

БИОХИМИЯ И БИОТЕХНОЛОГИЯ
BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>



УДК 615.37

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

**Способ получения рекомбинантных антител,
продуцируемых клеточной линией, трансдуцированной
рекомбинантными аденовирусами**

Е.С. Седова✉, **Д.Н. Щербинин**, **А.С. Банделюк**, **Л.В. Верховская**, **Н.Ю. Вискова**,
Е.Д. Авдонина, **В.В. Прокофьев**, **Е.И. Рябова**, **И.Б. Есмагамбетов**, **К.А. Первойкина**,
Е.А. Богачева, **А.А. Лысенко**, **М.М. Шмаров**

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства Здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

✉ Автор для переписки, e-mail: sedova-es@yandex.ru

Аннотация

Цели. Разработать технологию получения рекомбинантных антител в суспензионной культуре клеток человека НЕК293 с помощью трансдукции рекомбинантными аденовирусами человека пятого серотипа, несущими гены, экспрессирующие тяжелые и легкие цепи антител, на примере двух противогриппозных антител широкого спектра действия 27F3 и CR9114.

Методы. Рекомбинантные аденовирусы Ad5-27F3-H, Ad5-CR9114-H и Ad5-27F3-L, несущие ген тяжелой цепи антитела 27F3, ген тяжелой цепи антитела CR9114 и ген легкой цепи 27F3, были получены с помощью набора AdEasy™ Adenoviral vector system. Для накопления препаративных количеств рекомбинантных антител r27F3 и rCR9114 суспензионную клеточную линию НЕК293 трансдуцировали рекомбинантными аденовирусами, несущими гены тяжелых и легких цепей антител, и культивировали клетки в биореакторе волнового типа. Рекомбинантные антитела очищали из культуральной жидкости хроматографическим методом. Молекулярную массу полученных антител

анализировали с помощью белкового электрофореза, их способность взаимодействовать с вирусами гриппа А и В методом вестерн-блот анализа, а способность нейтрализовать вирусы гриппа А и В с помощью реакции вирус-нейтрализации.

Результаты. Отработана методика накопления и очистки рекомбинантных антител r27F3 и CR9114 из культуральной жидкости суспензионной культуры клеток человека после трансдукции ее рекомбинантными аденовирусами, несущими гены тяжелых и легких цепей этих антител. Показана способность антитела r27F3 взаимодействовать с вирусами гриппа А подгруппы 1 (кроме вируса гриппа А субтипа H2) и подгруппы 2 и нейтрализовать их. Показана способность антитела rCR9114 взаимодействовать с вирусами гриппа А подгруппы 1 и вирусами гриппа В, а также нейтрализовать вирусы гриппа А подгруппы 1.

Выводы. Отработана технология получения рекомбинантных антител в суспензионной культуре клеток HEK293 с помощью трансдукции рекомбинантными аденовирусами, несущими гены, экспрессирующие тяжелые и легкие цепи антител, и показана их специфичность.

Ключевые слова: рекомбинантные антитела, рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа, суспензионная культура клеток

Для цитирования: Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Банделюк А.С., Верховская Л.В., Вискова Н.Ю., Авдонина Е.Д., Прокофьев В.В., Рябова Е.И., Есмагамбетов И.Б., Первойкина К.А., Богачева Е.А., Лысенко А.А., Шмаров М.М. Способ получения рекомбинантных антител, продуцируемых клеточной линией, трансдуцированной рекомбинантными аденовирусами. *Тонкие химические технологии*. 2023;18(1):48–64. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>

RESEARCH ARTICLE

Method for obtaining recombinant antibodies produced by a cell line transduced with recombinant adenoviruses

Elena S. Sedova✉, **Dmitriy N. Shcherbinin**, **Alina S. Bandelyuk**, **Ludmila V. Verkhovskaya**, **Natalia Yu. Viskova**, **Elena D. Avdonina**, **Vladimir V. Prokofiev**, **Ekaterina I. Ryabova**, **Ilias B. Esmagambetov**, **Kristina A. Pervoykina**, **Elena A. Bogacheva**, **Andrei A. Lysenko**, **Maksim M. Shmarov**

The Gamaleya National Center for Epidemiology and Microbiology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 123098 Russia

✉ *Corresponding author, e-mail: sedova-es@yandex.ru*

Abstract

Objectives. To develop a technology for obtaining recombinant antibodies in a suspension culture of human HEK293 cells using transduction with recombinant adenovirus serotype 5 (rAd5) carrying genes expressing heavy and light chains of antibodies on the example of two broad-spectrum anti-influenza antibodies 27F3 and CR9114.

Methods. Ad5-27F3-H, Ad5-CR9114-H, and Ad5-27F3-L recombinant adenoviruses carrying the 27F3 antibody heavy chain gene, CR9114 antibody heavy chain gene, and 27F3 light chain gene, respectively, were generated using the AdEasy™ Adenoviral vector system. To accumulate preparative amounts of recombinant r27F3 and rCR9114 antibodies, the HEK293 suspension cell line was transduced with recombinant adenoviruses carrying genes for heavy and light chains of antibodies. The cells were cultured in a wave-type bioreactor. Chromatography was used to purify recombinant antibodies from the culture medium. After analyzing the molecular weights of purified antibodies using protein electrophoresis, their ability to interact with influenza A and B viruses was analyzed using the Western blot technique, while their ability to neutralize influenza A and B viruses was evaluated using the virus neutralization assay.

Results. A method for the accumulation and purification of recombinant r27F3 and CR9114 antibodies from the culture medium of a suspension culture of human cells following transduction with its recombinant adenoviruses carrying the genes for heavy and light chains of these antibodies was developed. The ability of the r27F3 antibody to interact with and neutralize influenza A viruses of group 1 (except influenza A virus subtype H2) and group 2 was shown. The ability of the rCR9114 antibody to interact with influenza A viruses of group 1 and influenza B viruses, as well as to neutralize influenza A viruses of group 1, was demonstrated.

Conclusions. A technology for obtaining recombinant antibodies in a suspension culture of HEK293 cells using transduction with recombinant adenoviruses carrying genes expressing heavy and light chains of antibodies was developed along with a confirmation of their specificity.

Keywords: recombinant antibodies, recombinant human adenovirus 5 serotype, suspension cell culture

For citation: Sedova E.S., Shcherbinin D.N., Bandelyuk A.S., Verkhovskaya L.V., Viskova N.Yu., Avdonina E.D., Prokofiev V.V., Ryabova E.I., Esmagambetov I.B., Pervoykina K.A., Bogacheva E.A., Lysenko A.A., Shmarov M.M. Method for obtaining recombinant antibodies produced by a cell line transduced with recombinant adenoviruses. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2023;18(1):48–64 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2023-18-1-48-64>

ВВЕДЕНИЕ

Благодаря таким свойствам, как высокое сродство и специфичность к конкретному антигену, моноклональные антитела широко используются как в лабораторной практике для обнаружения, очистки и характеристики целевых белков, так и в медицине, для диагностических и терапевтических целей [1, 2]. Биологические препараты на основе антител являются одним из самых продаваемых классов биомолекул на современном рынке.

Современные рекомбинантные технологии позволяют проводить наработку антител в препаративных количествах. На сегодняшний день для продукции рекомбинантных антител (pAT), а также их фрагментов, применяют следующие системы экспрессии: бактериальную, дрожжевую, экспрессию с помощью бакуловирусных векторов в клетках насекомых, а также экспрессию в клетках млекопитающих [3]. Все эти системы экспрессии подразумевают получение высоко-

производительного продуцента, постоянно экспрессирующего целевой белок. Бактериальная [4] и дрожжевая [5] системы экспрессии характеризуются высоким выходом целевого продукта (20–1000 мг антитела с 1 л культуральной жидкости), однако подходят только для получения негликозилированных фрагментов антител (бактерий) или высоко манозилированных форм антител, которые быстро выводятся из организма (дрожжи) [6]. Гликозилирование антител, полученных в дрожжевой и бакуловирусной системе экспрессии [7], отличается от нативного гликозилирования антител млекопитающих [8]. Сегодня большинство терапевтических антител производят в клетках млекопитающих, которые лучше всего подходят для продукции pAT, обладающих наибольшей степенью биологического сходства с антителами, вырабатываемыми в организме человека. Количество pAT, получаемых в клетках СНО (клетки яичника китайского хомячка) могут достигать примерно 10 г/л культуральной

жидкости [8]. Еще более высокого титра антител можно добиться при экспрессии в эмбриональной линии клеток сетчатки человека Per.C6 (*Crucell*, Лейден, Нидерланды) – до 27 г/л в перфузионном биореакторе. Однако создание высокопродуктивных клеточных линий слишком дорого, трудоемко и требует много времени [9].

