

УДК 60


<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2026-21-2-188-211>

EDN LAJHYG



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

## Разработка и масштабирование технологии хроматографической очистки однодоменных антител, слитых с Fc-фрагментом IgG1 человека

Д.С. Полянский<sup>1</sup>, В.В. Прокофьев<sup>2</sup>, А.В. Саморукова<sup>2</sup>, Ф.А. Шишконоков<sup>2</sup>, Д.В. Васильев<sup>2</sup>, Е.И. Рябова<sup>2</sup>, А.А. Деркаев<sup>2</sup>, А.И. Государев<sup>2</sup>, Ю.А. Ефимова<sup>1</sup>, Д.В. Щебляков<sup>2</sup>, А.П. Карпов<sup>2</sup>, И.Б. Есмагамбетов<sup>2</sup>

<sup>1</sup> МИРЭА — Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва, 119454 Россия

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

 Автор для переписки, e-mail: [polanskiydmityriy15@gmail.com](mailto:polanskiydmityriy15@gmail.com)

### Аннотация

**Цели.** Разработать технологию хроматографической очистки для препаратов на основе модифицированных однодоменных антител, специфичных к вирусу SARS-CoV-2. Подобрать оптимальные параметры процесса очистки и масштабировать данную технологию на производстве.

**Методы.** Исследование проводилось на культуре клеток яичников китайского хомячка CHO GAMP2C5 клон 78, CHO B5 клон 4, CHO B10 клон 4, продуцирующих модифицированные однодоменные антитела GAMP2C5, GAMB5, GAMB10 соответственно. Хроматографическая очистка проводилась с применением хроматографов АКТА Pure 25 и АКТА Pilot 600s. Контроль качества полученных препаратов был осуществлен при помощи высокоэффективной жидкостной хроматографии, капиллярного гель-электрофореза, динамического рассеяния света, иммуноферментного анализа, полимеразной цепной реакции.

**Результаты.** Мультимодальная хроматография с применением сорбента Ca<sup>++</sup>Pure-NA (*TOSOH*, Япония) на основе керамического гидроксипатита 1 типа позволяет эффективно избавляться от агрегированных форм антитела. Препараты, полученные после хроматографии с применением сорбента Ca<sup>++</sup>Pure-NA на основе керамического гидроксипатита 1, имеют чистоту более 97%. Разработанная технология очистки была масштабирована до очистки объемом 200 л культуральной жидкости после культивирования в биореакторе STR 200.

**Выводы.** Разработана технология очистки модифицированных однодоменных антител с применением мультимодального сорбента Ca<sup>++</sup>Pure-NA на основе керамического гидроксипатита 1 типа, позволяющая эффективно избавляться от низкомолекулярных примесей и агрегированных форм антитела. Полученные с помощью разработанной технологии антитела характеризуются высокой степенью чистоты, отсутствием различных примесей (остаточного белка штамма продуцента, остаточного белка А и остаточного ДНК штамма продуцента), а также обладают гидродинамическим радиусом молекул, соответствующим теоретическому значению мономерной форм антител.

### Ключевые слова

хроматографическая очистка, керамический гидроксипатит 1 типа, мультимодальная хроматография, разработка технологии очистки, масштабирование

**Поступила:** 15.01.2026

**Доработана:** 11.02.2026

**Принята в печать:** 16.03.2026

### Для цитирования

Полянский Д.С., Прокофьев В.В., Саморукова А.В., Шишконоков Ф.А., Васильев Д.В., Рябова Е.И., Деркаев А.А., Государев А.И., Ефимова Ю.А., Щебляков Д.В., Карпов А.П., Есмагамбетов И.Б. Разработка и масштабирование технологии хроматографической очистки однодоменных антител, слитых с Fc-фрагментом IgG1 человека. *Тонкие химические технологии*. 2026;21(2):188–211. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2026-21-2-188-211>

## RESEARCH ARTICLE

# Development and scaling of a chromatographic purification technology for single-domain antibodies fused to the Fc fragment of human IgG1

Dmitry S. Polyansky<sup>1</sup>, Vladimir V. Prokofiev<sup>2</sup>, Alexandra V. Samorukova<sup>2</sup>, Fedor A. Shishkonakov<sup>2</sup>, Dmitry V. Vasiliev<sup>2</sup>, Ekaterina I. Ryabova<sup>2</sup>, Artem A. Derkaev<sup>2</sup>, Andrey I. Gosudarev<sup>2</sup>, Yuliya A. Efimova<sup>1</sup>, Dmitry V. Shcheblyakov<sup>2</sup>, Andrey P. Karpov<sup>2</sup>, Ilyas B. Esmagambetov<sup>2</sup>

<sup>1</sup> MIREA — Russian Technological University (M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119454 Russia

<sup>2</sup> N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

✉ Corresponding author; e-mail: [polanskiydmityri15@gmail.com](mailto:polanskiydmityri15@gmail.com)

### Abstract

**Objectives.** The work set out to develop a chromatographic purification technology for drugs based on modified single-domain antibodies specific to the SARS-CoV-2 virus, as well as to select the optimal parameters for the purification process and scale up this technology for production.

**Methods.** The study was conducted on a culture of Chinese hamster ovary (CHO) cells GAMP2C5 clone 78, CHO B5 clone 4, and CHO B10 clone 4, which were used to produce modified single-domain antibodies GAMP2C5, GAMB5, and GAMB10, respectively. Chromatographic purification was performed using AKTA pure 25 and AKTA Pilot 600s chromatographs. Quality control of the obtained drugs was carried out using high-performance liquid chromatography, capillary gel electrophoresis, dynamic light scattering, enzyme-linked immunosorbent assay, and polymerase chain reaction.

**Results.** Multimodal chromatography using CA<sup>++</sup>Pure-HA (TOSOH, Japan) resin based on type 1 ceramic hydroxyapatite can be effectively used for the removal of aggregated antibody forms. The drugs obtained after chromatography using CA<sup>++</sup>Pure-HA resin based on type 1 ceramic hydroxyapatite have a purity of more than 97%. The developed purification technology was scaled up to purify 200 L of culture fluid after cultivation in an STR 200 bioreactor.

**Conclusions.** The described technology developed for purifying modified mono-domain antibodies using the CA<sup>++</sup>Pure-HA multimodal resin based on type 1 ceramic hydroxyapatite allows for the effective removal of low-molecular-weight impurities and aggregated forms of the antibody. The antibodies obtained using the developed technology are characterized by a high degree of purity and the absence of various impurities (residual protein of the producer strain, residual protein A, and residual DNA of the producer strain), as well as offering a hydrodynamic molecular radius corresponding to the theoretical value of monomeric forms of antibodies.

### Keywords

chromatographic purification, type 1 karmic hydroxyapatite, multimodal chromatography, purification technology development, scaling

**Submitted:** 15.01.2026

**Revised:** 11.02.2026

**Accepted:** 16.03.2026

### For citation

Polyansky D.S., Prokofiev V.V., Samorukova A.V., Shishkonakov F.A., Vasiliev D.V., Ryabova E.I., Derkaev A.A., Gosudarev A.I., Efimova Yu.A., Shcheblyakov D.V., Karpov A.P., Esmagambetov I.B. Development and scaling of a chromatographic purification technology for single-domain antibodies fused to the Fc fragment of human IgG1. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2026;21(2):188–211. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2026-21-2-188-211>

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время многие фармацевтические компании имеют в своем портфеле разработки ряда моноклональных антител, поскольку они находят широкое применение в терапии и профилактике различных заболеваний. Помимо 100 зарегистрированных препаратов на основе антител, около 250 находятся на различных этапах клинических исследований [1–11]. Поскольку терапевтические антитела востребованы в клинической практике и подходы их применения постоянно расширяются, целесообразным является оптимизация и усовершенствование технологии их получения. Технология производства моноклональных антител включает 2 основных этапа: культивирование клеток и хроматографическая очистка. Пример разработки технологии культивирования клеток был описан ранее [12]. Процесс очистки антител начинается с фильтрации культуральной жидкости с использованием глубинных и мембранных фильтров для отделения среды, содержащей моноклональные антитела, от клеток хозяина [13]. Классическая технология хроматографической очистки состоит из 3-х этапов. Стандартным первым этапом при очистке моноклональных антител является аффинная хроматография на белке А или реже белке G, которая позволяет избавиться от большей части примесей за счет высокой селективности сорбента. Принцип метода основан на взаимодействии Fc-фрагмента антитела с белком А с высокой селективностью. Таким образом, моноклональные антитела, находящиеся в культуральной жидкости, связываются с белком А и остаются на сорбенте, в то время как все примесные компоненты остаются в несвязанном виде и вытесняются при промывке колонны. Одним из возможных этапов промежуточной очистки антител является анионообменная хроматография. Данный этап необходим для высокоэффективной очистки препаратов от ДНК, вирусов, эндотоксинов и кислых белков клеток-хозяина. Процесс осуществляется за счет взаимодействия зарядов молекул разделяемых веществ и противоположных зарядов активных групп сорбента, ковалентно связанных с хроматографической матрицей [14].

Для того чтобы провести финальную стадию «полировки» от близкородственных примесей (агрегатов, протеолитических расщепленных фрагментов антитела, заряженных форм целевого антитела) обычно применяют эксклюзионную или мультимодальную хроматографии. Данный метод разделяет антитела в зависимости от их размера и позволяет выделить мономерную фракцию, отделенную от агрегатов, а также от расщепленных фрагментов антител. Однако данный тип хроматографии

(эксклюзионная хроматография) является трудно масштабируемым в рамках производства. При масштабировании технологии очистки обычно применяют мультимодальные сорбенты. Одним из наиболее интересных сорбентов является Ca<sup>++</sup>Pure-НА (*TOSOH*, Япония) на основе керамического гидроксипатита, который позволяет разделять агрегаты от мономеров на основании их заряда, а также ван-дер-ваальсовых сил.

В Национальном исследовательском центре эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства Здравоохранения Российской Федерации (НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России) были получены различные однодоменные антитела, слитые с Fc-фрагментом человеческого иммуноглобулина класса G1, обладающее широким спектром вируснейтрализующей активности в отношении различных вирусов [15–23]. В данной статье описана разработка технологии хроматографической очистки для антител специфичных к вирусу SARS-CoV-2. Были подобраны оптимальные условия для отделения целевой фракции антитела от примесей и разработана система проверки чистоты полученных препаратов. Разработанная технология хроматографической очистки может быть применима для разных однодоменных антител, содержащих вариабельные домены с разными специфичностями. Благодаря технологии очистки три различных препарата против вируса SARS-CoV-2 показали чистоту более 98% и находятся на различных стадиях клинических испытаний.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Клеточная линия

В работе были использованы следующие клеточные линии:

- культура клеток яичников китайского хомячка (Chinese hamster ovary (CHO) cells) GAMP2C5 (клон 78), продуцирующая однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека P2C5;
- культура CHO cells GAMB5 (клон 04), продуцирующая однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека B5;
- культура CHO cells GAMB10 (клон 12), продуцирующая однодоменное антитело, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека B10.

Все три клеточные линии получены 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).

## Хроматография

Для буферов были взяты следующие вещества: хлорид натрия, хлорид кальция, глицин, трис и трис-НСl (*Neofroxx*, Германия); монофосфат натрия, дигидрофосфат натрия, полисорбат 80 (*PanReas*, Испания). Буферы для различных типов хроматографии указаны в табл. 1.

**Аффинная хроматография:** для проведения хроматографии в лабораторных условиях

использовали хроматограф АКТА Pure 25 (*Cytiva*, Швеция). Культуральную жидкость объемом 1 л осветляли путем центрифугирования при 200g в течение 10 мин и последующего центрифугирования 5000g в течение 20 мин. Далее супернатант пропускали через шприцевые фильтры с диаметром пор 0.8 мкм. Перед нанесением рН осветленной культуральной жидкости составлял 7.1. Образец наносили на колонну ХК 16/20 (*Cytiva*, Швеция), сорбент RUselect-P (*Гринвэн*, Россия) объемом 20 мл.

