

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Куш А.А.<sup>1</sup>, Климова Р.Р.<sup>1</sup>, Фёдорова Н.Е.<sup>1</sup>, Масалова О.В.<sup>1</sup>, Никонова А.А.<sup>2</sup>, Леснова Е.И.<sup>1</sup>,  
Момотюк Е.Д.<sup>1</sup>, Демидова Н.А.<sup>1</sup>, Самарцева Т.Г.<sup>2</sup>, Зверев В.В.<sup>2</sup>.

## ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ К F-БЕЛКУ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА, НЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ ИНФЕКЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ ВИРУСА В КЛЕТОЧНОЙ КУЛЬТУРЕ

<sup>1</sup> Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, г. Москва, Россия;

<sup>2</sup> ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, г. Москва, Россия

**Введение.** Респираторно-синцициальный вирус (РСВ) является наиболее распространённой причиной острых инфекционных заболеваний респираторного тракта. Отсутствие широкого спектра терапевтических препаратов, а также вакцин для профилактики и лечения РСВ-инфекции свидетельствует о высокой актуальности их разработки. **Цель** работы – получение высокоактивных и специфичных моноклональных антител (МкАТ), способных обнаружить РСВ в заражённых клетках и нейтрализовать инфекционную активность вируса *in vitro*. **Материал и методы.** РСВ эталонных штаммов 2 субгрупп группы А (А2 и Long) размножали в перевиваемых клетках HEp-2 и MA-104 соответствующим образом. Мышей иммунизировали очищенным вирусом, МкАТ получали с помощью гибридомной технологии. **Результаты.** Получена панель из 6 МкАТ, взаимодействующих с РСВ (А2 и Long) и с F-белком РСВ: 4 МкАТ принадлежали к иммуноглобулинам класса G, изотипам IgG2a или IgG2b; 2 МкАТ – к классу IgM. Тип лёгкой цепи во всех моноклональных Ig был карра. Полученные МкАТ активно взаимодействовали с РСВ в иммуноферментном анализе, в реакциях иммунофлюоресценции и иммунопероксидазной окраски заражённых клеток, а также в иммунодоте. 5 из 6 МкАТ нейтрализовали инфекционную активность вируса в клеточной культуре. Обнаружены значительные различия в способности МкАТ реагировать с F-белком в иммунохимических и биологических реакциях, что предполагает направленность МкАТ к разным антигенным сайтам. **Обсуждение.** Сравнительный анализ с опубликованными данными свидетельствует о том, что полученные МкАТ можно использовать для разработки диагностических препаратов и тест-систем, для обнаружения РСВ в клинических материалах и для доказательства этиологии инфекции при выделении вируса, в том числе быстрым культуральным методом. **Заключение.** Высокая активность и специфичность показывают, что разработанные МкАТ могут служить основой для создания новых профилактических препаратов и вакцин.

**Ключевые слова:** моноклональные антитела; респираторно-синцициальный вирус; реакция биологической нейтрализации; иммуноферментный анализ; F-белок; иммунофлюоресцентная и иммунопероксидазная детекция респираторно-синцициального вируса в зараженных клетках; иммунодот.

**Для цитирования:** Куш А.А., Климова Р.Р., Фёдорова Н.Е., Масалова О.В., Никонова А.А., Леснова Е.И., Момотюк Е.Д., Демидова Н.А., Самарцева Т.Г., Зверев В.В. Получение и свойства моноклональных антител к F-белку респираторно-синцициального вируса, нейтрализующих инфекционную активность вируса в клеточной культуре. *Вопросы вирусологии.* 2019; 64(2):90-96. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-90-96>

Kushch A.A.<sup>1</sup>, Klimova R.R.<sup>1</sup>, Fedorova N.E.<sup>1</sup>, Masalova O.V.<sup>1</sup>, Nikonova A.A.<sup>2</sup>, Lesnova E.I.<sup>1</sup>,  
Momotyuk E.D.<sup>1</sup>, Demidova N.A.<sup>1</sup>, Samartseva T.G.<sup>2</sup>, Zverev V.V.<sup>2</sup>

## DEVELOPMENT AND PROPERTIES OF NEUTRALIZING MONOCLONAL ANTIBODIES FOR FUSION PROTEIN OF RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS

<sup>1</sup> Ivanovsky Institute of Virology «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named honorary academician NF Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation;

<sup>2</sup> Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russian Federation

**Introduction.** Respiratory syncytial virus (RSV) is the most common cause of lower respiratory tract infections in infants and the elderly. The absence of a wide range of therapeutic drugs and vaccines indicates to the high relevance of the development of new effective drugs for the prevention and treatment of RSV infections. **Purpose:** to obtain highly active and specific monoclonal antibodies (MAbs) capable of detecting RSV in infected cells and neutralizing the infectious activity of the virus *in vitro*. **Material and methods.** RSV reference strains of group A 2 subgroups (A2 and Long) were propagated in HEp-2 and MA-104 cell lines, respectively. Mice were immunized with purified RSV A2 virus. MAbs were obtained using hybridoma technology. **Results.** A panel of 6 MAbs reacting with RSV strains A2 and Long has been obtained. Four MAbs were IgG (IgG2a or IgG2b subtype), two MAbs were IgM. All MAbs reacted with RSV F-protein in immunochemical tests. The MAbs actively reacted with RSV in ELISA, in immunofluorescence and peroxidase staining of infected cells, and in immunodot test. Five out of 6 MAbs neutralized of RSV in cell culture. Different properties of MAbs suggest that they target different antigenic sites of F-protein. **Discussion.** Comparative analysis suggests that the obtained MAbs can be used for the development of diagnostic preparations, for RSV detection in clinical materials and confirmation of infection etiology by rapid culture method. **Conclusion.** High activity and specificity of MAbs indicate that they can serve as a basis for development vaccines and preventive medicines.

**Keywords:** monoclonal antibodies; respiratory syncytial virus; reaction of biological neutralization; immunoenzyme assay; F-protein, immunofluorescence and immunoperoxidase detection of RSV in infected cells; immunodot.