Более простым и дешевым методом является временная экспрессия генов антител в клетках млекопитающих, так как она не требует создания клеточных линий-продуцентов [10]. Такой способ продукции антител подходит для мелкосерийного и внутрилабораторного производства. В качестве примера можно привести самый распространенный на сегодняшний день метод наработки рАТ – временная котрансфекция клеточной линии СНО двумя плазмидами, несущими экспрессионные кассеты с легкой и тяжелой цепями антитела. При использовании такой технологии экспрессионная кассета не интегрируется в геном клетки и, соответственно, длительная экспрессия антител не поддерживается, гены экспрессируются в течение нескольких дней, после чего транскрипт теряется из-за деления клетки или факторов окружающей среды [11].

Несмотря на широкое применение, временная экспрессия рАТ в клетках СНО также имеет недостатки. Показано, что профиль гликозилирования различается у белков, получаемых в культуре клеток СНО, и белков, получаемых в культурах клеток человека [12]. Поэтому такие человеческие клеточные линии, как Per.C6 и HEK293, также широко используются для получения моноклональных антител. Клеточная линия HEK293 способна обеспечивать оптимальные пост-трансляционные модификации антител человека, включая их гликановый профиль [13, 14]. Системы экспрессии, основанные на суспензионных клетках человека, с использованием бессывороточных сред, поддерживающих высокую плотность суспензии, позволяют добиться выхода целевых антител в десятки и сотни миллиграмм с литра культуральной среды [6]. Однако трансфекция суспензионных клеточных культур является трудоемким методом, требующим использования достаточно дорогих реактивов, а также высокоочищенных плазмид [15], что не оправдано для мелкосерийного и внутрилабораторного производства.

В связи с вышесказанным, в настоящее время актуальными является разработка новых или усовершенствование существующих технологий для наработки и очистки рАТ. Одной из таких технологий является использование рекомбинантных вирусных векторов, позволяющих эффективно доставлять генетическую информацию во многие типы клеток, в том числе в суспензионные

культуры клеток человека [16]. Использование рекомбинантных вирусных векторов для доставки в клетки-продуценты генетической информации, кодирующей целевые антитела, позволяет удешевить и упростить технологию благодаря исключению стадии трансфекции. Наиболее распространенным и хорошо изученным вирусным вектором для доставки генетической информации в клетки человека, является рекомбинантный аденовирус человека пятого серотипа (рАд5). Нами была разработана методика получения рАТ путем трансдукции линии клеток эмбриональной почки человека HEK293 рАд5, несущими гены тяжелой и легкой цепи целевых антител. Такой подход впервые используется для разработки технологии получения препаративных количеств рекомбинантных антител. В качестве целевых антител были выбраны антитела к гемагглютининому вируса гриппа широкого спектра действий – 27F3 [17] и CR9114 [18].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Вирусы

В работе использовали вирусы гриппа А A/California/04/2009 (H1N1) (номера в GenBank KY238116–KY238123), A/BlackDuck/NewJersey/1580/1978 (H2N3) (номера в GenBank KX879562–KX879569), A/Aichi/2/1968 (H3N2) (номера в GenBank KX879570–KX879577), A/Duck/Pennsylvania/10218/1984 (H5N2) (номера в GenBank KX879578–KX879585), A/Chicken/Moscow/NJ294598-12/20017 (H7N2) (номера в GenBank MN400380–MN400388), A/Swine/HongKong/9A-1/1998 (H9N2) (номера в GenBank KX879586–KX879593), а также вирусы гриппа В – В/Phuket/3073/2013 и В/Washington/20/2019, полученные из Государственной коллекции вирусов РФ (подразделение Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Культуры клеток

Адгезионная и суспензионная клеточные культуры эмбриональной почки человека HEK293 были получены из Коллекции клеточных культур лаборатории культур тканей подразделения Института вирусологии им. Д. И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. Культура клеток аденокарциномы кишечника Сасо-2 была получена из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии Российской академии наук.

Антитела

В работе был использован антивидовой иммунопероксидазный конъюгат Anti-Human IgG (Fc specific)–Peroxidase antibody (A0170, Merck, Германия).

Получение рAd5, экспрессирующих гены тяжелой и легкой цепи антитела человека 27F3, а также ген тяжелой цепи антитела человека CR9114

Последовательности нуклеотидов, кодирующие тяжелые и легкие цепи целевых антител, были химически синтезированы (*Евроген*, Россия) и клонированы в плазмиду рAL-TA. Далее целевые гены переклонировали в плазмиду рShuttle-CMV из набора AdEasy™ Adenoviral vector system (*Agilent Stratagene*, США). Рекомбинантные аденовирусы Ad5-27F3-Н, Ad5-CR9114-Н и Ad5-27F3-L, несущие гены тяжелой цепи антитела 27F3, ген тяжелой цепи антитела CR9114 и ген легкой цепи антитела 27F3, соответственно, получали согласно инструкции к набору. Титры рAd5 определяли на адгезионной культуре клеток НЕК293 с помощью реакции бляшкообразования [19].

Накопление препаративных количеств рAd5 27F3 и гCR9114 в культуральной жидкости

Для накопления препаративных количеств антител г27F3 и гCR9114 суспензионную клеточную линию НЕК293 трансдуцировали рAd5 Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-Н или Ad5-27F3-L и Ad5-CR9114-Н. Для этого клетки культивировали в биореакторе волнового типа в мешках для культивирования клеток Biostat® Cultibag RM 5L (*Sartorius AG*, Германия) в культуральной среде CDM4НЕК293 NuClone™ (*Cytiva*, США) с добавлением 2 г/л бикарбоната натрия (*ПанЭко*, Россия), 1 г/л Poloxamer 188 (*Corning*, США) и 4 мМ L-глутамин (*ПанЭко*, Россия) при температуре 37 °С и 5% CO₂. После достижения концентрации 2·10⁶ клеток/мл в культуру асептически вносили 100 мл вирусной суспензии, содержащей аденовирус Ad5-27F3-L (2·10⁸ БОЕ/мл) (бляшкообразующих единиц в мл), и 200 мл суспензии, содержащей аденовирус Ad5-27F3-Н (10⁸ БОЕ/мл), или 200 мл суспензии, содержащей аденовирус Ad5-CR9114-Н (10⁸ БОЕ/мл). Клетки совместно с рекомбинантными аденовирусами инкубировали в течение 3 суток до достижения 50–60% цитопатического действия (ЦПД). Процент погибших клеток определяли путем визуального подсчета в камере Горяева аликвоты клеточной суспензии,

окрашенной трипановым синим. Полученную клеточную суспензию центрифугировали при 7700g в течение 20 мин при комнатной температуре (20 °С) и отбирали надосадочную жидкость, которую хранили при температуре –70 °С в стерильных пробирках.

Препаративное выделение рAd5 27F3 и гCR9114 из культуральной жидкости

Четыре литра осветленной культуральной жидкости фильтровали через капсульный фильтр Sartopore® 2 0.45/0.2 мкм (*Sartorius AG*, Германия). рН культуральной жидкости доводили до 7.2 добавлением 1 М Трис-НСl, рН 8. Кондуктивность доводили до 17 мС раствором 5 М хлорида натрия. Хроматографическую колонку ХК26/20 (*Cytiva*, США), упакованную 20 мл сорбента MabSelect SuRe™ (*Cytiva*, США), уравнивали буфером, содержащим 20 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлорида натрия, рН 7.2. Культуральную жидкость наносили с линейной скоростью 500 см/ч. После нанесения колонку промывали 10 объемами колонки буфером, содержащим 20 мМ фосфата натрия и 150 мМ хлорида натрия, рН 7.2. Антитела элюировали в изократическом режиме буфером, содержащим 150 мМ хлорида натрия, 0.1% Tween® 20, 200 мМ глицин-НСl, рН 3.5, и нейтрализовали добавлением в элюат 10% раствора 1 М Трис-НСl, рН 8. Дополнительную очистку и замену буфера на буфер, содержащий 20 мМ фосфата натрия, 150 мМ хлорида натрия, 0.05% Tween® 20, рН 7.2, проводили при помощи гель-фильтрации на хроматографической колонке ХК 26/100 (*Cytiva*, США), упакованной сорбентом Superdex™ 200 prep grade (*Cytiva*, США).

Для удаления остаточного количества возможной примеси рAd5 проводили противовирусную фильтрацию препаратов рAd5 при помощи фильтров Viresolve® Pro Micro (*Millipore*, США). Фильтрацию осуществляли при постоянном давлении 0.9 бар, при помощи подачи сжатого воздуха. Отработанные фильтры перед утилизацией стерилизовали автоклавированием.

Дот-иммуноферментный анализ (дот-ИФА)

На нитроцеллюлозный фильтр по радиусу располагали точки для последующего нанесения образцов и визуального контроля адсорбции, включая точки для положительного и отрицательного контролей. Образцы в объеме 1.5 мкл наносили на точку и давали им высохнуть, контролируя на просвет. Затем нитроцеллюлозный фильтр отмывали 3 раза для удаления несвязавшихся белков раствором 0.1% Tween® 20.