**Таблица 1.** Буферы для различных этапов хроматографической очистки

**Table 1.** Buffers for different stages of chromatographic purification

Название Designation	рН	Состав Compound	Виды хроматографии Types of chromatography	Функции Functions
Буфер А Buffer А	7.2	Хлорид натрия 150 мМ Монофосфат натрия 15 мМ Дигидрофосфат натрия 5 мМ Полисорбат 80 0.01%	Аффинная Эксклюзионная Affinity Size exclusion	Связывание Элюция Binding Elution
	5.0	Sodium chloride 150 mM Monosodium phosphate 15 mM Sodium dihydrogen phosphate 5 mM Polysorbate 80 0.01%	Катионообменная Cation exchange	
	7.2	Хлорид натрия 1000 мМ Монофосфат натрия 15 мМ Дигидрофосфат натрия 5 мМ Полисорбат 80 0.01%	Гидрофобное взаимодействие Hydrophobic interaction	Связывание Элюция Binding Elution
Буфер Б Buffer В	3.0	Глицин 200 мМ Хлорид натрия 150 мМ Полисорбат 80 0.01%	Аффинная Affinity	Элюция Elution
Буфер В Buffer С	8.5	Трис-НСl 1 М Tris-HCl 1 М	Аффинная Affinity	Доведение рН Adjusting pH
Буфер Г Buffer D	6.8	Трис 20 мМ Хлорид натрия 150 мМ Tris 20 mM Sodium chloride 150 mM	Анионообменная Мультимодальная Anion exchange Multimodal	Уравновешивание Промывка Equilibration Flushing
Буфер Д Buffer E	7.5	Монофосфат натрия 75 мМ Дигидрофосфат натрия 25 мМ Хлорид кальция 4 ppm Monosodium phosphate 75 mM Sodium dihydrogen phosphate 25 mM Calcium chloride 4 ppm	Мультимодальная Multimodal	Заряд Элюция Molecule charge Elution

Перед нанесением образца колонну уравнивали 5 колонными объемами (далее по тексту КО) буфера А. Хроматографию проводили в режиме нанесения-снятия со скоростью 2 мл/мин. После нанесения образца колонну промывали 5 КО буфера А. Далее образец элюировали с помощью буфера Б с кислым рН. После элюции проводили вирусную инактивацию полупродукта аффинной хроматографии в виде инкубации в течение 30 мин при низком значении рН (рН 3.0), затем доводили рН с помощью буфера В до значения 6.8–6.9.

При масштабировании технологии культуральную жидкость предварительно фильтровали при помощи глубинной и осветляющей фильтрации. Объем культуральной жидкости до фильтрации составлял 200 л. Для проведения хроматографии в производственных условиях использовали хроматограф АКТА Pilot 600s (Cytiva, Швеция) и колонну AxiChrom 100/300 (Cytiva, Швеция), сорбент RUselect-P (Гринвэн, Россия) объемом 1 л. Объем осветленной культуральной жидкости после фильтрации и промывки фильтров буферным раствором для вытеснения остаточного объема материала составлял около 230 л. Полученный материал разделяли на две партии в равных соотношениях и проводили аффинную хроматографию последовательно. Хроматографию проводили в подобных лабораторных условиях за исключением объема и скорости нанесения (табл. 2). Максимально допустимая нагрузка на сорбент, рассчитанная исходя из экспериментальных данных (в данной статье не представлены) составляла 30 г/л. После проведения аффинной хроматографии проводили вирусную инактивацию (рН 3, 30 мин). Далее обе партии полупродукта объединяли и проводили следующую стадию очистки.

**Анионообменная хроматография:** в лабораторном масштабе процесс проводился на хроматографе АКТА Pure 25 (Cytiva, Швеция). Для данной хроматографии использовали колонны Cytiva XK16/20 с сорбентом Q Sepharose™ Fast Flow (Cytiva, Швеция) объемом 5 мл. Колонну уравнивали 5 КО буфера Г. Хроматографию проводили в проскоковом режиме. Образец наносили со скоростью 0.5 мл/мин. При значении оптического поглощения 20 mAU на 280 нм начинался сбор фракции. По окончании нанесения образца колонну вновь промывали буфером Г до падения пика оптического поглощения до 20 mAU.

Для проведения хроматографии в производственных условиях использовали хроматограф АКТА Pilot 600s (Cytiva, Швеция) и колонны AxiChrom 70/300 (Cytiva, Швеция), сорбент Q Sepharose™ Fast Flow (Cytiva, Швеция) объемом 1 л. Хроматографию проводили в подобных

лабораторных условиях за исключением объема и скорости нанесения (табл. 2).

**Эксклюзионная хроматография:** процесс хроматографии в лабораторных условиях проводили с помощью хроматографа АКТА Pure 25 (Cytiva, Швеция) с использованием колонны XK26/100 (Cytiva, Швеция), заполненной сорбентом Superdex™ 200 (Cytiva, Швеция), хроматография проводилась в проскоковом режиме. Образец наносили со скоростью 5 мл/мин. В качестве основного буфера использовали буфер А.

**Хроматография гидрофобного взаимодействия:** процесс проводился в лабораторных условиях на системе АКТА Pure 25 (Cytiva, Швеция) с использованием колонны XK 16/20 (Cytiva, Швеция), сорбент Phenyl Sepharose™ (Cytiva, Швеция) объемом 5 мл. В образцы объемом 30, 34 и 35 мл антител GAMP2C5, GAMB5, GAMB10 соответственно, которые прошли стадию анионообменной хроматографии, добавляли хлорид натрия до концентрации 1 М для обеспечения лучшего связывания с сорбентом. Хроматографию проводили в режиме нанесения-снятия на скорости 1 мл/мин. Колонну уравнивали 5 КО буфера А с концентрацией хлорида натрия 1 М. Далее наносили образец и снова промывали колонну с помощью буфера А с концентрацией хлорида натрия 1 М до падения оптической плотности до 10 mAU. После этого проводили элюцию в линейном градиенте до 100% концентрации буфера А без хлорида натрия в течение 10 мин. Целевой белок (мономерная форма) выходил в первых фракциях, затем по мере увеличения концентрации буфера А выходили олигомерные и агрегатные формы антител. Объемы целевых фракций составили 17.0, 27.5 и 19.8 мл для антител GAMP2C5, GAMB5, GAMB10 соответственно.

**Катионообменная хроматография:** процесс проводился на хроматографической системе АКТА Pure 25 (Cytiva, Швеция) с помощью колонны XK 16/20 (Cytiva, Швеция) с сорбентом SP Sepharose™ (Cytiva, Швеция) в объеме 5 мл. Хроматографию проводили в проскоковом режиме со скоростью 1 мл/мин. Колонну уравнивали 5 КО буфера А с пониженным рН (рН 5). После этого наносили на колонну образцы антител GAMP2C5, GAMB5, GAMB10, переданные с анионообменной хроматографии, объемом 40 мл каждый; рН образцов также понижали до значения 5. Целевая фракция содержала мономерные формы антител. Далее использовали буфер А с рН 5 и концентрацией хлорида натрия 1 М для снятия агрегатных форм антител. Объемы целевых фракций составили 18.0, 35.5 и 23.0 мл для антител GAMP2C5, GAMB5, GAMB10 соответственно.

**Мультимодальная хроматография:** хроматографию проводили на хроматографе АКТА Pure 25 (*Cytiva*, Швеция) с помощью колонны *Cytiva* XK16/20, упакованной 5 мл сорбента Ca<sup>++</sup>Pure-НА (*TOSOH*, Япония) в лабораторном масштабе. Оптимальной нагрузкой для очистки в лабораторном масштабе является количество полупродукта анионообменной хроматографии, соответствующего 100 мл культуральной жидкости на 1 мл сорбента. Колонну уравнивали буфером Д, далее промывали буфером Г. Доводили рН образца до значения 6.8, затем наносили образец на колонну в режиме нанесения-снятия со скоростью 2 мл/мин. После нанесения образца колонну промывали буфером Г, затем для элюции мономерной формы антител использовали буфер А.

В производственном масштабе хроматографию проводили с использованием хроматографа АКТА Pilot 600s (*Cytiva*, Швеция) и колонны *AxiChrom* 140/300 (*Cytiva*, Швеция), упакованной сорбентом Ca<sup>++</sup>Pure-НА (*TOSOH*, Япония). Хроматографию проводили в аналогичных условиях за исключением объема и скорости нанесения. Параметры процессов хроматографии указаны в табл. 2.

## Масштабирование

**Глубинная фильтрация** проводилась на установке для глубокой фильтрации 3М™ Zeta Plus™

Encapsulated System EZP (3М, США) с фильтрами 3М™ Zeta Plus™ Encapsulated System Capsule 1.6 м<sup>2</sup> (3М, США).

**Осветляющая фильтрация** проводилась с использованием аппарата стального фильтрационного АСФ-006 (ЗАО «Владисарт», Россия) с осветляющими капсульными фильтрами Sartoguard PES 0.2 μm (1.6 м<sup>2</sup>) (*Sartorius*, Германия).

**Концентрирование и диафильтрация:** концентрирование полученного фильтрата проводилось методом фильтрации в тангенциальном потоке. Фильтрацию проводили на установке АКТА Flux 6 (*Cytiva*, Швеция) с ультрафильтрационным картриджем SARTOCON Slice Cassette 30 кДа (*Sartorius*, Германия).

**Противовирусная фильтрация:** для процесса использовали противовирусный фильтр Virosart HF 200 см<sup>2</sup> (*Sartorius*, Германия).

## Аналитические методы

Концентрация антител в культуральной жидкости и полупродуктах определяли методом биослойной интерферометрии как описано ранее [12].

**Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ):** определение подлинности исследуемого образца проводили методом эксклюзионной ВЭЖХ. Для анализа использовали

**Таблица 2.** Параметры для различных этапов хроматографической очистки (КЖ — культуральная жидкость)

**Table 2.** Parameters for different stages of chromatographic purification (CF — culture fluid)

Тип хроматографии Type of chromatography	Объем КЖ, л Volume of CF, L	Колонна Column	Скорость, мл/мин Speed, mL/min	Объем сорбента, мл Resin volume, mL	Время контакта, мин Contact time, min
Лабораторный масштаб Laboratory scale					
Аффинная Affinity	1	XK 16/20	8	20	2.5
Анионообменная Anion exchange		XK 16/20	0.5	5	10
Мультимодальная Multimodal		XK 16/20	2	5	2.5
Производственный масштаб Production scale					
Аффинная Affinity	200	Axichrom 100/300	400	1	2.5
Анионообменная Anion exchange		Axichrom 100/300	100	1	10
Мультимодальная Multimodal		Axichrom 100/300	400	1	2.5

хроматограф Agilent 1260 Infinity Capillary LC System (*Agilent Technologies*, США), колонна: Phenomenex SEC-s3000 (размер частиц 5 мкм, размер пор 290 Å, геометрия 300 × 7.8 мм). Хроматографию проводили в изократических условиях. Объем вводимой пробы 20 мкл. Продолжительность анализа 35 мин. Образец наносили со скоростью 0.5 мл/мин. УФ-детектор рассчитан на длину волны 214 нм.

**Остаточный белок А:** для определения количества остаточного белка А использовали набор Immunoenzymetric Assay for the Measurement of Protein A F400 (*Cygnus Technologies*, США) согласно протоколу производителя.

**Остаточная ДНК штамма-производителя:** для определения количества остаточного ДНК штамма-производителя использовали наборы PrepSEQ™ Residual DNA Sample Preparation Kit (*Thermo Fisher Scientific*, США) и resDNASEQ™ Quantitative CHO DNA Kit (*Thermo Fisher Scientific*, США), а также набор для выделения ДНК согласно протоколам производителей.

**Остаточный белок штамма-производителя:** для определения количества остаточного белка штамма-производителя использовали наборы Immunoenzymetric Assay for the Measurement of Chinese Hamster Ovary Host Cell Proteins F550 (*Cygnus*, США) согласно протоколу производителя.

