

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Получение и характеристика моноклональных антител к G-белку респираторно-синцитиального вируса

Демидова Н.А.¹, Климова Р.Р.¹, Куц А.А.^{1✉}, Леснова Е.И.¹, Масалова О.В.¹, Дорофеева А.Д.², Никонова А.А.², Федорова Н.Е.¹, Зверев В.В.^{2,3}¹ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 127994, Москва, Россия

Цель работы состояла в получении гибридом, продуцирующих моноклональные антитела (МКА) к G-белку респираторно-синцитиального вируса (РСВ), и в изучении их иммунологических характеристик и вируснейтрализующей активности.

Материал и методы. Мышиные МКА получали с помощью гибридомной технологии. Свойства МКА изучали методами иммуноферментного анализа (ИФА), иммунофлюоресцентного окрашивания (ИФл) зараженных клеток культуры, а также в реакции биологической нейтрализации *in vitro* (РБН). Взаимное расположение эпитопов, выявляемых МКА на G-белке, определяли с помощью теста аддитивности в ИФА.

Результаты. Гибридизация спленоцитов с клетками миеломы Sp2/0 и первичный скрининг показали, что 75 гибридом продуцируют МКА, взаимодействующие с очищенным вирусом, 17 из которых реагируют также и с рекомбинантным G-белком в ИФА. В РБН 4 гибридомы подавляли РСВ-инфекцию *in vitro* более чем на 50%. Клонирование этих гибридом позволило выявить 4 моноклона, продуцирующих наиболее активные МКА. МКА 1С11 принадлежали к IgG2a, 3 других (5D4, 5G11 и 6H4) — к IgM. 3 МКА IgM активно реагировали как с РСВ А2 и Long, так и с G-белком, МКА 1С11 были менее активны со всеми антигенами. Все МКА подавляли РСВ-инфекцию, причем МКА 5D4 — практически полностью (98%). ИФл-анализ показал, что все МКА выявляли G-белок РСВ в цитоплазме клеток культуры, наибольшее количество зараженных клеток детектировали с помощью МКА 5D4 (80%). Полученные МКА направлены к двум неперекрывающимся эпитопам на G-белке РСВ.

Заключение. Полученные МКА могут использоваться для обнаружения РСВ в клиническом материале методами ИФА и ИФл. Активность в РБН создает предпосылки для получения на основе МКА гуманизированных рекомбинантных антител и возможность их использования для терапии РСВ-инфекции.

Ключевые слова: респираторно-синцитиальный вирус; G-белок; моноклональные антитела; иммуноферментный анализ; иммунофлюоресцентное окрашивание зараженных клеток; неперекрывающиеся эпитопы.

Источник финансирования. Работа выполнена при поддержке гранта РНФ 17-15-01525.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Демидова Н.А., Климова Р.Р., Куц А.А., Леснова Е.И., Масалова О.В., Дорофеева А.Д., Никонова А.А., Федорова Н.Е., Зверев В.В. Получение и характеристика моноклональных антител к G-белку респираторно-синцитиального вируса. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2020; 97(1): 7–14.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-1-7-14>

Поступила 03.12.2019

Принята в печать 18.12.2019

Obtaining and Characterization of the Monoclonal Antibodies Against G-Protein of the Respiratory Syncytial Virus

Natalia A. Demidova¹, Regina R. Klimova¹, Alla A. Kushch^{1✉}, Ekaterina I. Lesnova¹, Olga V. Masalova¹, Anastasia D. Dorofeeva², Alexandra A. Nikonova², Natalia E. Fedorova¹, Vitaly V. Zverev^{2,3}¹National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after the honorary academician N.F. Gamaleya, Moscow 123098, Russia;²Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow 105064, Russia;³I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow 127994, Russia

The **aim** of this study was to obtain hybridomas producing monoclonal antibodies (Mabs) to the G-protein of the respiratory syncytial virus (RSV), and to evaluate their immunological characteristics and virus-neutralizing activity.

Material and methods. Mouse Mabs were obtained using hybridoma technology. The properties of Mabs were studied by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), immunofluorescence staining (IF) of infected cells, as well as by biological neutralization test *in vitro* (NT). To identify epitopes recognized by the Mabs on G protein ELISA additivity test was used.

Results. Hybridization of splenocytes with Sp2/0 myeloma cells and primary screening showed that 75 hybridomas produce antibodies interacting with purified virus, 17 of them also react with the recombinant G-protein in ELISA. In NT 4, hybridomas suppressed *in vitro* RSV infection by more than 50%. Cloning of these hybridomas revealed 4 monoclones producing the most active Mabs. Mab 1C11 was IgG2a, 3 others (5D4, 5G11 and 6H4) were IgM. Three IgM Mabs actively reacted with both RSV A2 and Long, and with G-protein; Mab 1C11 was less reactive with all antigens tested. All Mabs suppressed RSV infection, while Mab 5D4 suppressed it almost completely (98%). IF analysis showed that all Mabs detected RSV G-protein in the cell cytoplasm, the largest number of infected cells was detected using Mab 5D4 (80%). It was shown that the isolated Mabs were directed to two non-overlapping epitopes on the RSV G-protein.

