

На правах рукописи

Деркаев Артем Алексеевич

**ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА СПЕЦИФИЧНЫЕ К ТОКСИНУ
C.BOTULINUM И ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ ДЛЯ
ТЕРАПИИ БОТУЛИЗМА**

3.2.7. – Иммунология (биологические науки)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России).

Научный руководитель:

кандидат биологических наук Есмагамбетов Ильяс Булатович, зав. лабораторией стромальной регуляции иммунитета ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

Официальные оппоненты:

Бровко Федор Александрович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Филатов Александр Васильевич – доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией иммунохимии Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства.

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Защита диссертации состоится « 19» декабря 2025 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета 21.1.018.03 при ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России по адресу: 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России и на сайте Центра: <http://www.gamaleya.org/>.

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
д.б.н.,

Ермолаева С.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы и степень ее разработанности

Ботулизм – это острое паралитическое заболевание, вызываемое нейротоксинами, вырабатываемыми бактерией *Clostridium botulinum*. *C. botulinum* – это спорообразующая анаэробная грамположительная палочка, которая широко распространена в почве и водных отложениях. В настоящее время обнаружено семь типов нейротоксинов, различающихся по антигенным свойствам и специфичности протеолитической активности: A, B, C, D, E, F, G и Н. Типы А, В и Е чаще всего вызывают заболевания человека [Popoff M. et al., 2024].

Ботулинический нейротоксин (BoNT), белок массой 150 кДа, является одним из самых мощных известных токсинов. Ботулинический нейротоксин связывается с рецепторами на пресинаптической клеточной мембране нервно-мышечных соединений. Эндоцитоз позволяет легкой цепи нейротоксина, массой 50 кДа, являющейся Zn-зависимой эндопептидазой, проникать через мембрану нейрональной клетки. В терминале аксона легкая цепь действует как протеаза, прерывая экзоцитоз синаптических пузырьков посредством расщепления одного из трех различных компонентов комплекса синаптического слияния: SNAP-25, синтаксин и синаптобревин [Dembek Z.F. et al., 2007]. Благодаря своей протеолитической активности BoNT прерывает высвобождение ацетилхолина. Это приводит к нарушению нервно-мышечной передачи, что приводит к мышечной миорелаксации или параличу.

Существует четыре основные формы ботулизма человека: детский ботулизм, пищевой ботулизм, раневой ботулизм и кишечный токсикоз у взрослых. Как у младенцев, так и у взрослых, кишечный токсикоз ботулизма возникает после попадания в организм спор *C. botulinum*, обычно содержащихся в меде или почве, которые прорастают в желудочно-кишечном тракте хозяина и впоследствии продуцируют BoNT [Sox N., et al., 2002]. Раневой ботулизм возникает после прямого попадания спор в поврежденную ткань [Brett M.M., 2005; Sieradzan K.A., 2005]. Пищевой ботулизм отличается от других видов ботулизма тем, что он возникает после употребления загрязненных спорами *C. botulinum* таких пищевых продуктов, как домашние консервы, соленое, копченое или ферментированное мясо, подверженные недостаточной термической обработке (15-20 минут не более 80 °C). При таких условиях споры только активируются, прорастают и переходят в вегетативную форму, продуцирующую ботулинический нейротоксин в богатой питательной среде в анаэробных условиях [Sobel J., 2005].

О клиническом течении ботулизма может свидетельствовать появление тошноты и рвоты, точный механизм появления которых неясен. Эти признаки явно отсутствуют при раневом ботулизме [Sobel J., 2005]. Симптомы и признаки поражения черепно-мозговых нервов неизменно являются начальным неврологическим проявлением, отражающимся в ухудшении зрения и светобоязни,

диплопии, птозе, дизартрии, дисфонии и дисфагии, часто следуют различные степени нисходящего и симметричного мышечного паралича, начинающегося с мышц шеи и прогрессирующего до дыхательных мышц и мышц конечностей. Также может наблюдаться вегетативная дисфункция, характеризующаяся ортостатической гипотензией, расширенными и неподвижными зрачками, ксеростомией, кишечной непроходимостью и задержкой мочи [Dembek Z.F. et al., 2007].

Быстрота возникновения заболевания и скорость его прогрессирования зависят от дозы нейротоксина и варьирующихся от нескольких часов до нескольких дней. Смерть от ботулизма обычно наступает из-за обструкции дыхательных путей, вызванной параличом мышц глотки, и остановки дыхания в связи с недостаточностью дыхательных мышц и диафрагмы [Sobel J., 2005].

Одним из основных методов терапии ботулизма является антитоксиновая терапия, направленная на нейтрализацию несвязанных, свободно циркулирующих токсинов. Данный метод используется при возникновении подозрения на интоксикацию BoNT. Однако при использовании существующих антитоксинов клинические симптомы могут прогрессировать до 12 часов после начала терапии [Dembek Z.F. et al., 2007].

Антитоксин лошадиного происхождения с 1970 г. является универсальным доступным средством терапии. Было показано, что раннее введение антитоксина (в течение 24 ч после интоксикации) более эффективно предотвращает прогрессирование неврологических симптомов и сокращает продолжительность искусственной вентиляции легких (ИВЛ) и пребывания в реанимации [Chang G.Y. et al., 2003]. Однако применение данного препарата вызывает гиперчувствительность и сывороточную болезнь в 9–17%, а анафилаксию – в 1,9% случаев, а также множество других побочных эффектов, связанных с использованием препарата [Black R.E. et al., 1980].

В течение последних двух десятилетий было описано множество разработок новых терапевтических препаратов на основе мАт [Anniballi F. et al., 2014; Rossetto O. et al., 2019; Shcheblyakov D. et al., 2019]. Такие препараты имеют значительные перспективы для повышения эффективности нейтрализации. Кроме того, мАт могут быть получены в неограниченном количестве и не будут иметь риска большого количества аллергических реакций или других побочных эффектов.

Однодоменные антитела для терапии различных заболеваний являются перспективным средством для лечения, поскольку обладают повышенной стабильностью, сниженной иммуногенностью, способностью связываться с труднодоступными эпитопами, а также проникать через гематоэнцефалический барьер [Muyllemans S. et al., 2001; Есмагамбетов И.Б. и др., 2021]. Однако недостатком однодоменных антител является низкая длительность циркуляции. Использование различных модификаций антител, например, связывание с человеческим Fc-фрагментом (в результате чего антитело становится состоящим

только из тяжелых цепей), позволяет улучшить фармакокинетические параметры антитела и обеспечить эффекторные функции в организме [Kontermann R.E, 2009; Danquah W. et al., 2016].

Таким образом разработка высокоэффективных средств экстренной профилактики и терапии ботулизма на основе рекомбинантных моноклональных антител, обладающих высокой нейтрализующей активностью в отношении ботулинического нейротоксина типа А, является актуальным направлением исследований.

Целью данной работы являлось получение однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа А, и изучение возможности его применения для терапии и экстренной профилактики ботулизма.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Создать генетическую конструкцию, содержащую ген однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа А, получить на ее основе клеточную линию-продуцент и отработать условия ее культивирования;
2. Разработать технологию очистки однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа А;
3. Изучить физико-химические и иммунологические свойства полученного однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа А;
4. Исследовать защитную активность однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека, при системной интоксикации мышей ботулиническим нейротоксином типа А;
5. Отработать модель внутрижелудочной интоксикации мышей ботулиническим нейротоксином типа А и оценить потенциальную возможность применения модифицированного однодоменного антитела для терапии пищевой формы ботулизма;
6. Провести доклинические исследования безопасности однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа А.

