

УДК 60

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-6-582-593>

EDN VKKHOP



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Сравнительный анализ трех генетических конструкций для доставки и экспрессии гена модифицированного однодоменного антитела в составе rAAV

Е.И. Рябова¹✉, А.А. Деркаев¹, И.Б. Есмагамбетов¹, М.А. Довгий¹, А.А. Блинов¹, Р.М. Хоссаин¹,
О.Е. Дмитриев¹, Д.С. Полянский², А.Н. Носков¹, Д.В. Щепляков¹, Д.Ю. Логунов¹, А.Л. Гинцбург¹

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

² МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий
им. М.В. Ломоносова), Москва, 119454 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: ryabovaei96@gmail.com

Аннотация

Цели. Получить и сравнить эффективность трех вариантов rAAV, экспрессирующих ген модифицированного однодоменного антитела B11-Fc, специфичного к ботулиническому токсину типа А (BoNT/A) — rAAV-DJ-CMV-B11-Fc, rAAV-DJ-CASI-B11-Fc и scAAV-DJ-CMV-B11-Fc.

Методы. Для создания целевых конструкций и получения rAAV использовали систему AAV-DJ Packaging System (Cell Biolabs, США). Экспрессию гена антитела B11-Fc в составе полученных rAAV оценивали *in vitro* (клеточные линии HEK293, CHO-S и C2C12) и *in vivo* (мыши линии BALB/c) при помощи биослойной интерферометрии. Защитные свойства препаратов изучали на модели летальной интоксикации мышей BoNT/A.

Результаты. Препарат rAAV-DJ-CMV-B11-Fc показал высокий уровень продукции антитела B11-Fc как *in vitro*, так и *in vivo* без значимого снижения концентрации в течение как минимум 6 месяцев. Препараты rAAV-DJ-CASI-B11-Fc и scAAV-DJ-CMV-B11-Fc показали сравнимый уровень продукции B11-Fc как *in vitro* и *in vivo*, за исключением клеток C2C12, где rAAV-DJ-CASI-B11-Fc показал самую высокую эффективность. При изучении защитной активности препаратов против летальной дозы BoNT/A продемонстрировано, что в первые двое суток rAAV-DJ-CASI-B11-Fc и scAAV-DJ-CMV-B11-Fc обладают более выраженной активностью по сравнению с rAAV-DJ-CMV-B11-Fc. Однако на более поздних сроках, начиная с 3 месяца, препарат rAAV-DJ-CMV-B11-Fc демонстрирует наиболее выраженную защиту против высоких доз BoNT/A.

Выводы. Полученные в ходе исследования данные показывают, что для индукции защиты от BoNT/A на ранних сроках (24–48 ч) после введения следует применять препарат rAAV-DJ-CASI-B11-Fc, тогда как для индукции защиты от максимально высоких доз BoNT/A в долгосрочной перспективе следует использовать rAAV-DJ-CMV-B11-Fc. Исследования специфической активности препаратов на более поздних сроках после введения продолжаются.

Ключевые слова

rAAV, аденоассоциированный вирус, однодоменные антитела, ботулизм, пассивная иммунизация, профилактика

Поступила: 03.09.2025

Доработана: 23.09.2025

Принята в печать: 11.11.2025

Для цитирования

Рябова Е.И., Деркаев А.А., Есмагамбетов И.Б., Довгий М.А., Блинов А.А., Хоссайн Р.М., Дмитриев О.Е., Полянский Д.С., Носков А.Н., Щербляков Д.В., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Сравнительный анализ трех генетических конструкций для доставки и экспрессии гена модифицированного однодоменного антитела в составе rAAV. *Тонкие химические технологии*. 2025;20(6):582–593. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-6-582-593>

RESEARCH ARTICLE

Comparative analysis of three genetic constructs for delivery and expression of a modified single-domain antibody gene in rAAV

Ekaterina I. Ryabova^{1,✉}, Artem A. Derkaev¹, Ilias B. Esmagambetov¹, Mikhail A. Dovgiy¹, Anton A. Blinov¹, Roza M. Hossain¹, Oleg E. Dmitriev¹, Dmitry S. Polyansky², Anatoly N. Noskov¹, Dmitry V. Shcheblyakov¹, Denis Y. Logunov¹, Alexander L. Gintsburg¹

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, 119454 Russia

✉ Corresponding author; e-mail: ryabovaei96@gmail.com

Abstract

Objectives. To obtain and compare the efficiency of three recombinant adeno-associated virus (rAAV) variants expressing the gene of the modified single-domain antibody B11-Fc specific to botulinum toxin type A (BoNT/A): rAAV-DJ-CMV-B11-Fc, rAAV-DJ-CASI-B11-Fc, and scAAV-DJ-CMV-B11-Fc.

Methods. The AAV-DJ Packaging System (Cell Biolabs, USA) was used to create target constructs and obtain rAAV. Expression of the B11-Fc antibody gene in the obtained rAAV was assessed *in vitro* (HEK293, CHO-S, and C2C12 cell lines) and *in vivo* (BALB/c mice) using biolayer interferometry. The protective properties of the drugs were investigated on the model of lethal intoxication of mice with BoNT/A.

Results. The rAAV-DJ-CMV-B11-Fc drug demonstrated a high level of B11-Fc antibody production both *in vitro* and *in vivo* without a significant decrease in concentration for at least 6 months. Comparable levels of B11-Fc production were demonstrated by rAAV-DJ-CASI-B11-Fc and scAAV-DJ-CMV-B11-Fc drugs in both *in vitro* and *in vivo* studies, with the exception of C2C12 cells, where rAAV-DJ-CASI-B11-Fc demonstrated the highest efficacy. When investigating the protective activity of the drugs against a lethal dose of BoNT/A, it was found that rAAV-DJ-CASI-B11-Fc possessed more pronounced activity in the first two days following administration as compared to rAAV-DJ-CMV-B11-Fc. However, at later stages, starting from 3 months, the rAAV-DJ-CMV-B11-Fc drug product demonstrated the most pronounced protection against high doses of BoNT/A.

Conclusions. The obtained data show that rAAV-DJ-CASI-B11-Fc should be used for the induction of protection against BoNT/A at early stages (24–48 h) after administration, whereas for protection against the highest doses of BoNT/A in the long term, rAAV-DJ-CMV-B11-Fc should be used. Studies into the specific activity of the drugs at later stages after administration are still ongoing.

Keywords

rAAV, adeno-associated virus, single-domain antibodies, botulism, passive immunization, prophylaxis

Submitted: 03.09.2025

Revised: 23.09.2025

Accepted: 11.11.2025

For citation

Ryabova E.I., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Dovgiy M.A., Blinov A.A., Hossain R.M., Dmitriev O.E., Polyansky D.S., Noskov A.N., Shcheblyakov D.V., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. Comparative analysis of three genetic constructs for delivery and expression of a modified single-domain antibody gene in rAAV. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2025;20(6):582–593. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2025-20-6-582-593>

ВВЕДЕНИЕ

Векторы на основе аденоассоциированного вируса (rAAV) являются превосходным инструментом не только для создания средств генной терапии, но и для создания средств профилактики инфекционных заболеваний, основанных на пассивной генетической иммунизации. Данный принцип построен на доставке и длительной экспрессии в организме генов нейтрализующих антител, специфичных к определенному патогену. Такой подход показал свою эффективность для создания средств профилактики гриппа, COVID-19, ВИЧ инфекции и др. [1, 2]. Эффективность препаратов для пассивной генетической иммунизации на основе rAAV во многом зависит от дизайна генетической конструкции, обеспечивающей экспрессию гена нейтрализующего антитела.