Conclusion. The isolated Mabs can be used to detect RSV in clinical samples by ELISA and IF. The isolated Mabs can be used for humanized recombinant antibodies construction and for the treatment of RSV infection in future.

Keywords: respiratory syncytial virus; G-protein; monoclonal antibodies; ELISA; immunofluorescence staining of infected cells; non-overlapping epitopes.

Acknowledgments. This work was supported by a grant from the Russian Science Foundation 17-15-01525.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Demidova N.A., Klimova R.R., Kushch A.A., Lesnova E.I., Masalova O.V., Dorofeeva A.D., Nikonova A.A., Fedorova N.E., Zverev V.V. Obtaining and Characterization of the Monoclonal Antibodies Against G-Protein of the Respiratory Syncytial Virus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal.* 2020; 97(1): 7–14. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2020-97-1-7-14>

Received 3 December 2019

Accepted 18 December 2019

Введение

Острые респираторные инфекции занимают ведущее место в структуре общей заболеваемости населения России. Детская заболеваемость превышает заболеваемость взрослых в среднем в 3,5–4 раза, и за последнее время наблюдается повышение респираторной заболеваемости у детей. Так, с 2004 по 2016 г. заболеваемость острыми респираторными инфекциями увеличилась на 33,4% [1].

Среди возбудителей инфекций особое место занимает респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), который является главной причиной инфекций нижних отделов респираторного тракта у детей раннего возраста [2]. К группам риска тяжелого течения РСВ-инфекции относятся недоношенные дети с очень низкой и экстремально низкой массой тела при рождении, люди старшего возраста (старше 65 лет), а также лица с сердечно-сосудистыми заболеваниями и сниженным иммунитетом. Согласно данным Всемирной организации здравоохранения, РСВ ежегодно инфицируются 64 млн человек, из них 160 тыс. человек умирают [3].

Единственным разрешенным средством против РСВ-инфекции в настоящее время является препарат на основе гуманизированных моноклональных антител (МКА) к F-белку РСВ — паливизумаб. Применение паливизумаба оказывает профилактическое действие и позволяет снизить тяжесть течения заболевания. Эффективность паливизумаба у недоношенных детей с бронхолегочной дисплазией была подтверждена отечественными авторами в результате многоцентрового исследо-

вания: у детей, которые относились к группе высокого риска тяжелого течения РСВ-инфекции по причине недоношенности, зарегистрировано снижение частоты госпитализаций после 3 инъекций паливизумаба до 0,3% [4]. Однако применение препарата не предотвращает повторного заболевания, эффективность препарата значительно ниже при лечении доношенных новорожденных и более старших детей, а более аффинные антитела к F-белку (мотавизумаб) вызывали аллергические реакции [5]. Кроме того, высокая стоимость препарата препятствует его широкому использованию. Одним из недостатков препаратов на основе антител к F-белку является появление резистентных штаммов [6].

Для преодоления перечисленных недостатков проводятся исследования, направленные как на усовершенствование средств, специфичных к F-белку, так и на поиск новых подходов, основанных на использовании в качестве мишени других белков РСВ: нуклеопротеина (N), полимеразы (L), белка оболочки G РСВ [7]. В качестве наиболее перспективной мишени рассматривается G-белок — один из двух белков РСВ (наряду с F-белком), индуцирующих нейтрализующие антитела. Опыты на животных показали, что антитела к G-белку оказывают терапевтическое действие, причем в условиях, когда антитела к F-белку неэффективны [8].

Цель настоящей работы состояла в получении МКА, специфически взаимодействующих с G-белком РСВ, и в изучении их иммунологических свойств и вируснейтрализующей активности.

Материал и методы

Использовали РСВ двух эталонных штаммов (A2 и Long, подгруппа А) из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова. РСВ A2 размножали в перевиваемой клеточной культуре HEp-2 (человек, эпидермоидная карцинома гортани), в среде RPMI, содержащей 5% эмбриональной телячьей сыворотки, глутамин и гентамицин (ООО «ПанЭко», Россия), при 37°C в атмосфере 5% CO₂. РСВ Long культивировали с использованием перевиваемой культуры клеток MA-104 (макака резус, эмбриональная почка) в среде Игла MEM.

Вирус из культуральной жидкости (КЖ) от зараженных клеток концентрировали и очищали [9]. Для титрования вирусов использовали клетки MA-104, т.к. на них хорошо проявляется классическое цитопатогенное действие РСВ (образование синцитиев), которое можно учитывать при контроле моносоля с использованием микроскопа.

Титр вирусов рассчитывали по формуле Спирмена–Кербера. Титр РСВ A2 после концентрирования составил 9 lg тканевой 50% цитопатической дозы в 1 мл (ТЦД₅₀/мл), РСВ Long — 7 lg ТЦД₅₀/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.

Мышей линии BALB/c (самки массой 18–20 г), полученных из питомника «Пушино» (Московская обл.), иммунизировали внутрибрюшинно 3 раза с 2-недельным интервалом: 1-е введение — РСВ с полным адьювантом Фрейнда, следующие — с неполным адьювантом Фрейнда («Sigma», США). Доза РСВ A2 при каждой инъекции составляла 100 мкг/мышь. Исследования выполняли согласно Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных¹.