Научная новизна работы

Впервые показана принципиальная возможность применения однодоменных антител и их модификаций для разработки средств терапии и профилактики ботулизма. Впервые были созданы генетические конструкции, кодирующие гены модифицированных однодоменных антител, нейтрализующих ботулинический нейротоксин типа А. Также, впервые при помощи культивирования клеточной линии-продуцента и технологии трехступенчатой хроматографической очистки

было получено однодоменное антитело, модифицированное Fc-фрагментом, нейтрализующее ботулинический нейротоксин типа А. Впервые была отработана внутрижелудочная модель интоксикации мышей ботулиническим нейротоксином типа А, обеспечивающая длительное развитие симптомов ботулизма. Впервые показано, что полученное модифицированное однодоменное антитело способно обеспечивать защиту от летальной интоксикации ботулиническим нейротоксином типа А в режимах терапии, экстренной или краткосрочной профилактики. Изучены и получены новые данные о безопасности молекул антител, имеющих неканоническое строение.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в расширении знаний в области разработки методов терапии и профилактики ботулизма. В частности, была продемонстрирована возможность использования однодоменных антител для создания средств терапии и профилактики интоксикации ботулиническим токсином типа А.

Практическая значимость работы заключается в создании прототипа препарата для терапии и экстренной профилактики ботулизма, вызываемого ботулиническим токсином типа А, разработке технологии его получения, а также проведении доклинических исследований его эффективности и безопасности. Практическая значимость подтверждена патентом RU 2766348 С1 от 29.07.2021 (Однодоменное антитело и его модификации, специфически связывающиеся с ботулиническим нейротоксином типа А, и способ их применения для терапии или экстренной профилактики интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А). Результаты работы были использованы при исследованиях, защищенных патентом РФ на изобретение RU 2768044 С1 от 28.12.2021 (Экспрессионный вектор на основе аденоассоциированного вируса, обладающий защитными свойствами против интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А).

Внедрение полученных результатов в практику

Научная работа представляет собой законченный вид исследования, имеющий выраженную прикладную направленность. В рамках диссертационной работы был разработан метод измерения количественного содержания моноклональных и однодоменных антител в культуральной жидкости при культивировании трансфецированных эукариотических клеток с использованием биослойной интерферометрии. Данный метод внедрен на уровне ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, что подтверждается соответствующим актом о внедрении результатов в практику. По основным научным положениям, выводам и рекомендациям научно-исследовательской работы были внедрены лекции в

учебный курс аспирантов ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, что подтверждается соответствующим актом о внедрении.

Методология и методы исследования

В работе использовались методологические подходы, основанные на современных теоретических и практических исследованиях по получению рекомбинантных однодоменных антител; подходы, основанные на анализе и интерпретации полученных данных экспериментальных исследований. В работе были использованы современные иммунологические, биотехнологические, молекулярно-биологические, бактериологические, биоинформационные и статистические методы, а также методы работы с лабораторными животными.

Положения, выносимые на защиту

1. Однодоменное антитело, модифицированное Fc-фрагментом IgG1 человека, полученное при помощи разработанной технологии культивирования клеточной линии-продуцента и многоступенчатой хроматографической очистки, обладает нейтрализующей активностью в отношении ботулинического нейротоксина типа А;
2. Модифицированное однодоменное антитело B11-Fc способно обеспечивать защиту от ботулизма, вызванного ботулиническим нейротоксином типа А, в терапевтическом, экстренно-профилактическом и краткосрочном профилактическом режимах применения;
3. Полученное однодоменное антитело B11-Fc характеризуется безопасностью в доклинических исследованиях.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов подтверждается использованием современных методик, высокой воспроизводимостью результатов, что подтверждалось статистической обработкой данных. Сравнение групп проводилось с использованием критерия Краскела-Уоллиса. Попарное сравнение экспериментальных групп с контрольными проводилось с использованием критерия Даннета. Минимальный уровень значимости составлял 5% ($p<0,05$). Обсуждение результатов проводилось с учетом актуальных данных по данной тематике.

Апробация результатов

Результаты диссертационной работы были доложены на IX Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2022), I Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (Москва, 2023), X Всероссийской междисциплинарной научно-практической конференции с международным участием «Социально-значимые и

особо опасные инфекционные заболевания» (Сочи, 2023), II Российском конгрессе по медицинской микробиологии и инфектологии (Москва, 2024).

Апробация диссертации состоялась 07 июля 2023 года на совместной научной конференции отдела медицинской микробиологии, отдела генетики и молекулярной биологии бактерий, отдела иммунологии и отдела Государственной коллекции вирусов Центра ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Протокол № 2).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации и результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 6 и 7 паспорта научной специальности 3.2.7. Иммунология.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 7 научных работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых научных изданиях из списка ВАК и/или индексируемых в системах Web of Science, Scopus, 2 тезиса докладов в сборниках материалов российских и международных конференций, получены 2 патента РФ на изобретение.

Личный вклад автора

Автор лично получил генетическую конструкцию, кодирующую модифицированное однодоменное антитело B11-Fc, специфичное к ботулиническому токсину типа А, получил стабильную клеточную линию, продуцирующую антитело B11-Fc, исследовал ее генетическую стабильность, создал систему банков стабильного продуцента, оптимизировал процесс его культивирования, отработал стадии аффинной и анионообменной хроматографической очистки антитела B11-Fc, охарактеризовал чистоту и специфическую активность препарата, измерил показатели аффинности взаимодействия антитела с разными классами Fc-рецепторов, изучил возможность Fc-зависимой активации комплемента, провел изучение эффективности антитела B11-Fc на моделях острой внутрибрюшинной и внутрижелудочной интоксикации мышей, подобрал эффективные дозы антитела, оценил защитную активность антитела в различных режимах применения и против различных доз ботулинического токсина А, проанализировал и обобщил полученные результаты.

Получение ботулинического токсина типа А проводилось совместно с д.б.н., в.н.с. А.Н. Носковым, руководителем группы клостридиозов, и к.б.н., с.н.с. И.Д. Виноградовой лаб. иммунобиотехнологии ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России. Разработка лабораторной технологии получения модифицированных однодоменных антител проводилась совместно с м.н.с. Рябовой Е.И. Масштабирование получения препарата проводилось совместно с технологом Филиала «Медгамал» Полянским Д.С. и главным технологом Филиала «Медгамал» к.б.н. Карповым А.П. Доклинические исследования безопасности

антитела были проведены совместно с центром доклинических исследований ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 183 страницах машинописного текста и включает разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов, заключение, выводы, перспективы дальнейшей разработки темы, список сокращений и условных обозначений и список используемой литературы (225 источников: 10 – отечественных и 215 – иностранных публикаций). Работа содержит 22 таблицы и 41 рисунок.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение ботулинического токсина типа А. Ботулинический токсин типа А (BoNT/A) получали в виде комплекса BoNT/A с гемагглютининами (НА) и нетоксичными гемагглютининами (NTNH). Токсин получали при помощи культивирования в анаэробных условиях штамма *C.botulinum* A98 в среде TGY (триптон-глюкозный дрожжевой экстракт) в течение пяти дней при 37 °C. Культуральную жидкость концентрировали и проводили гель-фильтрацию с использованием Sephadryl S-300 (Cytiva, США) и анионообменную хроматографию с использованием DEAE Sepharose (Cytiva, США). Концентрацию BoNT/A определяли спектрофотометрически (длина волны 280 нм). Чистоту оценивали методом вертикального белкового электрофореза в полиакриламидном геле, в восстановляющих и невосстанавливющих условиях. LD₅₀ определяли при помощи внутрибрюшинного введения нескольких разведений токсина мышам BALB/c (18-20 г). Удельная токсическая активность используемого (LD₅₀) препарата нейротоксина на мышах BALB/c составляла 0,625 нг/кг.