В предыдущем исследовании нами был получен rAAV, обеспечивающий долгосрочную экспрессию гена нейтрализующего модифицированного однодоменного антитела B11-Fc¹ (rAAV-B11-Fc). Экспериментально установлено, что однократное введение rAAV-B11-Fc обеспечивает полную защиту животных от летальной дозы ботулинического нейротоксина серотипа А с сохранением протективного эффекта на протяжении как минимум 120 суток [3]. Настоящее исследование является продолжением указанной работы и сосредоточено на подборе оптимальной генетической конструкции для доставки и экспрессии гена антитела B11-Fc в составе rAAV и разработке прототипа кандидатного препарата для генетической пассивной иммунизации и профилактики ботулизма.

Таким образом, целью данной работы является получение и сравнение эффективности трех вариантов rAAV-конструкций, экспрессирующих ген антитела B11-Fc, специфичного к ботулиническому токсину типа А (BoNT/A) — rAAV-DJ²-CMV-B11-Fc, rAAV-DJ-CASI-B11-Fc, scAAV-DJ-CMV-B11-Fc. rAAV-DJ-CMV-B11-Fc является препаратом, использованным нами ранее [3], несущим ген модифицированного однодоменного антитела B11-Fc [4] под контролем CMV-промотора (Cytomegalovirus promoter). Для удобства и понимания в данной работе он был назван

rAAV-DJ-CMV-B11-Fc. rAAV-DJ-CASI-B11-Fc — конструкция, аналогичная по структуре, но включающая CASI³-промотор — синтетический гибридный промотор, содержащий элементы CMV, куриного β-актина и интрона UbC (Ubiquitin C), а также WPRE (woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element), который усиливает стабильность и уровень экспрессии мРНК. scAAV-DJ-CMV-B11-Fc — самокомплементарная форма вектора, экспрессирующая ген B11-Fc под контролем промотора CMV.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препаратов rAAV. Препарат rAAV-DJ-CMV-B11-Fc был получен с использованием плазмид, как описано ранее [3]. Препарат rAAV-DJ-CASI-B11-Fc получали с использованием плазмид pAAV-CASI-B11-Fc, pAAV-DJ-vector (*Cell Biolabs*, США) и pHelper Vector (*Cell Biolabs*, США). Препарат pAAV-CASI-B11-Fc получали при помощи синтеза последовательности промотора CASI вместе с сайтами клонирования и последовательностью WPRE и сигнала полиаденилирования в ЗАО «Евроген» (Россия) с последующим клонированием синтезированной последовательности между левым и правым инвертированными терминальными повторами (inverted terminal repeats, ITR), заменяя имеющуюся экспрессионную кассету. Препарат scAAV-DJ-CMV-B11-Fc получали с использованием плазмид pscAAV-CMV-B11-Fc, pAAV-DJ-vector (*Cell Biolabs*, США) и pHelper Vector (*Cell Biolabs*, США). Плазмиду pscAAV-CMV-B11-Fc получали при помощи клонирования последовательности гена B11-Fc в плазмиду pscAAV-MCS (*Cell Biolabs*, США).

Для получения rAAV-векторов использовали клеточную линию Human Embryonic Kidney 293 (HEK293) (из коллекции клеточных культур ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России). Культивирование и трансфекцию проводили в адгезионных условиях при 37°C и 5% CO₂, как описано ранее [3, 5]. Очистку вирусных препаратов проводили с использованием аффинной хроматографии (AC) на сорбенте POROS CaptureSelect AAVX Affinity Resin (*Thermo Fisher Scientific*, США) согласно

¹ B11-Fc — однодоменное антитело, модифицированное Fc-фрагментом IgG1 человека. [B11-Fc is a single-domain antibody modified with a human IgG1 Fc fragment.]

² rAAV-DJ — рекомбинантный адено-ассоциированный вирус (recombinant Adeno-Associated Virus) с капсидом типа DJ, который является синтетическим (химерным) серотипом, созданным путем смешения ДНК (DNA shuffling) из восьми различных природных серотипов AAV. [rAAV-DJ is recombinant Adeno-Associated Virus (rAAV) with a DJ-type capsid, which is a synthetic (chimeric) serotype created by DNA shuffling from eight different natural AAV serotypes.]

³ CASI-промотор — синтетический (химерный) промотор. Он состоит из энхансера CMV, куриного β-актинового промотора (CAG) и энхансера UbC. [CASI-promoter is a synthetic (chimeric) promoter. It consists of the CMV enhancer, the chicken β-actin promoter (CAG), and the UbC enhancer.]

инструкции производителя. Дополнительную очистку и замену буфера проводили при помощи эксклюзионной хроматографии (SEC) на колонке XK 26/100, упакованной сорбентом Superdex 200 (Cytiva, США). Финальное формулирование препаратов проводили на центрифужных концентраторах 100 кДа Amicon Ultra-15 (Merck, США). Количество и качество полученных препаратов изучали, как описано [5].

Изучение специфической активности препаратов gAAV *in vitro*. Клетки HEK293, CHO-S (адаптированные для культивирования в суспензии без сыворотки клетки китайского хомячка, Chinese hamster ovary [suspension]) (Thermo Fisher Scientific, США, кат. № R80007) и C2C12 (миобластная клеточная линия самки мыши C3H) (ATCC® CRL-1772™) трансдуцировали дозой 10^5 гк/клетку. Через 96 и 144 ч собирали образцы культуральной жидкости. Концентрацию B11-Fc в культуральной жидкости определяли методом биослойной интерферометрии (BLI), при помощи прибора OctetRED96e System (Fortebio, США) и сенсоров Anti-Human IgG Fc (Fortebio, США).

Изучение специфической активности препаратов gAAV *in vivo*. Самкам мышей инбредной линии BALB/c (6 недель, 18–20 г) (ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий» ФМБА России, филиал «Андреевка») вводили gAAV в дозе 10^{11} гк/животное внутримышечно. Кровь отбирали в ключевые временные точки. Концентрацию B11-Fc в сыворотке определяли аналогично как в эксперименте *in vitro*. Изучение защитной активности препаратов против BoNT/A проводили как описано [3, 6]. Содержание проводилось в виварии, в стандартных условиях: поликарбонатные клетки, плотность посадки — до 5 животных на клетку. Кормление осуществлялось полнорационным гранулированным кормом (*ad libitum*) с доступом к воде. Все процедуры выполнялись в соответствии с протоколом, одобренным локальным этическим комитетом ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» (протокол № 11 от 25.06.2021 г.).

Статистический анализ. Статистику проводили в программе GraphPad Prism 9.0 (Dotmatics, США). Выживаемость анализировали методом Каплана–Майера с логранговым тестом. Уровень значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Дизайн генетических конструкций и получение препаратов gAAV

Цис-действующие элементы gAAV-векторов, включая промоторы, определяют уровень, стабильность

и тканевую специфичность экспрессии. В данной работе мы исследовали эффективность экспрессии антитела B11-Fc в составе gAAV, несущих три разные генетические конструкции: gAAV-DJ-CMV-B11-Fc, gAAV-DJ-CASI-B11-Fc, scAAV-DJ-CMV-B11-Fc.