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% эмбриональной телячьей сыворотки («Gibco», «Invitrogen», США) и 0,2 ЕД/мл инсулина («Lilly», Франция). Культивирование проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Для слияния использовали клетки мышинной миеломы Sp2/0, не продуцирующие собственные иммуноглобулины.

Суспензию спленоцитов мыши смешивали с клетками Sp2/0 в соотношении 2:1 и добавляли раствор PEG/DMSO Solution («Hybri-Max™», «Sigma», США). После слияния клетки ресуспендировали в селективной среде гипоксантин-аминоптерин-тимидин («Hybri-Max™», «Sigma», США), вносили в 96-луночные панели и инкуби-

ровали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки культивировали в селективной среде гипоксантин-аминоптерин-тимидин в течение 14 дней после слияния. КЖ из лунок, содержащих гибридные клетки, тестировали на наличие антител к РСВ и G-белку в иммуноферментном анализе (ИФА).

ИФА антител к РСВ в сыворотках крови мышей, в КЖ от гибридных клеток, а также МКА проводили в непрямом варианте: вносили по 50 мкл РСВ в концентрации 10 мкг/мл в 0,1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7,2 в лунки 96-луночных планшетов MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE («Thermo Scientific», США) на 24 ч при 4°C. После отмывки фосфатно-солевым буфером с 0,1% раствором Твин-20 в лунки вносили сыворотки мышей в серийных разведениях или КЖ из лунок с гибридами и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После отмывки добавляли козы антитела к иммуноглобулинам мыши, меченные пероксидазой («Сорбент», Россия), в разведении 1:500. В качестве субстрата использовали тетраметилбензидина гидрохлорид («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-волна 620 нм. За титр антител принимали обратное разведение, ОП которого в 2 раза превосходила ОП отрицательных контролей — преиммунных мышинных сывороток или КЖ из лунок, не содержащих гибридные клетки.

Для анализа G-белка РСВ в лунки 96-луночных планшетов MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATE («Thermo Scientific», США) вносили рекомбинантный G-белок («Sino Biological», Республика Корея) РСВ A2 в концентрации 0,5 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере и инкубировали в течение 18 ч при 4°C. Затем вносили КЖ из лунок с гибридными клетками или МКА и выполняли ИФА.

Тест аддитивности МКА проводили согласно [10] и использовали для выяснения вопроса о том, распознают ли МКА различающиеся или близкие эпитопы. Панели сенсibilизировали препаратом концентрированного очищенного РСВ A2, как описано выше. Каждую пару МКА в насыщающих антиген концентрациях, подобранных в предварительных экспериментах, добавляли в отдельные лунки или одновременно в одну лунку панели. Затем определяли количество связанных с вирусом МКА в непрямом ИФА. Результаты выражали как индекс аддитивности (ИА), который сравнивает ОП, полученные в двух вариантах (для одного МКА и смеси) при стандартных условиях реакции. ИА вычисляли для каждой пары МКА по формуле:

$$\text{ИА} = \{ [2 \times A1 + 2 / (A1 + A2)] - 1 \} \times 100\%,$$

¹ Приказ Минздрава России от 19.06.2003 № 266.

где A1 и A2 — ОП МКА, нанесенных отдельно, A1+2 — ОП смеси МКА. ИА будет стремиться к нулю, если оба МКА распознают один и тот же эпитоп, и стремиться к 100%, если 2 эпитопа топографически не связаны.

Для проведения реакции биологической нейтрализации *in vitro* КЖ от моноклонов инкубировали с РСВ А2 (инфекционная множественность 10^4 ТЦД₅₀/мл) в течение 2 ч при 37°C в присутствии 5% СО₂ и затем вносили на монослой клеток МА-104. Через 1 ч обработанные клетки промывали средой без сыворотки и вносили среду поддержки с 2% эмбриональной телячьей сывороткой, содержащую двойную концентрацию глутамин. Цитопатогенное действие вируса на клетки оценивали через 72–96 ч, когда оно развивалось в инфицированной, но не обработанной культуре.

В зараженных клетках проводили непрямой иммунофлуоресцентный анализ (ИФл-анализ). Клетки МА-104 в концентрации 4×10^4 клеток/мл вносили в лунки 24-луночных панелей с покровными стеклами, на следующий день заражали РСВ с инфекционной множественностью 10^4 ТЦД₅₀/мл.

Через 4 сут после заражения клетки фиксировали метанолом 20 мин при –20°C. На фиксированные препараты наносили МКА и инкубировали 1 ч при 37°C. Затем промывали фосфатно-солевым буфером и наслаивали антимышиную сыворотку, меченую ФИТЦ («Dako», Дания). Клетки докрашивали Evans blue («Biochem», Франция). Окрашивание наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа «AxioScore A1» («Carl Zeiss», Германия) при длине волны 520–560 нм. Результаты оценивали по количеству окрашенных клеток и выражали в условных обозначениях: +++ соответствовали количеству окрашенных клеток >50%; ++ — 10–50%; + — единичные окрашенные клетки.