От неспецифического связывания фильтр блокировали 30 мин на шейкере рабочим фосфатным буфером pH 7.2 с 2% инертным белком Blosker™ Casein в фосфатно-солевом буфере (*Thermo Fisher Scientific*, США). По окончании инкубации фильтр отмывали три раза дистиллированной водой, затем три раза по 10 мин раствором 0.1% Tween® 20 на шейкере. После отмывки фильтр инкубировали в рабочем разведении 1/5000 антивидового иммунопероксидазного конъюгата Anti-Human IgG (Fc specific)–Peroxidase antibody (*Merck*, Германия) в течение 30–40 мин при 37 °С на шейкере. После окончания инкубации снова проводили отмывку. Окрашивание проводили готовым раствором 3,3'-диаминобензидина Pierce™ DAB Substrate Kit (*Thermo Fisher Scientific*, США). Реакцию останавливали через 10 мин, перенеся фильтр в дистиллированную воду.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН)

Фракционирование белков проводили методом электрофореза в 10% ПААГ-ДСН, в буферной системе Лэммли, с использованием вертикального прибора для мини-гелей Mini-Protean® 3 Cell (*Bio-Rad*, США). С целью анализа мономерной и мультимерной форм белка, перед внесением в гель образцы были обработаны в денатурирующих (+) и неденатурирующих (–) условиях. К образцу (+) был добавлен равный объем двукратного диссоциирующего буфера 2× Laemmli Sample Buffer (*Merck*, Германия), содержащего меркаптоэтанол, затем пробы были прогреты при 95 °С в течение 7 мин. К образцу (–) был добавлен равный объем двукратного буфера, не содержащего меркаптоэтанол, без последующего прогревания. Образцы вносили в лунки геля и проводили электрофорез при постоянной силе тока 20 мА/гель в электродном буфере следующего состава: 25 мМ Трис-НСl, 0.2 М глицина, 0.1% додецилсульфат натрия, pH 8.3. По окончании электрофореза гель сканировали с помощью прибора Gel Doc™ EZ imager (*Bio-Rad*, США). В качестве маркеров для электрофореза были использованы PageRuler™ Unstained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific*, США) и PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder (*Thermo Fisher Scientific*, США).

Высокоэффективная жидкостная хроматография и гель-фильтрация (ВЭЖХ-ГФ)

Для изучения очищенных препаратов рАТ r27F3 и rCR9114 применяли метод ВЭЖХ с использованием хроматографической системы Agilent 1260 Infinity II (*Agilent Technologies*, США)

и хроматографическую колонку Phenomenex SEC-s3000 (размер частиц: 5 мкм, размер пор: 290 Å, геометрия: 300 × 7.8 мм) (*Phenomenex*, США). Хроматографию проводили в изократическом режиме, со скоростью потока 0.3 мл/мин, 25 °С, с использованием ультрафиолетового детектора на длине волны 280 нм. Обсчет полученных результатов проводили при помощи программного обеспечения OpenLAB CDS Chemstation VL Edition (*Agilent Technologies*, США).

Изучение функциональной активности рАТ с помощью вестерн-блоттинга

Для постановки вестерн-блоттинга был осуществлен электрофорез в ПААГ-ДСН, а затем проведен трансфер белков из геля на мембрану полусухим переносом на приборе Trans Blot® SD Semi-dry Transfer cell (*Bio-Rad*, США) при постоянной силе тока 250 мА на площадь геля 5 × 8 см. По окончании переноса нитроцеллюлозную мембрану Nitrocellulose membranes 0.2 (*Bio-Rad*, США) трижды отмывали в дистиллированной воде в течение 10 мин и блокировали свободные сайты мембраны буфером, содержащем инертный белок Blosker™ Casein в фосфатно-солевом буфере (*Thermo Fisher Scientific*, США) в течение 30 мин при 37 °С на шейкере. Затем мембрану инкубировали буферном растворе, содержащем антитело r27F3 или антитело CR9114 в рабочем разведении 1/50 на шейкере при 22 °С в течение ночи (16 ч). По окончании инкубации, мембрану промывали дистиллированной водой, затем трижды по 10 мин фосфатным буфером pH 7.2 с 0.1% Tween® 20 на шейкере. Затем проводили инкубацию с вторичными антителами к Fc-фрагменту IgG человека, конъюгированными с пероксидазой хрена в разведении 1/5000 в течение часа при 37 °С на шейкере. После инкубации мембрану снова отмывали и проводили хемилюминисцентную детекцию связавшегося комплекса с использованием реактива ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent (*GEHealthcare*, США) с последующим сканированием иммунореплики на приборе Amersham™ Imager 680 (*GEHealthcare*, США).

Накопление и концентрирование вирусов гриппа

Вирусы гриппа А и В были накоплены в аллантоисной жидкости 9-дневных куриных эмбрионов при 37 °С в течение 48 ч. Вирус-содержащая аллантоисная жидкость хранилась при –70 °С.

Вирусосодержащую аллантоисную жидкость после осветления центрифугированием при

3000 об/мин, 15 мин, 4 °С наслаивали на 4 мл 20% сахарозы в буферном растворе, содержащем 0.15 М NaCl и 0.01 М Трис-HCl, pH 7.2 и осаждали ультрацентрифугированием в роторе SW-27 (*Beckman Coulter*, США) со скоростью 22000 об/мин в течение 90 мин при 4 °С. Полученный осадок ресуспендировали в гомогенизаторе Даунса в том же буферном растворе в 1/64 исходного объема и повторно осветляли центрифугированием на малой скорости (3500 об/мин, 8 мин, 4 °С). Очищенный и сконцентрированный вирусный препарат титровали с помощью реакции гемагглютинации (РГА) [20], а также оценивали 50% тканевое цитопатическое действие TCD_{50} /мл на культуре клеток аденокарциномы кишечника Сасо-2, и хранили при -80 °С.

Реакция вирус-нейтрализации

Реакцию вирус-нейтрализации проводили на культуре клеток аденокарциномы кишечника Сасо-2. Клетки культивировали на среде Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (*HyClone*, США) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки (*HyClone*, США) 2 г/л бикарбоната натрия (*ПанЭко*, Россия), пенициллина/стрептомицина 25000 Ед (*ПанЭко*, Россия) и 4 мМ L-глутамин (*ПанЭко*, Россия) при температуре 37 °С и 5% CO₂. Реакцию вирус-нейтрализации проводили в 96-луночном планшете при концентрации клеток (4–6)·10⁴ кл/луночку. Предварительно в 96-луночном планшете смешивали целевой вирус гриппа в количестве 10² TCD_{50} /луночку и двукратные разведения сывороток, сделанные в среде с 0.5% гидролизатом лактальбумина с солями Хенкса (*ПанЭко*, Россия). Полученную смесь инкубировали в течение 40 мин при 37 °С и добавляли к клеткам. Через 40 мин проводили смену среды на бессывороточную DMEM. Через 4–5 суток среду с планшета с клеточной культурой отбирали и оценивали в ней присутствие частиц вируса гриппа с помощью РГА [20]. Анализ проводили с четырехкратным повтором. Результаты реакции выражали с помощью 50% ингибирующей концентрации (ИК₅₀), представляющей собой количество антитела, ингибирующее вирус в 50% случаев.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рАТ5, экспрессирующих гены антител человека 27F3 и CR9114

Для разработки новой технологии получения рАТ в суспензионных эукариотических клетках, трансдуцированных рекомбинантными вирусными

векторами, экспрессирующими гены рАТ, нами была выбрана система «рекомбинантный вирусный вектор на основе аденовируса человека пятого серотипа для трансдукции суспензионной культуры клеток человека НЕК293». Такая система позволяет продуцировать антитела с наиболее близким к нативному для человека профилем гликозилирования и не требует дорогостоящих реактивов и трудоемкого метода трансфекции клеточной суспензии плазмидами. Ранее нами были опубликованы работы, где была показана возможность экспрессии гена рекомбинантного мини-антитела с использованием аденовирусного вектора в эукариотических клетках как *in vitro* [21], так и *in vivo* [22].

Мы провели литературный поиск моноклональных антител, которые могли бы послужить моделью для обрабатываемой технологии. В качестве модели мы решили выбрать антитела, специфичные к гемагглютинину вируса гриппа, с известной третичной структурой и широким спектром действия, позволяющим выявлять вирусы гриппа различных субтипов. Как правило, наибольшей шириной спектра действия обладают антитела, взаимодействующие с консервативной, стволовой частью гемагглютинина. Из множества известных моноклональных антител к стволу домену гемагглютинина, четыре антитела (CR9114, 27F3, CR6261, F10) взаимодействуют с гемагглютинином только в комплементарных определяющих областях тяжелых цепей [23], что делает их удобной моделью для препаративного получения с помощью рекомбинантных аденовирусов, так как не требует создания отдельных конструкций, кодирующих легкие цепи, для каждого антитела. В качестве модельных нами были выбраны противогриппозные антитела 27F3 и CR9114, поскольку они имеют максимально широкий спектр распознавания. В литературе показана возможность антитела 27F3 взаимодействовать с гемагглютинами вирусов гриппа субтипов Н1, Н5, Н6, Н9, Н11, Н12, Н13 и Н16 подгруппы Н1, и гемагглютининов Н3, Н7 и Н10 подгруппы Н3 [17]. Для антитела CR9114 показана способность взаимодействовать с гемагглютинами вирусов гриппа Н1, Н5, Н9, Н12, Н13, Н16 подгруппы Н1 и гемагглютинами вирусов гриппа Н3, Н7, Н10, Н15 подгруппы Н3, а также с различными вирусами гриппа В [18].