CMV-промотор широко применяется из-за высокой экспрессии в различных клетках (например, карциномы толстой кишки человека HCT116, колоректальной аденокарциномы DLD-1, клетках мозга и печени) [7]. Однако он подвержен эпигенетическому сайленсингу *in vivo*, особенно в мышечных и печеночных клетках, что ограничивает его длительную активность и может вызывать иммунный ответ [8–11].

CASI-промотор — синтетический гибрид (CMV, β -актин, UBC), устойчив к метилированию и обеспечивает стабильную экспрессию. В исследованиях индуцированных плюрипотентных стволовых клеток, дифференцированных в клетки пигментного эпителия сетчатки iPSC-RPE [12], а также при генной терапии колоректального рака препаратом AdC68-цетуксимаб [13] CASI-промотор демонстрировал высокую и стабильную экспрессию *in vivo* и *in vitro* [14]. Таким образом, по литературным данным, промотор CASI эффективен для доставки и экспрессии трансгена в мышечной ткани.

Самокомплементарные векторы аденоассоциированного вируса scAAV содержат двухцепочечную ДНК, что, согласно литературным данным, позволяет обеспечивать более быстрый и высокий уровень экспрессии трансгена [15–17]. Однако scAAV вызывает более выраженный иммунный ответ против трансгена [18, 19]. Также, необходимо отметить, что конструкция scAAV-DJ-CMV-B11-Fc несет последовательность «корового» CMV-промотора без энхансера, т.к. эффективная пакующая емкость AAV ограничена примерно 5000 нуклеотидов, а при упаковке самокомплементарных частиц scAAV эта емкость фактически снижена почти в 2 раза из-за того, что пакуется смысловая и анти-смысловая ДНК вместе, что диктует необходимость сокращения последовательностей регуляторных элементов в конструкции.

Кроме того, все три конструкции содержат различные интроны, способствующие увеличению экспрессии трансгена, — интрон человеческого β -глобина в конструкции pAAV-DJ-CMV-B11-Fc, интрон человеческого убиквитина C в конструкции pAAV-DJ-CASI-B11-Fc и малый интрон вируса SV40 конструкции pscAAV-DJ-CMV-B11-Fc. Также в конструкции pAAV-DJ-CASI-B11-Fc «вниз по течению» от трансгена содержится элемент WPRE вируса гепатита сурка, способствующий стабилизации мРНК и повышению экспрессии трансгена.

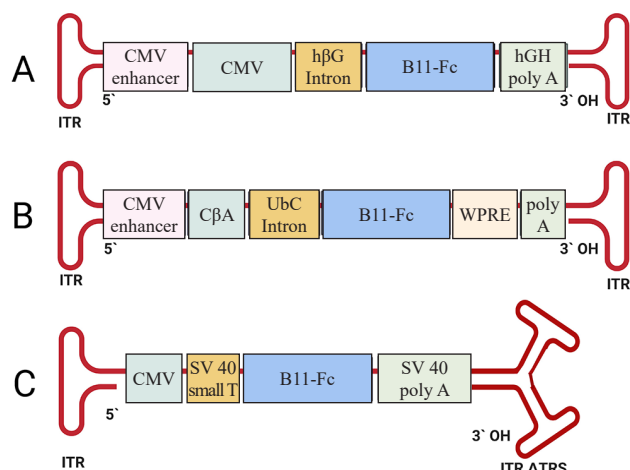


Рис. 1. Схематичное изображение полученных генетических конструкций, содержащей ген модифицированного антитела B11-Fc.
А: схема pAAV-DJ-CMV-B11-Fc, CMV — последовательность полноразмерного промотора CMV с энхансером; hβG intron — интрон бета-глобинового гена человека; B11-Fc — последовательность, кодирующая антитело B11-Fc; hGH poly A — сигнал полиаденилирования гормона роста человека; ITR — инвертированные терминальные повторы.
В: схема pAAV-DJ-CASI-B11-Fc; CASI — синтетический гибридный промотор, содержащий CMV энхансер и CβA (куриный β-актин); UbC интрон — интрон убиквитина C; B11-Fc — последовательность, кодирующая антитело B11-Fc, слитое с Fc-фрагментом; WPRE — посттранскрипционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка; poly A — синтетический сигнал полиаденилирования; ITR — инвертированные терминальные повторы.
С: схема pscAAV-DJ-CMV-B11-Fc, CMV — последовательность «кóрового» промотора CMV без энхансера; SV40 small T — малый интрон вируса SV40; B11-Fc — последовательность, кодирующая антитело B11-Fc; SV40 poly A — сигнал полиаденилирования SV40; ITR ΔTRS — модифицированный ITR с делецией сайта никазы, необходимый для формирования самокомплементарной структуры ДНК вектора.

Fig. 1. Schematic representation of the obtained genetic constructs containing the gene of the modified antibody B11-Fc.
A: pAAV-DJ-CMV-B11-Fc scheme, CMV is a sequence of the full-length CMV promoter with enhancer; hβG intron is an intron of the human β-globin gene; B11-Fc is a sequence encoding the antibody B11-Fc; hGH poly A is a polyadenylation signal of human growth hormone; ITR are inverted terminal repeats.
B: pAAV-DJ-CASI-B11-Fc scheme; CASI is a synthetic hybrid promoter containing the CMV enhancer and CβA (chicken β-actin); UbC intron is an intron of ubiquitin C; B11-Fc is a sequence encoding the antibody B11-Fc, fused with the Fc fragment; WPRE is a woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; poly A is a synthetic polyadenylation signal; ITR are inverted terminal repeats.
C: pscAAV-DJ-CMV-B11-Fc scheme, CMV is a CMV core promoter sequence without enhancer; SV40 small T is a small intron of SV40 virus; B11-Fc is a sequence encoding B11-Fc antibody; SV40 poly A is an SV40 polyadenylation signal; ITR ΔTRS is a modified ITR with nickase site deletion, required for formation of self-complementary structure of vector DNA

Таким образом, нами были выбраны 3 наиболее перспективные генетические конструкции для доставки и эффективной экспрессии гена антитела B11-Fc в составе rAAV. В работе был использован синтетический серотип rAAV-DJ, способный трансдуцировать широкий спектр различных клеток и тканей [10, 20] и использованный нами ранее для доставки и экспрессии генов нейтрализующих антител [2, 3].

Для получения трех препаратов rAAV были использованы соответствующие плазмидные конструкции pAAV-DJ-CMV-B11-Fc, pAAV-DJ-CASI-B11-Fc и pscAAV-DJ-CMV-B11-Fc. Схемы генетических конструкций показаны на рис. 1.

Препараты rAAV-DJ-CMV-B11-Fc, rAAV-DJ-CASI-B11-Fc, scAAV-DJ-CMV-B11-Fc были получены в культуре клеток HEK293 и очищены при помощи аффинной и эксклюзионной хроматографии. Качество препаратов оценивали при помощи электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия SDS-PAGE, Western blot и электронной микроскопии. Схема получения препаратов rAAV и типичные результаты контроля качества представлены на рис. 2.