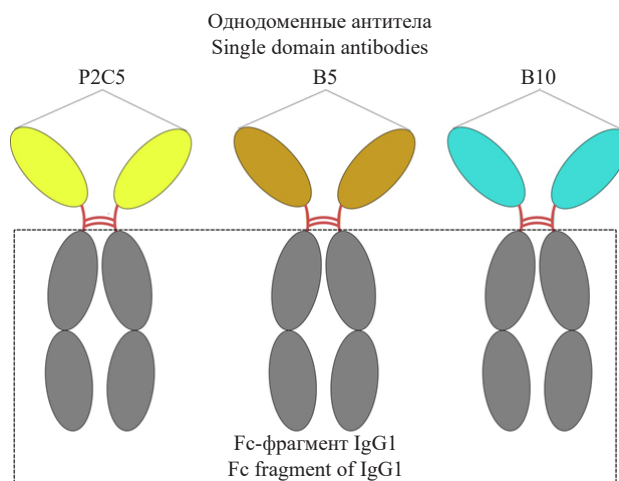
**Размер частиц:** измерение размера частиц в растворе выполняли методом динамического светорассеяния с помощью оборудования Zetasizer Nano ZS (*Malvern*, Великобритания) в соответствии с инструкцией производителя [24].

**Капиллярный гель-электрофорез:** данный анализ проводили с помощью системы капиллярного электрофореза Beckman/PA800 plus (*Beckman*, США). Испытуемый и стандартные образцы разводили водой, очищенной до концентрации, соответствующей концентрации антитела. Для этого в микроцентрифужную пробирку вместимостью 0.5 мл помещали 12 мкл образца и объем воды очищенной, рассчитанный по формуле:  $V = 1.5 \times C - 12$ , где  $C$  — концентрация белка в образце (мг/мл). Капилляр обрезали таким образом, чтобы общая длина составляла 30.2 см, эффективная длина должна составлять около 20.2 см. Капилляр устанавливали в картридж в соответствии с инструкцией по эксплуатации прибора, апертюра 100 × 200 мкм.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России на основе гуманизированных моноклональных антител был создан лекарственный препарат ГамКовиМаб для ранней этиотропной терапии коронавирусной инфекции, вызываемой вирусом

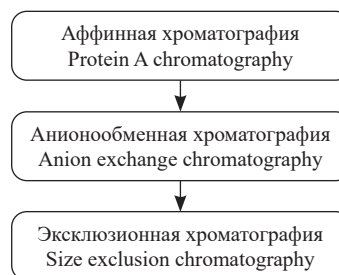
SARS-CoV-2. Действующим веществом препарата является тяжелцепочечное моноклональное антитело GAMP2C5, представляющее собой однодоменное антитело P2C5, слитое с Fc-фрагментом IgG1 человека [20, 21]. В дальнейшем из-за появления новых вариантов вируса SARS-CoV-2 были разработаны 2 новых тяжелцепочечных моноклональных антитела (GAMB5 и GAMB10) [12] (рис. 1).



**Рис. 1.** Схематичное изображение однодоменных антител, слитых с Fc-фрагментом IgG1 человека

**Fig. 1.** Schematic representation of single-domain antibodies fused with the Fc fragment of human IgG1

В данном исследовании была разработана и масштабирована технология очистки тяжелцепочечных антител с использованием мультимодального сорбента на основе керамического гидроксипатита. Культуральная жидкость для проведения хроматографической очистки была получена путем культивирования клеток CHO, стабильно продуцирующих антитела GAMP2C5, GAMB5 и GAMB10. Данные клеточные линии культивировались по технологии, разработанной ранее [12]. Изначально лабораторная технология хроматографической очистки состояла из трех этапов (рис. 2).



**Рис. 2.** Лабораторная схема хроматографической очистки однодоменных антител, слитых с Fc-фрагментом IgG1 человека

**Fig. 2.** Laboratory scheme for chromatographic purification of antibodies fused with the Fc fragment of human IgG1

## Аффинная хроматография

Классическим первым этапом для очистки моноклональных антител является аффинная хроматография. Элюирование целевой фракции, которая содержит моноклональные антитела, возможно при снижении pH элюирующего буфера до 3.0–4.0, в результате чего происходит разрушение взаимодействия между Fc-фрагментом и белком А. Поскольку исследуемые антитела GAMP2C5, GAMB5 и GAMB10 содержат Fc-фрагмент IgG1 человека, при его очистке также возможно применение аффинной хроматографии на белке А. Аффинная хроматография позволяет получить препарат с 95–99% чистоты, однако в препарате могут присутствовать остаточная ДНК клеток продуцентов, а также белок А, который может попадать в элюат в процессе элюции моноклональных антител.

Суммарные количества антител с полупродуктов, переданных со стадии аффинной хроматографии, указаны в табл. 3.

Далее полупродукты были переданы на стадию анионообменной хроматографии.

## Анионообменная хроматография

Процесс проходил в просоковом режиме. За счет взаимодействия зарядов отделяемых примесей и противоположных зарядов активных групп, ковалентно сшитых с матрицей сорбента или мембраны,

примеси оставались связанными с активными группами, тогда как целевые белки проходили через колонну.

Суммарные количества антител с полупродуктов, переданных со стадии анионообменной хроматографии, указаны в табл. 4.

Далее полупродукты были переданы на стадию эксклюзионной хроматографии.

## Эксклюзионная хроматография

В качестве референсной стадии для отделения целевой фракции от агрегатов, а также различных не полноразмерных форм, лабораторией используется эксклюзионная хроматография с применением сорбента Superdex™ 200. Разделение молекул хроматографируемой смеси происходит в соответствии с их размером за счет различия в их способности проникать в поры сорбента. В первых фракциях выходят агрегатные формы, затем димерные формы, а целевые мономерные формы выходят последними. Для получения достаточного разрешения при проведении эксклюзионной хроматографии образец перед нанесением предварительно концентрируют на центрифужных фильтрах с диаметром отсечения 30 kDa с целью обеспечения оптимального объема образца не более 10% объема колонны.

Суммарные количества антител с полупродуктов, переданных со стадии эксклюзионной хроматографии, представлены в табл. 5.

**Таблица 3.** Суммарные количества антител после стадии аффинной хроматографии

**Table 3.** Total amounts of antibodies after the affinity chromatography stage

Антитело Antibody	Суммарное количество антитела перед аффинной хроматографией, мг Total amount of antibody before affinity chromatography, mg	Суммарное количество антитела после аффинной хроматографии, мг Total amount of antibody after affinity chromatography, mg
GAMP2C5	350.0 ± 10.0	320.0 ± 10.0
GAMB5	400.0 ± 10.0	360.0 ± 10.0
GAMB10	480.0 ± 10.0	415.0 ± 10.0

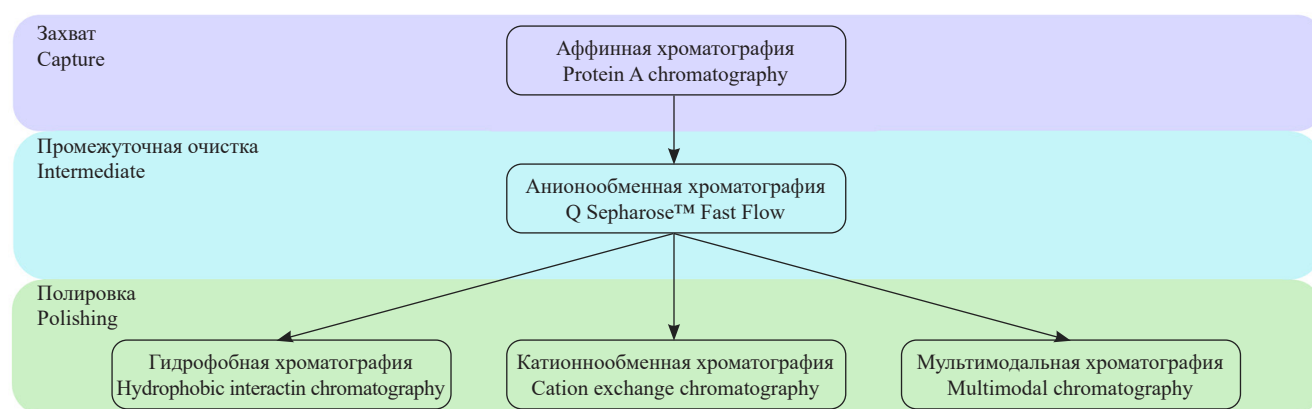
**Таблица 4.** Суммарные количества антител после стадии анионообменной хроматографии

**Table 4.** Total amounts of antibodies after the anion exchange chromatography stage

Антитело Antibody	Суммарное количество антитела после аффинной хроматографии, мг Total amount of antibody after affinity chromatography, mg	Суммарное количество антитела после анионообменной хроматографии, мг Total amount of antibody after anion exchange chromatography, mg
GAMP2C5	320.0 ± 10.0	302.0 ± 10.0
GAMB5	360.0 ± 10.0	340.0 ± 10.0
GAMB10	415.0 ± 10.0	390.0 ± 10.0

**Таблица 5.** Суммарные количества антител после стадии эксклюзионной хроматографии**Table 5.** Total amounts of antibodies after the size exclusion chromatography stage

Антитело Antibody	Суммарное количество антитела после анионообменной хроматографии, мг Total amount of antibody after anion exchange chromatography, mg	Суммарное количество антитела после эксклюзионной хроматографии, мг Total amount of antibody after size exclusion chromatography, mg
GAMP2C5	302.0 ± 10.0	264.0 ± 10.0
GAMB5	340.0 ± 10.0	300.0 ± 10.0
GAMB10	390.0 ± 10.0	340.0 ± 10.0

**Рис. 3.** Схема подбора сорбента для финальной стадии «полировка»**Fig. 3.** Scheme for selecting a sorbent for the polishing final stage

Поскольку лабораторная технология с использованием эксклюзионного сорбента сложно масштабируема для производственных объемов, была произведена разработка технологии с использованием различных сорбентов. Схема исследования представлена на рис. 3.

Одним из первых исследуемых сорбентов был гидрофобный сорбент Phenyl Sepharose™, принцип действия которого основан на обратимом взаимодействии белков с гидрофобными лигандами, иммобилизованными на поверхности сорбента. Целевые антитела взаимодействуют за счет гидрофобных аминокислот. Для увеличения силы взаимодействия (гидрофобного эффекта) была повышена концентрация хлорида натрия в буфере А до 1 М. Колонну уравнивали 3 КО буфера А. В испытуемом образце также довели концентрацию хлорида натрия до 1 М и затем наносили на колонну. После нанесения образца сорбент вновь промывали буфером А с 1 М хлорида натрия. Далее проводили элюцию в линейном градиенте до 100% концентрации буфера А без хлорида натрия в течение 10 мин. Целевой белок (мономерная форма) выходил в первых фракциях, затем с уменьшением концентрации соли выходила агрегатная форма.

Суммарные количества антител с полупродуктов, переданных со стадии гидрофобной хроматографии с использованием сорбента Phenyl Sepharose™, представлены в табл. 6.

Также для разделения мономерной фракции от агрегатов мы использовали катионообменную хроматографию. Для данной хроматографии свойственно взаимодействие зарядов молекул разделяемых веществ и противоположных зарядов активных групп сорбента. В нашем исследовании мы использовали катионообменный сорбент SP Sepharose™. Активной группой данного сорбента является сульфопропил, который заряжен отрицательно. Агрегаты обычно имеют суммарно больший положительный заряд и, соответственно, они должны связываться с сорбентом сильнее, чем мономерная форма. Хроматографию проводили в проскоковом режиме. В первую очередь уравнивали колонну буфера А, предварительно понизив pH раствора до 5.0. Затем перед нанесением образца понижали значение pH раствора антитела до 5.0. Целевая фракция содержала мономерные формы антител, а затем с помощью высокосолевого буфера (1 М NaCl) снимали агрегатные формы антител. Суммарные количества

**Таблица 6.** Суммарные количества антител после стадии гидрофобной хроматографии с использованием сорбента Phenyl Sepharose™

**Table 6.** Total amounts of antibodies after the hydrophobic chromatography stage using Phenyl Sepharose™ resin

Антитело Antibody	Суммарное количество антитела после анионообменной хроматографии, мг Total amount of antibody after anion exchange chromatography, mg	Суммарное количество антитела после гидрофобной хроматографии, мг Total amount of antibody after hydrophobic chromatography, mg
GAMP2C5	302.0 ± 10.0	150.0 ± 10.0
GAMB5	340.0 ± 10.0	198.0 ± 10.0
GAMB10	390.0 ± 10.0	220.0 ± 10.0

**Таблица 7.** Суммарные количества антител после стадии катионообменной хроматографии с использованием сорбента SP Sepharose™

**Table 7.** Total amounts of antibodies after the cation exchange chromatography stage using SP Sepharose™ resin

Антитело Antibody	Суммарное количество антитела после анионообменной хроматографии, мг Total amount of antibody after anion exchange chromatography, mg	Суммарное количество антитела после катионообменной хроматографии, мг Total amount of antibody after cation exchange chromatography, mg
GAMP2C5	302.0 ± 10.0	170.0 ± 10.0
GAMB5	340.0 ± 10.0	214.0 ± 10.0
GAMB10	390.0 ± 10.0	268.0 ± 10.0

**Таблица 8.** Суммарные количества антител после стадии мультимодальной хроматографии с использованием сорбента Ca<sup>++</sup>Pure-НА

**Table 8.** Total amounts of antibodies after the multimodal chromatography stage using Ca<sup>++</sup>Pure-NA resin

Антитело Antibody	Суммарное количество антитела после анионообменной хроматографии, мг Total amount of antibody after anion exchange chromatography, mg	Суммарное количество антитела после мультимодальной хроматографии, мг Total amount of antibody after multimodal chromatography, mg
GAMP2C5	302.0 ± 10.0	260.0 ± 10.0
GAMB5	340.0 ± 10.0	301.0 ± 10.0
GAMB10	390.0 ± 10.0	344.4 ± 10.0

антител с полупродуктов, переданных со стадии катионообменной хроматографии с использованием сорбента SP Sepharose™, представлены в табл. 7.

