питательной среды ActiPro™ в комбинации с питательными добавками 7A и 7B, в которой культура клеток СНО экспрессирует наибольшее количество целевого антитела. Данный вывод был сделан на основе изучения условий культивирования клеток СНО, стабильно продуцирующих антитело GamP2C5 (клон 78). Описан

процесс культивирования данного клона в волновом биореакторе с рабочим объемом 10 л. Подобрана оптимальная питательная среда, позволяющая давать максимальное содержание целевого белка. Проведена работа по оценке влияния изменения температуры во время культивирования на продуктивность целевого антитела. Кроме того, подобран pH питательной среды, который также влияет на культивирование данного клона. Затем для перехода в биореактор производственного масштаба (биореактор с осевым типом перемешивания) проведена работа по подбору оптимальных параметров с учетом изменения типа перемешивания. Для данной работы была использована система минибиореакторов Ambr® 250, с помощью которой подобраны оптимальные параметры по температуре и pH. Кроме того, в исследовании было выяснено, что показатели продуктивности для клеточной линии СНО, стабильно продуцирующей

антитело GamP2C5 (клон 78), в биореакторе с волновым и осевым типом перемешивания имеют разные значения. Для данного клона в биореакторе с волновым типом перемешивания (рабочий объем 10 л) наилучший результат по выходу целевого антитела был продемонстрирован при $T = 37^\circ\text{C}$, а при культивировании в биореакторе с осевым типом перемешивания (минибиореактор Ambr[®] 250) наибольшая продуктивность была продемонстрирована при $T = 33^\circ\text{C}$. При этом содержание целевого антитела в минибиореакторе Ambr[®] 250 при $T = 33^\circ\text{C}$ превосходит данный показатель по сравнению с биореактором с волновым типом перемешивания (рабочий объем 10 л) при $T = 37^\circ\text{C}$. После подбора оптимальных параметров культивирования для клеточной линии CHO, стабильно продуцирующей антитело GamP2C5 (клон 78), было проведено культивирование в биореакторе с осевым типом перемешивания с рабочим объемом 200 л. Параметры для этого процесса были подобраны с использованием данных, полученных в результате экспериментов в минибиореакторе Ambr[®] 250. Кроме того, для обеспечения оптимальными условиями культуры клеток CHO, стабильно продуцирующей антитело GamP2C5, питательные добавки вносились с учетом анализа/контроля метаболитов. Таким образом, в нашей работе была разработана эффективная технология культивирования клеток CHO, стабильно продуцирующих антитело GamP2C5, которое является компонентом I кандидатного препарата ГамКовиМаб для экстренной профилактики и терапии инфекции, вызванной вирусом SARS-CoV-2.

Вклад авторов

Д.С. Полянский — проведение экспериментов по культивированию клеток CHO в мини биореакторах Ambr[®] 250; проведение экспериментов по масштабированию процесса культивирования; сбор и анализ данных; написание текста рукописи;

Е.И. Рябова — получение клеточной линии CHO, стабильно продуцирующей модифицированное однодоменное антитело GamP2C5; проведение экспериментов по подбору питательных сред в колбах Эрленмейера; сбор и анализ данных.

А.А. Деркаев — проведение экспериментов по подбору питательных сред в колбах Эрленмейера; измерение концентрации продукта в культуральной жидкости; сбор и анализ данных.

Н.С. Старков — масштабирование процесса культивирования в биореакторе с осевым типом перемешивания STR 200; подготовка материалов рукописи.

И.С. Кашапова — проведение экспериментов по культивированию в волновых биореакторах RM 20.

Д.В. Шебляков — дизайн генетической конструкции, экспрессирующей модифицированное однодоменное антитело.

А.П. Карпов — руководство экспериментами по масштабированию процесса культивирования; корректировка текста рукописи; утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

И.Б. Есмагамбетов — общее руководство; корректировка текста рукописи; утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

Authors' contributions

D.S. Polyansky — conducting the experiments of cultivating CHO cells in an Ambr[®] 250 mini bioreactor, conducting the experiments of scaling the cultivation process, data collection and analysis, and writing the text of the manuscript.

E.I. Ryabova — development of CHO cell line, stably producing GamP2C5 modified single-domain antibody, conducting the experiments of the selection of culture media in Erlenmeyer's flasks, and data collection and analysis.