Сравнение экспрессии B11-Fc в составе полученных препаратов rAAV *in vitro* и *in vivo*

Для оценки экспрессии B11-Fc использовали клеточные линии HEK293, CHO-S и C2C12, трансдуцированные rAAV-DJ-CMV-B11-Fc, rAAV-DJ-CASI-B11-Fc, scAAV-DJ-CMV-B11-Fc и rAAV-DJ-CMV-EGFP (в качестве К-). Препарат добавляли из расчета 100000 геномных копий на клетку. Образцы культуральной жидкости отбирали через 96 и 144 ч после трансдукции. Цитотоксического эффекта при трансдукции препаратов в выбранной дозе не наблюдалось. Анализ с использованием биослойной интерферометрии (BLI) показал, что уровень продукции B11-Fc зависит от промотора и клеточной линии (рис. 3а).

Конструкция rAAV-DJ-CMV-B11-Fc обеспечивала высокую экспрессию в клетках CHO-S (до 69.2 мкг/мл к 144 ч), тогда как в C2C12 уровень был ниже (6.13 мкг/мл на 96 ч). CASI-промотор (rAAV-DJ-CASI-B11-Fc) обеспечивал стабильную экспрессию (рис. 3а), особенно в клетках миобластов C2C12 (до 19.5 мкг/мл), что косвенно подтверждает его эффективность для мышечной ткани. scAAV-DJ-CMV-B11-Fc обеспечивал средний уровень экспрессии антитела в клетках CHO-S и HEK293, но самый низкий уровень в C2C12. При этом не было показано экспрессии антитела при трансдукции контрольным вектором

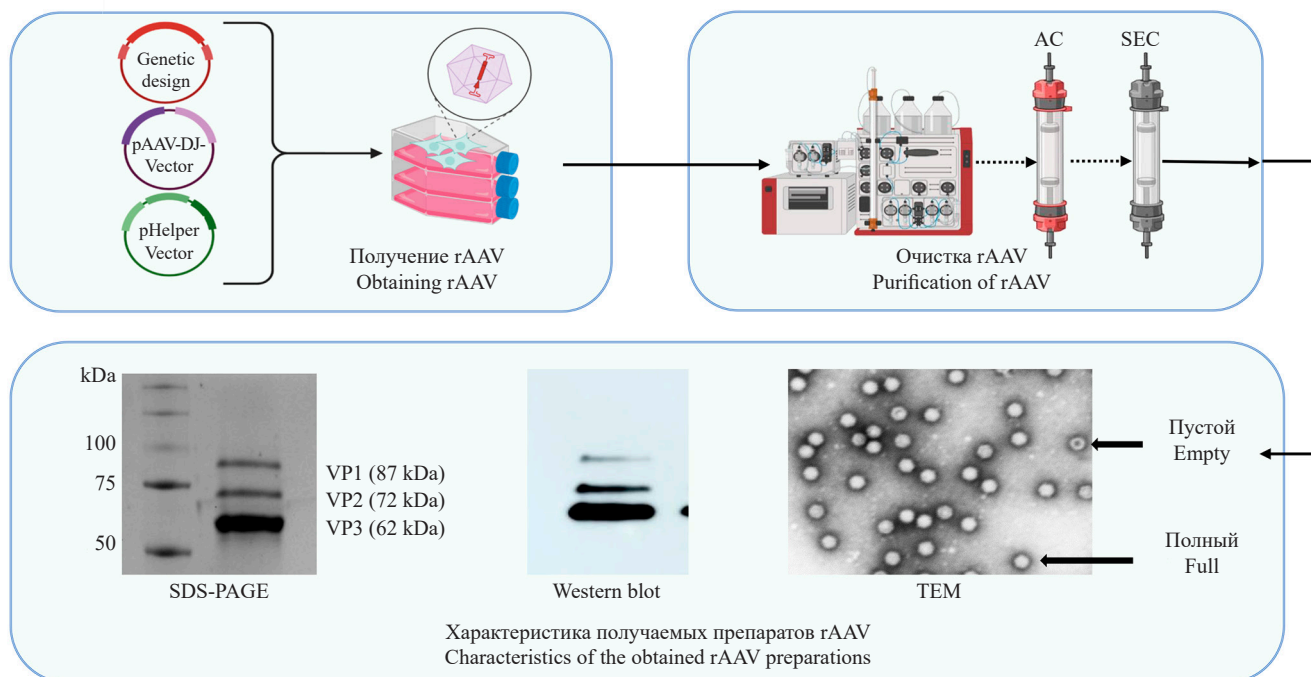


Рис. 2. Краткая схема процесса получения препарата rAAV. AC — аффинная хроматография (affinity chromatography), SEC — эксклюзионная хроматография (size-exclusion chromatography), SDS-PAGE — электрофорез в полиакриламидном геле, VP1, VP2, VP3 — структурные белки аденоассоциированного вируса, TEM — трансмиссионная электронная микроскопия

Fig. 2. Brief scheme of the rAAV preparation process. AC is affinity chromatography, SEC is size-exclusion chromatography, SDS-PAGE is polyacrylamide gel electrophoresis, VP1, VP2, VP3 are structural proteins of adeno-associated virus, TEM is transmission electron microscopy

(rAAV-DJ-CMV-EGFP). Таким образом, препарат rAAV-DJ-CMV-B11-Fc обеспечивает высокий уровень экспрессии B11-Fc в клетках CHO-S и HEK293, а препарат rAAV-DJ-CASI-B11 — в клетках C2C12, тогда как препарат scAAV-DJ-CMV-B11-Fc обеспечивает средний уровень экспрессии в клетках CHO-S и HEK293 и низкий уровень экспрессии в клетках C2C12.

Выбор клеточных линий был обусловлен тем, что препараты генетической пассивной иммунизации на основе rAAV обычно вводятся внутримышечно с целью обеспечения длительной продукции антител в организме, за счет низкой митотической активности мышечной ткани. Чем менее интенсивно делятся клетки, тем дольше rAAV способен персистировать в виде эпизом и экспрессировать трансген [12, 16, 17].

Таким образом, для косвенной оценки эффективности конструкций *in vitro* были выбраны клетки миобластов линии C2C12 как модель мышечной ткани. Клеточная линия HEK293 была использована в качестве альтернативной модели для изучения уровня экспрессии полученных rAAV-конструкций в других типах клеток, в частности в эпителиальных. Клетки линии CHO-S были выбраны на основании их высокой эффективности для продукции антител,

в том числе модифицированных однодоменных антител [6, 21].

В ходе эксперимента было показано, что конструкция rAAV-DJ-CASI-B11-Fc обладает наибольшей эффективностью в клетках миобластов, что соответствует данным литературы [14, 18]. В то же время наибольшую экспрессию в клетках HEK293 и CHO-S показала конструкция rAAV-DJ-CMV-B11-Fc несмотря на то, что предполагалась более высокая экспрессия у конструкции scAAV-DJ-CMV-B11-Fc за счет более эффективной трансдукции. Гипотеза о преимуществе самокомплементарных rAAV в нашем эксперименте не подтвердилась, т.к. конструкция scAAV-DJ-CMV-B11-Fc обеспечила наименьший уровень продукции антител B11-Fc, что может быть обусловлено отсутствием в конструкции последовательности энхансера.