Кроме того, для проведения финальной стадии мы использовали мультимодальный сорбент Ca<sup>++</sup>Pure-НА на основе керамического гидроксипатита 1 типа.

Гидроксипатит 1 типа имеет три группы взаимодействия:

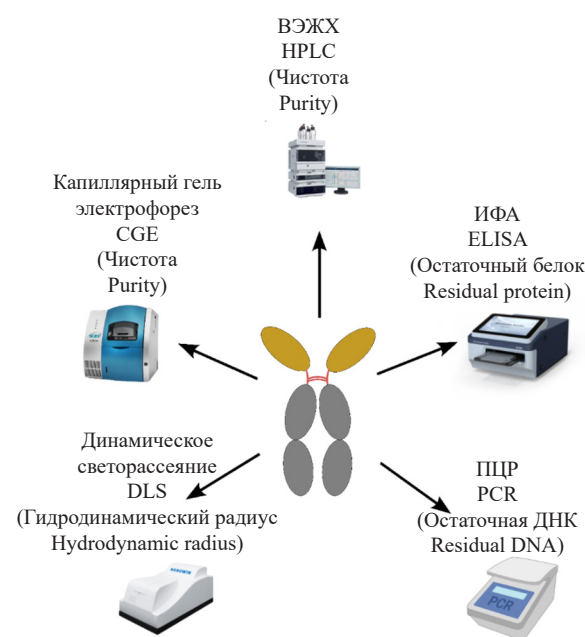
- 1) Ca<sup>2+</sup>;
- 2) фосфатные группы PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>;
- 3) гидроксидные группы OH<sup>-</sup>.

Сахарофосфатный остов нуклеиновых кислот реагирует с кальцием и гидроксильными группами, а антитела взаимодействуют с кальцием через карбоксильную

группу –ООС и с фосфатными группами через аминогруппы <sup>+</sup>H<sub>3</sub>N. Сначала проводили хроматографию в лабораторном масштабе с помощью колонны Cytiva XK16/20, упакованной 5 мл гидроксипатита 1 типа. Перед нанесением образца колонну последовательно промывали буфером Д и буфером Г. Перед нанесением рН образца доводили до значения 6,8, затем наносили образец на колонну. Хроматографию проводили в режиме нанесения-снятия со скоростью 10 мл/мин. После нанесения образца колонну промывали буфером Г. Затем для элюции мономерной формы антител использовали буфер А. Суммарные количества антител с полупродуктов, переданных со стадии мультимодальной хроматографии с использованием сорбента Ca<sup>++</sup>Pure-НА, представлены в табл. 8.

## Оценка степени чистоты

Для выбора итогового сорбента для финальной стадии очистки предстояло определить подлинность и чистоту полученных препаратов. Для подтверждения чистоты препаратов использовали аналитические методы, включая анализ на остаточный белок штамма продуцента, остаточное ДНК штамма-продуцента, остаточное количество белка А. Для подтверждения подлинности препарата проводили анализ подвижности молекул с помощью гель-фильтрации методом ВЭЖХ, капиллярного гель-электрофореза белка, а также определяли размер частиц методом динамического светорассеяния (рис. 4).



**Рис. 4.** Методы оценки чистоты очищенного антитела. ВЭЖХ — высокоэффективная жидкостная хроматография; ИФА — иммуноферментный анализ; ПЦР — полимеразная цепная реакция; ДНК — дезоксирибонуклеиновая кислота

**Fig. 4.** Methods for assessing the purity of purified antibodies. HPLC — high-performance liquid chromatography; ELISA — enzyme-linked immunosorbent assay; PCR — polymerase chain reaction; DNA — deoxyribonucleic acid; CGE — capillary gel electrophoresis; DLS — dynamic light scattering

В результате анализа наличия остаточной ДНК штамма-продуцента клеток СНО методом полимеразной цепной реакции в реальном времени в образцах очищенных антител GAMP2C5, GAMB5 и GAMB10 на трех исследуемых сорбентах было установлено, что количество остаточной ДНК не превышает допустимых границ и составляет

не более 10 пг/мг белка<sup>1</sup>. Иммуноферментный анализ образцов очищенных антител GAMP2C5, GAMB5 и GAMB10 на трех исследуемых сорбентах показал, что остаточные белки штамма-продуцента находятся в пределах допустимых концентраций и составляют не более 1 мкг/мг белка, а содержание остаточного белка А составляет не более 25 нг/мг белка.

Для исследования подлинности препаратов была проведена гель-фильтрация методом ВЭЖХ. Полученные результаты были экспортированы в программное обеспечение Chromeleon версии 7.0 (*Thermo Fisher Scientific*, США) для обработки данных. В результате установлено, что исследуемые антитела после хроматографической очистки на сорбенте Ca<sup>++</sup>Pure-НА имеют чистоту 99% для всех трех образцов, в отличие от антител, переданных на анализ после сорбентов Phenyl Sepharose™: 80% для GAMB5, 94% для GAMB10 и 60% для GAMP2C5. Чистота после хроматографии с использованием сорбента SP Sepharose™ составила 95% для GAMB5, 98% для GAMB10 и 79% для GAMP2C5. В препарате, полученном после очистки на сорбенте Ca<sup>++</sup>Pure-НА, наблюдался преимущественно один пик и отсутствовали какие-либо значимые примеси (рис. 5).

Помимо метода гель-фильтрации для определения чистоты исследуемых антител был использован метод капиллярного электрофореза, который основан на разделении компонентов смеси в кварцевом капилляре под воздействием электрического поля. Полученные электрофореграммы были экспортированы в программное обеспечение Chromeleon версии 7.0 для обработки данных. Для полученных антител было показано, что после использования сорбента Phenyl Sepharose™ чистота образцов составила 83% для GAMB5, 83% для GAMB10 и 90% для GAMP2C5. После использования сорбента SP Sepharose™ чистота образцов составила 82% для GAMB5, 81% для GAMB10 и 86% для GAMP2C5. Чистота после использования сорбента Ca<sup>++</sup>Pure-НА составила 97% для GAMB5, 97% для GAMB10 и 99% для GAMP2C5 (рис. 6).

После проведения очистки на различных сорбентах в качестве наиболее перспективного сорбента для финальной стадии очистки выбран гидроксипатит 1 типа, поскольку на других сорбентах нам не удалось подобрать условия для разделения целевой фракции от остаточных количеств агрегатов и нецелевых форм антител.

<sup>1</sup> Note for Guidance on Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology, 3AB1A. Production and Quality Control of Medicinal Products Derived by Recombinant DNA Technology. 1995. P. 214.

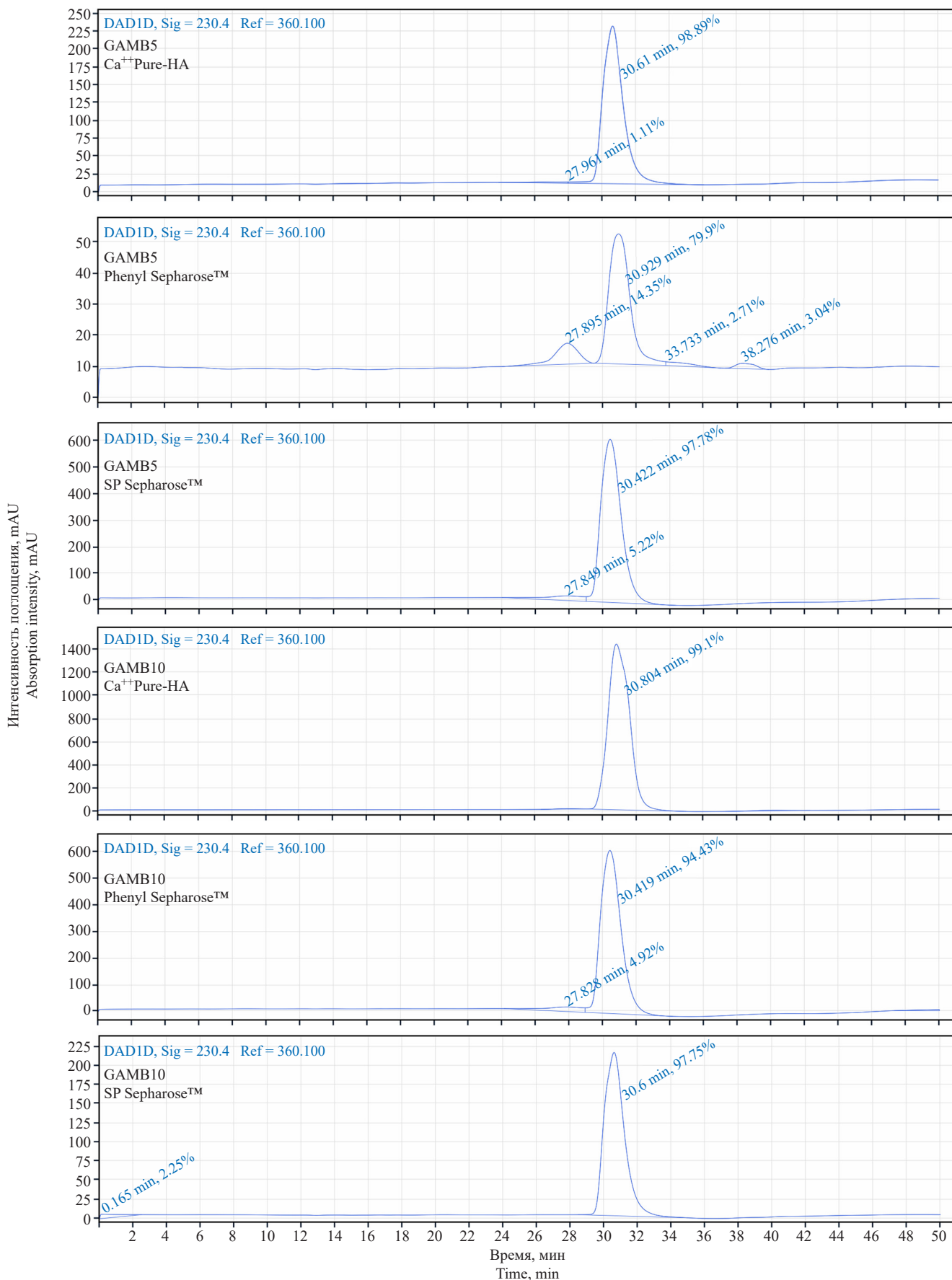


Рис. 5. Оценка степени чистоты методом гель-фильтрации после финальной стадии очистки

Fig. 5. Evaluation of the degree of purity by gel filtration after the final stage of purification