**Для корреспонденции:** Куш Алла Александровна, д-р биол. наук, профессор, руководитель лаборатории ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи», Минздрава России, 123098, г. Москва. E-mail: [vitalku@mail.ru](mailto:vitalku@mail.ru)

**For citation:** Kushch A.A., Klimova R.R., Fedorova N.E., Masalova O.V., Niconova A.A., Lesnova E.I., Momotyuk E.D., Demidova N.A., Samartseva T.G., Zverev V.V. Development and properties of neutralizing monoclonal antibodies for fusion protein of respiratory syncytial virus. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2019; 64(2):90-96. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2019-64-2-90-96>

**For correspondence:** Alla A. Kushch, professor, head of the laboratory of the Ivanovsky Institute of Virology «Federal Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya», Moscow, 123098, Russian Federation. E-mail: [vitalku@mail.ru](mailto:vitalku@mail.ru)

**Information about authors:**

Kushch A.A., <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>  
 Klimova R.R., <http://orcid.org/0000-0002-4147-8444>  
 Fedorova N.E., <http://orcid.org/0000-0001-8466-7993>  
 Masalova O.V., <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>  
 Demidova N.A., <http://orcid.org/0000-0003-1961-9789>

Niconova A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9610-0935>  
 Lesnova E.I., <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>  
 Momotyuk E.D., <http://orcid.org/0000-0002-6217-5311>  
 Samartseva T.G., <https://orcid.org/0000-0003-3264-6722>  
 Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

**Acknowledgment.** This work was supported by a grant from the Russian Science Foundation No. 17-15-01525.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

Received 20 October 2018

Accepted 31 October 2018

## Введение

Острые респираторные вирусные инфекции (ОРВИ) широко распространены во всем мире и нередко приводят к смерти пациента. Возбудителями ОРВИ являются вирусы, относящиеся к разным таксономическим группам. Наиболее распространённой причиной острых инфекционных заболеваний нижних отделов респираторного тракта среди детей в возрасте младше 5 лет является респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) [1]. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире ежегодно инфицируются РСВ 64 млн человек и 160 тыс. человек умирают [2]. Все дети в течение первых 2 лет жизни по крайней мере 1 раз инфицируются РСВ [3], причём смертность детей в возрасте до 1 года от РСВ-инфекции более высокая, чем от любого другого патогена, кроме малярии [4]. В США от РСВ-инфекции ежегодно умирают более 100 тыс. детей [5]. В Российской Федерации данная проблема не менее актуальна. Эпидемиологическое исследование, проведённое в 2011–2013 гг. в Санкт-Петербурге, показало, что в этиологической структуре ОРВИ госпитализированных детей первых 5 лет жизни доминировала РСВ-инфекция [6]. У взрослых людей в группах высокого риска (со сниженным иммунитетом, с заболеваниями лёгких, сердечно-сосудистой системы), а также у лиц старшего возраста РСВ-инфекция протекает с тяжёлыми последствиями и нередко со смертельным исходом [7].

В то же время единственное разрешённое средство борьбы с РСВ-инфекцией – препарат паливизумаб (palivizumab, Synagis®) – гуманизированное моноклональное антитело (МкАТ), полученное методами молекулярной и клеточной биотехнологии [8]. Этот препарат снижает заболеваемость в группах риска [9], но не предотвращает реинфекции и у части пациентов вызывает образование устойчивых к паливизумабу вариантов РСВ [10, 11]. Оценка эффективности паливизумаба в разных исследованиях варьирует от 39 до 78% [12]. Следует отметить, что высокая стоимость препарата существенно ограничивает возможность его использования для профилактики заболевания. Отсутствие более широкого спектра терапевтических препаратов, а также вакцин свидетельствуют о высокой актуальности разработки новых более эффективных препаратов для профилактики и лечения РСВ-инфекции. Не менее актуально усовершенствование дифференциальной диагностики это-

го заболевания, так как успех терапии зависит от своевременного, эффективного и специфичного обнаружения возбудителя при сходных клинических проявлениях у пациентов с острой инфекцией респираторного тракта. В то же время, согласно данным, опубликованным группой европейских авторов [13], при стандартном подходе дифференциальная диагностика респираторных инфекций более чем в 50% случаев оказывается неудовлетворительной.

Цель настоящей работы – получение высокоактивных и специфичных МкАТ, способных обнаруживать РСВ в заражённых клетках и нейтрализовать инфекционную активность вируса *in vitro*.

## Материал и методы

**Вирус и клетки.** Использовали РСВ двух эталонных штаммов (A2 и Long, подгруппа А) из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И. И. Мечникова. РСВ А2 размножали в перевиваемой клеточной культуре HEp-2 (человек, эпидермоидная карцинома гортани), в среде RPMI, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), глутамин и гентамицин (ООО «Панэко», Россия), при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. РСВ Long культивировали с использованием перевиваемой культуры клеток МА-104 (макака резус, эмбриональная почка) в среде Игла MEM. Концентрировали и очищали вирусы из клеток преципитацией с PEG6000. Осадок, содержащий вирус, растворяли в 20% сахарозе. При концентрировании вируса использовали методику согласно О. Уеба [14]. Для титрования вирусов использовали клетки МА-104, так как на них хорошо проявляется классическое цитопатогенное действие РСВ (образование синцитиев), которое можно учитывать при контроле монослоя с использованием микроскопа. Титр вирусов рассчитывали по формуле Спирмена–Кербера. Титр РСВ А2 после концентрирования составил 9lg тканевой 50% цитопатической дозы в 1 мл (ТЦД<sub>50</sub>/мл), РСВ Long – 7lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Концентрацию белка в вирусном препарате определяли на микроспектрофотометре NanoDrop (Thermo Scientific, США) при длине волны 280 нм против 20% сахарозы или с помощью реагента Брэдфорда (Sigma, США) в соответствии с инструкцией.

**Иммунизация мышей.** Иммунизацию мышей (самки линии BALB/c), полученных из питомника «Пушино» (Московская обл.), проводили с использованием 2 схем (1-я группа и 2-я группа, по 5 животных в каждой груп-

пе). Доза РСВ А2 при каждой инъекции составляла 100 мкг/мышь. В качестве адъювантов использовали полный адъювант Фрейнда (ПАФ) и неполный адъювант Фрейнда (НАФ) (Sigma, США). Мышей 1-й группы иммунизировали 3 раза с 2-недельным интервалом, 2-й группы – 5 раз с недельным интервалом: 1-е введение РСВ с ПАФ, следующие – с НАФ. Исследования выполняли согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ Минздрава России от 19.06.2003 № 266).