Антитела 27F3 и CR9114 взаимодействуют со стволовым доменом гемагглютинина вируса гриппа и относятся к классу антител VH1-69. Взаимодействие этого класса антител со своим эпитопом проходит при участии только тяжелой цепи [17]. Согласно литературным данным, для препаративного накопления с высоким выходом

дом тяжелой цепи антитела в эукариотических системах экспрессии, необходима экспрессия легкой цепи в эквивалентных количествах [7]. Поэтому нами были сконструированы три рАд5: рАд5, несущий ген тяжелой цепи антитела 27F3, рАд5, несущий ген тяжелой цепи антитела CR9114, а также рАд5, несущий ген легкой цепи антитела 27F3, который был предназначен для получения транзientной экспрессии как полноразмерного антитела 27F3, так и полноразмерного антитела CR9114.

Аминокислотные последовательности Fab-фрагментов тяжелой и легкой цепей антитела 27F3 и тяжелой цепи CR9114 были получены из белковой базы данных третичных структур – Protein Data Bank ID¹ (5WKO и 4FQH). На основании полученных аминокислотных последовательностей были построены нуклеотидные последовательности с кодонами, оптимизированными для экспрессии в клетках человека. Были разработаны генетические конструкции, в состав которых входил ген тяжелой или легкой цепи целевого антитела и лидерная последовательность секретируемой щелочной фосфатазы (secreted alkaline phosphatase, SEAP), необходимая для выхода антитела из клетки в культуральную среду. Схемы полученных конструкций представлены на рис. 1.

Рекомбинантные аденовирусы Ad5-27F3-H, Ad5-CR9114-H и Ad5-27F3-L получали в соответствии с инструкцией к набору AdEasy™ Adenoviral vector system (Agilent Stratagen, США). Препаративное накопление рекомбинантных аденовирусов проводили в адгезионной культуре эукариотических клеток линии HEK293. В результате были получены клеточные лизаты, содержащие рекомбинантные аденовирусы Ad5-27F3-L, Ad5-CR9114-H и Ad5-27F3-H, имеющие титры $2 \cdot 10^8$, $1 \cdot 10^8$ и $1 \cdot 10^8$ БОЕ/мл, соответственно.

Подбор условий для получения препаративного количества рАТ в культуре клеток HEK293

На следующем этапе работы были подобраны оптимальные условия для накопления в культуральной жидкости максимального уровня рАТ. Подбор условий проводили на примере рАТ r27F3 при трансдукции суспензионной линии клеток HEK293 рекомбинантными аденовирусами Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-H. Клеточную суспензию с концентрацией $1 \cdot 10^6$ клеток/мл трансдуцировали разными количествами клеточных лизатов,

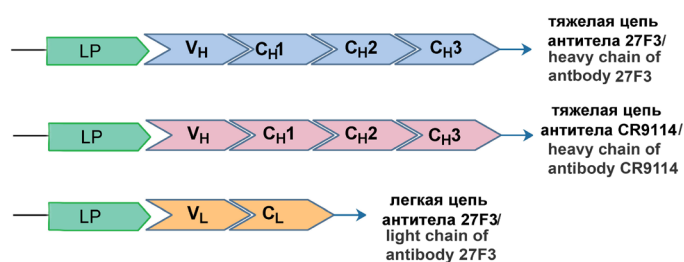


Рис. 1. Схематическое изображение генетических конструкций, кодирующих тяжелую цепь антитела 27F3, тяжелую цепь антитела CR914 и легкую цепь антитела 27F3. LP – лидерный пептид секретируемой щелочной фосфатазы SEAP; V_H – вариабельный домен тяжелой цепи; V_L – вариабельный домен легкой цепи; C_H – константный домен тяжелой цепи; C_L – константный домен легкой цепи.

Fig. 1. Schematic representation of the genetic constructs encoding the heavy chain of the 27F3 antibody, the heavy chain of the CR914 antibody, and the light chain of the 27F3 antibody. LP – secreted alkaline phosphatase SEAP leader peptide; V_H – heavy chain variable domain; V_L – light chain variable domain; C_H – heavy chain constant domain; C_L – light chain constant domain.

содержащих аденовирусные частицы Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-H так, чтобы соотношение частиц было 1:1. Были использованы дозы рАд5 2 БОЕ/клетку каждого аденовируса, 20 и 200 БОЕ/клетку. Оценку количества целевого антитела в культуральной жидкости проводили при наступлении 30–40%, 50–60% и 100% ЦПД. Полученные образцы культуральной жидкости анализировали в дот-ИФА с помощью конъюгированных с пероксидазой антител к Fc-фрагменту IgG человека. Каждая точка эксперимента была повторена трижды. Результаты дот-ИФА были разделены на три группы: «–» – отсутствие окрашенной точки на мембране в месте внесения образца, «+» – присутствие окрашенной точки, «++» – присутствие яркой, хорошо заметной окрашенной точки. Полученные результаты подбора условий представлены в табл. 1.

Как видно из табл. 1, оптимальными параметрами для накопления антитела r27F3 являются доза 200 БОЕ/клетку каждого рАд5 Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-H, и наступление 50–60% ЦПД, что соответствует 3 суткам инкубации.

Дальнейшее накопление антитела r27F3 проводили при трансдукции клеточной суспензии 200 БОЕ/клетку каждого рАд5 Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-H и антитела rCR9114 при трансдукции суспензии 200 БОЕ/клетку Ad5-27F3-L и Ad5-CR9114-H. Сбор культуральной жидкости проводили на третьи сутки инкубации при наступлении 50–60% ЦПД.

¹ <https://www.rcsb.org/docs/general-help/identifiers-in-pdb>. Дата обращения 20.01.2021. / Accessed January 20, 2021.

Таблица 1. Подбор условий препаративного накопления антитела r27F3 в культуральной жидкости после трансдукции культуры клеток HEK293 Ad5-27F3-L и Ad5-27F3-H

Table 1. Selection of conditions for the preparative accumulation of the r27F3 antibody in the culture fluid after transduction of the HEK293 Ad5-27F3-L and Ad5-27F3-H cell culture

Количество вирусных частиц каждого рAd, БОЕ/клетку Number of viral particles of each rAd, PFU/cell	Среднее ЦПД, % Mean CPE, %	Время инкубации, сутки Incubation time, days	Результаты дот-ИФА Dot-ELISA results
2	36.5	6	–
2	56.2	7	–
2	100	9	–
20	37.2	4	–
20	53.4	5	+
20	100	7	–
200	40.1	2	+
200	56.5	3	++
200	100	5	–

Получение препаративных количеств рАТ r27F3 и rCR9114, хроматографическая очистка и анализ полипептидного спектра очищенных антител

На следующем этапе работы препараты рАТ r27F3 и rCR9114 были накоплены в препаративных количествах и очищены из культуральной жидкости хроматографическим методом на колонке с аффинным сорбентом MabSelect™ SuRe™ (Cytiva, США). Финальную очистку рАТ и замену буфера проводили при помощи гель-фильтрации с использованием сорбента Superdex® 200 pg (Cytiva, США). Такой подход для очистки рАТ использовался нами ранее [24] и позволяет получать препараты рАТ высокой степени очистки, достаточной для дальнейших лабораторных исследований *in vitro* и *in vivo*. Кроме того, для нивелирования потенциального риска загрязнения препаратов рекомбинантными аденовирусами, используемыми для трансдукции клеток, препараты после финальной очистки были профильтрованы через противовирусные фильтры Viresolve® Pro (Millipore, США), имеющие размер пор 20 нм и позволяющие эффективно избавляться как от оболочечных, так и от безоболочечных вирусов.

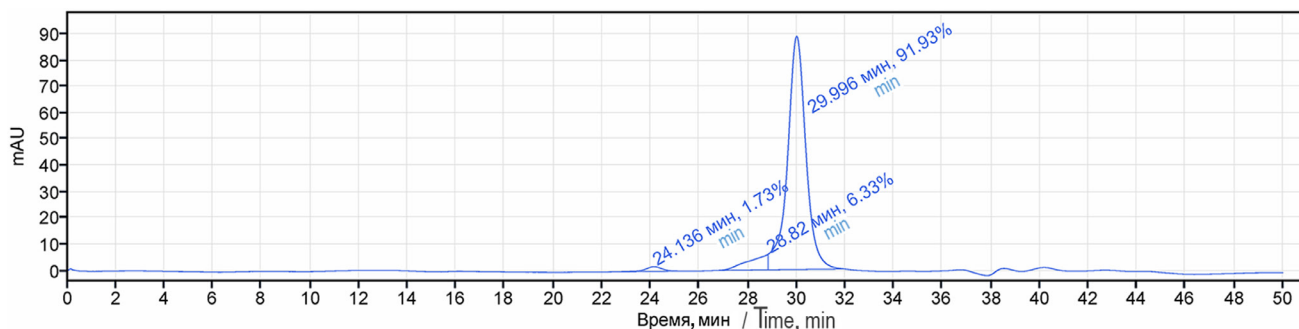
В результате из 4 л культуральной жидкости было получено 12 мг рАТ r27F3 и 10 мг рАТ rCR9114. Препарат очищенного рАТ r27F3 имел концентрацию 1.12 мг/мл, а препарат очищенного рАТ rCR9114 имел концентрацию 0.56 мг/мл.