Лабораторные животные. Исследования эффективности проводили на мышах BALB/c. Для исследований безопасности использовали аутбредных мышей, мышей СВА, мышей C57B1/6, мышей СВАхС57B1/6 F1, аутбредных крыс, кроликов Шиншилла, морских свинок альбиносов.

Клеточные линии и бактериальные штаммы. Для продукции антител использовали клетки линии CHO (клеточная линия, полученная из клеток яичника китайского хомяка). Для бактериальной трансформации использовали лабораторный штамм DH5α *Escherichia coli* (New England Biolabs, США).

Плазмидные векторы. Для оценки эффективности трансформации бактерий использовали плазмидную ДНК pBluescript II SK(+). В качестве плазмида, содержащей целевой ген, использовали pAL-TA-B11-Fc. В качестве контрольной плазмида использовали pBACP-EGFP.

Антитела и рекомбинантные белки. В работе использовали: поликлональные козы антитела с пероксидазной меткой (horseradish peroxidase – HRP), специфичные к Fc IgG человека (Anti-Human IgG (Fc specific)–Peroxidase antibody produced in goat) (Sigma, США), поликлональные IgG козы к IgG кролика с HRP меткой (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, HRP-conjugate) (Sigma, США), IgG овцы к IgG человека с HRP меткой (NA933 Human IgG HRP Linked Whole Ab) (Sigma, США).

Культивирование эукариотических клеток. Для получения продуцента B11-Fc использовали клетки СНО. Для этого целевую плазмидную ДНК гидролизовали по сайту Alw44I и проводили трансфекцию на среде TransFX-C (Cytiva, США). В качестве реагентов для трансфекции использовали polyethylenimine (PEI) 25000 (Polysciences, США).

Для культивирования и подбора условий использовали бессыворочные питательные среды SFM4CHO и ActiPro (Cytiva, США) с добавлением 5 мМ L-глутамина и смеси антибиотиков пенициллина (50 ЕД/мл) и стрептомицина (50 мкг/мл) (ПанЭко, Россия). Для селекции использовали антибиотик пуромицин (InvivoGen, США). В качестве подпитки использовали питательные растворы CellBoost 5 и CellBoost 7a/7b (Cytiva, США).

Материалы для очистки и фильтрации. Аффинную очистку антител проводили с использованием сорбента MabSelect SuRe (Cytiva, США), анионообменную – с помощью мембранныго адсорбера Sartobind Q Nano 3 мл (Sartorius, Германия), мультимодальную – с помощью керамического гидроксиапатита СНТ Type I (Bio-Rad, США). Для конечной фильтрации препарата использовали: Sartopore 2 0,2-0,1 мкм и Virosart CPV 200 см² (Sartorius, Германия), а также Corning 1L Filter System (Corning, США).

Материалы для анализа. Перенос белков для иммуноблоттинга проводили на нитроцеллюлозную мембрану Protran Premium 0.45 μm NC (Amersham, Cytiva, Швеция). Для визуализации использовали субстрат ECL Clarity (Bio-Rad, США).

Для оценки уровня экспрессии антител использовали набор для ИФА IgG общий-ИФА-БЕСТ (АО Вектор-Бест, Россия).

Для исследования банков клеток на микоплазмы выделение ДНК проводили с использованием набора Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, США).

Для изучения наличия остаточной ДНК штамма-продуцента использовали набор resDNASEQ Quantitative CHO DNA Kit (Thermo Scientific, США). Для выделения ДНК использовали PrepSEQ Residual DNA Sample Preparation Kit (Thermo Scientific, США).

Для исследования наличия остаточного белка штамма-продуцента в препарате использовали набор СНО HCP ELISA Kit, 3G (F550 -1) (Cygnus, США).

Для исследования наличия остаточного белка А в препарате использовали набор Protein A-H ELISA Kit (Human IgG) (F050H) (Cygnus, США).

Для изучения пирогенности использовали ЛАЛ-реактив Endosafe KTA и Контрольный стандарт эндотоксина (Charles River Endosafe, США), пробирки «Пиротест» 10x75 мм и вода для ЛАЛ-теста «Пиротест» (ЛАЛ-Центр, Россия).

Измерение концентрации антител методом биослойной интерферометрии. Проведение анализа концентрации антител в образцах культуральной жидкости проводили методом биослойной интерферометрии с использованием прибора Octet RED96 (Sartorius, Германия) и сенсоров с иммобилизованным белком A Protein A (Sartorius, Германия). Измерение проводили в соответствии с протоколом производителя. В качестве стандартных образцов использовали очищенные измеряемые антитела в концентрациях 1000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 0 мкг/мл.

Измерение аффинности взаимодействия методом биослойной интерферометрии. Измерение аффинности взаимодействия Fc-фрагмента B11-Fc с разными классами Fc рецепторов проводили методом биослойной интерферометрии с использованием прибора Octet RED96 (Sartorius, Германия) и сенсоров Ni-NTA (Sartorius, Германия). Измерение проводили в соответствии с протоколом производителя в режиме кинетического измерения. Белки FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b, γRI загружали на сенсоры в концентрациях 30 мкг/мл в течение 60 с. B11-Fc вносили в лунки в молярных концентрациях 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,625, 7,813 и 0 нМ в кинетическом буфере на 300 с. Диссоциацию осуществляли в кинетическом буфере в течение 300 с. Анализ полученных данных выполняли с использованием программного обеспечения Octet Data Analysis 10.0.

Определение чистоты антитела. Анализ чистоты очищенного антитела проводили методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) в соответствии со стандартной методикой [Mant C.T. et al., 2007] с использованием колонки BioSep SEC-s3000 (Phenomenex, США).

Также, определение чистоты методом измерения размера наночастиц в растворе проводили с использованием прибора Zetasizer Nano ZS в соответствии с инструкцией производителя.

Определение гликанового профиля антитела. Анализ содержания основных форм гликанов в препарате антитела проводили методом ВЭЖХ, с использованием колонки Accucore 150 Amide HILIC (Thermo Scientific, США) и стандартов гликанов G0-N, G0F-N, G0, Man5, G1, G1F, G2F, G0F (Agilent, США).

Оценка токсичности BoNT/A на острой внутрибрюшинной и внутрижелудочной моделях интоксикаций. Для изучения острого течения заболевания использовали внутрибрюшинную интоксикацию дозами 5 и 10 LD₅₀. Для изучения возможности терапии использовали более вялотекущую модель – внутрижелудочную интоксикацию 12000 LD₅₀. Тяжесть токсических признаков оценивали по следующим признакам: западение передней брюшной стенки, агональное дыхание, вялость, слабость, паралич тела.

Изучение фармакокинетических параметров. Для расчета параметров проводили внутривенное введение препарата B11-Fc, далее отбирали кровь из хвостовой вены в различные временные интервалы. Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 3500 об/мин, 15 мин. Полученный материал хранили при -80°C для дальнейшего анализа. Концентрацию B11-Fc оценивали методом ИФА на иммунологических планшетах из набора IgG общий-ИФА-БЕСТ. В качестве калибровочной кривой использовали антитело B11-Fc в различных концентрациях. В качестве конъюгата использовали Goat Anti-Human IgG (Fc specific) [HRP] (1:5000).

Доклинические исследования безопасности. Исследования проводили с использованием стандартных методов, изложенных в Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств [Миронов А.Н., 2012].