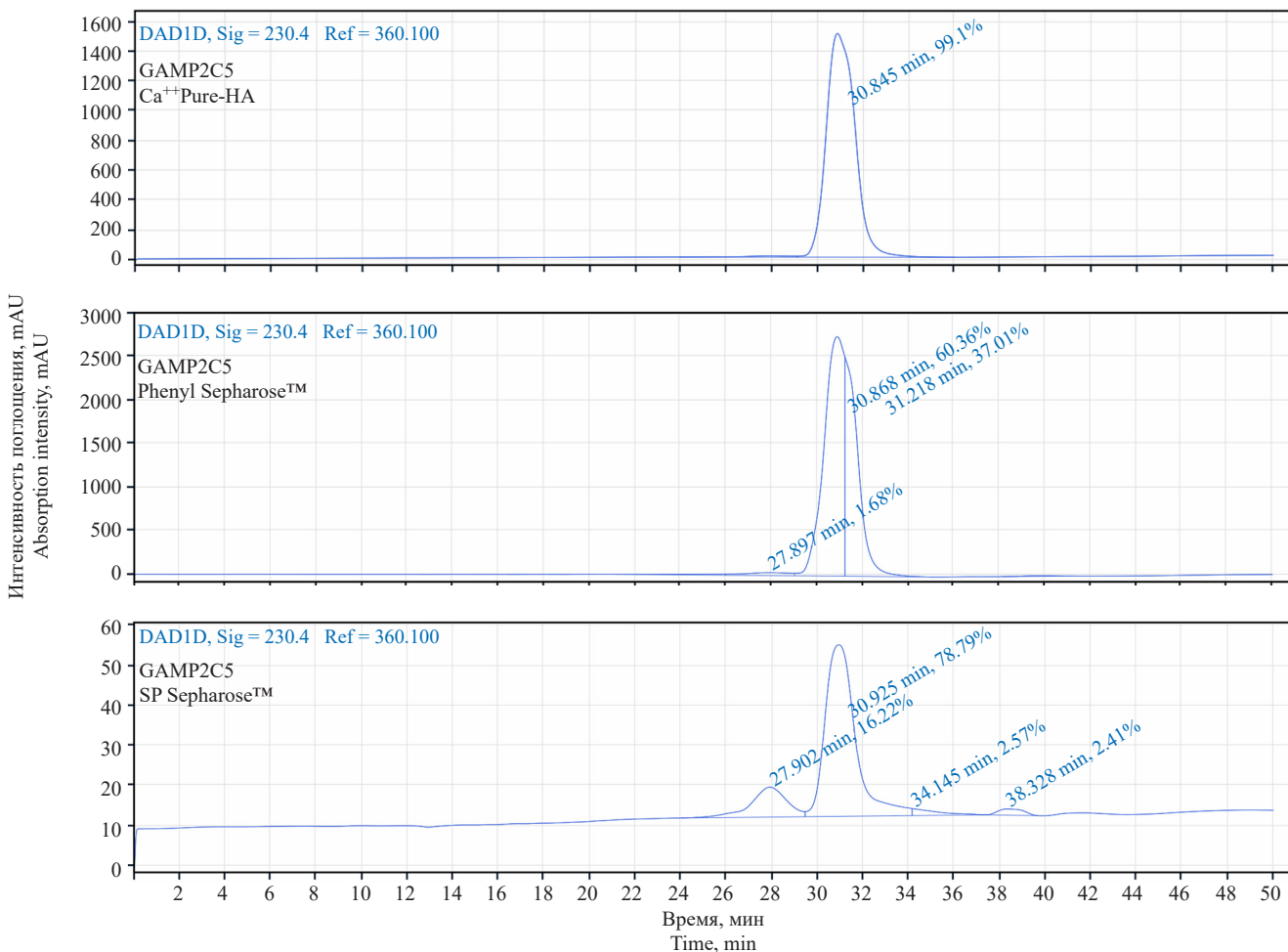


Рис. 5. Оценка степени чистоты методом гель-фильтрации после финальной стадии очистки (продолжение)

Fig. 5. Evaluation of the degree of purity by gel filtration after the final stage of purification (continued)

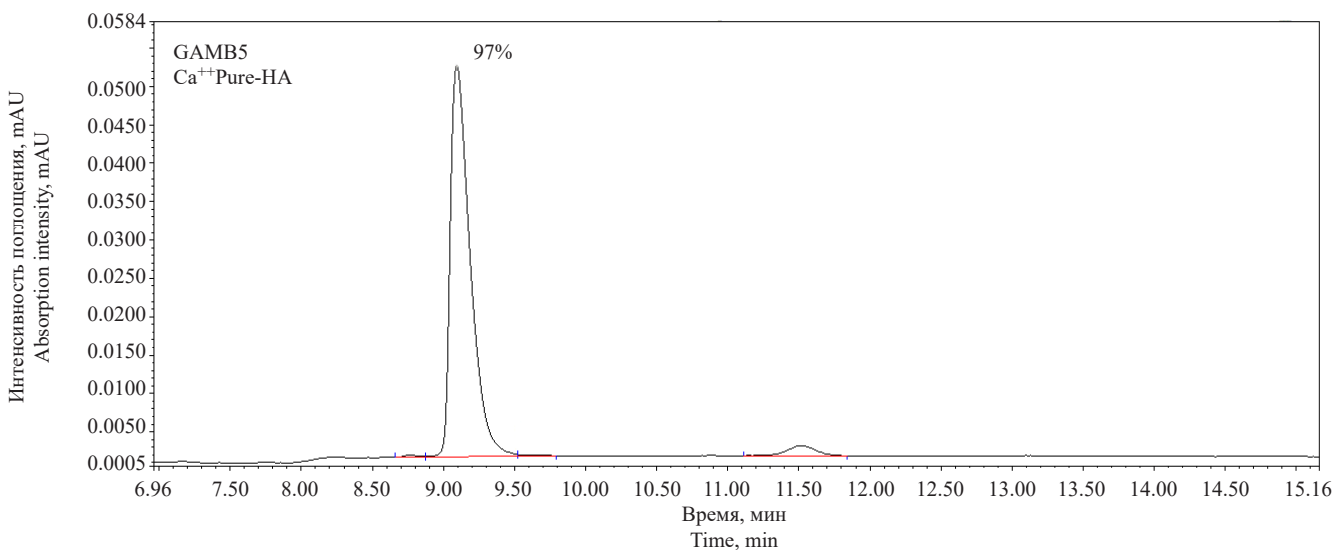


Рис. 6. Оценка чистоты методом капиллярного гель-электрофореза после финальной стадии очистки

Fig. 6. Evaluation of purity by capillary gel electrophoresis after the final stage of purification

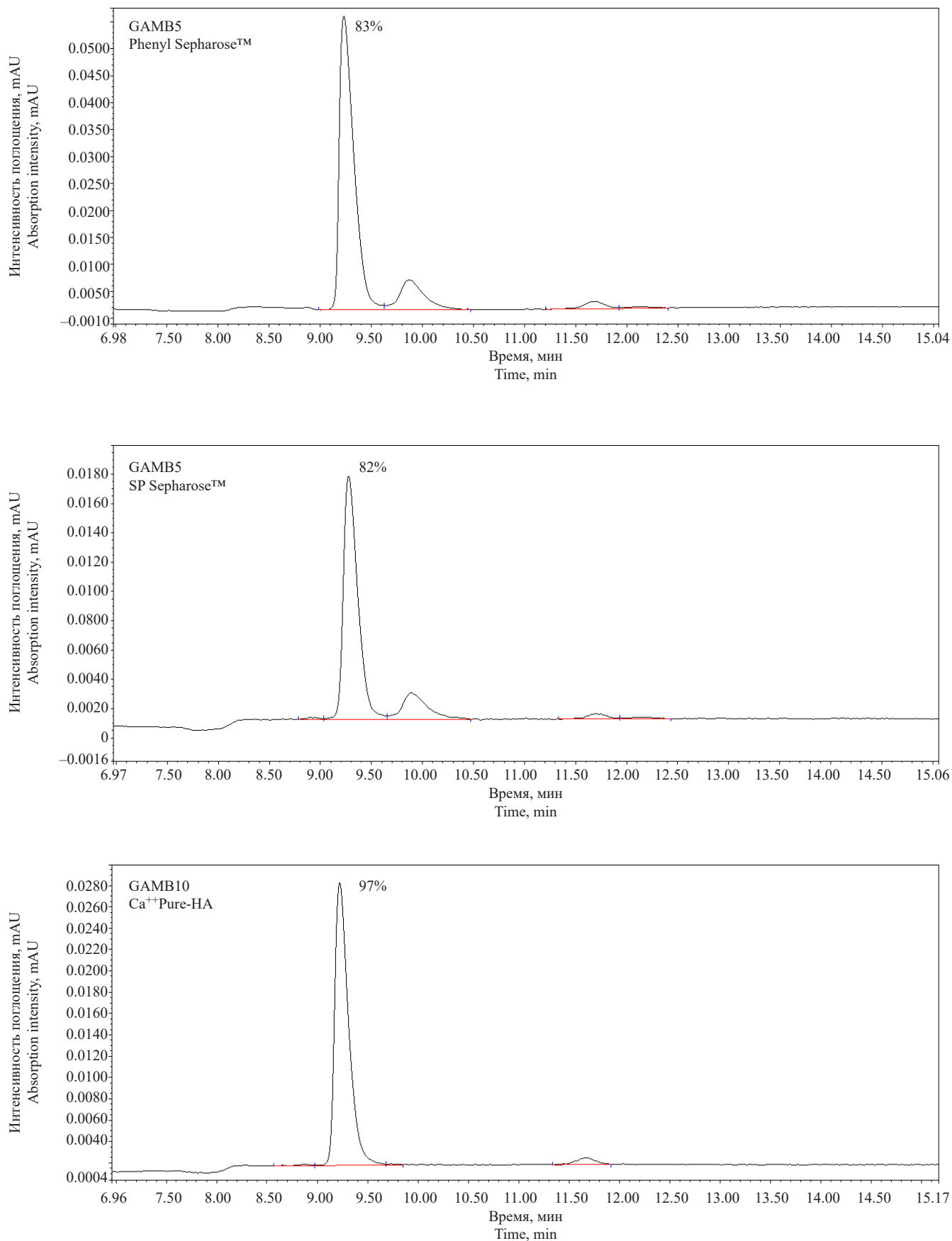


Рис. 6. Оценка чистоты методом капиллярного гель-электрофореза после финальной стадии очистки (продолжение)

Fig. 6. Evaluation of purity by capillary gel electrophoresis after the final stage of purification (continued)

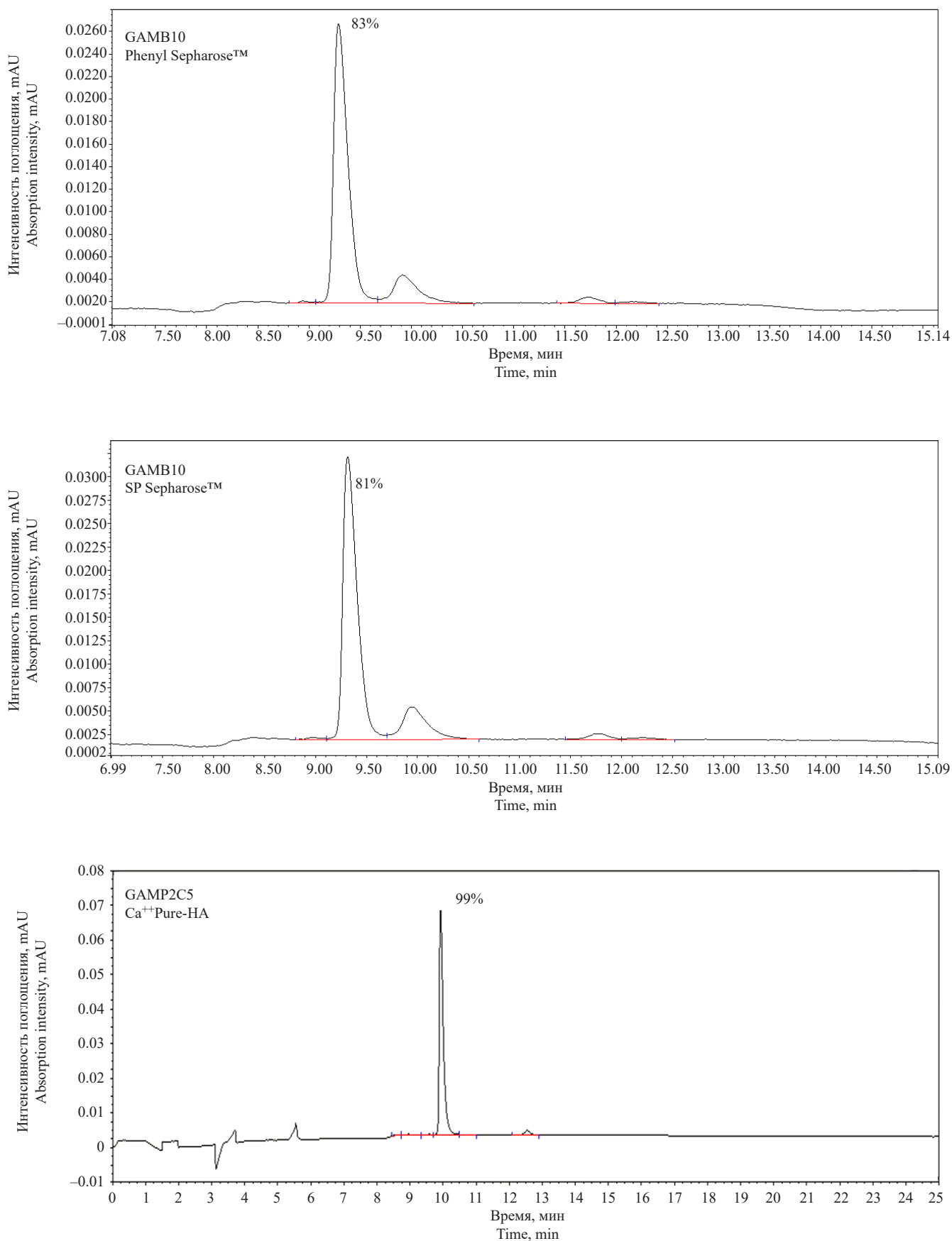


Рис. 6. Оценка чистоты методом капиллярного гель-электрофореза после финальной стадии очистки (продолжение)