**Иммуноферментный анализ (ИФА)** антител к РСВ в сыворотках крови мышей, в культуральных жидкостях от гибридных клеток, а также МкАТ проводили в непрямом варианте: вносили по 50 мкл РСВ в концентрации 10 мкг/мл в 0,1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,2 (PBS) в лунки 96-луночных планшетов (Thermo Scientific, США) на 24 ч при 4 °С. После отмывки раствором PBS с твином (0,1% твин-20 в PBS) в лунки вносили: сыворотки мышей в серийных разведениях; или культуральные жидкости (КЖ) из лунок с гибридными клетками; или КЖ из лунок с моноклонами, и инкубировали в течение 1 ч при 37 °С. После отмывки добавляли козы антигена к иммуноглобулинам мыши, меченные пероксидазой («Сорбент», Россия), в разведении 1 : 500. В качестве субстрата использовали тетраметилбензидин гидрохлорид (ТМБ; US Biomedical, США). Для торможения реакции добавляли 1N серную кислоту. Оптическую плотность (ОП) измеряли на планшетном иммуноферментном анализаторе «Sunrise» (Tecan, Швейцария) при длине волны 450 нм, референс-волны – 620 нм. За титр антител принимали обратное разведение, ОП которого в 2 раза превосходила ОП отрицательных контролей – преимунные мышинные сыворотки или КЖ из лунок, не содержащих гибридные клетки.

**Гибридизация и клонирование.** Миеломные и гибридомные клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 4,5 г/л глюкозы, 3 мМ глутамин, 60 мкг/мл гентамицина (ООО «ПанЭко», Россия) с добавлением 20% ЭТС (Gibco, Invitrogen, США) и 0,2 ед/мл инсулина (Lilly, Франция). Культивирование проводили в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Для слияния использовали клетки мышинной миеломы Sp2/0, не продуцирующие собственные иммуноглобулины.

Гибридизацию проводили по методу [15] с модификациями, как описано ранее [16]. Суспензию спленоцитов мыши смешивали с клетками Sp2/0 в соотношении 2 : 1, соответственно, и добавляли раствор PEG/DMSO solution (Hybri-Max™, Sigma, США). После слияния клетки ресуспендировали в селективной среде гипоксантин-аминоптерин-тимидин (ГАТ) (Hybri-Max™, Sigma, США), вносили в 96-луночные панели и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Клетки культивировали в селективной среде ГАТ в течение 14 дней после слияния. КЖ из лунок, содержащих гибридные клетки, тестировали на наличие антител к РСВ в ИФА, как описано выше, и в реакции биологической нейтрализации (РБН).

**Реакция биологической нейтрализации.** КЖ от гибридных культур или моноклонов инкубировали с РСВ А2 (инфекционная множественность 10<sup>4</sup> ТЦД<sub>50</sub>/мл) в течение 2 ч при 37 °С в присутствии 5% CO<sub>2</sub> и затем вносили на монослой клеток МА-104. Через 1 ч обработанные клетки промывали средой без сыворотки и вносили среду поддержки с 2% ЭТС, содержащую двойную концентрацию глутамин. Цитопатогенное действие (ЦПД) вируса на клетки оценивали через 72–96 ч, когда

в инфицированной, но не обработанной культуре развивалось ЦПД.

**Иммунофлюоресцентный анализ РСВ** в заражённых клетках проводили методом непрямого иммунофлюоресцентного анализа. Клетки МА-104 в концентрации 4x10<sup>4</sup> клеток/мл вносили в лунки 24-луночных панелей с покровными стеклами, на следующий день заражали РСВ с инфекционной множественностью 10<sup>4</sup> ТЦД<sub>50</sub>/мл. Через 4 сут после заражения клетки фиксировали метанолом 20 мин при -20 °С. На фиксированные препараты наносили МкАТ и инкубировали 1 ч при 37 °С. Затем промывали PBS и наслаивали антимышиную сыворотку, меченную ФИТЦ (ДАКО, Дания). Клетки докрашивали эвансом синим («Biochem», Франция). Окрашивание наблюдали с помощью флюоресцентного микроскопа AxioScope A1 (Carl Zeiss, Германия) при длине волны 520–560 нм. Результаты оценивали по интенсивности окраски и выражали в условных обозначениях: +++ соответствовали яркой изумрудно-зелёной окраске, ++ – менее яркой окраске, + – слабой окраске.

**Иммуноферментный анализ F-белка РСВ** проводили с использованием 96-луночных планшетов MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE (Thermo Scientific, США). В лунки вносили рекомбинантный F-белок (Sino Biological, Республика Корея) РСВ А2 в концентрации 0,5 мкг/мл в 0,1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,2 (PBS) и инкубировали в течение 18 ч при 4 °С. Затем вносили МкАТ и выполняли ИФА, как описано выше.

**Субтипы МкАТ и типы лёгких цепей** определяли методом ИФА с помощью набора «Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit» (Thermo Scientific, США) в соответствии с инструкцией: КЖ от МкАТ вносили в лунки планшета, преадсорбированного антителами к иммуноглобулинам мыши классов G (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), IgA и IgM, а также к субтипам легкой цепи kappa и lambda. После инкубации добавляли поливалентный конъюгат к IgG + IgA + IgM, меченный пероксидазой, после инкубации – субстрат ТМБ. Принадлежность МкАТ определяли по максимальному сигналу с определённым субтипом Ig и типом лёгкой цепи.

**Иммунопероксидазное выявление антигена РСВ в заражённых клетках.** Клетки, содержащие РСВ, выявляли иммуноцитохимическим окрашиванием *in situ* с помощью полученных МкАТ. Клетки фиксировали охлаждённым метанолом, обрабатывали МкАТ и инкубировали 1 ч при 37 °С. Антитела отмывали PBS, наслаивали антимышинные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (anti-mouse PX, PO260; Dako, Дания), и инкубировали 1 ч при 37 °С. Препараты промывали PBS и наносили раствор 3,3'-диаминобензидина в концентрации 1 мг/мл в буфере 0,05 М Трис-НСl (pH 7,4) с добавлением 3% пероксида водорода. Реакцию останавливали через 10 мин внесением дистиллированной воды. Результаты иммунопероксидазного окрашивания оценивали с использованием светового микроскопа AxioVert A1.