Статистическая обработка результатов. Фармакокинетические параметры рассчитывались с использованием модуля PKSolver (Version 2.0, China Pharmaceutical University) для Microsoft Excel. Статистическую обработку всех количественных данных проводили с помощью программы Microsoft Excel с использованием пакета стандартных приложений Microsoft Office и программы STATISTICA 6.0. При анализе сравнение групп проводилось с использованием критерия Краскела-Уоллиса. Попарное сравнение экспериментальных групп с контрольными проводилось с использованием критерия Даннета. Минимальный уровень значимости составлял 5% ($p<0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение модифицированного однодоменного антитела, обладающего нейтрализующей активностью в отношении ботулинического нейротоксина типа А

Получение плазмидных конструкций, экспрессирующих гены модифицированных однодоменных антител. Последовательности однодоменных антител, обладающих специфической и нейтрализующей активностью к ботулиническому нейротоксину типа А (антитела G3 и B11), были получены Годаковой С.А. [Godakova S.A. et al., 2019]. В исследовании было показано, что данные антитела имели период полувыведения менее 1 ч, что является обычным для однодоменных антител. Данный фактор ограничивает их применение для терапии и профилактики ботулизма, поэтому для улучшения фармакокинетических свойств и придания антителам эффекторных функций, актуально получение антител B11 и G3, модифицированных Fc-фрагментом IgG человека. При помощи методов *in silico* в программе Geneious Prime был разработан дизайн генетических конструкций, содержащих последовательности антител G3 или B11, связанные с последовательностями тяжелой цепи IgG1 (регионы SP, hinge, CH2 и CH3) (модифицированные антитела G3-Fc и B11-Fc) (Рисунок 1). Нуклеотидные

последовательности элементов модифицированных антител G3-Fc и B11-Fc получали с использованием базы данных последовательностей белков UniProt.



Рисунок 1 – Схематичное изображение генетической конструкции, содержащей гены модифицированных антител G3-Fc и B11-Fc. SP – сигнальный пептид, обеспечивающий секрецию антитела в культуральную жидкость; VHH – однодоменное антитело, специфичное к BoNT/A (G3 или B11); Hinge – шарнирный регион человека IgG1; CH2 и CH3 – домены тяжелой цепи человека IgG1.

Нуклеотидные последовательности генетических конструкций были синтезированы ЗАО «Евроген» в составе вектора pAL-TA. Ген G3-Fc или B11-Fc клонировали в плазмиду pBACP (получена в лаборатории иммунобиотехнологии) по сайтам рестрикции NheI и HindIII, в результате чего были созданы плазмиды pBACP-G3-Fc и pBACP-B11-Fc (Рисунок 2), которые использовали в дальнейшей работе.

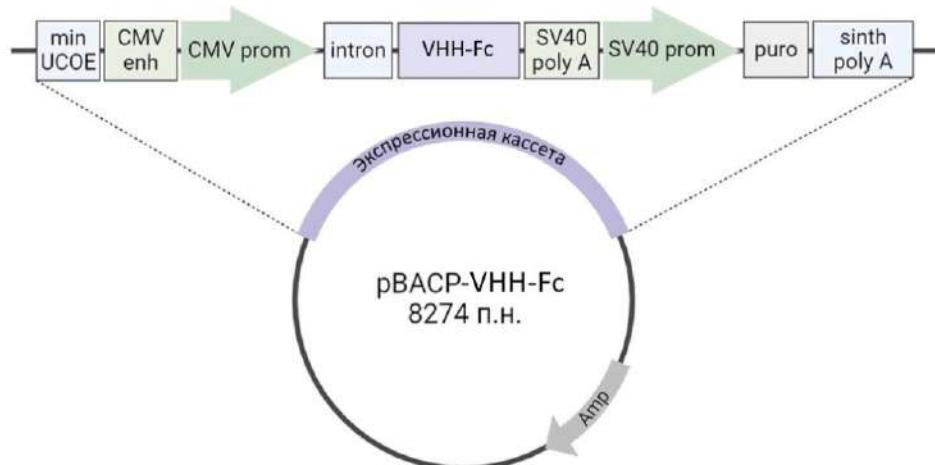


Рисунок 2 – Схематичное изображение плазмидных конструкций, содержащих гены антитела G3-Fc или B11-Fc.

Таким образом были созданы генетические конструкции, содержащие гены антител G3-Fc и B11-Fc, пригодные для дальнейшей работы.

Получение и отбор модифицированного однодоменного антитела, нейтрализующего ботулинический нейротоксин типа А. Для отбора наиболее перспективного модифицированного антитела проводили получение исследуемых модифицированных однодоменных антител G3-Fc и B11-Fc при помощи транзиентной трансфекции клеток СНО, предоставленных из коллекции ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России. В результате культивирования трансфицированных клеток и аффинной хроматографической очистки

культуральных жидкостей при помощи сорбента, содержащего белок A (MabSelect SuRe, Cytiva, США) были получены исследуемые антитела G3-Fc и B11-Fc.

Для отбора наиболее перспективного антитела оценивали эффективность нейтрализации BoNT/A антителами при помощи внутрибрюшинной интоксикации мышей в дозе 5 LD₅₀ и одновременного внутривенного введения G3-Fc или B11-Fc в дозах 0,6 и 0,3 мг/кг. В результате, доза 0,3 мг/кг продемонстрировала различия в эффективности нейтрализации BoNT/A антителами: B11-Fc обеспечил 100%-ную защиту, в то время как G3-Fc обеспечил только 50%-ную защиту (Рисунок 3).

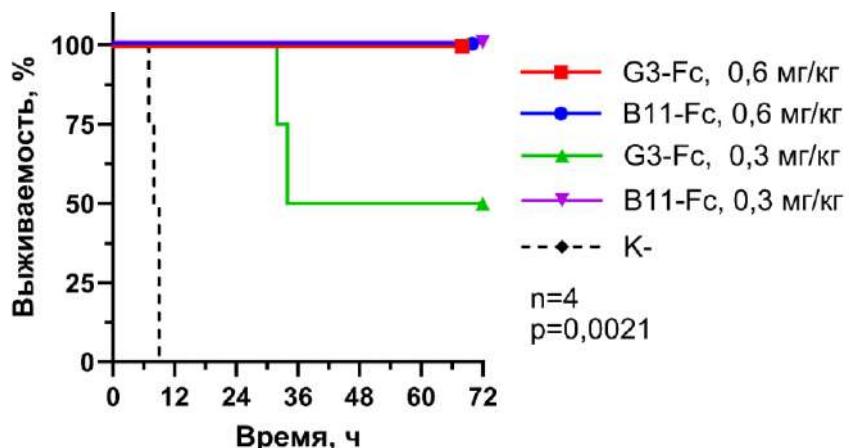


Рисунок 3 – Выживаемость групп мышей, получивших внутрибрюшинно 5 LD₅₀ BoNT/A одновременно с внутривенным введением антитела B11-Fc в дозах 0,6 и 0,3 мг/кг.

Таким образом, для дальнейшей работы было отобрано модифицированное однодоменное антитело B11-Fc, которое наиболее эффективно нейтрализует BoNT/A на мышиной модели интоксикации.

Разработка технологии получения модифицированного однодоменного антитела

Получение клеточной линии, стабильно продуцирующей модифицированное однодоменное антитело B11-Fc, и оптимизация условий ее культивирования. Для дальнейшего исследования антитела B11-Fc необходимо было получить эукариотический клон, стабильно продуцирующий данное антитело с целью обеспечения высокого выхода, поддержания посттрансляционных модификаций, минимизации гетерогенности, стандартизации процесса и воспроизводимости результатов. Плазмидную ДНК pVACP-B11-Fc линеаризовали с использованием эндонуклеазы рестрикции Alw44I и трансфецировали в клетки СНО. В результате селекции трансфецированных клеток с использованием антибиотика пуромицина и последующего отбора высокопродуктивного моноклона-продуцента на основе данных измерения концентрации антител в культуральной жидкости

методом биослойной интерферометрии на системе Octet RED96 (Sartorius, Германия), был получен клон-продуцент B7. В дальнейшем была подтверждена генетическая стабильность полученной клеточной линии и создана система клеточных банков.