Субтипы МКА и типы легких цепей определяли методом ИФА с помощью набора «Pierce Rapid ELISA Mouse mAb Isotyping Kit» («Thermo Scientific», США) в соответствии с инструкцией: КЖ от МКА вносили в лунки планшета, предварительно сорбированного антителами к иммуноглобулинам мыши классов G (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), IgA и IgM, а также к субтипам легкой цепи каппа и лямбда. После инкубации добавляли по-

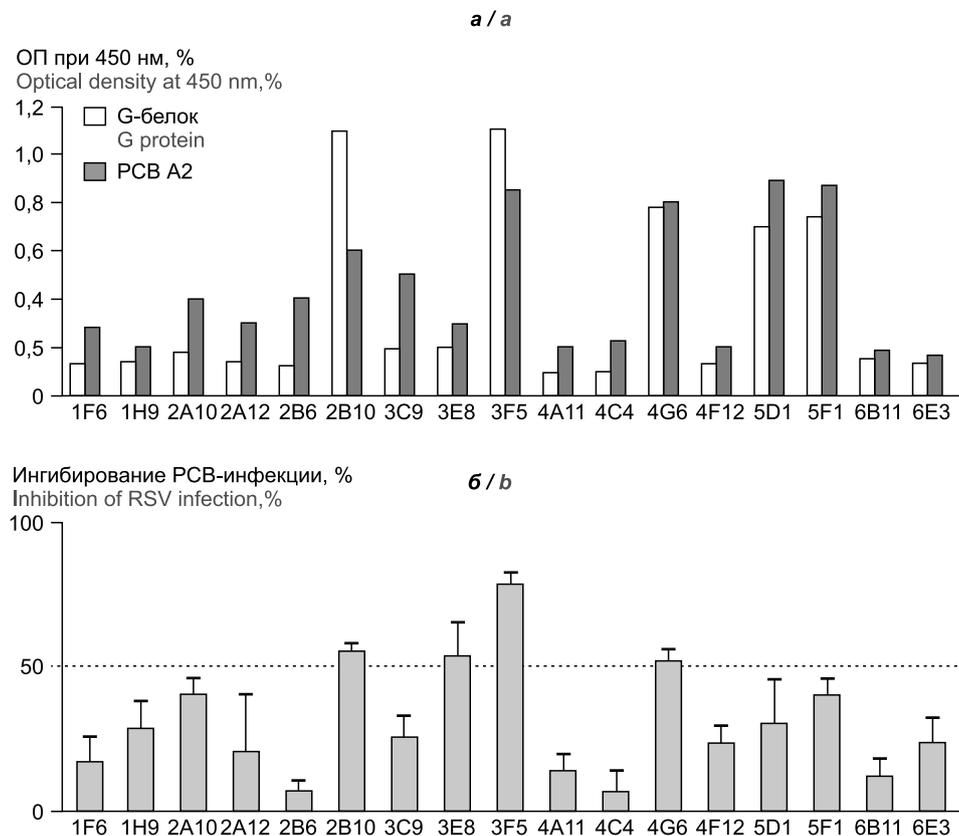


Рис. 1. Активность взаимодействия антител, продуцируемых гибридными культурами, с цельным РСВ и G-белком РСВ.

a — взаимодействие антител в КЖ с цельным вирусом РСВ А2 и G-белком в ИФА;
b — вируснейтрализующая активность КЖ от гибридом, продуцирующих антитела к G-белку РСВ.

Fig. 1. The activity of the interaction of antibodies produced by hybrid cultures, with whole RSV and with RSV G protein.

a — interaction of antibodies in supernatants with whole RSV A2 virus and G protein in ELISA;
b — virus-neutralizing activity of supernatants from hybridomas producing antibodies to the G protein of RSV.

Таблица 1. Свойства МКА к G-белку РСВ
Table 1. The properties of the Mabs to the RSV G protein

МКА Mabs	Изотип Ig, тип легкой цепи Ig isotype, light chain type	ИФА: ОП ₄₅₀ с КЖ* ELISA: optical density with supernatants			Реакция биологической нейтрализации <i>in vitro</i> , % ингибирования Reaction of neutralization <i>in vitro</i> , % inhibition	ИФл- анализ** Immunofluorescence assay**
		PCB A2	PCB Long	G-белок G protein		
1C11	Ig2a, κ	1,48	0,34	0,31	60	+
5D4	IgM, κ	2,50	2,39	2,02	98	+++
5G11	IgM, κ	2,30	2,58	2,36	60	++
6H4	IgM, κ	2,38	2,46	2,31	50	+

Примечание. *Показатели ОП при анализе МКА в КЖ от гибридом; ОП отрицательных контролей = 0,03; **ИФл — сравнительная оценка эффективности обнаружения инфицированных клеток, зараженных РСВ А2 в реакции иммунофлюоресценции.
 Note. *Optical density indicators in the analysis of Mabs in supernatants from hybridomas; Optical density of negative controls = 0.03; **Immunofluorescence assay — a comparative evaluation of the detection efficiency of infected cells infected with RSV A2 in the immunofluorescence reaction.