**Иммунодот.** Образцы (концентрированные препараты вирусов, F-белок, лизаты заражённых и незаражённых клеток) наносили в серийных разведениях на нитроцеллюлозную мембрану 0,45 мкм (Schleicher & Schuell, Германия) с помощью вакуумного насоса с использованием Bio-Dot apparatus (Bio-Rad, США), как описано ранее [17]. Инкубацию с МкАТ в блокирующем растворе PBS, содержащем 5% обезжиренного сухого молока и 0,1% твин-20, проводили в течение 2 ч на качалке при комнатной температуре, затем – в течение 1 ч с антимышинными



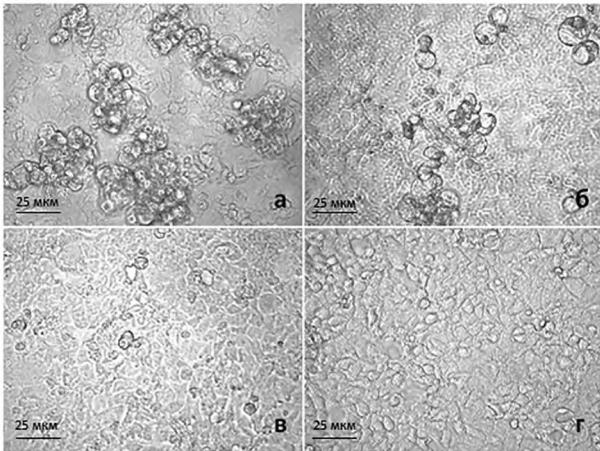


Рис. 1. Морфологические проявления вируснейтрализующей активности моноклональных антител против респираторно-синциального вируса (PCV) в клетках культуры МА-104 в реакции биологической нейтрализации.

*a* – цитопатогенное действие РСВ, контроль заражения; *б* – подавление инфекционной активности РСВ моноклональными антителами (MкАТ) 7H5 на 60%; *в* – подавление MкАТ 11F6 на 80%; *г* – неинфицированные клетки МА-104, контроль. Фазовый контраст. Ув. 400×.

антителами, меченными пероксидазой хрена (Jackson Immuno Research, США) в разведении 1 : 500. Реакцию проявляли раствором субстрата 3,3'-диаминобензида (Sigma, США) (0,05 М трис-НСl, рН 7,4; 0,03% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,5 мг/мл 3,3'-диаминобензида). Результаты оценивали визуально по интенсивности пятен.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программ MS Office Excel 2010 и Statistica 6. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента; различия считали статистически значимыми при *p* < 0.05.

**Результаты**

Таблица 1

**Сравнительный анализ специфической активности антител в сыворотках иммунизированных мышей в отношении РСВ А2**

Схема иммунизации	Мыши, № п/п	Титр антител в ИФА*, класс и субклассы Ig			Титр в РБН**
		IgG1	IgG2a	IgG суммарный	
1-я схема (3 иммунизации через 2 нед с ПАФ и НАФ)	1	7 · 10 <sup>5</sup>	6 · 10 <sup>5</sup>	7,8 · 10 <sup>5</sup>	160
	2	10 <sup>5</sup>	3 · 10 <sup>4</sup>	4 · 10 <sup>5</sup>	160
	3	7 · 10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	5,6 · 10 <sup>5</sup>	80
	4	10 <sup>5</sup>	2 · 10 <sup>5</sup>	4,9 · 10 <sup>5</sup>	80
	5	2 · 10 <sup>5</sup>	2 · 10 <sup>5</sup>	6 · 10 <sup>5</sup>	40
	6	2 · 10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	1,6 · 10 <sup>5</sup>	< 40
2-я схема (5 иммунизаций через 1 нед с ПАФ и НАФ)	7	10 <sup>5</sup>	2 · 10 <sup>4</sup>	4 · 10 <sup>5</sup>	< 40
	8	10 <sup>5</sup>	3 · 10 <sup>4</sup>	4 · 10 <sup>5</sup>	< 40
	9	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	4 · 10 <sup>5</sup>	160
	10	6 · 10 <sup>5</sup>	5 · 10 <sup>5</sup>	7,8 · 10 <sup>5</sup>	80
Неиммунизированные мыши		< 250	< 250	< 250	< 40

Примечание. \* За титр принято обратное предельное разведение сыворотки; \*\* за титр принято обратное предельное разведение сыворотки, при котором цитопатогенное действие РСВ А2 подавлено на 50%. Жирным шрифтом выделены лучшие показатели активности антител. Расшифровка аббревиатур дана в тексте.

Сравнительный анализ иммунного ответа мышей, иммунизированных по 2 схемам, проводили через 7 дней после последней иммунизации. Схемы различались количеством введений РСВ и интервалами между ними, как описано в разделе «Материал и методы». Определяли титр антител при тестировании суммарных IgG, а также антител изотипов IgG1 и IgG2a к РСВ А2. Результаты определения антител в сыворотках крови мышей методом ИФА и способности антител нейтрализовать инфекционную активность РСВ в РБН показали, что после 2-й иммунизации иммунный ответ мышей в обеих группах был относительно слабым, титры суммарных Ig анти-РСВ не превышали 1 : 10<sup>4</sup>; титры в РБН составляли 1 : 10, что статистически значимо не отличалось от уровня контрольных неиммунизированных животных. После иммунизации животных по 1-й и 2-й схемам активность иммунного ответа возрастала (табл. 1).

Сыворотки неиммунизированных мышей не реагировали с РСВ А2: ОП всех разведений в ИФА была *p* < 0.05. Среднегеометрические титры антител к РСВ, иммунизированных по 1-й схеме, составляли 1 : 5,6 · 10<sup>5</sup>, по 2-й схеме – 1 : 3,8 · 10<sup>5</sup>, различия статистически незначимы (*p* > 0,05). Анализ сывороток в РБН показал, что вируснейтрализующие антитела образовались у всех животных, иммунизированных по схеме 1, и характеризовались титрами 1 : 40 – 1 : 160. Напротив, в группе мышей, иммунизированных по схеме 2, только у 2 животных детектировали вируснейтрализующие антитела. Для получения гибридом, продуцирующих MкАТ к РСВ, были отобраны 2 мыши, имевшие лучшие показатели активности сывороточных антител к РСВ (табл. 1).