Для обеспечения максимального выхода продукта проводили оптимизацию культивирования полученного продуцента в суспензионных условиях на питательных средах SFM4CHO и ActiPro (Cytiva, США) в сочетании с питательными добавками CellBoost 5 и CellBoost 7a/7b (Cytiva, США). В результате было продемонстрировано, что комбинация ActiPro + CellBoost 7a/7b обеспечивает наибольший выход антитела B11-Fc (0,608 г/л среды), поэтому данную схему культивирования использовали в дальнейшей работе.

Разработка технологии очистки модифицированного однодоменного антитела B11-Fc. При помощи методов хроматографической очистки были подобраны оптимальные условия, обеспечивающие максимальную чистоту наряду с наименьшими потерями. Было показано, что сочетание аффинной хроматографии с использованием сорбента, содержащего белок A, анионообменной хроматографии с использованием Sartobind Q Nano 3 мл (Sartorius, Германия) и очистки с помощью керамического гироксиаппатита I типа (СНТ Туре I, Bio-Rad, США), обеспечивает высокую чистоту антитела B11-Fc с отсутствием агрегированных форм. Итоговый выход антитела после всех стадий очисток составил 0,5 г/л культуральной жидкости. В результате исследования стабильности B11-Fc был подобран оптимальный состав вспомогательных компонентов буферного раствора (150 mM NaCl, 15 mM Na₂HPO₄, 5 mM NaH₂PO₄, 0,01% твин-80, pH=7,2), обеспечивающего хранение антитела B11-Fc в течение 1 года при 4 °C.

Таким образом была разработана методика очистки антитела B11-Fc при помощи аффинной, анионообменной и мультимодальной хроматографии. Средний выход очищенного антитела B11-Fc составил около 0,5 г на 1 л культуральной жидкости. Был подобран состав формулирующего раствора, обеспечивающего длительное хранение.

Физико-химическая и иммунологическая характеристика полученного антитела B11-Fc. Целостность молекулы и содержание примесей оценивали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В результате, на хроматограмме детектировался один основной пик, соответствующий мономерной форме B11-Fc, и отсутствовали пики примесных белков (Рисунок 4А).

Исследование чистоты методом определения размера наночастиц в растворе позволяет не только определить размер молекул и наличие их олигомеров, но и детектировать более крупные агломераты частиц, которые могут не определяться методом ВЭЖХ. В результате измерения было показано присутствие одного основного пика, соответствующего молекулам со средним диаметром 7,85 нм, что согласуется со средним размером молекул B11-Fc (Рисунок 4Б).

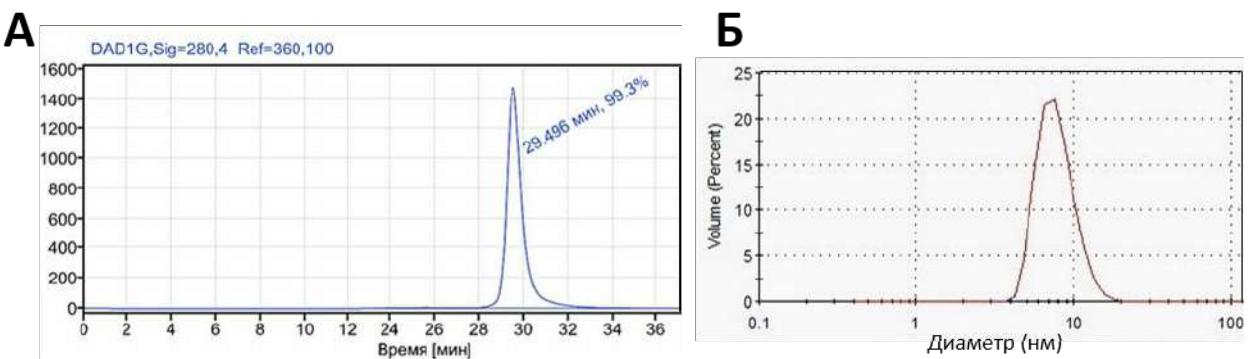


Рисунок 4 – Результаты исследования чистоты B11-Fc методом ВЭЖХ (А) и результаты исследования методом определения размера наночастиц в растворе (Б).

Исследование примесей остаточного белка А, эндотоксинов, а также остаточных белков и ДНК штамма-продуцента продемонстрировало, что их наличие не превышает допустимую норму для препаратов антител (не более 1 мкг/мл остаточного белка, не более 10 пг/мг остаточной ДНК, не более 25 нг/мг остаточного белка А).

При исследовании гликанового профиля антитела B11-Fc было показано, что содержание маннозилированных форм гликанов составляет от 1 до 5% (Таблица 1). Также антитело содержит афукозилированные гликаны и не содержит высокогалактозилированных форм.

Таблица 1 – Процентное содержание гликанов очищенного антитела B11-Fc

Группа гликанов	G0-N	G0F-N	G0	G0F	Man5	G1	G1F	G2F	G2+G2
Количественное содержание	0-2%	0-2%	0,5-5%	30-50%	1-5%	1-5%	15-25%	5-15%	0%

Для изучения функциональной активности Fc-фрагмента антитела B11-Fc проводили анализ его взаимодействия с белками FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b, γ RI человека, являющимися мишениями для связывания с Fc-фрагментом человеческих иммуноглобулинов. В результате измерения методом биослойной интерферометрии были получены следующие значения констант диссоциаций (K_D), представленные в Таблице 2.

Таблица 2 – Полученные значения констант диссоциации, измеренные между антителом B11-Fc и разными классами Fc рецепторов

Fc receptor	CD16a	CD16b	CD32a	CD32b	FcRn	γ RI
K_D	$2,3 \cdot 10^{-8} M$	$4,2 \cdot 10^{-9} M$	$4,6 \cdot 10^{-8} M$	$4,5 \cdot 10^{-8} M$	$3,4 \cdot 10^{-8} M$	$2,6 \cdot 10^{-8} M$

В реакции непрямого ИФА было показано, что антитело B11-Fc в концентрациях 40-1000 мкг/мл взаимодействует с белком C1q.

Таким образом, была продемонстрирована однородность очищенного антитела B11-Fc и высокая чистота. Было показано отсутствие высокогалактозилированных форм гликанов, которые потенциально могут повышать иммуногенность. Антитело B11-Fc взаимодействует с высокой аффинностью с различными классами человеческих Fc-рецепторов и белком системы комплемента C1q, демонстрируя функциональность Fc-фрагмента.

Доклинические исследования эффективности модифицированного однодоменного антитела B11-Fc

Перед началом доклинических исследований эффективности полученного антитела проводили отработку модели интоксикации мышей BoNT/A внутрибрюшинным способом. В результате были подобраны дозы для внутрибрюшинной интоксикации (5 или 10 LD₅₀), демонстрирующие наступление симптомов спустя 3 ч и гибель животных спустя 7-9 ч, что является острой моделью (Рисунок 8А, Б).

Для подбора протективной дозы антитела проводили внутрибрюшинное введение 10 LD₅₀ BoNT/A и последующее внутривенное введение антитела B11-Fc в различных дозах, в результате чего была показана полная защита мышей от летальной интоксикации в концентрациях 1,2 и 0,6 мг/кг. Доза антитела 0,6 мг/кг была выбрана для дальнейшего исследования как минимальная доза, обеспечивающая 100% защиту от летальной интоксикации мышей.

Для исследования защитного потенциала выбранной дозы проводили внутрибрюшинную интоксикацию групп мышей повышенными дозами BoNT/A (5, 10, 20, 50 и 100 LD₅₀) и одновременное внутривенное введение антитела B11-Fc в дозе 0,6 мг/кг. В результате была показана полная защита мышей против доз 5, 10 и 20 LD₅₀ BoNT/A, 60% защита от дозы 50 LD₅₀ и 30% защита от дозы 100 LD₅₀ BoNT/A (Рисунок 5). Таким образом, была продемонстрирована полная защита мышей при внутрибрюшинной интоксикации не более 20 LD₅₀ BoNT/A, что говорит о высоком защитном потенциале антитела B11-Fc в выбранной дозе.