ливалентный конъюгат к IgG+IgA+IgM, меченный пероксидазой, затем субстрат тетраметилбензидин гидрохлорид. Принадлежность МКА определяли по максимальному сигналу с определенным субтипом иммуноглобулина и типом легкой цепи.

Результаты

Анализ иммунного ответа 5 мышей на введение очищенного РСВ А2 показал, что минимальная активность антител к РСВ в ИФА соответствовала титру 4×10^{-5} , максимальная — $7,8 \times 10^{-5}$. МКА в сыворотках крови всех мышей нейтрализовали инфекционную активность РСВ в титрах от 1:40 до 1:160. Для опытов по гибридизации клеток были выбраны 2 мыши с максимальной активностью в обеих реакциях. В результате экспериментов по слиянию спленоцитов отобранных мышей с клетками миеломы было получено 236 гибридных культур, устойчивых к селективной среде гипоксантин-аминоптерин-тимидин. Через 7–14 дней был проведен анализ МКА в КЖ в ИФА, который показал присутствие МКА, взаимодействующих с РСВ А2 в 75 КЖ (32%) от

гибридных клеток. Анализ КЖ от гибридных культур в ИФА с G-белком показал, что 17 (23%) из 75 клонов реагировали с G-белком (рис. 1, а). КЖ от данных гибридом были изучены в реакции биологической нейтрализации *in vitro* (рис. 1, б).

Для последующего клонирования были отобраны 4 гибридные культуры (2B10, 3E8, 3F5 и 4G6), взаимодействующие с G-белком и нейтрализующие РСВ-инфекцию более чем на 50%. В результате опытов по клонированию были отобраны по одному моноклону от каждой культуры — 4 гибридомы, продуцирующие МКА к G-белку. Иммунологические, иммуноцитохимические и биологические свойства МКА представлены в табл. 1 и на рис. 2.

Определены субтипы моноклональных иммуноглобулинов. Результаты изотипирования МКА показали, что МКА 1C11 принадлежали к изотипу IgG2a, 3 других — к классу IgM. Во всех моноклональных Ig был каппа-тип легкой цепи.

Результаты ИФА показали, что МКА 5D4, 5G11 и 6H4 одинаково интенсивно с ОП $\geq 2,0$ реагировали как со штаммом РСВ А2, к которому были получе-

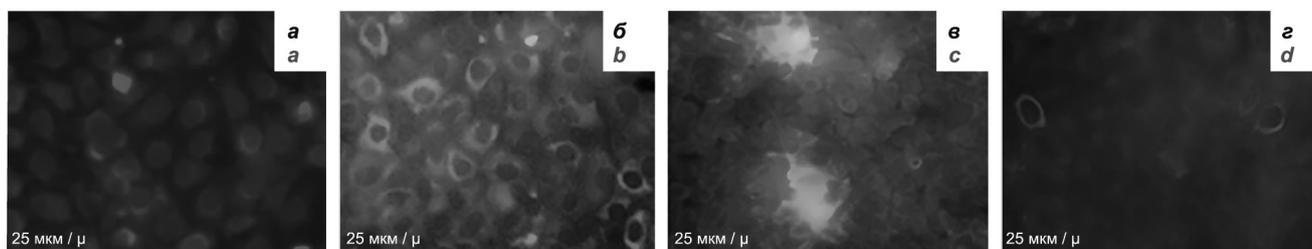


Рис. 2. ИФл-анализ взаимодействия МКА с клетками MA-104, инфицированными РСВ А2.

а — МКА к вирусу гепатита, отрицательный контроль; б — МКА 5D4, количество окрашенных клеток 80% (+++); в — МКА 5G11, количество окрашенных клеток 20% (++); г — МКА 6H4, единичные окрашенные клетки (+); зеленая окраска — ФИТЦ, красная — докраска Evans blue. Рисунок продублирован на обложке журнала.

Fig. 2. IF analysis of the interaction of Mabs with MA-104 cells infected with RSV A2.

a — Mabs for hepatitis virus, negative control; b — Mabs 5D4, the number of stained cells 80% (+++); c — Mabs 5G11, the number of stained cells 20% (++); d — Mabs 6H4, single stained cells (+); green color — FITC, red — Evans blue. The picture is duplicated on the cover of the magazine.

Таблица 2. Индексы аддитивности для МКА к G-белку РСВ ($M \pm m$, %)**Table 2. Additivity index for Mabs to G-protein of RSV ($M \pm m$, %)**

МКА	5D4	6H4	5G11	1C11
5D4	1,6 ± 0,3	8,3 ± 2,8	11,3 ± 0,5	41,6 ± 3,1
6H4	–	2,1 ± 0,6	12,1 ± 0,8	40,7 ± 4,2
5G11	–	–	3,5 ± 0,7	42,4 ± 2,6
1C11	–	–	–	4,2 ± 3,1

ны, так и со штаммом РСВ Long и с G-белком РСВ. МКА 1C11 достаточно активно взаимодействовали с РСВ A2, но слабее — с РСВ Long и с G-белком. Важно отметить, что 3 из 4 МКА проявили значительную вируснейтрализующую активность, подавляя развитие РСВ-инфекции на 60–98%.

