

РАЗРАБОТКА И МАСШТАБИРОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРОИЗВОДСТВА ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ МОДИФИЦИРОВАННЫХ ОДНОДОМЕННЫХ АНТИТЕЛ

Научный руководитель – Есмагамбетов Ильяс Булатович

Полянский Дмитрий Сергеевич

Аспирант

МИРЭА - Российский технологический университет, Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

E-mail: preclanc@mail.ru

Актуальность:

В течение последних лет моноклональные антитела часто используются для подавления распространения инфекции посредством прямой вируснейтрализующей активности. Однако, также перспективностью в борьбе с различными вирусами обладают однодоменные антитела, которые являются наименьшим функциональным форматом антител и представляют собой эффективную альтернативу классических моноклональных антител во многих аспектах. Существует множество работ, демонстрирующих успешное применение модифицированных однодоменных антител для терапии и профилактики различных инфекционных заболеваний [1–11]. Поскольку данные антитела имеют большой спрос, то необходимо постоянно совершенствовать технологию их получения. В лаборатории иммунобиотехнологии ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, при помощи иммунизации двугорбого верблюда и технологии фагового дисплея, были получены однодоменные антитела P2C5, B5, B10 обладающее высокой вируснейтрализующей активностью в отношении различных штаммов вируса SARS-CoV-2, а также антитело B11, нейтрализующее ботулотоксин типа А. На основе данных антител были получены тяжелоцепочечные антитела P2C5-Fc, B5-Fc, B10-Fc, B11-Fc представляющее собой однодоменные антитела слитые с Fc-фрагментом иммуноглобулина IgG1 человека. Для получения производственных серий препаратов для доклинических и клинических исследований необходимо было разработать технологию культивирования стабильных клеточных линий, продуцирующей антитела и эффективную технологию хроматографической очистки самих антител.

Цель исследования: разработать и масштабировать технологию получения препаратов на основе модифицированных однодоменных антител.

Задачи:

1. Разработать технологию культивирования клеточных линий, продуцирующих модифицированные однодоменные антитела;
2. Разработать технологию очистки модифицированных однодоменных антител;
3. Изучить свойства полученных препаратов;
4. Оптимизировать технологию производства препаратов на основе модифицированных однодоменных антител под GMP производство;
5. Осуществить трансфер технологии на GMP производство.

Результаты:

1. Разработана технология культивирования клеточных линий: CHO GamP2C5 клон 78, CHO B5 клон 4, CHO B10 клон 4, CHO B11-Fc-B7 продуцирующих модифицированные однодоменные антитела GAMP2C5, GAMB5, GAMB10, GAMB11 соответственно, обеспечивающая выход целевого продукта: 0,5 г/л для GAMP2C5, 0,7 г/л для GAMB5, 0,5 г/л для GAMB10, 0,6 г/л для GAMB11;

2. Разработана технология очистки модифицированных однодоменных антител с применением мультимодального сорбента Ca++ Pure-NA (TOSOH, Япония) на основе керамического гидроксипатита 1 типа, позволяющая эффективно избавляться от низкомолекулярных примесей и агрегированных форм антитела;

3. Препараты, полученные с помощью разработанной технологии, характеризуются высокой степенью чистоты (более 95%), отсутствием различных примесей (остаточный белок штамма продуцента, остаточный белок А и остаточное ДНК штамма продуцента), а также обладают гидродинамическим радиусом молекул, соответствующим теоретическому значению мономерной форм антител;

4. При помощи системы минибиореакторов Ambr250 были подобраны условия культивирования для клеточных линий CHO GamP2C5 клон 78, CHO B5 клон 4, CHO B10 клон 4, CHO B11-Fc-B7 для масштабирования технологии культивирования в биореакторе с осевым типом перемешивания STR200;

5. Осуществлен трансфер технологии на GMP производство в осевой биореактор STR200; препараты после масштабирования показали сопоставимые значения с данными по чистоте и подлинности в лабораторной технологии.

Источники и литература

- 1) 1. 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>]
- 2) 2. 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. Наноантитела – потенциальные терапевтические препараты 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>]
- 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) 4. Voronina D.V., Shcheblyakov D.V., Favorskaya I.A., Esmagambetov I.B., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulin A.I., Zubkova O.V., Popova O., Kan V.Y., Bandelyuk A.S., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditskiy B.S., Gintsburg A.L. Cross-Reactive Fc-Fused Single-Domain Antibodies to Hemagglutinin Stem Region Protect Mice from Group 1 Influenza A Virus Infection. *Viruses*. 2022;14(11):2485. <https://doi.org/10.3390/v14112485>

- 5) 5. 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>
- 6) 6. 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. <http://doi.org/10.3390/toxins11080464>
- 7) 7. 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>
- 8) 8. 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>
- 9) 9. Dmitry V. Shcheblyakov, Irina A. Favorskaya, Inna V. Dolzhikova, Anastasia I. Korobkova, Ilias B. Esmagambetov, Olga L. Voronina, Olga V. Zubkova, Amir I. Tukhvatulin, Artem A. Derkaev, Ekaterina I. Ryabova, Anna A. Iliukhina, Iliia D. Zorkov, Daria M. Grousova, Dmitriy A. Reshetnikov, Natalia N. Ryzhova, Ekaterina I. Ermolova, Marina S. Kunda, Ilya O. Matyuta, Konstantin M. Boyko, Alexander L. Gintsburg. Ultra-potent RBM-specific single-domain antibody broadly neutralizes multiple SARS-CoV-2 variants with picomolar activity *Int J Biol Macromol.* 2025; 19:145386. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2025.145386>.
- 10) 10. Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Банделюк А.С., Верховская Л.В., Вискова Н.Ю., Авдонова Е.Д., Прокофьев В.В., Рябова Е.И., Есмагамбетов И.Б., Первоикина 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. = FineChem. Technol.* 2023;18(1):48–64 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>]
- 11) 11. 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. Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment. 2025;25(1):58-70. (In Russ.) <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2025-591>]