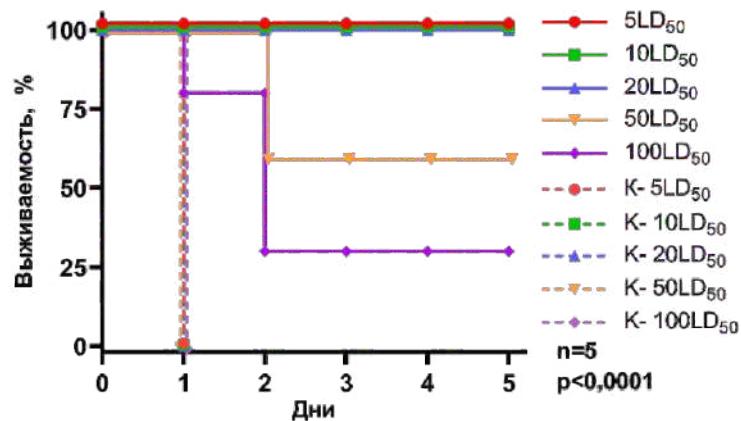


Рисунок 5 – Выживаемость групп мышей, получивших внутрибрюшинно различные LD₅₀ BoNT/A одновременно с введением B11-Fc в протективной дозе.

Для изучения фармакокинетики антитело B11-Fc вводили внутривенно в дозе 0,6 мг/кг мышам и проводили отбор крови спустя различные интервалы времени. В результате анализа методом ИФА были получены данные динамики изменения концентрации B11-Fc в сыворотке крови с течением времени (Рисунок 6). Период полувыведения антитела составил 46,4 ч, максимальная концентрация B11-Fc 1,22 мкг/мл, длительность циркуляции составила 672 ч.

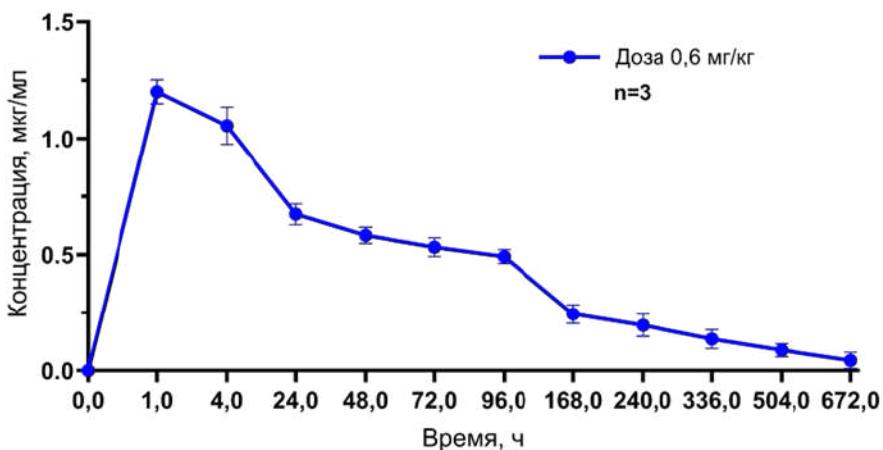


Рисунок 6 – Динамика изменения концентрации B11-Fc в сыворотке крови мыши.

Для оценки защитной эффективности антитела B11-Fc в профилактическом режиме проводили внутривенное введение антитела B11-Fc мышам в рабочей дозе. Спустя 7, 14, 21 и 28 дней проводили интоксикацию 5 LD₅₀ BoNT/A внутрибрюшинно. В результате было показано, что однократное введение антитела B11-Fc обеспечивает полную защиту мышей в течение 3 недель после введения, что коррелирует с результатами фармакокинетики (Рисунок 7А).

Для исследования антитела B11-Fc в режиме экстренной профилактики и терапии группам мышей проводили внутрибрюшинное введение 5 LD₅₀ BoNT/A и внутривенное введение антитела B11-Fc спустя 0 (одновременно), 2, 4 и 6 часов. В результате была показана полная защита при одновременном введении B11-Fc, а также с отсрочкой в 2 часа, и 40% защита с отсрочкой в 4 часа (Рисунок 7Б).

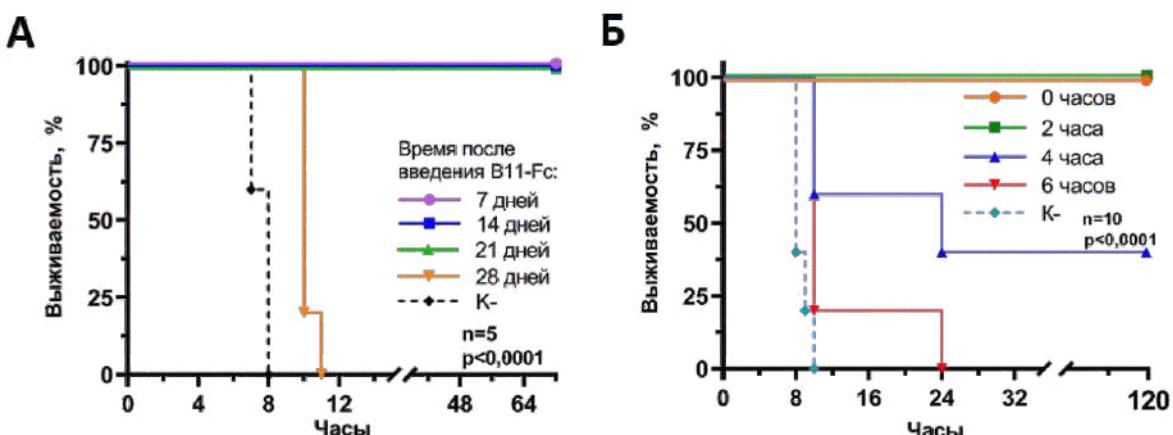
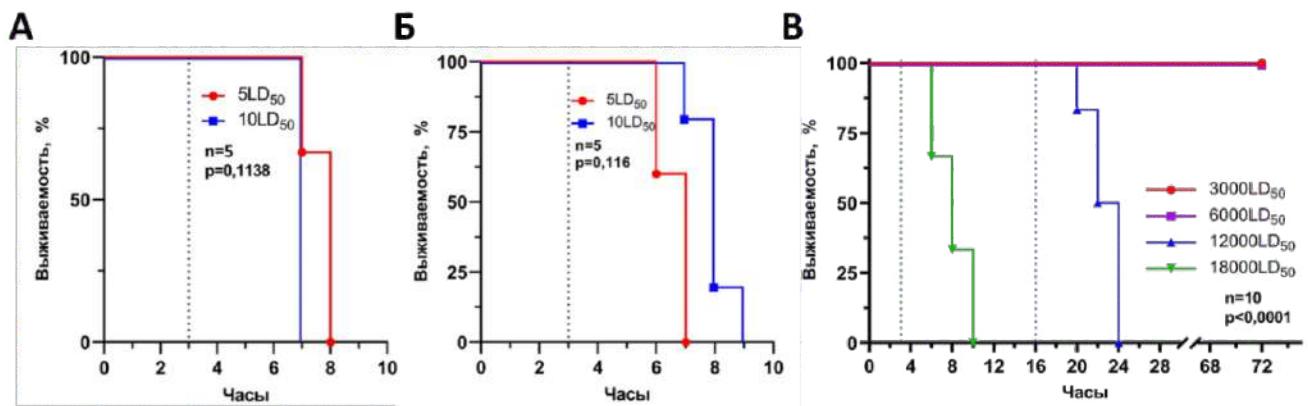


Рисунок 7 – Выживаемость групп мышей, которым вводили антитело B11-Fc в дозе 0,6 мг/кг, и затем BoNT/A в дозе 5 LD₅₀ BoNT/A внутрибрюшно, в различные интервалы времени в режиме профилактики (А) и выживаемость групп мышей, которым вводили 5 LD₅₀ BoNT/A внутрибрюшно, и затем антитело B11-Fc в различные интервалы времени в режимах экстренной профилактики и терапии (Б).