Все полученные клоны выявляли РСВ в зараженных клетках, но с разной активностью (табл. 1, рис. 2). ИФл-анализ показал, что МКА выявляли G-белок РСВ в цитоплазме клеток, наибольшее количество зараженных клеток детектировали с помощью МКА 5D4 и 5G11.

Топографические связи между эпитопами определяли в тесте аддитивности (табл. 2). Метод требует использования антител в специально подобранных концентрациях, полностью насыщающих антиген. Низкие ИА получены для всех МКА при сочетании «самих с собой» (от 1,6 до 4,2%), что свидетельствует об адекватных условиях проведения реакции. Для пар МКА 5D4-6H4, 5D4-5G11 и 6H4-5G11 ИА составил 8,3–12,1%, что говорит о перекрывающихся или близко расположенных на G-белке эпитопах, распознаваемых данными МКА. ИА для пар МКА 1C11 с остальными МКА были >40%, следовательно, эпитоп, связывающийся с МКА 1C11, расположен в отдалении от эпитопов для МКА 5D4, 6H4 и 5G11.

Обсуждение

В настоящей работе получены 4 гибридомы, продуцирующие МКА к G-белку РСВ. G-белок более изменчив по сравнению с F-белком, который зачастую используется для получения препаратов для профилактики РСВ-инфекции, в то же время его введение оказывает протективное действие. В последнее время G-белок привлекает внимание исследователей благодаря ряду свойств, которые открывают перспективу использования его для разработки терапевтических препаратов и вакцин. Белок содержит небольшой, но высококонсервативный центральный домен (CCD) [7] и проявляет иммуногенность при введении здоровым людям [11]. В CCD G-белка обнаружен хемокиновый мотив CX3C, который взаимодействует с хемокиновым рецептором CX3CR1 на клетках хозяина, что приводит к нарушениям противовирусного ответа [12]. Установлено, что МКА, направленные на CCD,

оказывают противовирусное действие при РСВ-инфекции на модели зараженных мышей, блокируя развитие заболевания и улучшая иммунный ответ [13]. G-белок взаимодействует с эпителиальными клетками респираторного тракта пациентов, индуцируя инфекционный процесс. Показано, что антитела к G-белку эффективно подавляют воспаление [14]. Дальнейшее изучение антигенной структуры и функций G-белка необходимо для определения новой стратегии борьбы с РСВ-инфекцией [15].

МКА, полученные в настоящей работе, связываются с двумя эпитопами G-белка, при взаимодействии проявляют аддитивный эффект, выявляют вирусный антиген в зараженных клетках культуры и могут использоваться для обнаружения РСВ в клиническом материале методами иммунофлюоресценции, иммунопероксидазного окрашивания и ИФА. Вируснейтрализующая активность МКА создает предпосылки для получения на их основе гуманизированных рекомбинантных антител. Дальнейшие исследования покажут возможность и эффективность применения полученных МКА к G-белку в сочетании с МКА к F-белку РСВ для профилактики и терапии РСВ-инфекции.

ЛИТЕРАТУРА

1. Заплатников А.Л., Гирина А.А., Бурцева Е.И., Свиницкая В.И., Казакова С.А., Леписева И.В. и др. Современные возможности иммунопрофилактики вирусных и бактериальных респираторных инфекций у детей. *Русский медицинский журнал. Медицинское обозрение*. 2018; 2(1-2): 93-8.
2. Tripp R.A., Power U.F., Openshaw P.J.M., Kauvar L.M. Respiratory syncytial virus: targeting the G protein provides a new approach for an old problem. *J. Virol.* 2018; 92(3): e01302-17. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01302-17>
3. Pebody R., Moyes J., Hirve S., Campbell H., Jackson S., Moen A., et al. Approaches to use the WHO respiratory syncytial virus surveillance platform to estimate disease burden. *Influenza Other Respir. Viruses*. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/irv.12667>
4. Чубарова А.И., Давыдова И.В., Виноградова И.В., Дегтярева Е.А., Кешишян Е.С., Сафина А.И. и др. Эффективность паливизумаба в снижении частоты госпитализации детей с РСВ инфекцией в группах высокого риска: проспективное наблюдательное многоцентровое исследование. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2017; 72(4): 282-9. DOI: <http://doi.org/10.15690/vramn855>
5. O'Brien K.L., Chandran A., Weatherholtz R., Jafri H.S., Griffin M.P., Bellamy T., et al. Efficacy of motavizumab for the