Fig. 6. Evaluation of purity by capillary gel electrophoresis after the final stage of purification (continued)

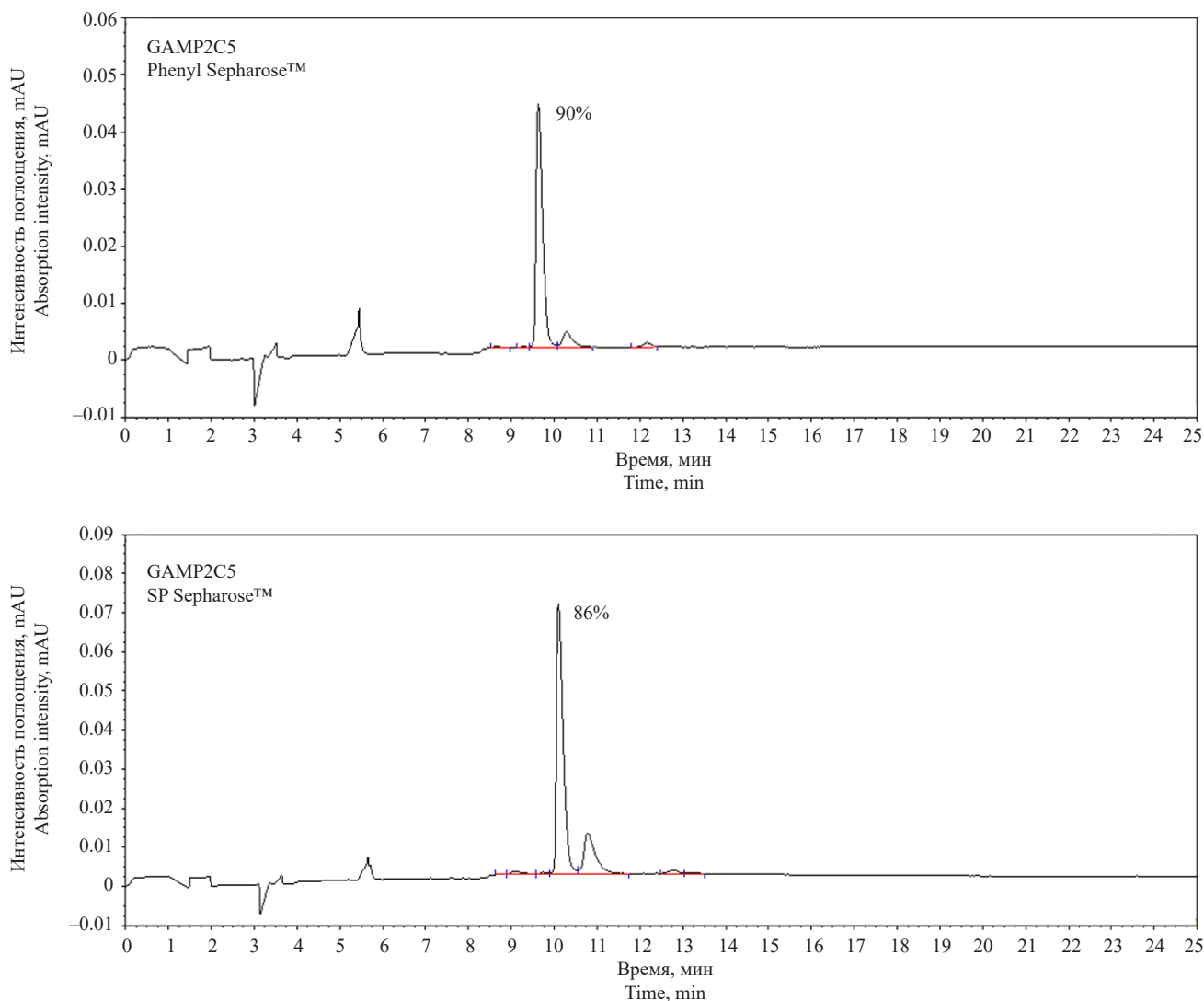


Рис. 6. Оценка чистоты методом капиллярного гель-электрофореза после финальной стадии очистки (продолжение)

Fig. 6. Evaluation of purity by capillary gel electrophoresis after the final stage of purification (continued)

Дополнительно для оценки качества полученных антител использовали метод динамического рассеяния света, позволяющий определить размер молекул и наличие крупных агломератов частиц, которые не могут быть определены методом электрофореза и ВЭЖХ. Было показано, что после очистки всех трех антител GAMP2C5, GAMB5 и GAMB10 на мультимодальном сорбенте Ca<sup>++</sup>Pure-NA детектируется присутствие одного основного пика, соответствующего молекулам со средним диаметром 7.6–7.8 нм (рис. 7).

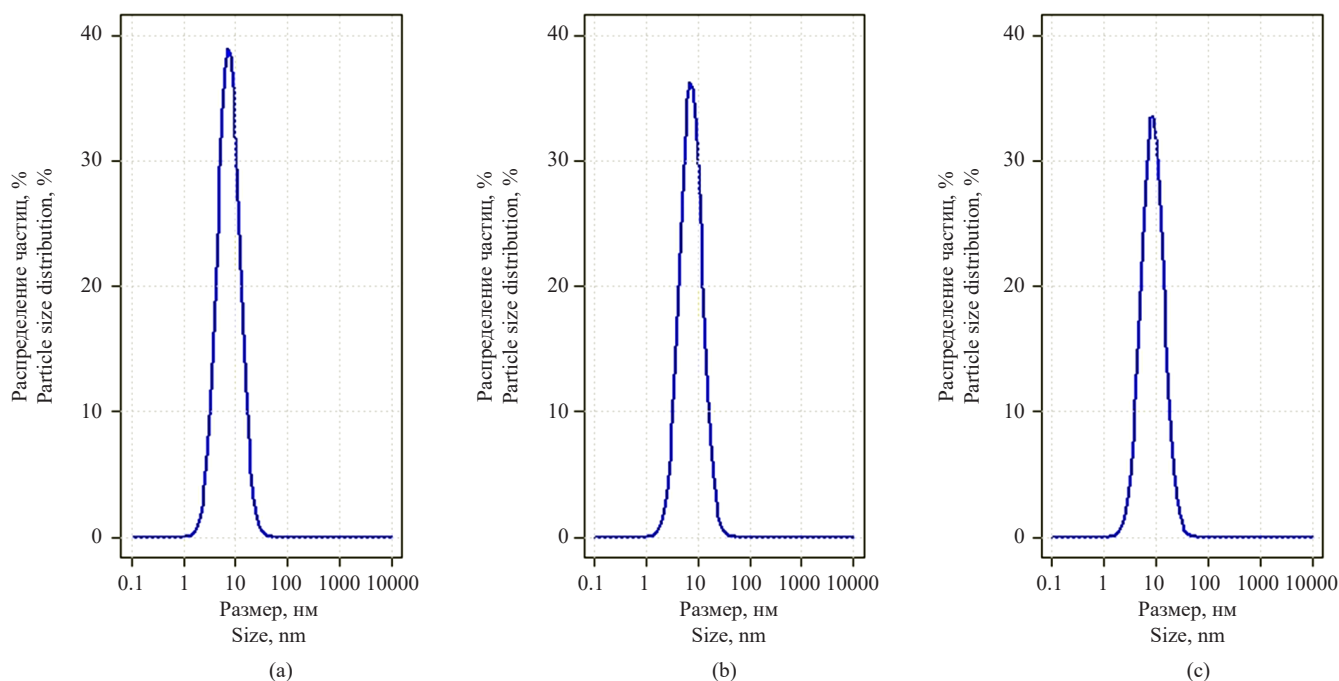
## Масштабирование

После проведения экспериментов в лабораторном масштабе и подтверждения подлинности, а также чистоты препарата было произведено масштабирование данной технологии на производстве

в условиях надлежащей производственной практики. Схема очистки при масштабировании представлена на рис. 8.

После проведения масштабирования процесса культивирования и очистки суммарное количество целевого продукта осталось практически неизменным. Разница в количестве полупродукта, полученного при использовании лабораторной и масштабированной производственной технологии, составила не более 10%. Данные представлены в табл. 9.

Также при масштабировании было проведен анализ на содержание остаточных белков штамма-продукта (содержание составило не более 1 мкг/мг белка), остаточной ДНК штамма-продукта (не более 10 пг/мг белка), остаточного содержания белка А (не более 25 нг/мг белка). Содержание примесей в зависимости от масштаба производства указано в табл. 10.



**Рис. 7.** Оценка размера частиц после финальной стадии очистки методом динамического светорассеяния в лабораторном масштабе: (a) GAMB5, (b) GAMP2C5 и (c) GAMB10

**Fig. 7.** Particle size evaluation after the final stage of cleaning using dynamic light scattering at the laboratory scale: (a) GAMB5, (b) GAMP2C5, and (c) GAMB10



**Рис. 8.** Схема технологии хроматографической очистки при масштабировании

**Fig. 8.** Scheme of chromatographic purification technology during scaling

**Таблица 9.** Суммарное количество целевого белка после трех стадий хроматографической очистки

**Table 9.** Total amount of target protein after 3 stages of chromatographic purification

Антитело Antibody	Лабораторный масштаб Laboratory scale		Производственный масштаб Production scale	
	Объем КЖ, л Volume of QF, L	Суммарное количество антитела после очистки, мг Total amount of antibody after purification, mg	Объем КЖ, л Volume of QF, L	Суммарное количество антитела после очистки, г Total amount of antibody after purification, g
GAMP2C5	1.0	260.0	200.0	46.0
GAMB5		301.0		58.0
GAMB10		344.0		64.0

**Таблица 10.** Содержание примесей при масштабировании

**Table 10.** Impurity content at scaling

Антитело Antibody	Лабораторный масштаб Laboratory scale			Производственный масштаб Production scale		
	Остаточный белок штамма продуцента, мкг/мг Residual protein of the producer strain, µg/mg	Остаточный белок А, нг/мг Residual protein A, ng/mg	Остаточная ДНК, пг/мг Residual DNA, pg/mg	Остаточный белок штамма продуцента, мкг/мг Residual protein of the producer strain, µg/mg	Остаточный белок А, нг/мг Residual protein A, ng/mg	Остаточная ДНК, пг/мг Residual DNA, pg/mg
GAMP2C5	0.111	2.85	Не определяется Not defined	0.241	3.29	Не определяется Not defined
GAMB5	0.029	4.62	3.2	0.107	2.85	Не определяется Not defined
GAMB10	0.036	Не определяется Not defined	Не определяется Not defined	0.022	2.0	4.0

Для подтверждения чистоты препаратов при масштабировании технологии была проведена гель-фильтрация методом ВЭЖХ. Содержание примесей составило не более 5%. Степень чистоты указана в табл. 11. Хроматограммы для каждого антитела представлены на рис. 9.