Для оценки экспрессии B11-Fc *in vivo* мышам BALB/c вводили по 10^{11} гк rAAV-конструкций: rAAV-DJ-CMV-B11-Fc, rAAV-DJ-CASI-B11-Fc, scAAV-DJ-CMV-B11-Fc, а также отрицательный контроль rAAV-DJ-CMV-EGFP (по 8 животных в группе). Сыворотку отбирали на 1, 2, 3, 7, 14, 21, 28, 56, 62, 84, 112, 120, 140, 149, 168, 184 сутки после инъекции различными вариантами rAAV. Доза препаратов была выбрана исходя из данных

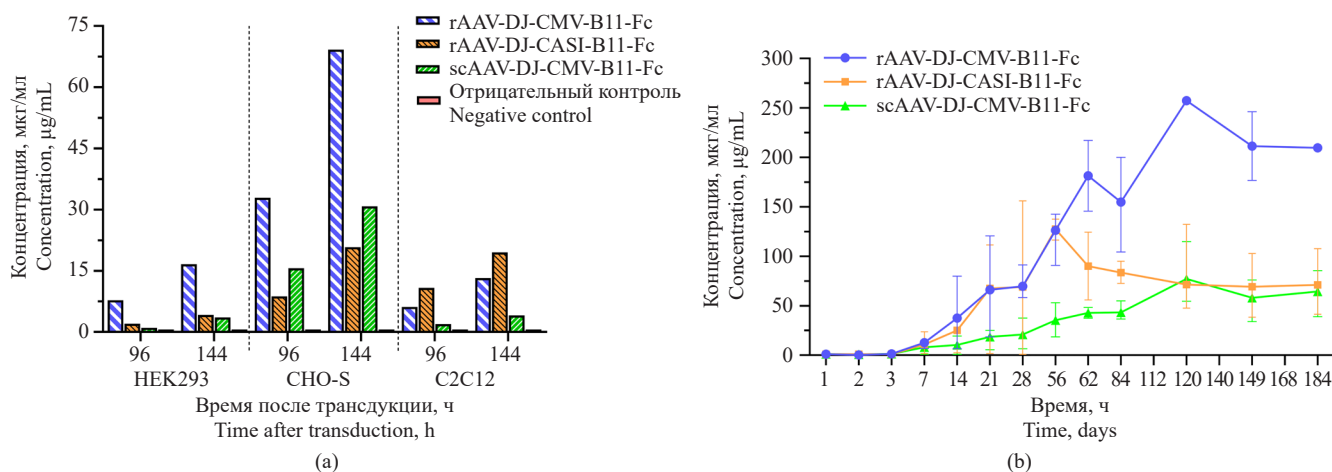


Рис. 3. Концентрация антител B11-Fc (мкг/мл): (а) в культуральной жидкости после трансдукции rAAV; (б) в сыворотке крови мышей, в различные промежутки времени после инъекции препаратов rAAV

Fig. 3. Concentration of B11-Fc antibodies (μg/mL): (a) in culture fluid after rAAV transduction; (b) in mouse serum, at different time points after rAAV injection

предыдущих исследований [3]. Экспрессия B11-Fc начиналась уже через сутки во всех группах. Максимальная концентрация отмечена в группе CMV-вектора — >250 мкг/мл на 120-й день с сохранением ~230 мкг/мл до 184-х суток. CASI-вектор обеспечивал до 120 мкг/мл (пик на 56 сутки), с последующей стабилизацией на уровне ~80 мкг/мл. У scAAV концентрация достигала ~75 мкг/мл к 120 дню и оставалась стабильной (рис. 3b). В группе животных, которым вводился контрольный вектор (rAAV-DJ-CMV-EGFP), специфический сигнал BLI не детектировался (на графике не представлены).

Таким образом, данные *in vitro* исследований на клетках C2C12 не вполне могут отражать экспрессию трансгена в составе rAAV при внутримышечном введении *in vivo*. По совокупности приведенных выше данных *in vivo* можно сделать предварительный вывод о перспективности конструкции rAAV-DJ-CMV-B11-Fc для доставки и экспрессии гена антитела B11-Fc.

В результате, все исследованные конструкции обеспечивают значительный уровень экспрессии гена и продукцию антитела B11-Fc как *in vitro*, так и *in vivo*. Однако конструкция rAAV-DJ-CMV-B11-Fc демонстрирует наилучшие результаты, что коррелирует с данными о защитной активности препаратов *in vivo*, описанных в следующем разделе.

Оценка защитной способности rAAV-B11-Fc *in vivo*

В эксперименте оценивали способность различных rAAV-конструкций, экспрессирующих однодоменное антитело B11-Fc, защищать мышей от токсина

BoNT/A. Эффективность терапевтических антител оценивали по уровню выживаемости животных после введения токсина. Мышам вводили по 10^{11} гк rAAV, а затем через разные промежутки времени внутрибрюшинно вводили разные дозы токсина BoNT/A. Результаты исследования представлены на рис. 4.

Уже через 24 ч rAAV-DJ-CASI-B11-Fc и scAAV-DJ-CMV-B11-Fc обеспечивали 100% выживаемость от 5 и 10 LD₅₀, в то время как rAAV-DJ-CMV-B11-Fc демонстрировал ~60% выживаемость. Через 48 ч все конструкции, включая rAAV-DJ-CMV-B11-Fc, показали 100% защиту при дозах до 20 LD₅₀, однако при 30 LD₅₀ rAAV-DJ-CMV-B11-Fc защищал только 80% животных. На 10-е сутки после введения все препараты обеспечивали полную защиту при дозах до 150 LD₅₀. Через 78 суток CMV-вектор сохранял 100% протективность даже при 1000 LD₅₀, тогда как rAAV-DJ-CASI-B11-Fc и scAAV-DJ-CMV-B11-Fc продемонстрировали эффективность только против 800 LD₅₀.

В качестве положительного контроля использовали животных, которым внутримышечно вводили очищенный препарат B11-Fc в дозе, обеспечивающей защиту от токсина BoNT/A [6]. Введение исследуемых rAAV-препаратов приводило к выраженному защитному эффекту против интоксикации, что проявлялось в выживаемости и отсутствии признаков интоксикации у животных. В то же время в группах отрицательного контроля (введение физиологического раствора) наблюдалась 100%-ная гибель животных.