- prevention of respiratory syncytial virus disease in healthy Native American infants: a phase 3 randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2015; 15(2): 1398-408. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00247-9](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00247-9)
6. Bates J.T., Keefer C.J., Slaughter J.C., Kulp D.W., Schief W.R., Crowe J.E. Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein. *Virology.* 2014; 454-455: 139-44. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.010>
 7. Jorquera P.A., Tripp R.A. Respiratory syncytial virus: prospects for new and emerging therapeutics. *Expert. Rev. Respir. Med.* 2017; 11(8): 609-15. DOI: <http://doi.org/10.1080/17476348.2017.1338567>
 8. Boyoglu-Barnum S., Todd S.O., Chirkova T., Barnum T.R., Gaston K.A., Haynes L.M., et al. An anti-G protein monoclonal antibody treats RSV disease more effectively than an anti-F monoclonal antibody in BALB/c mice. *Virology.* 2015; 483: 117-25. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.035>
 9. Ueba O. Respiratory syncytial virus. I. Concentration and purification of the infectious virus. *Acta. Med. Okayama.* 1978; 32(4): 265-72.
 10. Xiang K., Cheng Y., Zhou M., Sun L., Ji Y., Wang Y., et al. Production of monoclonal antibody against EP0 protein of pseudorabies virus and determination of its recognized epitope. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 2014; 33(6): 409-13. DOI: <http://doi.org/10.1089/mab.2014.0046>
 11. Power U.F., Nguyen T.N., Rietveld E., de Swart R.L., Groen J., Osterhaus A.D., et al. Safety and immunogenicity of a novel recombinant subunit respiratory syncytial virus vaccine (BBG2Na) in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* 2001; 184(11): 1456-60. DOI: <http://doi.org/10.1086/324426>
 12. Haynes L.M., Jones L.P., Barskey A., Anderson L.J., Tripp R.A. Enhanced disease and pulmonary eosinophilia associated with formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccination are linked to G glycoprotein CX3C-CX3CR1 interaction and expression of substance P. *J. Virol.* 2003; 77(18): 9831-44. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.77.18.9831-9844.2003>
 13. Boyoglu-Barnum S., Todd S.O., Meng J., Barnum T.R., Chirkova T., Haynes L.M., et al. Mutating the CX3C motif in the G protein should make a live respiratory syncytial virus vaccine safer and more effective. *J. Virol.* 2017; 91(10): e02059-16. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.02059-16>
 14. Cortjens B., Yasuda E., Yu X., Wagner K., Claassen Y.B., Bakker A.Q., et al. Broadly reactive anti-respiratory syncytial virus G antibodies from exposed individuals effectively inhibit infection of primary airway epithelial cells. *J. Virol.* 2017; 91(10): e02357-16. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.02357-16>
 15. Boyoglu-Barnum S., Chirkova T., Anderson L.J. Biology of infection and disease pathogenesis to guide RSV vaccine development. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1675. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01675>
- REFERENCES
1. Zaplatnikov A.L., Girina A.A., Burtseva E.I., Svintsitskaya V.I., Kazakova S.A., Lepiseva I.V., et al. Modern possibilities of immunoprophylaxis of viral and bacterial respiratory infections in children. *Russkiy meditsinskiy zhurnal. Meditsinskoe obozrenie.* 2018; 2(1-2): 93-8. (in Russian)
 2. Tripp R.A., Power U.F., Openshaw P.J.M., Kauvar L.M. Respiratory syncytial virus: targeting the G protein provides a new approach for an old problem. *J. Virol.* 2018; 92(3): e01302-17. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.01302-17>
 3. Pebody R., Moyes J., Hirve S., Campbell H., Jackson S., Moen A., et al. Approaches to use the WHO respiratory syncytial virus surveillance platform to estimate disease burden. *Influenza Other Respir. Viruses.* Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/irv.12667>
 4. Chubarova A.I., Davydova I.V., Vinogradova I.V., Degtyareva E.A., Keshishyan E.S., Safina A.I., et al. The effectiveness of palivizumab in reducing the hospitalization rate of children with RSV infection in high-risk groups: a prospective observational multicenter study. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk.* 2017; 72(4): 282-9. DOI: <http://doi.org/10.15690/vramn855> (in Russian)
 5. O'Brien K.L., Chandran A., Weatherholtz R., Jafri H.S., Griffin M.P., Bellamy T., et al. Efficacy of motavizumab for the prevention of respiratory syncytial virus disease in healthy Native American infants: a phase 3 randomised double-blind placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 2015; 15(2): 1398-408. DOI: [http://doi.org/10.1016/S1473-3099\(15\)00247-9](http://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00247-9)
 6. Bates J.T., Keefer C.J., Slaughter J.C., Kulp D.W., Schief W.R., Crowe J.E. Escape from neutralization by the respiratory syncytial virus-specific neutralizing monoclonal antibody palivizumab is driven by changes in on-rate of binding to the fusion protein. *Virology.* 2014; 454-455: 139-44. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2014.02.010>
 7. Jorquera P.A., Tripp R.A. Respiratory syncytial virus: prospects for new and emerging therapeutics. *Expert. Rev. Respir. Med.* 2017; 11(8): 609-15. DOI: <http://doi.org/10.1080/17476348.2017.1338567>
 8. Boyoglu-Barnum S., Todd S.O., Chirkova T., Barnum T.R., Gaston K.A., Haynes L.M., et al. An anti-G protein monoclonal antibody treats RSV disease more effectively than an anti-F monoclonal antibody in BALB/c mice. *Virology.* 2015; 483: 117-25. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.035>
 9. Ueba O. Respiratory syncytial virus. I. Concentration and purification of the infectious virus. *Acta. Med. Okayama.* 1978; 32(4): 265-72.
 10. Xiang K., Cheng Y., Zhou M., Sun L., Ji Y., Wang Y., et al. Production of monoclonal antibody against EP0 protein of pseudorabies virus and determination of its recognized epitope. *Monoclon. Antib. Immunodiagn. Immunother.* 2014; 33(6): 409-13. DOI: <http://doi.org/10.1089/mab.2014.0046>
 11. Power U.F., Nguyen T.N., Rietveld E., de Swart R.L., Groen J., Osterhaus A.D., et al. Safety and immunogenicity of a novel recombinant subunit respiratory syncytial virus vaccine (BBG2Na) in healthy young adults. *J. Infect. Dis.* 2001; 184(11): 1456-60. DOI: <http://doi.org/10.1086/324426>
 12. Haynes L.M., Jones L.P., Barskey A., Anderson L.J., Tripp R.A. Enhanced disease and pulmonary eosinophilia associated with formalin-inactivated respiratory syncytial virus vaccination are linked to G glycoprotein CX3C-CX3CR1 interaction and expression of substance P. *J. Virol.* 2003; 77(18): 9831-44. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.77.18.9831-9844.2003>
 13. Boyoglu-Barnum S., Todd S.O., Meng J., Barnum T.R., Chirkova T., Haynes L.M., et al. Mutating the CX3C motif in the G protein should make a live respiratory syncytial virus vaccine safer and more effective. *J. Virol.* 2017; 91(10): e02059-16. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.02059-16>
 14. Cortjens B., Yasuda E., Yu X., Wagner K., Claassen Y.B., Bakker A.Q., et al. Broadly reactive anti-respiratory syncytial virus G antibodies from exposed individuals effectively inhibit infection of primary airway epithelial cells. *J. Virol.* 2017; 91(10): e02357-16. DOI: <http://doi.org/10.1128/JVI.02357-16>
 15. Boyoglu-Barnum S., Chirkova T., Anderson L.J. Biology of infection and disease pathogenesis to guide RSV vaccine development. *Front. Immunol.* 2019; 10: 1675. DOI: <http://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01675>