В результате экспериментов по гибридизации клеток было получено 768 гибридных культур, устойчивых к селективной среде ГАТ. Первичный скрининг КЖ установил, что 180 гибридных культур продуцировали антитела к белкам РСВ А2 (23%), которые реагировали с РСВ только в ИФА или только в РБН или в обеих реакциях. Проведено клонирование положительных культур с последующим изучением стабильности продукции антител при сохранении пролиферативной активности. Сравнительный анализ позволил отобрать 6 моноклонов для подробного изучения продуцируемых ими MкАТ. Данные представлены в табл. 2 и на рис. 1 и 2 (см. рис. 2 на третьей полосе обложки).

Определены субтипы моноклональных иммуноглобулинов: 3 MкАТ принадлежали к IgG, изотипам IgG2a или IgG2b; 2 MкАТ – к IgM. Тип лёгкой цепи во всех моноклональных Ig был каппа.

Результаты ИФА показали, что MкАТ 3F3 и 1B7 одинаково интенсивно реагировали как со штаммом РСВ А2, к которому были получены, так и со штаммом РСВ Long и с F-белком РСВ. Другие MкАТ более слабо реагировали с РСВ Long. В то же время все MкАТ взаимодействовали с F-белком, хотя и в разной степени. Важно отметить, что 5 из 6 MкАТ проявили значительную вируснейтрализующую активность, подавляя ЦПД РСВ *in vitro* на 60–80%.

Все полученные клоны выявляли РСВ в заражённых клетках, но с разной активностью (см. табл. 2). Иммунофлуоресцентный анализ (ИФл) показал, что MкАТ выявляли F-белок РСВ А2 в цитоплазме клеток. На рис. 2 а–д можно видеть, что MкАТ 3F3 и 11F6 взаимо-

Таблица 2

**Свойства моноклональных антител к респираторно-синцитиальному вирусу**

МкАТ	Изотип Ig, тип лёгкой цепи	РБН, % ингибирования	ИФА: ОП с КЖ*			ИФл**
			PCB A2	PCB Long	Ф-белок	
7Н5	IgG2a, κ***	60	3,0	1,1	1,0	++
11F6	IgG2a, κ	80	2,6	0,8	0,5	+++
3F3	IgM, κ	70	3,4	3,3	3,5	+++
5G8	IgG2b, κ	70	1,1	0,3	0,4	+
5D5	IgM, κ	70	3,2	0,8	0,8	+
1В7	IgG2b, κ	<50	2,8	2,3	2,4	+

Примечание. \* Показатели оптической плотности (ОП) при анализе моноклональных антител (МкАТ) в культуральных жидкостях (КЖ) от гибридом; \*\* ИФл – сравнительная оценка интенсивности флюоресценции в клетках, зараженных РСВ и окрашенных МкАТ, условные обозначения; \*\*\* κ – обозначение лёгкой цепи.

Таблица 3

**Чувствительность выявления Ф-белка респираторно-синцитиального вируса в вирусных препаратах методом иммунодота**

МкАТ	Ф-белок	Концентрированные РСВ, штаммы		Лизат клеток МА-104, инфицированных РСВ, штамм А2
		А2	Long	
7Н5	100 нг*	600 нг	2,0 мкг	20 мкг
11F6	50 нг	600 нг	4,8 мкг	20 мкг
3F3	20 нг	200 нг	500 нг	5 мкг
1В7	20 нг	100 нг	300 нг	1 мкг

Примечание. \* Минимальное количество белка, выявляемое указанными моноклональными антителами (МкАТ).

действовали с РСВ не только в синцитиях с видимым ЦПД, но также с вирусом в неслившихся клетках, соседних с синцитиями. Остальные МкАТ реагировали преимущественно с РСВ, локализованном в синцитиях. Такая же реакция с внутриклеточным вирусом была характерна и для поликлональной мышиной сыворотки к РСВ, которую использовали в качестве контроля. На рис. 2 ж приведён пример раннего обнаружения РСВ в клетках культуры методом иммунопероксидазного окрашивания.

4 МкАТ были испытаны в реакции иммунодота на способность выявлять Ф-белок РСВ. На рис. 3 в качестве примера представлены данные взаимодействия МкАТ 7Н5. Можно видеть, что исследованные МкАТ специфично реагировали с Ф-белком (1-я полоска) и препаратами РСВ А2 (2-я полоска) и Long (3-я полоска), не выявляя его в неинфицированных клетках (5-я полоска). Чувствительность детекции варьировала: для рекомбинантного Ф-белка от 20 до 100 нг, для концентрированных вирусов РСВ – от 100 до 600 нг (А2) и 300–4800 нг (Long), для клеток, инфицированных РСВ А2, – от 1 до 20 мкг/пятно (табл. 3).

**Обсуждение**

Поиски эффективных средств борьбы с РСВ-инфекцией продолжают в течение более 50 лет, однако до сих пор не удаётся существенно снизить заболеваемость среди детей и лиц старшего возраста. Отчасти это объясняется особенностями патогенеза РСВ-инфекции, при которой включаются механизмы иммунного ускольза-

ния. На ранних сроках после заражения РСВ иммунный ответ слабый и в дальнейшем характеризуется низкой стойкостью, что способствует частым реинфекциям даже при заражении структурно близкими штаммами вируса [18, 19]. Результаты настоящей работы подтверждают это наблюдение: даже после двукратной иммунизации цельным вирусом гуморальный ответ мышей был невысоким и сыворотки крови практически не содержали вируснейтрализующих антител. Поскольку для получения МкАТ необходимо индуцировать у мышей сильный антительный иммунный ответ к целевому антигену, мы использовали 2 схемы иммунизации животных с различным количеством инъекций и разными интервалами между введениями РСВ. Это позволило отобрать животных с высокими титрами сывороточных антител к РСВ и способностью нейтрализовать инфекционную активность вируса. В результате использования гибридомной технологии был получен набор гибридом и выбраны 6 моноклонов, продуцирующих вирусспецифические МкАТ. В ИФА все МкАТ обнаруживали РСВ двух референс-штаммов группы А (А2 и Long) и реагировали с Ф-белком РСВ, при этом МкАТ 3F3 и 1В7 – с одинаково высокой активностью, другие МкАТ реагировали со штаммом Long и Ф-белком значительно слабее. Одно из возможных объяснений состоит в различных свойствах моноклональных иммуноглобулинов, относящихся к разным типам и субтипам, в том числе в их способности реагировать с антигенными детерминантами на Ф-белке. Более вероятно, что МкАТ направлены к разным эпитопам Ф-белка. В пользу сделанного предположения свидетельствуют данные о том, что 6 антигенных сайтов на Ф-белке, индуцирующих РСВ-нейтрализующие антитела, существен-