При изучении очищенных препаратов рАТ r27F3 и rCR9114 методом ВЭЖХ были получены следующие результаты, представленные на рис. 2 и 3.

В результате была продемонстрирована высокая степень чистоты полученных препаратов (более 90%). Разница по высоте и площади пиков рАТ r27F3 и rCR9114 связана с их различной концентрацией в препарате. Кроме того, было продемонстрировано различное время удерживания основных пиков в препаратах r27F3 и rCR9114, что указывает на различный гидродинамический радиус у двух данных молекул. По всей видимости, рАТ rCR9114 обладает значительно более объемной пространственной структурой и появляется на хроматограмме более ранним пиком по сравнению с r27F3.

Анализ полипептидного спектра препаративно очищенных антител проводили методом белкового электрофореза в ПААГ-ДСН. Для оценки способности антител формировать комплекс тяжелой и легкой цепи (H+L) использовали «плюс–минус» модификацию обработки образца, т.е. денатурирующие (+) и неденатурирующие (–) условия. Такая модификация позволяет идентифицировать молекулярную массу как тяжелой и легкой цепей по отдельности, так и секретируемого функционального комплекса IgG (H+L).

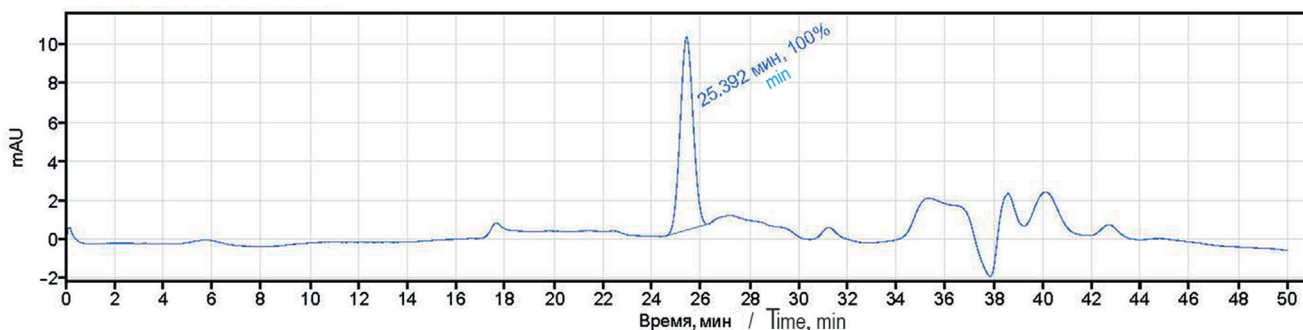
Результаты электрофореза в ПААГ-ДСН представлены на рис. 4. В денатурирующих условиях наблюдались два фрагмента весом ~55 кДа



Результаты для пика (Процент площади 1%) / Results for peak (Area percentage 1%)

Время удержания, мин Retention time, min	Описание сигнала Signal description	Ширина, мин Width, min	Площадь Area	Высота Height	Площадь, % Area, %
24.136		2.985	88.1	1.8	1.73
28.820	DAD1A, Sig = 280.4, Ref = 360.1	2.046	322.1	5.9	6.33
29.996		3.138	4674.8	88.8	91.93

Рис. 2. Хроматограмма ВЭЖХ очищенного антитела r27F3, а также процентное содержание целевого и примесных пиков.
Fig. 2. HPLC chromatogram of the purified r27F3 antibody, as well as the percentage of the target and impurity peaks.



Результаты для пика (Процент площади 1%) / Results for peak (Area percentage 1%)

Время удержания, мин Retention time, min	Описание сигнала Signal description	Ширина, мин Width, min	Площадь Area	Высота Height	Площадь, % Area, %
25.392	DAD1A, Sig = 280.4, Ref = 360.1	1.713	366.2	9.9	100.0

Рис. 3. Хроматограмма ВЭЖХ очищенного антитела rCR9114, а также процентное содержание целевого и примесных пиков.
Fig. 3. HPLC chromatogram of the purified rCR9114 antibody, as well as the percentage of the target and impurity peaks.

и 25 кДа, что соответствует молекулярной массе Н и L-цепей антитела. В неденатурирующих условиях наблюдался один фрагмент массой 160 кДа, что соответствует полному комплексу IgG. Также показано, что полученные препараты рАТ имеют высокую степень электрофоретической чистоты.

Изучение активности и специфичности рАТ r27F3 и rCR9114

Fab-специфичность рекомбинантных противогриппозных антител анализировали с помощью вестерн-блоттинга. В качестве антигенов использовали панель очищенных вирусов гриппа А и В. Образцы для проведения вестерн-блоттинга обрабатывали в неденатурирующих условиях.

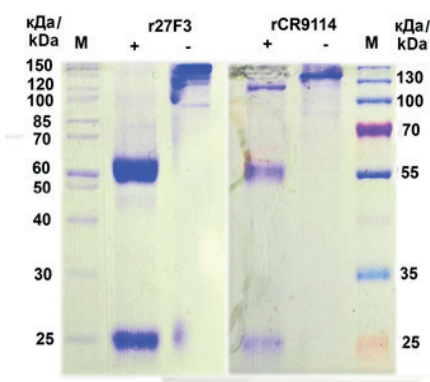


Рис. 4. Электрофореграмма очищенных антител r27F3 и rCR9114: М – маркеры молекулярного веса; «+» – денатурирующие условия; «-» – неденатурирующие условия.
Fig. 4. Electropherogram of purified r27F3 and rCR9114 antibodies. M are markers of molecular weight; “+” are denaturing conditions; “-” are non-denaturing conditions.

На рис. 5 представлены результаты вестерн-блоттинга с рАТ r27F3, на рис. 6 – с рАТ rCR9114.

По данным иммуноблоттинга (рис. 5) антитело r27F3 обладает широкой гетеросубтипической специфичностью, взаимодействует с гемагглютинидами вирусов гриппа А субтипов Н1, Н3, Н5, Н7, Н9 и не взаимодействует с гемагглютинином вируса гриппа А субтипа Н2 и вирусами гриппа В. Полученная специфичность для антитела r27F3 полностью соответствует литературным данным [17].

Согласно данным иммуноблоттинга (рис. 6) антитело rCR9114 также обладает широкой специфичностью, взаимодействует с гемагглютинидами вирусов гриппа А субтипов Н1, Н5 и Н9, относящихся к подгруппе 1 [18] (за исключением вируса гриппа субтипа Н2) и вирусами гриппа В как линии Виктория, так и линии Ямагата, но при этом не взаимодействует с вирусами гриппа субтипов Н3 и Н7, относящихся к подгруппе 2 [25]. Согласно литературным

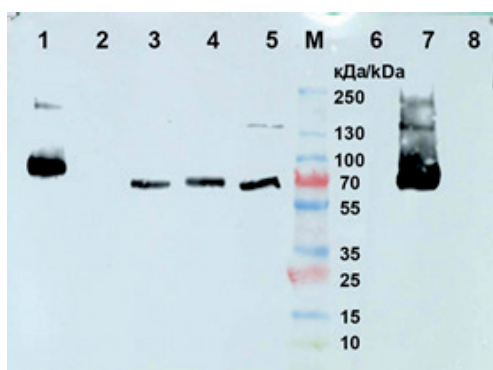


Рис. 5. Вестерн-блот анализ Fab-специфичности очищенного антитела r27F3.

М – маркер молекулярного веса;
цифрами обозначены вирусы гриппа:
1 – A/California/04/09 (H1N1);
2 – A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 (H2N3);
3 – A/Aichi/2/68 (H3N2);
4 – A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2);
5 – A/Chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2);
6 – B/Phuket/3073/13;
7 – A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2);
8 – B/Washington/20/2019.

Fig. 5. Western blot analysis of the Fab specificity of the purified r27F3 antibody. M is marker of molecular weight; the numbers indicate influenza viruses:

1 – A/California/04/09 (H1N1);
2 – A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 (H2N3);
3 – A/Aichi/2/68 (H3N2);
4 – A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2);
5 – A/Chicken/NJ/294598-12/2004 (H7N2);
6 – B/Phuket/3073/13;
7 – A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2);
8 – B/Washington/20/2019.