Таким образом показана полная защита мышей в профилактическом режиме при внутрибрюшинной интоксикации 5 LD₅₀ BoNT/A в течение 21 суток после введения антитела. Также показана 100% защита мышей при введении антитела B11-Fc одновременно с интоксикацией. Защита при системном введении ботулинического нейротоксина типа А наблюдалась при введении B11-Fc не позднее 2 часов после интоксикации 5 LD₅₀ BoNT/A, т.е. в экстренно-профилактическом режиме. При введении антител в режиме терапии (до 6 часов после интоксикации) наблюдалась частичная защита.

Ограничением внутрибрюшинной модели интоксикации BoNT/A является быстрота наступления симптомов, что не позволяет провести исследование терапевтической активности антитела при появлении клинических признаков заболевания. Кроме того, данная модель не отражает защиту от пищевой формы ботулизма, которая является основным способом интоксикации человека. Таким образом одной из задач исследования был подбор дозы BoNT/A, которая обеспечивала появление признаков ботулизма через длительный промежуток времени и при этом была летальной, для возможности оценки протективной активности. В результате отработки внутрижелудочной модели интоксикации была подобрана доза 12000 LD₅₀ (значения LD₅₀ получены при внутрибрюшинном введении BoNT/A), приводящая к наступлению симптомов через 16 ч и гибели мышей спустя 24 ч, что является более приближенным к клиническому течению пищевого ботулизма у человека (Рисунок 8В).



Для исследования возможности терапии ботулизма на модели внутрижелудочной интоксикации проводили введение BoNT/A в дозе 12000 LD₅₀ группам мышей, и последующее введение антитела B11-Fc в дозе 0,6 мг/кг в различные интервалы времени после появления симптомов. В результате группы, получившие антитело B11-Fc спустя 12 и 14 часов после интоксикации показали 100% выживаемость; группы, получившие антитело спустя 16 и 18 часов показали выживаемость 60 и 50% соответственно. При этом, введение антитела B11-Fc увеличивало продолжительность жизни групп животных в сравнении с контрольной группой (Рисунок 9А). Использование противоботулинической лошадиной сыворотки вместо антитела B11-Fc в аналогичном режиме введения показало корреляцию с защитой B11-Fc (Рисунок 9Б).

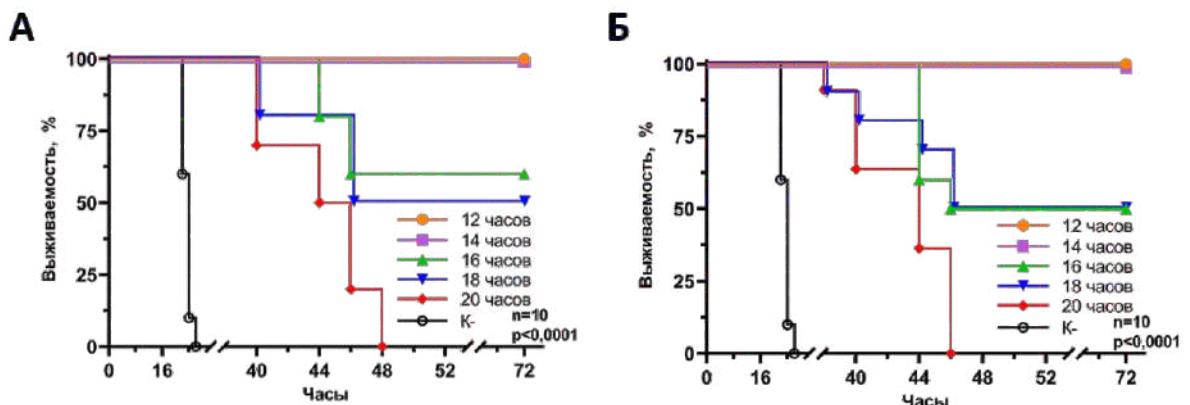


Рисунок 9 – Выживаемость групп мышей, получивших антитело B11-Fc в различные интервалы времени после внутрижелудочного введения 12000 LD₅₀ BoNT/A (А) и выживаемость групп мышей, получивших противоботулиническую сыворотку лошади в различные интервалы времени после внутрижелудочного введения 12000 LD₅₀ BoNT/A (Б).

Таким образом была показана возможность применения антитела B11-Fc для терапии внутрижелудочной интоксикации мышей BoNT/A в дозе 12000 LD₅₀, используя антитело при наступлении симптомов, что делает возможным применение B11-Fc для терапии пищевого ботулизма человека.

Доклинические исследования фармакокинетики и безопасности модифицированного однодоменного антитела B11-Fc

Доклинические исследования безопасности лекарственных средств включает исследования острой и местной токсичностей при однократном и многократном введении препарата, иммунотоксичности и аллергизирующих свойств [Миронов А.Н., 2012]. Проведенные исследования продемонстрировали отсутствие влияния антитела B11-Fc на исследуемые показатели: все полученные значения находились в границах значений нормы или эффекты не носили дозозависимый характер.

Дополнительно, в рамках исследования, было проведено изучение фармакокинетики на кроликах Шиншилла при внутривенном введении высоких доз антитела. В результате были рассчитаны фармакокинетические параметры и подтверждена гипотеза линейности для изучаемых доз. После однократного введения B11-Fc детектировали в сыворотке, начиная с первой временной точки, время достижения максимальной концентрации составило 0,5 ч (Рисунок 10). С_{max} составило 37, 125,5 и 232 мкг/мл для доз 6, 30 и 60 мг/кг соответственно.

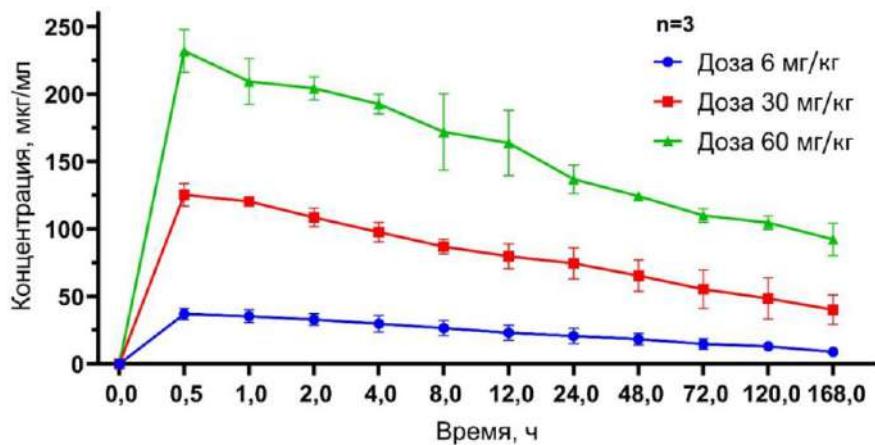


Рисунок 10 – Динамика изменения концентрации B11-Fc в сыворотке крови.