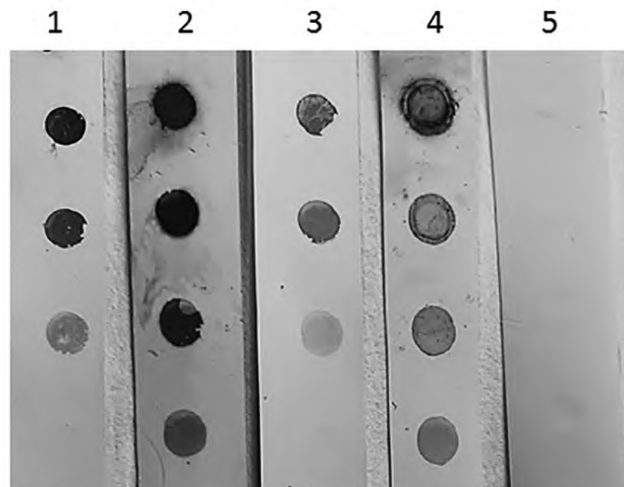


Рис. 3. Анализ взаимодействия моноклональных антител с РСВ А2 и Long в реакции иммунодота.

На нитроцеллюлозную мембрану нанесены следующие препараты в серийных разведениях с шагом 1 : 5. Начальные разведения: 1-я полоска – рекомбинантный Ф-белок – 2,5 мкг; 2-я полоска – концентрированный вирус РСВ А2 – 75 мкг; 3-я полоска – концентрированный вирус РСВ Long – 50 мкг; 4-я полоска – лизат клеток МА-104, заражённых РСВ А2 – 2,5 мкг; 5-я полоска – лизат незаражённых клеток МА-104 – 2,5 мкг. Мембраны инкубировали с КЖ 7Н5, реакцию проявляли, как описано в тексте (см. раздел «Материал и методы»).



но различаются по нейтрализующему потенциалу [20]. Что касается МкАТ 1В7, активно реагирующего в ИФА с F-белком, но не подавляющего инфекционную активность РСВ, то очевидно, что это МкАТ взаимодействует с эпитопом в другом антигенном регионе, возможно, локализованном не на апикальной поверхности F-белка, а на участке, приближенном к вирусной мембране.

В настоящее время несколько научных групп в разных странах проводят интенсивные исследования, направленные на разработку новых антител с улучшенными характеристиками [21–23].

Одна из целей получения новых МкАТ – использование их для лабораторной диагностики. Для респираторных инфекций диагностика имеет особое значение в связи со сходством клинических проявлений заболеваний различной этиологии. Среди полученных нами 2 МкАТ (3F3 и 1В7) высоко активно детектировали РСВ в ИФА, и по крайней мере еще 2 МкАТ (11F6 и 3F3) эффективно выявляли РСВ в зараженных клетках методом ИФл. Оба метода прямого обнаружения вирусного антигена широко используются в настоящее время наряду с молекулярными методами как в Европе, так и в США [24, 25]. В еженедельных сводках Центра по контролю за заболеваемостью и профилактикой инфекционных болезней США (Centers for Disease Control and Prevention) публикуются сведения о диагностике РСВ-инфекции, которая проводится тремя методами: детекция антигена, изоляция вируса и полимеразная цепная реакция (ПЦР). Согласно полученным данным, в 2018 г. количество положительных проб на РСВ при обнаружении антигена было выше, чем при использовании ПЦР и изоляции вируса: 14, 4 и 0% соответственно. О том, что стандартная ПЦР-диагностика РСВ-инфекции требует усовершенствования, свидетельствуют данные С. Lowe и соавт. [26], показавших, что при рутинной ПЦР-диагностике респираторных инфекций 30% случаев были пропущены.

Один из методов, используемых в диагностике для идентификации возбудителя, – выделение вируса. Его применяют для доказательства этиологии заболевания. В классическом варианте клинические материалы вносят в культуру чувствительных клеток и наблюдают развитие ЦПД с последующей идентификацией патогена разными методами. МкАТ позволяют идентифицировать вирус на ранних стадиях после заражения, до развития ЦПД. Этот вариант (так называемый быстрый культуральный метод), как показали данные ИФл-анализа, может использоваться с помощью полученных нами МкАТ.

Прямая детекция антигена РСВ продемонстрирована нами также в реакции иммунодота. Представляет интерес, что наибольшей чувствительностью обладали МкАТ 1В7, не способные нейтрализовать инфекционный вирус. Так, рекомбинантный F-белок выявлялся с чувствительностью 20 нг, в составе концентрированных препаратов РСВ А2 и Long – 100–300 нг, зараженных клеток – 1 мкг. Сходные характеристики получены для МкАТ к белкам РСВ, описанным ранее [27]. Таким образом, МкАТ1В7 могут быть использованы для разработки «быстрых» тестов для определения антигена РСВ на основе иммунодота, пригодных для скрининговых исследований и диагностики «у постели больного». В то же время МкАТ используют при разработке новых современных диагностических платформ, в том числе на основе нанотехнологий [28]. Усовершенствование диа-

гностики необходимо для надежной дифференциации РСВ-инфекции от других вирусных заболеваний, в том числе от гриппа, а также от бактериальных инфекций респираторного тракта, что позволяет начать терапию специфическими противогриппозными препаратами и ограничить применение антибиотиков. МкАТ являются полезным инструментом для скрининга антивирусных препаратов, мониторинга эпидемий и оценки эффективности вакцин. Новые МкАТ, в том числе полученные в данной работе, нужны для повышения качества и доступности лабораторной диагностики, для достижения баланса между новыми сложными мультиплексными платформами, требующими дорогостоящего оборудования и специалистов для обслуживания, и достаточно быстрыми и простыми методами для применения непосредственно в местах оказания первой медицинской помощи.