Для исследования изменения размера и строения молекул при масштабировании также был проведен капиллярный электрофорез. Процент содержания целевого белка в полупродукте указан в табл. 12. Хроматограммы для каждого антитела представлены на рис. 10.

Для дополнительного подтверждения успешного масштабирования технологии хроматографической очистки модифицированных однодоменных антител был использован метод динамического рассеяния света. После очистки всех трех антител GAMB5, GAMP2C5 и GAMB10 на мультимодальном сорбенте Ca<sup>++</sup>Pure-NA на производстве в соответствии с принципами GMP (Good Manufacturing Practice — надлежащая производственная практика) детектируются значения, которые соответствуют полученным ранее при очистке в лабораторном масштабе (рис. 11).

**Таблица 11.** Содержание целевого белка в полупродукте (ВЭЖХ)

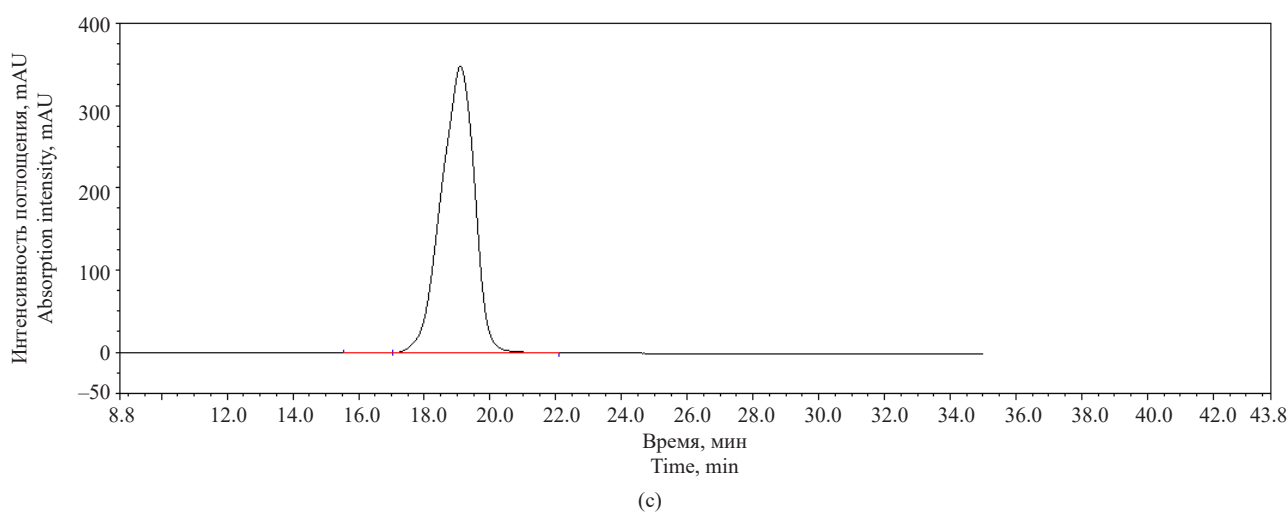
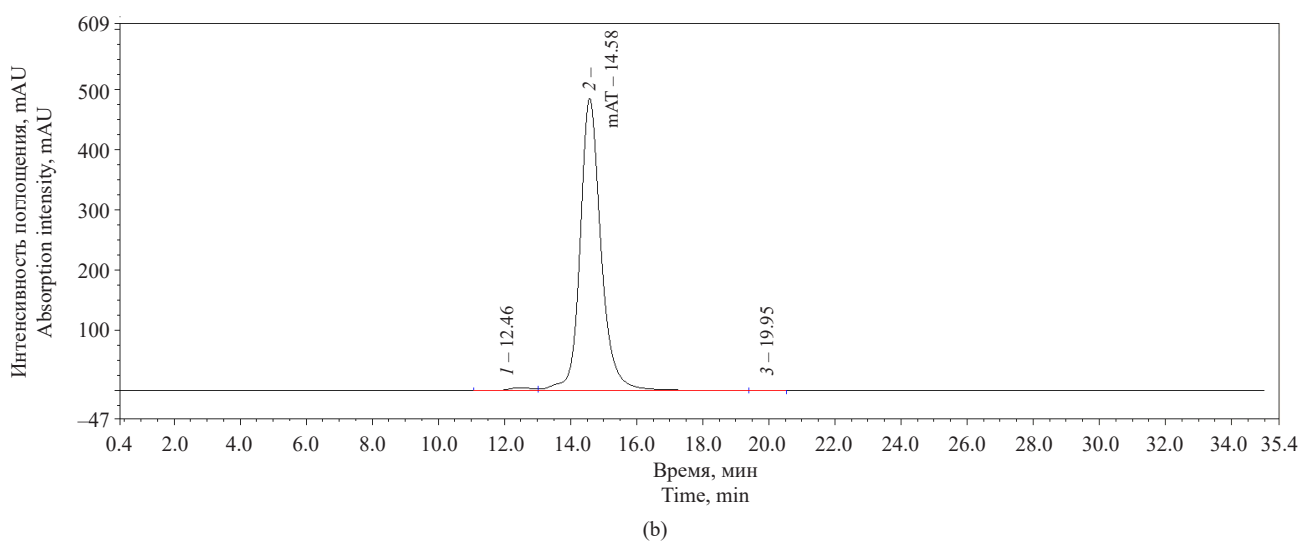
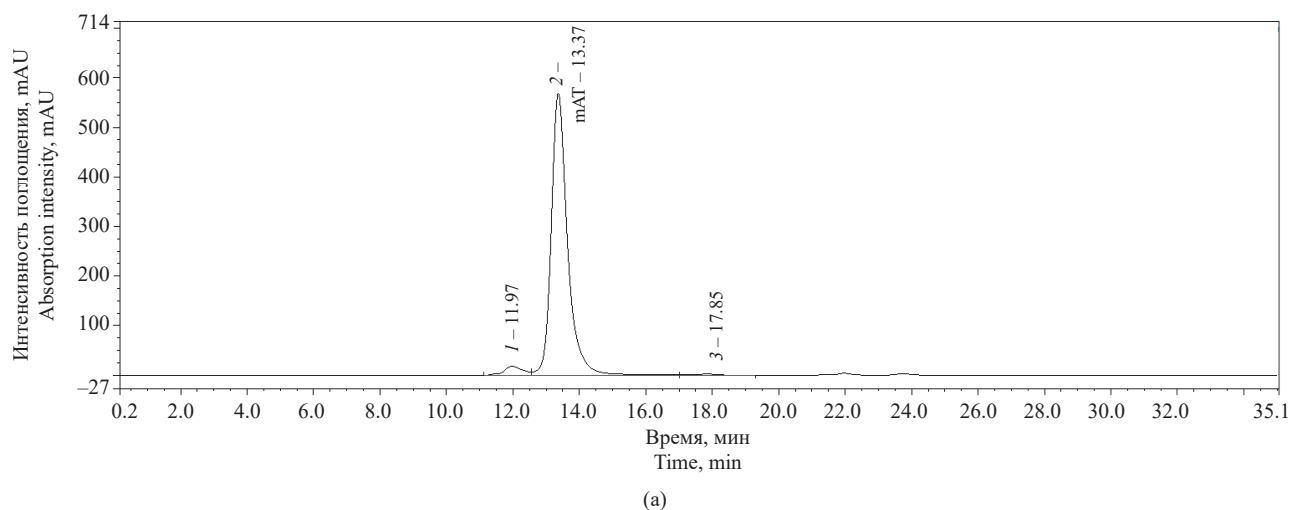
**Table 11.** Target protein content in the intermediate product (HPLC)

Полупродукт Intermediate product	Содержание целевого белка, % Target protein content, %
GAMP2C5	96.1
GAMB5	98.9
GAMB10	99.89

**Таблица 12.** Процент содержания целевого белка в полупродукте (капиллярный электрофорез)

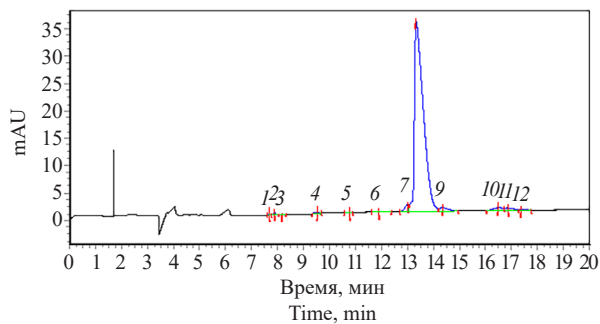
**Table 12.** Percentage of target protein content in the intermediate product (capillary electrophoresis)

Полупродукт Intermediate product	Содержание целевого белка, % Target protein content, %
GAMP2C5	92.3
GAMB5	94.0
GAMB10	95.8

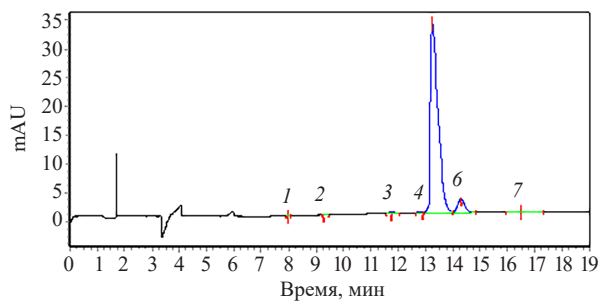


**Рис. 9.** Хроматограммы полупродуктов, полученных методом гель-фильтрации после финальной стадии очистки; содержание целевого белка: (a) 96.1% GAMP2C5, (b) 99.8% GAMB5 и (c) 99.89% GAMB10

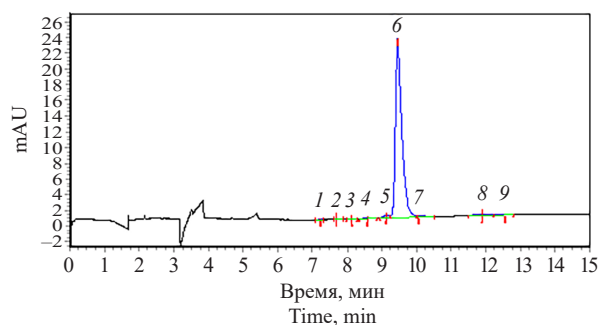
**Fig. 9.** Chromatograms of semifinished products obtained by gel filtration after the final stage of purification; the target protein content: (a) GAMP2C5, 96.1%; (b) GAMB5, 99.8%; (c) GAMB10, 99.89%



(a)



(b)



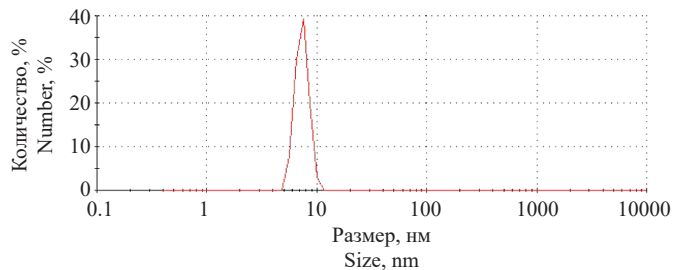
(c)

**Рис. 10.** Хроматограммы полупродуктов, полученных методом капиллярного электрофореза после финальной стадии очистки; содержание целевого белка: (a) 92.3% GAMP2C5, (b) 94.0% GAMB5 и (c) 95.8% GAMB10

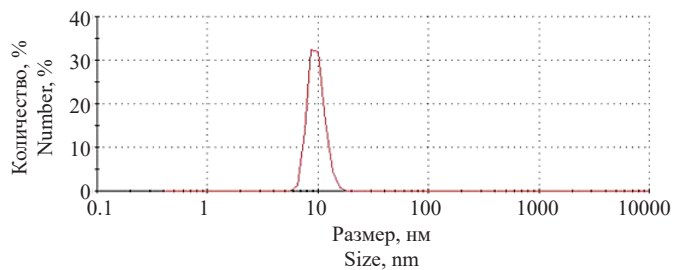
**Fig. 10.** Chromatograms of semifinished products obtained by capillary electrophoresis after the final stage of purification; the target protein content: (a) GAMP2C5, 92.3%; (b) GAMB5, 94.0%; (c) GAMB10, 95.8%