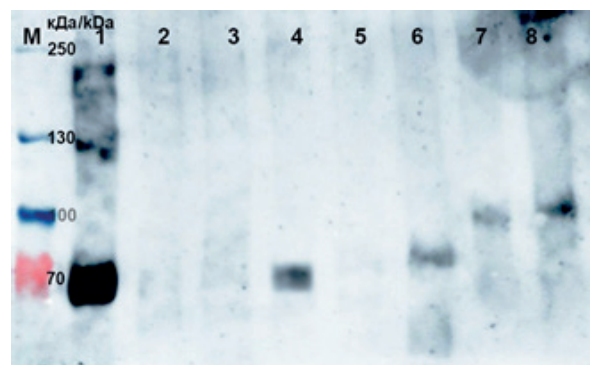


Рис. 6. Вестерн-блот анализ Fab-специфичности очищенного антитела rCR9114:

М – маркер молекулярного веса;
цифрами обозначены вирусы гриппа:
1 – A/California/04/09 (H1N1);
2 – A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 (H2N3);
3 – A/Aichi/2/68 (H3N2);
4 – A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2);
5 – A/Chicken/Moscow/NJ294598-12/2004 (H7N2);
6 – A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2);
7 – B/Phuket/3073/13; 8 – B/Washington/20/2019.

Fig. 6. Western blot analysis of the Fab specificity of the purified rCR9114 antibody: M is marker of molecular weight; the numbers indicate influenza viruses:

1 – A/California/04/09 (H1N1);
2 – A/BlackDuck/NewJersey/1580/78 (H2N3);
3 – A/Aichi/2/68 (H3N2);
4 – A/Duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2);
5 – A/Chicken/Moscow/NJ294598-12/2004 (H7N2);
6 – A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2);
7 – B/Phuket/3073/13; 8 – B/Washington/20/2019.

данным, антитело CR9114 обладает способностью связываться с гемагглютинидами вирусов гриппа А, относящимся к подгруппе 2, причем константы диссоциации K_d комплексов антиген-антитело (1.1–2.2) сравнимы с K_d при взаимодействии с гемагглютинидами вирусов гриппа В линии Ямагата (1.3–1.8) и меньше K_d вирусов гриппа В линии Виктория (1.5–4.8) [18]. Возможным объяснением отсутствия взаимодействия полученного нами антитела rCR9114 с вирусами гриппа, относящимися к подгруппе 2, является то, что данное антитело имело легкую цепь антитела 27F3. Легкая цепь антитела 27F3 принадлежит к типу каппа подгруппы 3, в то время как легкая цепь антитела CR9114 относится к типу лямбда подгруппы 1. Несмотря на то, что связывание с антигеном для CR9114 происходит только за счет тяжелой цепи, легкая цепь может участвовать в перераспределении энергии в пределах тяжелых цепей, что вносит свой вклад в конформацию отдельных участков тяжелой цепи и взаимодействие с антигеном. Возможно, именно наличие легкой цепи другого антитела не позволило

Таблица 2. Результаты реакции вирус-нейтрализации антител r27F3 и rCR9114 с вирусами гриппа А и В. Н.Д. – вирус-нейтрализация не детектируется
Table 2. Results of the virus neutralization assay of r27F3 and rCR9114 antibodies with influenza A and B viruses. N.D. – neutralization is not detected

Вирус гриппа Influenza virus	ИК ₅₀ (мкг/мл) IK ₅₀ (µg/mL)	
	r27F3	rCR9114
A/California/04/09 (H1N1)	2.8	5.6
A/Aichi/2/68 (H3N2)	Н.Д. N.D.	Н.Д. N.D.
A/Duck/Pensylvania/10218/84 (H5N2)	1.4	1.4
A/Chicken/Moscow/NJ294598-12/2004 (H7N2)	11.2	Н.Д. N.D.
A/Swine/Hong Kong/9A-1/98 (H9N2)	2.8	2.8
B/Phuket/3073/13	Н.Д. N.D.	Н.Д. N.D.
B/Washington/20/2019	Н.Д. N.D.	Н.Д. N.D.

антителу rCR9114 достаточно эффективно связываться с вирусами гриппа А, относящимися к подгруппе 2.

Специфичность антител r27F3 и rCR9114 была также оценена с помощью реакции вирус-нейтрализации. Полученные результаты представлены в табл. 2.

Согласно литературным данным, антитело 27F3 в реакции микронейтрализации способно нейтрализовать вирусы гриппа H1N1, H5N1, и H6N1, относящиеся к подгруппе 1, и вирусы гриппа H3N2, H7N9 и H10N8, относящиеся к подгруппе 2 [17]. Согласно табл. 2, антитело r27F3 нейтрализует вирусы гриппа А из подгруппы 1 H1N1, H5N2 и H9N2 и вирус гриппа А из подгруппы 2 H7N2. Не удалось детектировать нейтрализацию вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) из подгруппы 2, хотя антитело было способно взаимодействовать с ним по данным иммуноблоттинга.

Способность антитела rCR9114 связывать антигены посредством реакции вирус-нейтрализации полностью соответствует литературным данным [18]. Антитело rCR9114 нейтрализует вирусы гриппа А, относящиеся к подгруппе 1, нейтрализацию вирусов гриппа А из подгруппы 2 и вирусов гриппа В детектировать не удалось.

Таким образом было показано, что антитело r27F3, полученное с помощью аденовирусных

векторов, демонстрирует способность связываться с вирусами гриппа А субтипов H1N1, H3N2, H5N2, H9N2, но не демонстрирует способность связываться с вирусом гриппа А субтипа H2N3 и вирусами гриппа В, как и было описано в литературе [18].

Антитело rCR9114 также показало способность взаимодействовать с вирусами гриппа А, относящимися к подгруппе 1 (H1N1, H5N2, H9N2, но не H2N3), но не к подгруппе 2 (H3N2, H7N2), а кроме того, было способно связываться с вирусами гриппа В как линии Виктория, так и линии Ямагата. Возможно, замена собственной легкой цепи антитела rCR9114 на легкую цепь антитела r27F3 повлияло на функциональную активность антитела и послужила причиной потери способности связываться с вирусами гриппа А, относящимися к подгруппе 2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами были получены рекомбинантные аденовирусы человека пятого серотипа, несущие гены тяжелых цепей противогриппозных антител 27F3 и CR9114, а также рекомбинантный аденовирус человека, несущий ген легкой цепи антитела 27F3. Были отработаны условия заражения суспензионной линии клеток HEK293

полученными рекомбинантными аденовирусами и показано, что оптимальными условиями для получения максимального выхода антитела являются доза каждого рАД5, несущих гены тяжелой и легкой цепи рАТ, 200 БОЕ/клетку, и совместная инкубация вирусов и клеток в течение 3 суток до наступления 50–60% ЦПД (табл. 1). Полученные в результате трансдукции клеточной суспензии аденовирусами рАТ были очищены из культуральной жидкости с помощью хроматографического метода, выход рАТ составил 12 мг из 4 л культуральной жидкости для r27F3 и 10 мг для rCR9114. рАТ полностью соответствовали нативным по молекулярной массе (рис. 4) и были способны реагировать со вторичными антителами к Fc-фрагменту IgG человека. Функциональная активность полученных рАТ была оценена с помощью вестерн-блоттинга и реакции вирус-нейтрализации с использованием вирусов гриппа А и В различных субтипов. Функциональная активность антитела r27F3 соответствовала функциональной активности нативного антитела 27F3, тогда как антитело rCR9114 потеряло способность взаимодействовать с вирусами гриппа А, относящимися к подгруппе 2 (H3N2 и H7N2), что возможно связано с заменой легкой цепи антитела CR9114 на легкую цепь антитела 27F3.

Таким образом, с помощью описываемой нами технологии были получены в препаративных количествах и очищены два противогриппозных антитела широкого спектра действия. Данную технологию можно использовать для получения очищенных препаратов человеческих рАТ в случаях, когда гликозилирование антитела является принципиальным моментом.

Вклад авторов

М.М. Шмаров, Д.Н. Щербинин – идея, концепция и дизайн исследования;

М.М. Шмаров – утверждение окончательной версии статьи для публикации;

Е.С. Седова – интерпретация результатов исследования, написание и доработка текста;

А.А. Лысенко, И.Б. Есмагамбетов – консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ;

Д.Н. Щербинин, К.А. Первойкина, Е.А. Богачева – проведение работ по получению рекомбинантного аденовируса;

Н.Ю. Вискова – накопление препаративных количеств рекомбинантных антител в культуральной жидкости;

И.Б. Есмагамбетов, В.В. Прокофьев, Е.И. Рябова – препаративное выделение рекомбинантных антител из культуральной жидкости и ВЭЖХ-ГФ;

Л.В. Верховская, Е.Д. Авдонина, А.С. Бандельюк, А.А. Лысенко – дот-иммуноферментный анализ, электрофорез белков в полиакриламидном геле, постановка вестерн-блот анализа;

А.С. Бандельюк, Е.С. Седова – накопление и концентрирование вирусов гриппа и постановка реакции вирус-нейтрализации.