Полученные данные подтверждают возможность индукции длительной защиты против BoNT/A

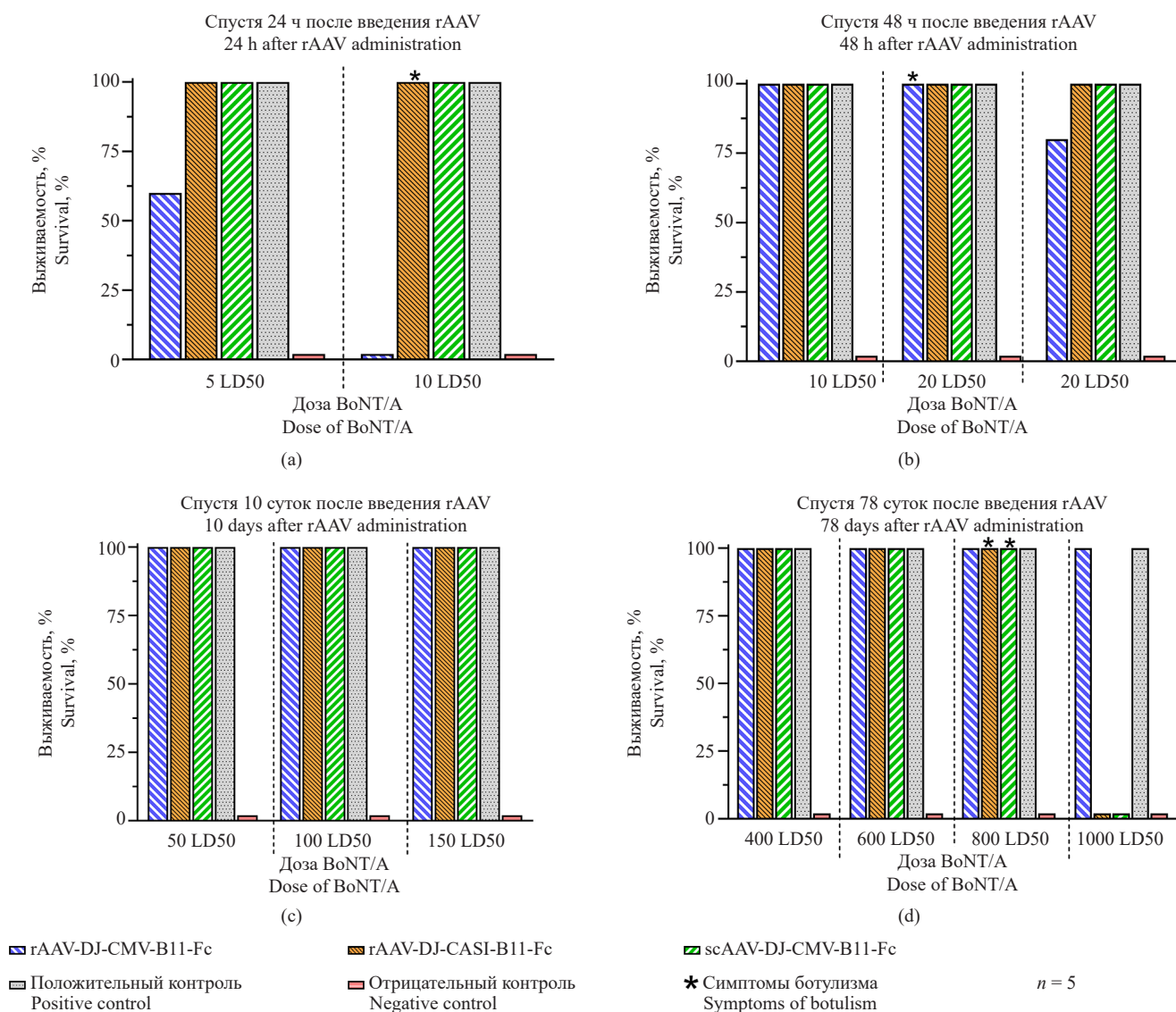


Рис. 4. Протективная активность препаратов rAAV, экспрессирующих нейтрализующее антитело B11-Fc при введении различных доз BoNT/A в различные сроки. Представлена выживаемость животных (%) при интоксикации различными дозами BoNT/A (в LD₅₀) через 24 ч (а), 48 ч (б), 10 суток (в) и 78 суток (г) после введения rAAV. Звездочкой (*) отмечены группы с симптомами ботулизма, количество животных *n* = 5 для каждой группы

Fig. 4. Protective activity of rAAV drugs expressing neutralizing antibody B11-Fc when different doses of BoNT/A were administered at different times. The survival rate of animals (%) is shown when intoxicated with different doses of BoNT/A (in LD₅₀) 24 h (a), 48 h (b), 10 days (c), and 78 days (d) after rAAV administration. The groups with botulism symptoms are marked with an asterisk (*); the number of animals was *n* = 5 for each group

однократным внутримышечным введением препаратов rAAV, экспрессирующих ген антитела B11-Fc. При этом показано, что rAAV-DJ-CMV-B11-Fc обладает более выраженной активностью против экстремально высоких доз ботулотоксина начиная с 2–3 месяцев после введения. Менее обнадеживающие данные о защитной активности rAAV-DJ-CMV-B11-Fc [3] могут быть обусловлены различиями в схеме очистки препарата, как описано в предыдущей главе. В свою очередь препараты rAAV-DJ-CASI-B11-Fc и scAAV-DJ-CMV-B11-Fc могут быть потенциально использованы, в том

числе, для экстренной профилактики ботулизма, так как обеспечивают защиту уже через 24 ч после введения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе был проведен сравнительный анализ трех rAAV-конструкций, экспрессирующих модифицированное однодоменное антитело B11-Fc против ботулинического нейротоксина типа A (BoNT/A).

Полученные данные демонстрируют, что дизайн rAAV-вектора, включая форму генома и тип

промотора, оказывает ключевое влияние на уровень экспрессии трансгена, длительность защитного эффекта. Конструкции rAAV-CMV-B11-Fc и rAAV-CASI-B11-Fc перспективны для длительной пассивной иммунизации. Вектор scAAV-CMV-B11-Fc может применяться в условиях, требующих ранней экспрессии и защиты в режиме экстренной профилактики.

Вклад авторов

Е.И. Рябова — постановка экспериментов по трансфекции и экспрессии в клеточных линиях HEK293, CHO-S и C2C12; сбор и анализ данных; написание текста рукописи.

А.А. Деркаев — постановка и анализ экспериментов *in vivo* на модели ботулизма; оценка защитного эффекта; сбор и анализ данных.

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

М.А. Довгий — разработка и клонирование конструкций rAAV, экспрессирующих однодоменное антитело B11-Fc.

А.А. Блинов — анализ прототипов методами Western blot, SDS-PAGE; обработка экспериментальных данных.

Р.М. Хоссанин — количественная оценка продукции антител в культуральной жидкости; обработка экспериментальных данных.

О.Е. Дмитриев — хроматографическая очистка векторов; анализ свойств препаратов.

Д.С. Полянский — подготовка графиков; иллюстраций и структурных схем конструкций; участие в написании и оформлении рукописи.

А.Н. Носков — концепция исследования; получение и очистка ботулинического токсина А.

Д.В. Щебляков — дизайн генетической конструкции, экспрессирующей однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом; руководство исследованиями.

Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург — руководство исследованиями; окончательное утверждение версии статьи для публикации.

Authors' contributions

E.I. Ryabova — performing transfection and expression experiments in HEK293, CHO-S, and C2C12 cell lines; data collection and analysis; writing the manuscript text.

A.A. Derkaev — performing *in vivo* experiments on the botulism model; evaluating protective efficacy; data collection and analysis.

I.B. Esmagambetov — general supervision; revising the manuscript text; approval of the final version of the manuscript for publication.

M.A. Dovgiy — development and cloning of rAAV constructs expressing the B11-Fc single-domain antibody.

A.A. Blinov — analysis of prototypes using Western blot and SDS-PAGE; processing experimental data.

R.M. Hossain — quantitative evaluation of antibody production in culture supernatant; processing experimental data.

O.E. Dmitriev — chromatographic purification of vectors; analysis of drug properties.

D.S. Polyansky — preparation of figures, illustrations, and structural diagrams of constructs; participation in writing and formatting the manuscript.

A.N. Noskov — research concept; isolation and purification of botulinum toxin in type A.