A.A. Derkaev — conducting the experiments of the selection of cultural media in Erlenmeyer's flasks, measuring the concentration of the product in the culture media, and data collection and analysis.

N.S. Starkov — scaling the cultivation process in an STR 200 stirred-tank bioreactor and preparation of materials for the manuscript.

I.S. Kashapova — conducting the experiments on cultivation in Biostat[®] RM 20 wave bioreactors.

D.V. Shchablyakov — design of a genetic construct expressing a modified single-domain antibody.

A.P. Karpov — managing the experiments on scaling the cultivation process; correcting the manuscript text, and approval of the final version of the manuscript for publication.

I.B. Esmagambetov — general management, correcting the manuscript text, and approval of the final version of the manuscript for publication.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Sun J., Yang .D., Xie X., Li L., Zeng H.Z., Gong B., Xu J.Q., Wu J.H., Qu B.B., Song G.W. Clinical application of SARS-CoV-2 antibody detection and monoclonal antibody therapies against COVID-19. *World J. Clin. Cases.* 2023;11(10):2168–2180. <https://doi.org/10.12998/wjcc.v11.i10.2168>
2. Mitra S., Tomar P.S. Hybridoma technology; advancements, clinical significance, and future aspects. *J. Genet. Eng. Biotechnol.* 2021;19(1):159. <https://doi.org/10.1186/s43141-021-00264-6>
3. Lu R.M., Hwang Y.C., Liu I.J., Lee C.C., Tsai H.Z., Li H.J., Wu H.C. 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>
4. Quinteros D.A., Bermúdez J.M., Ravetti S., Cid A., Allemanni D.A., Palma S.D. Therapeutic use of monoclonal antibodies: general aspects and challenges for drug delivery. Chapter 25. In: *Nanostructures for Drug Delivery. Micro and Nano Technologies.* 2017:807–833. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-46143-6.00025-7>