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

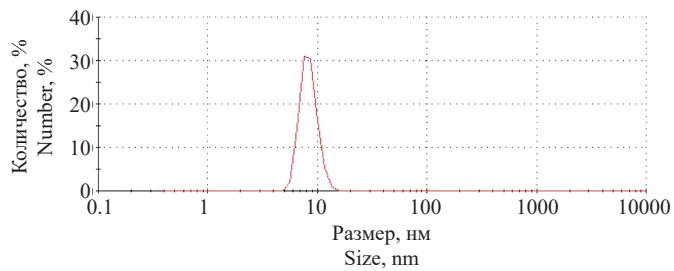
В результате проведенного исследования разработана лабораторная технология очистки для однодоменных антител, модифицированных Fc-фрагментом IgG1 человека, специфичных к вирусу SARS-CoV-2. На первой стадии хроматографической очистки использовали сорбент на основе белка А. Для промежуточной стадии применяли анионообменный сорбент на основе четвертичного амина. В качестве сорбента для финальной хроматографической стадии очистки был выбран керамический гидроксипатит



(a)



(b)



(c)

**Рис. 11.** Оценка размера частиц после финальной стадии очистки методом динамического рассеяния света в производственном масштабе: (a) GAMB5, (b) GAMP2C5 и (c) GAMB10

**Fig. 11.** Evaluation of particle size after the final stage of cleaning using dynamic light scattering at the industry scale: (a) GAMB5, (b) GAMP2C5, and (c) GAMB10

1 типа. Последний оптимально подходит для различных однодоменных антител, модифицированных Fc-фрагментом IgG1 человека, поскольку позволяет разделить фракцию целевого антитела от остаточных примесей агрегатов и нецелевых форм антител. После очистки трех различных антител удалось получить препарат высокой степени чистоты. Контроль качества полученных препаратов методами ВЭЖХ, капиллярного гель-электрофореза, динамического рассеяния света, иммуоферментного анализа и полимеразной цепной реакции показал, что был получен препарат с чистотой более 95%.

Разработанная технология хроматографической очистки антител CHO-GAMP2C5, CHO-GAMB5 и CHO-GAMB10 была перенесена на производство. Данная технология позволяет получать полупродукты из культуральной жидкости объемом 200 л.

Для полученных полупродуктов произведен контроль качества в соответствии с нормативной документацией. Данные препараты имели характеристики качества и чистоты, сопоставимые с характеристиками препаратов, полученных в лаборатории. Сделан вывод, что сорбент Ca<sup>++</sup>Pure-NA (*TOSOH*, Япония) на основе керамического гидроксипатита 1 типа является оптимальным сорбентом для финальной стадии очистки однодоменных антител, модифицированных Fc-фрагментом IgG1 человека, специфичных к вирусу SARS-CoV-2.

### Вклад авторов

**Д.С. Полянский** — проведение экспериментов по разработке лабораторной технологии хроматографической очистки модифицированных однодоменных антител, сбор и анализ данных, написание текста рукописи.

**В.В. Прокофьев** — проведение экспериментов по разработке лабораторной технологии хроматографической очистки модифицированных однодоменных антител.

**А.В. Саморукова, Ф.А. Шишконоков, Д.В. Васильев** — проведение процесса масштабирования технологии хроматографической очистки модифицированных однодоменных антител.

**Е.И. Рябова, А.А. Деркаев, А.И. Государев, Ю.А. Ефимова** — изучение чистоты и подлинности очищенных препаратов на основе модифицированных однодоменных антител.

**Д.В. Щербляков** — общее руководство процессом разработки препаратов на основе модифицированных однодоменных антител.

**А.П. Карпов** — руководство процессом масштабирования технологии хроматографической очистки антител, корректировка текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

**И.Б. Есмагамбетов** — руководство процессом разработки лабораторной технологии хроматографической очистки, корректировка текста рукописи, утверждение окончательной версии рукописи для публикации.

### Authors' contributions

**D.S. Polyansky** — conducting experiments to develop a laboratory technology for the chromatographic purification of modified single-domain antibodies, collecting and analyzing data, writing the manuscript.

**V.V. Prokofiev** — conducting experiments to develop a laboratory technology for the chromatographic purification of modified single-domain antibodies.

**A.V. Samorukova, F.A. Shishkonakov, D.V. Vasiliev** — scaling up the technology for the chromatographic purification of modified single-domain antibodies.

**E.I. Ryabova, A.A. Derkaev, A.I. Gosudarev, Yu.A. Efimova** — studying the purity and authenticity of purified preparations based on modified single-domain antibodies.

**D.V. Shcheplyakov** — overall management of the development of drugs based on modified single-domain antibodies.

**A.P. Karpov** — management of the scaling-up of the chromatographic purification technology for antibodies, proofreading the manuscript, approval of the final version of the manuscript for publication.

**I.B. Esmagambetov** — management of the development of the laboratory technology for chromatographic purification, proofreading the manuscript, 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

- Mekala J.R., Nalluri H.P., Reddy P.N., Sainath S.B., Sampath Kumar N.S., Sai Kiran G.V.S.D., Dhiman R., Chamarthy S., Komaragiri R.R., Manyam R.R., Dirisala V.R. Emerging trends and therapeutic applications of monoclonal antibodies. *Gene*. 2024;20(925):148607. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2024.148607>
- Esposito S., Amirthalingam G., Bassetti M., Blasi F., De Rosa F.G., Halasa N.B., Principi N. Monoclonal antibodies for prophylaxis and therapy of respiratory syncytial virus, SARS-CoV-2, human immunodeficiency virus, rabies and bacterial infections: An update from the world association of infectious diseases and immunological disorders and the Italian society of antinfective therapy. *Front. Immunol.* 2023;14:1162342. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1162342>
- Wang Z., Wang G., Lu H., Li H., Tang M., Tong A. Development of therapeutic antibodies for the treatment of diseases. *Mol. Biomed.* 2022;3:35. <https://doi.org/10.1186/S43556-022-00100-4>
- Paul S., Konig M.F., Pardoll D.M., Bettgeowda C., Papadopoulos N., Wright K.M., Gabelli S.B., Ho M., van Elsland A., Zhou S. Cancer therapy with antibodies. *Nature Reviews Cancer*. 2024;24(6):399–426. <https://doi.org/10.1038/s41568-024-00690-x>
- Kumar M., Jalota A., Sahu S.K., Haque S. Therapeutic antibodies for the prevention and treatment of cancer. *J. Biomed. Sci.* 2024;31(1):6. <https://doi.org/10.1186/s12929-024-00996-w>
- Kügler M., Stein C., Schwenkert M., Saul D., Vockentanz L., Huber T., *et al.* Stabilization and humanization of a single-chain Fv antibody fragment specific for human lymphocyte antigen CD19 by designed point mutations and CDR-grafting onto a human framework. *Protein Eng. Des. Sel.* 2009;22(3):135–147. <https://doi.org/10.1093/protein/gzn079>
- Jin B.K., Odongo S., Radwanska M., Magez S. Nanobodies: A review of generation, diagnostics and therapeutics. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24(6):5994. <https://doi.org/10.3390/IJMS24065994>
- Klein C., Brinkmann U., Reichert J.M., Kontermann R.E. The present and future of bispecific antibodies for cancer therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2024;23(4):301–319. <https://doi.org/10.1038/s41573-024-00896-6>
- Wang M., Ying T., Wu Y. Single-domain antibodies as therapeutics for solid tumor treatment. *Acta Pharmaceutica Sinica B.* 2024;14(7):2854–2868. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2024.03.016>
- Cheng L., Chen L., Shi Y., Gu W., Ding W., Zheng X., Liu Y., Jiang J., Zheng Z. Efficacy and safety of bispecific antibodies vs. immune checkpoint blockade combination therapy in cancer: A real-world comparison. *Mol. Cancer*. 2024;23(1):77. <https://doi.org/10.1186/s12943-024-01956-6>

11. Zacharias N., Podust V.N., Kajihara K.K., Leipold D., Del Rosario G., Thayer D., Dong E., Paluch M., Fischer D., Zheng K., Lei C. A homogeneous high-DAR antibody–drug conjugate platform combining THIOMAB antibodies and XTEN polypeptides. *Chem. Sci.* 2022;13(11):3147–3160. <https://doi.org/10.1039/D1SC05243H>
12. 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> [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> ]
13. Kelley B. Industrialization of mAb production technology: The bioprocessing industry at a crossroads. *MABs.* 2009;1(5): 443–452. <https://doi.org/10.4161/mabs.1.5.9448>
14. Ulmer N., Vogg S., Müller-Späth T., Morbidelli M. Purification of Human Monoclonal Antibodies and Their Fragments. In: Steinitz M. (Ed.). *Human Monoclonal Antibodies. Methods in Molecular Biology.* 2019. V. 1904. P. 163–188. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8958-4\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8958-4_7)
15. 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., Рыжова Н.Н., Зубкова О.В., Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Борисевич С.В., Гинцбург А.Л. Нанокантитела – 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> ]
16. 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>
17. 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., Naroditsky 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>
18. Panova E.A., Kleymenov D.A., Shcheblyakov D.V., Bykonina 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>
19. 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>
20. 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>
21. 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>
22. Shcheblyakov D.V., Favorskaya I.A., Dolzhikova I.V., Korobkova A.I., Esmagambetov I.V., Voronina O.L., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Derkaev A.A., Ryabova E.I., Iliukhina A.A., Zorkov I.D., Grousova D.M., Reshetnikov D.A., Ryzhova N.N., Ermolova E.I., Kunda M.S., Matyuta I.O., Boyko K.M., Gintsburg A.L. Ultra-potent RBM-specific single-domain antibody broadly neutralizes multiple SARS-CoV-2 variants with picomolar activity. *Int. J. Biol. Macromol.* 2025; 19(Pt 3):145386. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomac.2025.145386>
23. Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Банделок 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. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64> ]
24. 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> [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> ]

## Об авторах

**Полянский Дмитрий Сергеевич**, ассистент, кафедра аналитической химии им. И.П. Алимарина, 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>

**Прокофьев Владимир Владимирович**, лаборант-исследователь, 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: vladimir.prokofev.96@mail.ru. Scopus Author ID 57300704700, <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>

**Саморукова Александра Владимировна**, ведущий 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: av.samorukova@medgamal.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8060-4370>

**Шишконоков Федор Алексеевич**, 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: fa.shishkonakov@medgamal.ru. <https://orcid.org/0009-0009-7886-6019>

**Васильев Дмитрий Валерьевич**, 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: vasilyevdv@medgamal.ru. <https://orcid.org/0009-0002-9296-0588>

**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). 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>

**Государев Андрей Игоревич**, начальник отделения разработки и масштабирования, 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: gosudarev@medgamal.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8594-2627>

**Ефимова Юлия Александровна**, к.х.н., доцент, кафедра аналитической химии им. И.П. Алимарина, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119454, Россия, Москва, пр-т Вернадского, д. 78). E-mail: efimova\_yulia@bk.ru. Scopus Author ID 25228417800, <https://orcid.org/0000-0002-3582-0012>

**Щебляков Дмитрий Викторович**, д.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: sdmityrv@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**, 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, 119454, Russia). E-mail: polanskiydmityriy15@gmail.com. Scopus Author ID 57890564200, <https://orcid.org/0000-0003-0792-7063>

**Vladimir V. Prokofiev**, Laboratory Research Assistant, 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: vladimir.prokofev.96@mail.ru. Scopus Author ID 57300704700, <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>

**Alexandra V. Samorukova**, Leading 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: av.samorukova@medgamal.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8060-4370>

**Fedor A. Shishkonakov**, 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: fa.shishkonakov@medgamal.ru. <https://orcid.org/0009-0009-7886-6019>

**Dmitry V. Vasiliev**, 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: vasilyevdv@medgamal.ru. <https://orcid.org/0009-0002-9296-0588>

**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). 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>

**Andrey I. Gosudarev**, Head of the Department of Development and Scaling, 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: gosudarev@medgamal.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8594-2627>

**Yuliya A. Efimova**, Cand. Sci. (Chem.), 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, 119454, Russia). E-mail: efimova\_yulia@bk.ru. Scopus Author ID 25228417800, <https://orcid.org/0000-0002-3582-0012>

**Dmitry V. Shcheblyakov**, Dr. 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, RSCI SPIN-code 8132-2320, <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>