Важно отметить, что большинство полученных нами МкАТ нейтрализовали инфекционную активность РСВ в клеточной культуре. Особого внимания заслуживают МкАТ 3F3, которые проявили высокую активность во всех изученных иммунохимических и биологических реакциях, в том числе во взаимодействии с F-белком. F-белок обеспечивает проникновение вируса в клетку путем слияния вирусной и клеточной мембран, участвует в почковании и распространении вируса от клетки к клетке, и что важно, характеризуется меньшей изменчивостью, чем поверхностный гликопротеин G. МкАТ к F-белку послужили основой для получения паливизумаба – первого и единственного разрешенного препарата для профилактики РСВ-инфекции в группах высокого риска. В настоящее время предпринимаются усилия для разработки улучшенного препарата на основе новых МкАТ, направленных к другому, апикально экспонированному антигенному сайту на F-белке – Ø [19]. Использование новых МкАТ, в том числе полученных в настоящей работе, для изучения тонкой антигенной структуры F-белка РСВ – одно из необходимых условий для создания эффективной вакцины против РСВ-инфекции.

### Заключение

Суммируя результаты проделанной работы, можно сделать вывод, что получен набор из 6 МкАТ, показана способность МкАТ взаимодействовать с F-белком РСВ и нейтрализовать инфекционную активность вируса в клеточной культуре. Полученные МкАТ можно использовать для разработки диагностических препаратов, для иммуноферментного и иммунофлюоресцентного методов обнаружения РСВ в клинических материалах и для доказательства этиологии инфекции при выделении вируса. Кроме того, они могут стать основой для создания новых профилактических препаратов и вакцин.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ № 17-15-01525.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-5, 7-15, 17-21, 23-28 см. REFERENCES)

- Евдокимов К.В., Ровный В.Б., Бабаченко И.В., Шарипова Е.В. Респираторно-синцитиальная инфекция у детей раннего возраста. *Медицинский совет.* 2017; (4): 7-10.
- Климова Р.Р., Масалова О.В., Бурцева Е.И., Чичев Е.В., Леснова Е.И., Оскерко Т.А. и др. Моноклональные антитела к пандемическому вирусу гриппа А/IV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl, обла-

дающие высокой вируснейтрализующей активностью. *Вопросы вирусологии*. 2011; 56(3): 15-20.

22. Кривичкая В.З., Синцова К.С., Петрова П.Е., Сверлова М.В., Соколин Е.В., Царева Т.Р. и др. Генетическая и антигенная характеристика штаммов РСВ, выделенных в Санкт-Петербурге в 2013-2016 гг. *Вопросы вирусологии*. 2017; 62(6): 273-82.

## REFERENCES

- Jain S., Self W., Wunderink R., Fakhran S., Balk R., Bramley A., et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. Adults. *N. Engl. J. Med.* 2015; 373(5): 415-27. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1500245>
- Carbonell-Estrany X., Simoes E., Dagan R., Hall C., Harris B., Hultquist M., et al. Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial. *Pediatrics*. 2010; 125(1): 35-51. Doi: <https://doi.org/10.1542/peds.2008-1036>
- Shi T., McAllister D., O'Brien K., Simoes E., Madhi S., Gessner B., et al. Global, regional, and national disease burden estimates of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children in 2015: a systematic review and modelling study. *Lancet*. 2017; 390(10098): 946-58. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30938-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30938-8)
- Lozano R., Naghavi M., Foreman K., Lim S., Shibuya K., Aboyans V., et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*. 2013; 380(9859): 2095-128. Doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61728-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61728-0)
- Zhou H., Thompson W., Viboud C., Ringholz C., Cheng P., Steiner C., et al. Hospitalizations associated with influenza and respiratory syncytial virus in the United States, 1993-2008. *Clin. Infect. Dis.* 2012; 54(10): 1427-36. Doi: <https://doi.org/10.1093/cid/cis211>
- Evdokimov K.V., Rovnyy V.B., Babachenko I.V., Sharipova E.V. Respiratory syncytial infection in young children. *Meditsinskiy sovet*. 2017; (4): 7-10. (in Russian)
- Falsey A., Hennessey P., Formica M., Cox C., Walsh E. Respiratory syncytial virus infection in elderly and high-risk adults. *N. Engl. J. Med.* 2005; 352(17): 1749-5. Doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa043951>
- Johnson S., Oliver C., Prince G., Hemming V., Pfarr D., Wang S., et al. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent in vitro and in vivo activity against respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 1997; 176(5): 1215-24. Doi: <https://doi.org/10.1086/514115>
- The IMPact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics*. 1998; 102(3): 531-7.
- Zhu Q., McAuliffe J., Patel N., Palmer-Hill F., Yang C., Liang B., et al. Analysis of respiratory syncytial virus preclinical and clinical variants resistant to neutralization by monoclonal antibodies palivizumab and/or motavizumab. *J. Infect. Dis.* 2011; 203(5): 674-82. Doi: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiq100>
- Zhao X., Sullender W. In vivo selection of respiratory syncytial viruses resistant to palivizumab. *J. Virol.* 2005; 79(7): 3962-8. Doi: <https://doi.org/10.1128/JVI.79.7.3962-3968.2005>
- Wegzyn C., Toh L., Notario G., Biguenet S., Unnebrink K., Park C., et al. Safety and Effectiveness of Palivizumab in Children at High Risk of Serious Disease Due to Respiratory Syncytial Virus Infection: A Systematic Review. *Infect. Dis. Ther.* 2014; 3(2): 133-58. Doi: <https://doi.org/10.1007/s40121-014-0046-6>
- Alchikh M., Conrad T., Hoppe C., Ma X., Broberg E., Penttinen P., et al. Are we missing respiratory viral infections in infants and children? Comparison of a hospital-based quality management system with standard of care. *Clin. Microbiol. Infect.* 2019; 25(3):380. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2018.05.023>
- Ueba O. Respiratory syncytial virus concentration and purification of the infectious virus. *Acta. Med. Okayama*. 1978; 32(4): 265-72.
- Köhler G., Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*. 1976; 256(5517): 495-7.
- Klimova R.R., Masalova O.V., Burtseva E.I., Chichev E.V., Lesnova E.I., Oskerko T.A., et al. Monoclonal antibodies with high virus-neutralizing activity against pandemic influenza virus A/HIV-Moscow/01/2009 (H1N1)swl. *Voprosy virusologii*. 2011; 56(3): 15-20. (in Russian)
- Masalova O.V., Klimova R.R., Chichev E.V., Fediakina I.T., Loginova S.Y., Borisevich S.V., et al. Development of monoclonal antibodies to highly pathogenic avian influenza H5N1 virus and their application to diagnostics, prophylaxis, and therapy. *Acta Virol.* 2011; 55(1): 3-14.
- Graham B.S. Biological Challenges and Technological Opportunities for Respiratory Syncytial Virus Vaccine Development. *Immunol. Rev.* 2011; 239(1): 149-66. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2010.00972.x>
- González P., Carreño L., Bueno S., Riedel C., Kalergis A. Understanding respiratory syncytial virus infection to improve treatment and immunity. *Curr. Mol. Med.* 2013; 13(7): 1122-39.
- Graham B. Vaccine development for respiratory syncytial virus. *Curr. Opin. Virol.* 2017; 23: 107-112. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.03.012>
- Detalle L., Stohr T., Palomo C., Piedra P., Gilbert B., Mas V., et al. Generation and Characterization of ALX-0171, a Potent Novel Therapeutic Nanobody for the Treatment of Respiratory Syncytial Virus Infection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2015; 60(1): 6-13. Doi: <https://doi.org/10.1128/AAC.01802-15>
- Krivitskaya V.Z., Sintsova K.S., Petrova R.E., Sverlova M.V., Sorokin E.V., Tsareva T.R., et al. Genetic and antigenic characterization of RSV strains isolated in St. Petersburg in 2013–2016. *Voprosy virusologii*. 2017; 62(6): 273-82. (in Russian)
- Mejias A., Garcia-Maurino C., Rodriguez-Fernandez R., Peeples M., Ramilo O. Development and clinical applications of novel antibodies for prevention and treatment of respiratory syncytial virus infection. *Vaccine*. 2017; 35(3): 496-502. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.09.026>
- Broberg E., Waris M., Johansen K., Snacken R., Penttinen P. European Influenza Surveillance Network. Seasonality and geographical spread of respiratory syncytial virus epidemics in 15 European countries, 2010 to 2016. *Euro Surveill.* 2018; 23(5): 17-00284. Doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.5.17-00284>
- The National Respiratory and Enteric Virus Surveillance System (NREVSS). Available at: <https://www.cdc.gov/surveillance/nrevss/rsv/index.html>
- Lowe C., Leung V., Karakas L., Merrick L., Lawson T., Romney M. Targeted Management of Influenza A/B Outbreaks Incorporating the cobas® Influenza A/B&RSV into the Virology Laboratory. *J. Hosp. Infect.* 2018; 101(1): 38-41. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2018.08.014>
- Gómez R., Mora J., Cortés C., Riedel C., Ferrés M., Bueno S., et al. Respiratory syncytial virus detection in cells and clinical samples by using three new monoclonal antibodies. *J. Med. Virol.* 2014; 86(7): 1256-66. Doi: <https://doi.org/10.1002/jmv.23807>
- Tripp R., Alvarez R., Anderson B., Jones L., Weeks C., Chen W. Bioconjugated nanoparticle detection of respiratory syncytial virus infection. *Int. J. Nanomedicine*. 2007; 2(1): 117-24.