D.V. Shcheblyakov — design of the genetic construct expressing the single-domain antibody fused to an Fc fragment; research supervision.

D.Y. Logunov, A.L. Gintsburg — research supervision; 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

1. Laursen N.S., Friesen R.H., Zhu X., Jongeneelen M., Blokland S., Vermond J., Van Eijgen A., Tang C., Van Diepen H., Obmolova G., van der Neut Kolfschoten M., et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science*. 2018;362(6414):598–602. <https://doi.org/10.1126/science.aag0620>
2. Esmagambetov I.B., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Shcheblyakov D.V., Dolzhikova I.V., Favorskaya I.A., et al. 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>
3. 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>
4. Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Ugriumova G.A., Solovyev A.I., Esmagambetov I.B., et al. Camelid VHHs fused to human fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin a in mice. *Toxins*. 2019;11(8):464. <https://doi.org/10.3390/toxins11080464>

REFERENCES

1. Laursen N.S., Friesen R.H., Zhu X., Jongeneelen M., Blokland S., Vermond J., Van Eijgen A., Tang C., Van Diepen H., Obmolova G., van der Neut Kolfschoten M., et al. Universal protection against influenza infection by a multidomain antibody to influenza hemagglutinin. *Science*. 2018;362(6414):598–602. <https://doi.org/10.1126/science.aag0620>
2. Esmagambetov I.B., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Shcheblyakov D.V., Dolzhikova I.V., Favorskaya I.A., et al. 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>
3. 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>
4. Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Ugriumova G.A., Solovyev A.I., Esmagambetov I.B., et al. Camelid VHHs fused to human fc fragments provide long term protection against botulinum neurotoxin a in mice. *Toxins*. 2019;11(8):464. <https://doi.org/10.3390/toxins11080464>

- Рябова Е.И., Деркаев А.А., Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Довгий М.А., Бырихина Д.В., Прокофьев В.В., Чемоданова И.П. Сравнение различных технологий получения рекомбинантного аденоассоциированного вируса в лабораторном масштабе. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2021;21(4):266–278. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>
- Деркаев А.А., Рябова Е.И., Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., Носков А.Н., Виноградова И.Д., Прокофьев В.В., Полянский Д.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Кандидатный препарат на основе модифицированных однодоменных антител для терапии ботулизма, вызванного ботулиническим токсином типа А. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2025;25(1):58–70. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591>
- Cabrera A., Edelstein H.I., Glykofrydis F., Love K.S., Palacios S., Tycko J., Zhang M., Lensch S., Shields C.E., Livingston M., Weiss R., et al. The sound of silence: Transgene silencing in mammalian cell engineering. *Cell Syst*. 2022;13(12):950–973. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2022.11.005>
- Xu L., Daly T., Gao C., Flotte T.R., Song S., Byrne B.J., Sands M.S., Ponder K.P. CMV- β -actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 α promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Human Gene Ther*. 2001;12(5):563–573. <https://doi.org/10.1089/104303401300042500>
- Wang L., Bell P., Somanathan S., Wang Q., He Z., Yu H., McMenamin D., Goode T., Calcedo R., Wilson J.M. Comparative study of liver gene transfer with AAV vectors based on natural and engineered AAV capsids. *Mol. Ther*. 2015;23(12):1877–1887. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.179>
- Choi V.W., McCarty D.M., Samulski R.J. AAV hybrid serotypes: Improved vectors for gene delivery. *Curr. Gene Ther*. 2005;5(3):299–310. <https://doi.org/10.2174/1566523054064968>
- Wang D., Tai P.W., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Rev. Drug Discov*. 2019;18(5):358–378. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
- Brydon E.M., Bronstein R., Buskin A., Lako M., Pierce E.A., Fernandez-Godino R. AAV-mediated gene augmentation therapy restores critical functions in mutant PRPF31^{+/-} iPSC-derived RPE cells. *Mol. Ther. Methods Clin. Develop*. 2019;15:392–402. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.10.014>
- Xing M., Wang X., Chi Y., Zhou D. Gene therapy for colorectal cancer using adenovirus-mediated full-length antibody, cetuximab. *Oncotarget*. 2016;7(19):28262. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8596>
- Hollidge B.S., Carroll H.B., Qian R., Fuller M.L., Giles A.R., Mercer A.C., Danos O., Liu Y., Bruder J.T., Smith J.B. Kinetics and durability of transgene expression after intrastriatal injection of AAV9 vectors. *Front. Neurol*. 2022;13:1051559. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1051559>
- McCarty D.M. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol. Ther*. 2008;16(10):1648–1656. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.171>
- Yokoi K., Kachi S., Zhang H.S., Gregory P.D., Spratt S.K., Samulski R.J., Campochiaro P.A. Ocular gene transfer with self-complementary AAV vectors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science (IOVS)*. 2007;48(7):3324–3328. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1306>
- Rincon M.Y., de Vin F., Duqué S.I., Fripont S., Castaldo S.A., Bouhuijzen-Wenger J., Holt M.G. Widespread transduction of astrocytes and neurons in the mouse central nervous system after systemic delivery of a self-complementary AAV-PHPB vector. *Gene Ther*. 2018;25(2):83–92. <https://doi.org/10.1038/s41434-018-0005-z>
- Ryabova E.I., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Dovgiy M.A., Byrikhina D.V., Prokofiev V.V., Chemodanova I.P. Comparison of different technologies for producing recombinant adeno-associated virus on a laboratory scale. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2021;21(4):266–278 (in Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2021-21-4-266-278>
- Derkaev A.A., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Prokofiev V.V., Polyansky D.S., Logunov D.Y., Gintsburg A.L. A modified single-domain antibody candidate for the treatment of botulism caused by botulinum toxin type A. *BIOPreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie = BIOPreparations. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2025;25(1):58–70 (in Russ.). <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591>
- Cabrera A., Edelstein H.I., Glykofrydis F., Love K.S., Palacios S., Tycko J., Zhang M., Lensch S., Shields C.E., Livingston M., Weiss R., et al. The sound of silence: Transgene silencing in mammalian cell engineering. *Cell Syst*. 2022;13(12):950–973. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2022.11.005>
- Xu L., Daly T., Gao C., Flotte T.R., Song S., Byrne B.J., Sands M.S., Ponder K.P. CMV- β -actin promoter directs higher expression from an adeno-associated viral vector in the liver than the cytomegalovirus or elongation factor 1 α promoter and results in therapeutic levels of human factor X in mice. *Human Gene Ther*. 2001;12(5):563–573. <https://doi.org/10.1089/104303401300042500>
- Wang L., Bell P., Somanathan S., Wang Q., He Z., Yu H., McMenamin D., Goode T., Calcedo R., Wilson J.M. Comparative study of liver gene transfer with AAV vectors based on natural and engineered AAV capsids. *Mol. Ther*. 2015;23(12):1877–1887. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.179>
- Choi V.W., McCarty D.M., Samulski R.J. AAV hybrid serotypes: Improved vectors for gene delivery. *Curr. Gene Ther*. 2005;5(3):299–310. <https://doi.org/10.2174/1566523054064968>
- Wang D., Tai P.W., Gao G. Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery. *Nature Rev. Drug Discov*. 2019;18(5):358–378. <https://doi.org/10.1038/s41573-019-0012-9>
- Brydon E.M., Bronstein R., Buskin A., Lako M., Pierce E.A., Fernandez-Godino R. AAV-mediated gene augmentation therapy restores critical functions in mutant PRPF31^{+/-} iPSC-derived RPE cells. *Mol. Ther. Methods Clin. Develop*. 2019;15:392–402. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2019.10.014>
- Xing M., Wang X., Chi Y., Zhou D. Gene therapy for colorectal cancer using adenovirus-mediated full-length antibody, cetuximab. *Oncotarget*. 2016;7(19):28262. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8596>
- Hollidge B.S., Carroll H.B., Qian R., Fuller M.L., Giles A.R., Mercer A.C., Danos O., Liu Y., Bruder J.T., Smith J.B. Kinetics and durability of transgene expression after intrastriatal injection of AAV9 vectors. *Front. Neurol*. 2022;13:1051559. <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1051559>
- McCarty D.M. Self-complementary AAV vectors; advances and applications. *Mol. Ther*. 2008;16(10):1648–1656. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.171>
- Yokoi K., Kachi S., Zhang H.S., Gregory P.D., Spratt S.K., Samulski R.J., Campochiaro P.A. Ocular gene transfer with self-complementary AAV vectors. *Investigative Ophthalmology & Visual Science (IOVS)*. 2007;48(7):3324–3328. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-1306>
- Rincon M.Y., de Vin F., Duqué S.I., Fripont S., Castaldo S.A., Bouhuijzen-Wenger J., Holt M.G. Widespread transduction of astrocytes and neurons in the mouse central nervous system after systemic delivery of a self-complementary AAV-PHPB vector. *Gene Ther*. 2018;25(2):83–92. <https://doi.org/10.1038/s41434-018-0005-z>