На основании полученных результатов можно заключить, что полученное антитело B11-Fc обладает хорошей переносимостью и безопасностью. Проведенный объем доклинических исследований позволил получить разрешение на проведение клинических исследований I и II фазы (Протокол №-01-B11-FC-2024 «Исследование безопасности, переносимости, иммуногенности, фармакокинетики и фармакодинамики лекарственного препарата B11-Fc при однократном применении у взрослых»).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате диссертационной работы были созданы генетические конструкции, кодирующие однодоменные антитела, слитые с Fc-фрагментом IgG1 человека, обладающие специфической активностью в отношении BoNT/A. При помощи исследований *in vivo* на мышах было отобрано наиболее перспективное антитело B11-Fc, обладающее высокой нейтрализующей активностью против BoNT/A. Используя методы молекулярной биотехнологии была получена клеточная линия CHO, стабильно продуцирующая модифицированное однодоменное антитело B11-Fc, специфичное к BoNT/A. При помощи оптимизации условий культивирования и хроматографической очистки была разработана схема получения антитела B11-Fc.

При исследовании физико-химических и иммунологических характеристик было подтверждено качество полученных антител, а также их чистота и стабильность при длительном хранении. Кроме того, антитело было охарактеризовано по гликановому профилю и способности взаимодействия с Fc-рецепторами человека: FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b, γRI, а также белком системы комплемента C1q.

Экспериментальные данные продемонстрировали эффективность полученного модифицированного однодоменного антитела B11-Fc на различных моделях интоксикации мышей. Применение антитела B11-Fc на модели системной внутрибрюшинной интоксикации обеспечивало защиту в экстренно-профилактическом режиме применения. Кроме того, была показана возможность краткосрочной профилактики ботулизма в течение 3 недель, что достигается благодаря наличию у однодоменного антитела Fc-фрагмента IgG1. На разработанной модели внутрижелудочной интоксикации мышей была продемонстрирована эффективность полученного антитела B11-Fc в экстренной профилактике и терапии ботулизма даже при наличии симптомов интоксикации.

Проведенные доклинические исследования модифицированного однодоменного антитела B11-Fc продемонстрировали безопасность ввиду отсутствия влияния на различные иммунологические, биохимические и другие показатели организма животных. Проведенный объем доклинических исследований позволил получить разрешение на проведение клинических исследований I и II фазы.

ВЫВОДЫ

1. Создана генетическая конструкция, экспрессирующая ген однодоменного антитела, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 (B11-Fc), нейтрализующего BoNT/A, получена клеточная линия, производящая антитело B11-Fc, а также отработаны условия ее культивирования, обеспечивающие выход целевого продукта 0,5 г/л;
2. Разработана технология очистки модифицированного однодоменного антитела B11-Fc, включающая несколько стадий хроматографической очистки, обеспечивающая чистоту получаемого антитела до 99%;
3. В результате изучения характеристик антитела B11-Fc показано, что его размер составляет 7,85 нм, в составе молекулы присутствуют основные группы гликанов, Fc-фрагмент антитела способен взаимодействовать с рецепторами человека FcRn, CD16a, CD16b, CD32a, CD32b, γRI, а также с белком системы комплемента C1q;
4. Модифицированное однодоменное антитело B11-Fc способно обеспечивать 100%-ную защиту мышей от острой летальной интоксикации 20 LD₅₀ BoNT/A в течение 21 суток после внутривенного введения в дозе 0,6 мг/кг;
5. На внутрижелудочной модели интоксикации было показано, что введение антител при появлении симптомов ботулизма обеспечивает 100%-ную защиту, что демонстрирует возможность применения антител в режиме терапии;
6. В результате доклинических исследований была подтверждена безопасность препарата на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Для дальнейшей регистрации и применения препарата для терапии и экстренной профилактики ботулизма на основе модифицированного однодоменного антитела B11-Fc необходимо проведение I и II фазы клинических исследований, где будет изучена его безопасность, фармакокинетика, переносимость и эффективность.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В журналах, рекомендуемых ВАК:

1. Деркаев А.А. Кандидатный препарат на основе модифицированных однодоменных антител для терапии ботулизма, вызванного ботулиническим токсином типа А / **А.А. Деркаев, Е.И. Рябова, И.Б. Есмагамбетов, Д.В. Щебляков, А.Н. Носков, И.Д. Виноградова, В.В. Прокофьев, Д.С. Полянский, Д.Ю. Логунов, А.Л. Гинцбург** //БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2025. – Т. 13, № 1. – С. 58-70.

2. Derkaev, A.A. rAAV expressing neutralizing antibody for the botulinum neurotoxin type A prophylaxis / **A.А. Derkaev, E.I. Ryabova, I.B. Esmagambetov, D.V. Shcheblyakov, S.A. Godakova, I.D. Vinogradova, A.N. Noskov, D.Y. Logunov, B.S. Naroditsky, A.L. Gintsburg** //Frontiers in Microbiology. – 2022. – Vol. 13:960937.

3. Panova. E.A. Single-domain antibody delivery using an mRNA platform protects against lethal doses of botulinum neurotoxin A / E. A. Panova, D. A. Kleymenov, D. V. Shcheblyakov, E.N. Bykonia, E.P. Mazunina, A.S. Dzharullaeva, A.N. Zolotar, **А.А. Derkaev, I.B. Esmagambetov, I.I. Sorokin, E.V. Usachev, A.N. Noskov, I.A. Ivanov, T.S. Zatsepin, S.E. Dmitriev, V.A. Gushchin, B.S. Naroditsky, D.Y. Logunov, A.L. Gintsburg** //Frontiers in Immunology. – 2023. – Vol. 14.

В тезисах научных конференций:

4. Деркаев, А.А. Получение однодоменных антител, специфичных к ботулиническому токсину типа А, и изучение возможности их применения для терапии ботулизма / **А.А. Деркаев, Е.И. Рябова, И.Б. Есмагамбетов, А.Н. Носков, Д.В. Щебляков** //Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2024. – Т. 13, № S1. – С. 125-126.

5. Деркаев, А.А. Разработка средства терапии, экстренной профилактики и профилактики интоксикации, вызываемой ботулиническим нейротоксином типа А на основеnanoантител / **А.А. Деркаев, И.Б. Есмагамбетов, Е.И. Рябова, А.Н. Носков, М.А. Довгий, В.В. Прокофьев, Е.М. Смирнова, Д.В. Щебляков** //Материалы конгресса. РКММИ 2023: сборник тезисов. – М.: Издательство «У Никитских ворот», 2023. – 126 с.

Патенты РФ:

6. Патент РФ 2766348 С1, 2022, Однодоменное антитело и его модификации, специфически связывающиеся с ботулиническим нейротоксином типа А, и способ их применения для терапии или экстренной профилактики интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А. Есмагамбетов И.Б., Щебляков Д.В., **Деркаев А.А.**, Годакова С.А., Носков А.Н., Виноградова И.Д., Рябова Е.И., Алексеева И.А., Фаворская И.А., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Бюл. №8; опубликовано 15.03.2022

7. Патент РФ 2768044 С1, 2022, Экспрессионный вектор на основе аденоассоциированного вируса, обладающий защитными свойствами против интоксикации, вызванной ботулиническим нейротоксином типа А. Есмагамбетов И.Б., Рябова Е.И., **Деркаев А.А.**, Довгий М.А., Бырихина Д.В., Носков А.Н., Чемоданова И.П., Государев А.И., Щебляков Д.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Бюл. №9; опубликовано 23.03.2022.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВЭЖХ – высокоэффективная
жидкостная хроматография
ИВЛ – искусственная вентиляция
легких
мАт – моноклональное антитело
BoNT – ботулинический
нейротоксин (botulinum neurotoxin)
СН – константный домен тяжёлой
цепи иммуноглобулина
Fc – кристаллобразующий фрагмент
(fragment crystallizable)

HA – гемагглютинин
HRP – пероксидаза хрена (enzyme
horseradish peroxidase)
IgG – иммуноглобулин класса G
NTNH – нетоксичный
негемагглютинин
PEI – полиэтиленимин
(polyethylenimine)
VHH – однодоменные антитела,
nanoантитела (variable domain of the
heavy chain of the heavy chain antibody)