Authors' contributions

M.M. Shmarov, D.N. Shcherbinin – idea, concept, and design of the study;

M.M. Shmarov – approval of the final version of the article for publication;

E.S. Sedova – interpretation of the research results, writing the text of the article;

A.A. Lysenko, I.B. Esmagambetov – consultation on the issues of conducting individual stages of experimental work;

D.N. Shcherbinin, K.A. Pervoyakina, E.A. Bogacheva – recombinant adenovirus production;

N.Yu. Viskova – production of preparative amounts of recombinant antibodies in the culture fluid;

I.B. Esmagambetov, V.V. Prokofiev, E.I. Ryabova – preparative isolation of recombinant antibodies from the culture liquid and HPLC–gel-filtration;

L.V. Verkhovskaya, E.D. Avdonina, A.S. Bandelyuk, A.A. Lysenko – dot blot, protein electrophoresis in polyacrylamide gel, Western blot analysis;

A.S. Bandelyuk, E.S. Sedova – accumulation and concentration of influenza viruses and conducting virus neutralization assay.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kaplon H., Chenoweth A., Crescioli S., Reichert J.M. Antibodies to watch in 2022. *MAbs*. 2022 Jan-Dec. 2022;14(1):2014296. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2014296>
2. Kumar R., Paray H.A., Shrivastava T., Sinha S., Luthra K. Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;135:907–918. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.006>

REFERENCES

1. Kaplon H., Chenoweth A., Crescioli S., Reichert J.M. Antibodies to watch in 2022. *MAbs*. 2022 Jan-Dec. 2022;14(1):2014296. <https://doi.org/10.1080/19420862.2021.2014296>
2. Kumar R., Paray H.A., Shrivastava T., Sinha S., Luthra K. Phage display antibody libraries: A robust approach for generation of recombinant human monoclonal antibodies. *Int. J. Biol. Macromol.* 2019;135:907–918. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.06.006>

3. Альтшулер Е.П., Серебряная Д.В., Катруха А.Г. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности. *Успехи биологической химии*. 2010;50:203–258. URL: <https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/Altschuler.pdf>
4. Yu J., Guo Y., Gu Y., Fan X., Li F., Song H., Nian R., Liu W. A novel silk fibroin protein-based fusion system for enhancing the expression of nanobodies in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022;106(5–6):1967–1977. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11857-7>
5. Garvey M. Non-mammalian eukaryotic expression systems yeast and fungi in the production of biologics. *J. Fungi (Basel)*. 2022;8(11):1179. <https://doi.org/10.3390/jof8111179>
6. Vazquez-Lombardi R., Nevoltris D., Luthra A., Schofield P., Zimmermann C., Christ D. Transient expression of human antibodies in mammalian cells. *Nat. Protoc.* 2019;13:99–117. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.126>
7. Korn J., Schäckermann D., Kirmann T., Bertoglio F., Steinke S., Heisig J., Ruschig M., Rojas G., Langreder N., Wenzel E.V., Roth K.D.R., Becker M., Meier D., van den Heuvel J., Hust M., Dübel S., Schubert M. Baculovirus-free insect cell expression system for high yield antibody and antigen production. *Sci Rep.* 2020;10(1):21393. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78425-9>
8. Huang Y.M., Hu W., Rustandi E., Chang K., Yusuf-Makagiansar H., Ryll T. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol. Prog.* 2010;26(5):1400–1410. <https://doi.org/10.1002/btpr.436>
9. Gupta K., Parasnis M., Jain R., Dandekar P. Vector-related stratagems for enhanced monoclonal antibody production in mammalian cells. *Biotechnol. Adv.* 2019;37(8):107415. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107415>
10. Jäger V., Büsow K., Wagner A., Weber S., Hust M., Frenzel A., Schirrmann T. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* 2013;13:52. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-52>
11. Kim T.K., Eberwine J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010;397(8):3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
12. Croset A., Delafosse L., Gaudry J.P., Arod C., Glez L., Losberger C., Begue D., Krstanovic A., Robert F., Vilbois F., Chevalet L., Antonsson B. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J. Biotechnol.* 2012;161(3):336–348. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.038>
13. Tan E., Chin C.S.H., Lim Z.F.S., Ng S.K. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
14. König J., Hust M., van den Heuvel J. Validation of the Production of Antibodies in Different Formats in the HEK₂₉₃ Transient Gene Expression System. *Methods Mol. Biol.* 2021;2247:59–76. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1126-5_4
15. 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>
3. Al'tshuler E.P., Serebryanaya D.V., Katrukha A.G. Obtaining recombinant antibodies and methods for increasing their affinity. *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*. 2010;50:203–258 (in Russ.). URL: <https://www.fbras.ru/wp-content/uploads/2017/10/Altschuler.pdf>
4. Yu J., Guo Y., Gu Y., Fan X., Li F., Song H., Nian R., Liu W. A novel silk fibroin protein-based fusion system for enhancing the expression of nanobodies in *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2022;106(5–6):1967–1977. <https://doi.org/10.1007/s00253-022-11857-7>
5. Garvey M. Non-mammalian eukaryotic expression systems yeast and fungi in the production of biologics. *J. Fungi (Basel)*. 2022;8(11):1179. <https://doi.org/10.3390/jof8111179>
6. Vazquez-Lombardi R., Nevoltris D., Luthra A., Schofield P., Zimmermann C., Christ D. Transient expression of human antibodies in mammalian cells. *Nat. Protoc.* 2019;13:99–117. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.126>
7. Korn J., Schäckermann D., Kirmann T., Bertoglio F., Steinke S., Heisig J., Ruschig M., Rojas G., Langreder N., Wenzel E.V., Roth K.D.R., Becker M., Meier D., van den Heuvel J., Hust M., Dübel S., Schubert M. Baculovirus-free insect cell expression system for high yield antibody and antigen production. *Sci Rep.* 2020;10(1):21393. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78425-9>
8. Huang Y.M., Hu W., Rustandi E., Chang K., Yusuf-Makagiansar H., Ryll T. Maximizing productivity of CHO cell-based fed-batch culture using chemically defined media conditions and typical manufacturing equipment. *Biotechnol. Prog.* 2010;26(5):1400–1410. <https://doi.org/10.1002/btpr.436>
9. Gupta K., Parasnis M., Jain R., Dandekar P. Vector-related stratagems for enhanced monoclonal antibody production in mammalian cells. *Biotechnol. Adv.* 2019;37(8):107415. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.107415>
10. Jäger V., Büsow K., Wagner A., Weber S., Hust M., Frenzel A., Schirrmann T. High level transient production of recombinant antibodies and antibody fusion proteins in HEK293 cells. *BMC Biotechnol.* 2013;13:52. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-52>
11. Kim T.K., Eberwine J.H. Mammalian cell transfection: the present and the future. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010;397(8):3173–3178. <https://doi.org/10.1007/s00216-010-3821-6>
12. Croset A., Delafosse L., Gaudry J.P., Arod C., Glez L., Losberger C., Begue D., Krstanovic A., Robert F., Vilbois F., Chevalet L., Antonsson B. Differences in the glycosylation of recombinant proteins expressed in HEK and CHO cells. *J. Biotechnol.* 2012;161(3):336–348. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.06.038>
13. Tan E., Chin C.S.H., Lim Z.F.S., Ng S.K. HEK293 Cell Line as a Platform to Produce Recombinant Proteins and Viral Vectors. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021;9:796991. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.796991>
14. König J., Hust M., van den Heuvel J. Validation of the Production of Antibodies in Different Formats in the HEK₂₉₃ Transient Gene Expression System. *Methods Mol. Biol.* 2021;2247:59–76. https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1126-5_4
15. Ryabova E.I., Derkaev A.A., Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Dovgii M.A., Byrikhina D.V., Prokof'ev 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>