Поступила 20.10.18

Принята в печать 31.10.18

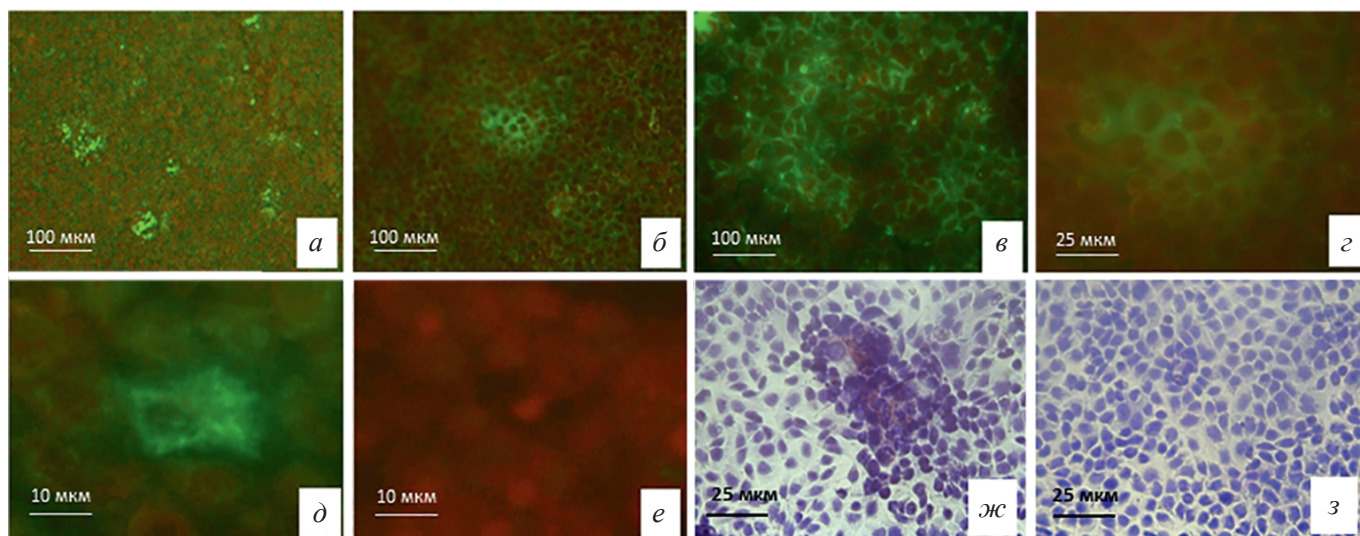


Рис. 2. Иммуноцитохимический анализ взаимодействия моноклональных антител (МкАТ) с клетками МА-104, инфицированными РСВ А2.

*a-e* – метод иммунофлуоресцентного окрашивания: *a* – поликлональная мышиная сыворотка к респираторно-синцитиальному вирусу (РСВ) А2 в разведении 1 : 100; *б* – МкАТ 11F6; *в, г* – МкАт 3F3; *д* – МкАТ 1В7; *е* – МкАТ к вирусу гепатита С, отрицательный контроль. Зелёная окраска – ФИТЦ, красная – докраска Эванс синий;

*ж, з* – метод иммунопероксидазного окрашивания: *ж* – инфицированная культура клеток МА-104, коричневая окраска соответствует локализации РСВ, определённой при помощи МкАТ11F6 к F-белку РСВ; *з* – неинфицированная культура, контроль. Докраска гематоксилином.