5. Garcia J., Hurwitz H.I., Sandler A.B., Miles D., Coleman R.L., Deurloo R., Chinot O.L. Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: a review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treat. Rev.* 2020;86:102017. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102017>
6. Chisari C.G., Sgarlata E., Arena S., Toscan S., Luca M., Patti F. Rituximab for the treatment of multiple sclerosis: a review. *J. Neurol.* 2022;269(1):159–183. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10362-z>
7. Hemperly A., Vande Castele N. Clinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Infliximab in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Clin. Pharmacokinet.* 2018;57(8):929–942. <https://doi.org/10.1007/s40262-017-0627-0>
8. Weinblatt M.E., Keystone E.C., Furst D.E., Kavanaugh A.F., Chartash E.K., Segurado O.G. Long term efficacy and safety of adalimumab plus methotrexate in patients with rheumatoid arthritis: ARMADA 4-year extended study. *Ann. Rheum. Dis.* 2006;65(6):753–759. <https://doi.org/10.1136/ard.2005.044404>
9. Salazar G., Zhang N., Fu T.M., An Z. Antibody therapies for the prevention and treatment of viral infections. *NPJ Vaccines.* 2017;2:19. <https://doi.org/10.1038/s41541-017-0019-3>
10. Pelegrin M., Naranjo-Gomez M., Piechaczyk M. Antiviral Monoclonal Antibodies: Can They Be More Than Simple Neutralizing Agents? *Trends Microbiol.* 2015;23(10):653–665. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.005>
11. Pantaleo G., Correia B., Fenwick C., Joo V.S., Perez L. Antibodies to combat viral infections: development strategies and progress. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2022;21(9):676–696. <https://doi.org/10.1038/s41573-022-00495-3>
12. Miyazato Y., Yamamoto K., Nakaya Y., Morioka S., Takeuchi J.S., Takamatsu Y., Maeda K., Kimura M., Sugiura W., Mitsuya H., Yano M., Ohmagaria N. Successful use of casirivimab/imdevimab anti-spike monoclonal antibodies to enhance neutralizing antibodies in a woman on anti-CD20 treatment with refractory COVID-19. *J. Infect. Chemother.* 2022;28(7):991–994. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2022.03.002>
13. Jovčevska I., Muyldermans S. The Therapeutic Potential of Nanobodies. *BioDrugs.* 2019;34(1):11–26. <https://doi.org/10.1007/s40259-019-00392-z>
14. Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Егорова Д.А., Воронина О.Л., Деркаев А.А., Воронина Д.В., Попова О., Рябова Е.И., Щербинин Д.Н., Аксенова Е.И., Семенов А.Н., Кунда М.С., Рязова Н.Н., Зубкова О.В., Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Борисевич С.В., Гинцбург А.Л. Наноантитела – потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола. *Acta Naturae.* 2021;13(4):53–63. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11487> [Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Egorova D.A., Voronina O.L., Derkaev A.A., Voronina D.V., Popova O., Ryabova E.I., Shcherbinin D.N., Aksenova E.I., Semenov A.N., Kunda M.S., Ryzhova N.N., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Borisevich S.V., Gintsburg A.L. Nanobodies Are Potential Therapeutic Agents for the Ebola Virus Infection. *Acta Naturae.* 2021;13(4):53–63. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11487>]
15. Derkaev A.A., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Godakova S.A., Vinogradova I.D., Noskov A.N., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. rAAV expressing recombinant neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type A prophylaxis. *Front. Microbiol.* 2022;13:960937. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.960937>
16. Voronina D.V., Shcheblyakov D.V., Favorskaya I.A., Esmagambetov I.B., Dzharrullaeva A.S., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Popova O., Kan V.Y., Bandelyuk A.S., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditskiy B.S., Gintsburg A.L. Cross-Reactive Fc-Fused Single-Domain Antibodies to Hemagglutinin Stem Region Protect Mice from Group 1 Influenza A Virus Infection. *Viruses.* 2022;14(11):2485. <https://doi.org/10.3390/v14112485>
17. Panova E.A., Kleymenov D.A., Shcheblyakov D.V., Bykonia E.N., Mazunina E.P., Dzharrullaeva A.S., Zolotar A.N., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Sorokin I.I., Usachev E.V., Noskov A.N., Ivanov I.A., Zatsepin T.S., Dmitriev S.E., Gushchin V.A., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A. *Front. Immunol.* 2023;14:1098302. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1098302>
18. Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Ugriumova G.A., Solovyev A.I., Esmagambetov I.B., Tukhvatulin A.I., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Shcheblyakov D.V., Gintsburg A.L. 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>
19. Esmagambetov I.B., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Shcheblyakov D.V., Dolzhikova I.V., Favorskaya I.A., Grousova D.M., Dovgiy M.A., Prokofiev V.V., Gosudarev A.I., Byrikhina D.V., Zorkov I.D., Iliukhina A.A., Kovyrshina A.V., Shelkov A.Y., Naroditsky B.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. rAAV expressing recombinant antibody for emergency prevention and long-term prophylaxis of COVID-19. *Front. Immunol.* 2023;14:1129245. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1129245>
20. Favorskaya I.A., Shcheblyakov D.V., Esmagambetov I.B., Dolzhikova I.V., Alekseeva I.A., Korobkova A.I., Voronina D.V., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Kovyrshina A.V., et al. Single-Domain Antibodies Efficiently Neutralize SARS-CoV-2 Variants of Concern. *Front. Immunol.* 2022;13:822159. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.822159>
21. Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Банделюк А.С., Верховская Л.В., Вискова Н.Ю., Авдонина Е.Д., Прокофьев В.В., Рябова Е.И., Есмагамбетов И.Б., Первойкина К.А., Богачева Е.А., Лысенко А.А., Шмаров М.М. Способ получения рекомбинантных антител, продуцируемых клеточной линией, трансдуцированной рекомбинантными аденовирусами. *Тонкие химические технологии.* 2023;18(1):48–64. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64> [Sedova E.S., Shcherbinin D.N., Bandelyuk A.S., Verkhovskaya L.V., Viskova N.Yu., Avdonina E.D., Prokofiev V.V., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Pervoykina K.A., Bogacheva E.A., Lysenko A.A., Shmarov M.M. Method for obtaining recombinant antibodies produced by a cell line transduced with recombinant adenoviruses. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):48–64 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>]
22. Yao T., Asayama Y. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod. Med. Biol.* 2017;16(2):99–117. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12024>
23. Xu P., Clark C., Ryder T., Sparks C., Zhou J., Wang M., Russell R., Scott C. Characterization of TAP Ambr 250 disposable bioreactors, as a reliable scale-down model for biologics process development. *Biotechnol. Prog.* 2017;33(2):478–489. <https://doi.org/10.1002/btpr.2417>