16. Greber U.F., Gomez-Gonzalez A. Adenovirus – a blueprint for gene delivery. *Curr. Opin. Virol.* 2021;48:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.03.006>
17. Lang S., Xie J., Zhu X., Wu N.C., Lerner R.A., Wilson I.A. Antibody 27F3 broadly targets influenza A group 1 and 2 hemagglutinins through a further variation in V_H1-69 antibody orientation on the HA stem. *Cell Rep.* 2017;20(12):2935–2943. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.084>
18. Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijdgheest D., Khayat R., Ekiert D.C., Lee J.H., Metlagel Z., Bujny M.V., Jongeneelen M., van der Vlugt R., Lamrani M., Korse H.J., Geelen E., Sahin Ö., Sieuwerts M., Brakenhoff J.P., Vogels R., Li O.T., Poon L.L., Peiris M., Koudstaal W., Ward A.B., Wilson I.A., Goudsmit J., Friesen R.H. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science.* 2012;337(6100):1343–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1222908>
19. Tutykhina I., Esmagambetov I., Bagaev A., Pichugin A., Lysenko A., Shcherbinin D., Sedova E., Logunov D., Shmarov M., Ataulakhov R., Naroditsky B., Gintsburg A. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
20. Шубладзе А.К., Гайдамович С.Я. *Краткий курс практической вирусологии.* М.: Медгиз, 1954. 272 с.
21. Грибова И.Ю., Тиллиб С.В., Тутыхина И.Л., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю., Верховска Л.В., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Эффективная экспрессия наноантител рекомбинантным аденовирусным вектором *in vitro.* *Acta Naturae.* 2011;3(3):66–72.
22. Tutykhina I.L., Sedova E.S., Gribova I.Y., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Tillib S.V., Gintsburg A.L. Passive immunization with a recombinant adenovirus expressing an HA (H5)-specific single-domain antibody protects mice from lethal influenza infection. *Antiviral Res.* 2013;97(3):318–328. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.12.021>
23. Щербинин Д.Н., Алексеева С.В., Шмаров М.М., Смирнов Ю.А., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Анализ В-клеточных эпитопов гемагглютинина вирусов гриппа. *Acta Naturae.* 2016;8(1):13–20. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-1-13-20>
24. Есмагамбетов И.Б., Шебляков 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 – потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола. *Acta Naturae.* 2021;13(4):53–63. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11487>
25. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., Cinatl J., ter Meulen J., Lasters I., Carsetti R., Peiris M., de Kruif J., Goudsmit J. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM⁺ memory B cells. *PLoS One.* 2008;3(12):e3942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003942>
16. Greber U.F., Gomez-Gonzalez A. Adenovirus – a blueprint for gene delivery. *Curr. Opin. Virol.* 2021;48:49–56. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.03.006>
17. Lang S., Xie J., Zhu X., Wu N.C., Lerner R.A., Wilson I.A. Antibody 27F3 broadly targets influenza A group 1 and 2 hemagglutinins through a further variation in V_H1-69 antibody orientation on the HA stem. *Cell Rep.* 2017;20(12):2935–2943. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.084>
18. Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijdgheest D., Khayat R., Ekiert D.C., Lee J.H., Metlagel Z., Bujny M.V., Jongeneelen M., van der Vlugt R., Lamrani M., Korse H.J., Geelen E., Sahin Ö., Sieuwerts M., Brakenhoff J.P., Vogels R., Li O.T., Poon L.L., Peiris M., Koudstaal W., Ward A.B., Wilson I.A., Goudsmit J., Friesen R.H. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science.* 2012;337(6100):1343–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1222908>
19. Tutykhina I., Esmagambetov I., Bagaev A., Pichugin A., Lysenko A., Shcherbinin D., Sedova E., Logunov D., Shmarov M., Ataulakhov R., Naroditsky B., Gintsburg A. Vaccination potential of B and T epitope-enriched NP and M2 against Influenza A viruses from different clades and hosts. *PLoS One.* 2018;13(1):e0191574. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191574>
20. Shubladze A.K., Gaidamovich S.Ya. *Kratkii kurs prakticheskoi virusologii (Short Course of Practical Virology).* Moscow: Medgiz, 1954. 273 p. (in Russ.).
21. Gribova I.Yu., Tillib S.V., Tutykhina I.L., Shmarov M.M., Logunov D.Yu., Verkhovska L.V., Naroditskii B.S., Gintsburg A.L. Effective Genetic Expression of Nanoantibodies by Recombinant Adenoviral Vector *in vitro.* *Acta Naturae.* 2011;3(3):64–70.
22. Tutykhina I.L., Sedova E.S., Gribova I.Y., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Tillib S.V., Gintsburg A.L. Passive immunization with a recombinant adenovirus expressing an HA (H5)-specific single-domain antibody protects mice from lethal influenza infection. *Antiviral Res.* 2013;97(3):318–328. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.12.021>
23. Shcherbinin D.N., Alekseeva S.V., Shmarov M.M., Smirnov Yu.A., Naroditskii B.S., Gintsburg A.L. The Analysis of B-Cell Epitopes of Influenza Virus Hemagglutinin. *Acta Naturae.* 2016;8(1):13–20. <https://doi.org/10.32607/20758251-2016-8-1-13-20>
24. Esmagambetov I.B., Shcheblyakov D.V., Egorova D.A., *et al.* Nanobodies Are Potential Therapeutic Agents for the Ebola Virus Infection. *Acta Naturae.* 2021;13(4):53–63. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11487>
25. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., Cinatl J., ter Meulen J., Lasters I., Carsetti R., Peiris M., de Kruif J., Goudsmit J. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM⁺ memory B cells. *PLoS One.* 2008;3(12):e3942. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003942>

Об авторах:

Седова Елена Сергеевна, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: sedova-es@yandex.ru. Scopus Author ID 36341354100, ResearcherID S-4206-2017, SPIN-код РИНЦ 7104-6582, <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Щербинин Дмитрий Николаевич, к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: dim284@inbox.ru. Scopus Author ID 36599350900, ResearcherID E-7682-2014, SPIN-код РИНЦ 7743-6517, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Банделюк Алина Сергеевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: alinabond88@mail.ru. Scopus Author ID 56290408700, ResearcherID D-9771-2014, SPIN-код РИНЦ 1125-9816, <https://orcid.org/0000-0001-8453-797X>

Верховская Людмила Викторовна, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: verkhov@mail.ru. SPIN-код РИНЦ 5529-5909, <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

Вискова Наталья Юрьевна, научный сотрудник лаборатории клеточной микробиологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: apr2004@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-6476-3520>

Авдонина Елена Дмитриевна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: avdonina.yelena@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8059-9743>

Прокофьев Владимир Владимирович, лаборант-исследователь лаборатории иммунобиотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: vladimir.prokofev2609@gmail.com. Scopus Author ID 57300704700, SPIN-код РИНЦ 2336-1087, <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>

Рябова Екатерина Игоревна, младший научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (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>

Есмагамбетов Ильяс Булатович, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: esmagambetov@gmail.com. Scopus Author ID 56120429700, ResearcherID E-3327-2014, SPIN-код РИНЦ 8132-2320, <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Первойкина Кристина Алексеевна, лаборант-исследователь лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: uk-ru123@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0780-5998>

Богачева Елена Александровна, младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: boga4eva85@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9289-3608>

Лысенко Андрей Александрович, старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: andrei.a.lysenko@yandex.ru. Scopus Author ID 55573757600, SPIN-код РИНЦ 7830-3830, <https://orcid.org/0000-0002-0230-1822>

Шмаров Максим Михайлович, д.б.н., заведующий лаборатории молекулярной биотехнологии, «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ (123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, д. 18). E-mail: ribozym@mail.ru. Scopus Author ID 6507322279, ResearcherID D-8662-2014, SPIN-код РИНЦ 4874-2578, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

About the authors:

Elena S. Sedova, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: sedova-es@yandex.ru. Scopus Author ID 36341354100, ResearcherID S-4206-2017, RSCI SPIN-code 7104-6582, <https://orcid.org/0000-0001-6959-9988>

Dmitriy N. Shcherbinin, Cand. Sci. (Biol.), Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: dim284@inbox.ru. Scopus Author ID 36599350900, ResearcherID E-7682-2014, RSCI SPIN-code 7743-6517, <https://orcid.org/0000-0002-8518-1669>

Alina S. Bandelyuk, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: alinabond88@mail.ru. Scopus Author ID 56290408700, ResearcherID D-9771-2014, RSCI SPIN-code 1125-9816, <https://orcid.org/0000-0001-8453-797X>

Ludmila V. Verkhovskaya, Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: verkhov@mail.ru. RSCI SPIN-code 5529-5909, <https://orcid.org/0000-0002-4731-1629>

Natalia Yu. Viskova, Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: apr2004@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0002-6476-3520>

Elena D. Avdonina, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: avdonina.yelena@mail.ru. <https://orcid.org/0000-0001-8059-9743>

Vladimir V. Prokofiev, Laboratory Assistant-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: vladimir.prokofev2609@gmail.com. Scopus Author ID 57300704700, RSCI SPIN-code 2336-1087, <https://orcid.org/0000-0002-4130-177X>

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>

Ilias B. Esmagambetov, Cand. 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: esmagambetov@gmail.com. Scopus Author ID 56120429700, ResearcherID E-3327-2014, RSCI SPIN-code 8132-2320, <https://orcid.org/0000-0002-2063-2449>

Kristina A. Pervoykina, Laboratory Assistant-Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: uk-ru123@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0003-0780-5998>

Elena A. Bogacheva, Junior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: boga4eva85@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0001-9289-3608>

Andrei A. Lysenko, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: andrei.a.lysenko@yandex.ru. Scopus Author ID 55573757600, RSCI SPIN-code 7830-3830, <https://orcid.org/0000-0002-0230-1822>

Maksim M. Shmarov, Dr. Sci. (Biol.), Head of the Laboratory of Molecular Biotechnology, N.F. Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology (The Gamaleya National Center), Ministry of Health of the Russian Federation (18, Gamaleya ul., Moscow, 123098, Russia). E-mail: ribozym@mail.ru. Scopus Author ID 6507322279, ResearcherID D-8662-2014, RSCI SPIN-code 4874-2578, <https://orcid.org/0000-0002-5268-1296>

*Поступила: 11.10.2022; получена после доработки: 28.11.2022; принята к опубликованию: 11.01.2023.
The article was submitted: October 11, 2022; approved after reviewing: November 28, 2022; accepted for publication: January 11, 2023.*