18. Wu T., Töpfer K., Lin S.W., Li H., Bian A., Zhou X.Y., High K.A., Ertl H.C. Self-complementary AAVs induce more potent transgene product-specific immune responses compared to a single-stranded genome. *Mol. Ther.* 2012;20(3):572–579. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.280>
19. McCarty D.M., Monahan P.E., Samulski R.J. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 2001;8(16):1248–1554. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301514>
20. Katada Y., Kobayashi K., Tsubota K., Kurihara T. Evaluation of AAV-DJ vector for retinal gene therapy. *Peer J.* 2019;7:e6317. <https://doi.org/10.7717/peerj.6317>
21. Полянский Д.С., 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>
18. Wu T., Töpfer K., Lin SW., Li H., Bian A., Zhou X.Y., High K.A., Ertl H.C. Self-complementary AAVs induce more potent transgene product-specific immune responses compared to a single-stranded genome. *Mol. Ther.* 2012;20(3):572–579. <https://doi.org/10.1038/mt.2011.280>
19. McCarty D.M., Monahan P.E., Samulski R.J. Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther.* 2001;8(16):1248–1554. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3301514>
20. Katada Y., Kobayashi K., Tsubota K., Kurihara T. Evaluation of AAV-DJ vector for retinal gene therapy. *Peer J.* 2019;7:e6317. <https://doi.org/10.7717/peerj.6317>
21. 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. *Fine Chem. Technol.* 2024;19(3): 240–257. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2024-19-3-240-257>

Об авторах

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>

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>

Довгий Михаил Андреевич, 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: imhail@yandex.ru. ResearcherID AFV-2114-2022, SPIN-код РИНЦ 4033-2216, <https://orcid.org/0000-0002-0017-7784>

Блинов Антон Анатольевич, лаборант исследователь, лаборатория 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: blinow.t@gmail.com. ResearcherID OCL-6033-2025, <https://orcid.org/0009-0005-9866-7376>

Хоссани Роза Махбубовна, младший научный сотрудник, лаборатория 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: xossain2013@gmail.com. ResearcherID OCL-6134-2025, <https://orcid.org/0009-0009-4483-2697>

Дмитриев Олег Евгеньевич, ведущий инженер, лаборатория 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: d.e.oleg.work@gmail.com. ResearcherID ODJ-2714-2025, <https://orcid.org/0000-0003-3709-8358>

Полянский Дмитрий Сергеевич, ассистент, кафедра аналитической химии им. И.П. Алимарины, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119454, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 78). E-mail: polanskiydmityriy15@gmail.com. Scopus Author ID 57890564200, <https://orcid.org/0000-0003-0792-7063>

Носков Анатолий Николаевич, д.б.н., ведущий 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: a_n_noskov@mail.ru. Scopus Author ID 7005685081

Щебляков Дмитрий Викторович, д.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель отдела генетики и молекулярной биологии бактерий, 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>

Логунов Денис Юрьевич, д.б.н., академик Российской академии наук, заместитель директора по научной работе, 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: ldy78@yandex.ru. Scopus Author ID 22835557900, ResearcherID E-8300-2014, SPIN-код РИНЦ 4000-4717, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Гинцбург Александр Леонидович, академик Российской академии наук, академик Российской академии медицинских наук, д.б.н., профессор, директор 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: gintsburg@gamaleya.org. Scopus Author ID 7005111491, SPIN-код РИНЦ 7626-0373, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>

About the Authors

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, RSCI SPIN-code 9339-9440, <https://orcid.org/0000-0003-3776-3856>

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, RSCI SPIN-code 8132-2320, <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Mikhail A. Dovgiy, 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: inhail@yandex.ru. ResearcherID AFV-2114-2022, RSCI SPIN-code 4033-2216, <https://orcid.org/0000-0002-0017-7784>

Anton A. Blinov, Laboratory Research Assistant, 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: blinov.t@gmail.com. ResearcherID OCL-6033-2025, <https://orcid.org/0009-0005-9866-7376>

Roza M. Hossain, Junior Researcher, 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: xossain2013@gmail.com. ResearcherID OCL-6134-2025, <https://orcid.org/0009-0009-4483-2697>

Oleg E. Dmitriev, Leading Engineer, 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: d.e.oleg.work@gmail.com. ResearcherID ODJ-2714-2025, <https://orcid.org/0000-0003-3709-8358>

Dmitry S. Polyansky, Assistant Professor, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (78, Vernadskogo pr., Moscow, 119545, Russia). E-mail: polanskiydmityriy15@gmail.com. Scopus Author ID 57890564200, <https://orcid.org/0000-0003-0792-7063>

Anatoly N. Noskov, Dr. Sci. (Biol.), Leading 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: a_n_noskov@mail.ru. Scopus Author ID 7005685081

Dmitry V. Shcheblyakov, Dr. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Head of the Department of Genetics and Molecular Biology of Bacteria, 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, RSCI SPIN-code 6357-2725, <https://orcid.org/0000-0002-1289-3411>

Denis Y. Logunov, Academician at the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Deputy Director for Research, 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: ldy78@yandex.ru. Scopus Author ID 22835557900, ResearcherID E-8300-2014, RSCI SPIN-code 4000-4717, <https://orcid.org/0000-0003-4035-6581>

Alexander L. Gintsburg, Academician at the Russian Academy of Sciences, Academician at the Russian Academy of Medical Sciences, Dr. Sci. (Biol.), Professor, Director of the 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: gintsburg@gamaleya.org. Scopus Author ID 7005111491, RSCI SPIN-code 7626-0373, <https://orcid.org/0000-0003-1769-5059>