Об авторах

Полянский Дмитрий Сергеевич, технолог, филиал «Медгамал», ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18); ассистент кафедры аналитической химии им. И.П. Алимарина, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 86). E-mail: polanskiydmityriy15@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-0792-7063>

Рябова Екатерина Игоревна, младший научный сотрудник, лаборатория иммунобиотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18); аспирант, ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» (109472, Россия, Москва, ул. Академика Скрябина, д. 23). E-mail: ryabovaei96@gmail.com. Scopus Author ID 57301278100, ResearcherID AAE-7335-2022, SPIN-код РИНЦ 6963-1376, <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>

Деркаев Артем Алексеевич, младший научный сотрудник, лаборатория иммунобиотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: derkaev.a@yandex.ru. Scopus Author ID 57381507000, ResearcherID AFU-7075-2022, SPIN-код РИНЦ 9339-9440, <https://orcid.org/0000-0003-3776-3856>

Старков Никита Сергеевич, технолог, филиал «Медгамал», ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: starkovns@medgamal.ru. <https://orcid.org/0009-0000-6493-5903>

Кашапова Ирина Сергеевна, научный сотрудник, лаборатория клеточной микробиологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: kashapova@medgamal.com. SPIN-код РИНЦ 4860-3713, <https://orcid.org/0000-0002-5108-3841>

Щебляков Дмитрий Викторович, к.б.н., ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией иммунобиотехнологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: sdmitryv@yahoo.com. Scopus Author ID 35073056900, ResearcherID E-5899-2014, SPIN-код РИНЦ 6357-2725, <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

Карпов Андрей Павлович, к.б.н., главный технолог, филиал «Медгамал», ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: ap.karpov@medgamal.ru. Scopus Author ID 22834845200

Есмагамбетов Ильяс Булатович, к.б.н., ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией стромальной регуляции иммунитета, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: iesmagambetov@yandex.ru. Scopus Author ID 56120429700, ResearcherID E-3327-2014, SPIN-код РИНЦ 8132-2320, <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

About the authors

Dmitry S. Polyansky, Technologist, Medgamal Branch, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia); Assistant Professor, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: polanskiydmityriy15@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0003-0792-7063>

Ekaterina I. Ryabova, Junior Researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia); Postgraduate Student, K.I. Skryabin Moscow State Academy of Veterinary Medicine and Biotechnology – MVA (23, Akademika Skryabina ul., Moscow, 109472, Russia). E-mail: ryabovaei96@gmail.com. Scopus Author ID 57301278100, ResearcherID AAE-7335-2022, RSCI SPIN-code 6963-1376, <https://orcid.org/0000-0002-2687-5185>

Artem A. Derkaev, Junior Researcher, Laboratory of Immunobiotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: derkaev.a@yandex.ru. Scopus Author ID 57381507000, ResearcherID AFU-7075-2022, SPIN-код РИНЦ 9339-9440, <https://orcid.org/0000-0003-3776-3856>

Nikita S. Starkov, Technologist, Medgamal Branch, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: starkovns@medgamal.ru. <https://orcid.org/0009-0000-6493-5903>

Irina S. Khashapova, Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: khashapova@medgamal.com. SPIN-код РИНЦ 4860-3713, <https://orcid.org/0000-0002-5108-3841>

Dmitry V. Shcheblyakov, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Laboratory of Immunobiotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: sdmitryv@yahoo.com. Scopus Author ID 35073056900, ResearcherID E-5899-2014, SPIN-код РИНЦ 6357-2725, <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

Andrey P. Karpov, Cand. Sci. (Biol.), Chief Technologist, Medgamal Branch, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: ap.karpov@medgamal.ru. Scopus Author ID 22834845200

Ilias B. Esmagambetov, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Laboratory of Stromal Regulation of Immunity, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: iesmagambetov@yandex.ru. Scopus Author ID 56120429700, ResearcherID E-3327-2014, SPIN-код РИНЦ 8132-2320, <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>