Информация об авторах:

Демидова Наталья Андреевна — м.н.с. ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1961-9789>. E-mail: ailande@yandex.ru

Климова Регина Рафаиловна — к.б.н., с.н.с. лаборатории клеточной инженерии Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4147-8444>. E-mail: regi.k@mail.ru

Куц Алла Александровна — д.б.н., проф., рук. отдела молекулярной вирусологии, зав. лабораторией клеточной инженерии Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>. E-mail: vitaliku@mail.ru

Леснова Екатерина Ивановна — н.с. лаборатории клеточной инженерии Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>. E-mail: wolf252006@yandex.ru

Масалова Ольга Владимировна — д.б.н., в.н.с. лаборатории клеточной инженерии Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>. E-mail: ol.mas@mail.ru

Дорофеева Анастасия Дмитриевна — м.н.с. ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2501-2847>. E-mail: d0r0feeva@yandex.ru

Никонова Александра Александровна — к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биотехнологии отдела вирусологии ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9610-0935>. E-mail: sana80@list.ru

Федорова Наталья Евгеньевна — к.б.н., в.н.с. лаборатории клеточной инженерии Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи», 123098, Москва, Россия.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8466-7993>. E-mail: ninani@mail.ru

Зверев Виталий Васильевич — д.б.н., проф., акад. РАН, науч. рук. ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия; зав. кафедрой микробиологии, вирусологии, иммунологии, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России (Сеченовский Университет), 127994, Москва, Россия
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-0017-1892>. E-mail: vitalyzverev@outlook.com

Участие авторов: все авторы сделали эквивалентный вклад в подготовку публикации.

Information about the authors:

Natalia A. Demidova — junior researcher, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0003-1961-9789>. E-mail: ailande@yandex.ru

Regina R. Klimova — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of cell engineering, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-4147-8444>. E-mail: regi.k@mail.ru

Alla A. Kushch — Doct. Sci. (Biol.), Prof., Head, Laboratory of cell engineering, Department of molecular virology, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-3396-5533>. E-mail: vitaliku@mail.ru

Ekaterina I. Lesnova — researcher, Laboratory of cell engineering, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2801-6843>. E-mail: wolf252006@yandex.ru

Olga V. Masalova — Doct. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of cell engineering, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-5571-5669>. E-mail: ol.mas@mail.ru

Anastasia D. Dorofeeva — junior researcher, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-2501-2847>. E-mail: d0r0feeva@yandex.ru

Alexandra A. Nikonova — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of molecular biotechnology, Department of virology, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia.
ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0001-9610-0935>. E-mail: sana80@list.ru

Natalia E. Fedorova — Cand. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of cell engineering, D.I. Ivanovsky Institute of Virology, N.F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, 123098, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0001-8466-7993>. E-mail: ninani@mail.ru

Vitaly V. Zverev — Doct. Sci. (Biol.), prof., Academician of RAS, Scientific Director, Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, 105064, Moscow, Russia; Head, Microbiology, virology, immunology department, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University of Ministry of Health of Russian Federation (Sechenov University), 127994, Moscow, Russia.
ORCID ID: <http://orcid.org/0000-0002-0017-1892>. E-mail: vitalyzverev@outlook.com

Contribution: the authors contributed equally to this article.