JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2024; 101(3)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-486
REVIEWS

Научный обзор
https://doi.org/10.36233/0372-9311-486

Check for updates

Технология получения моноклональных антител. 50 лет развития

Массино Ю.С., Тараканова Ю.Н.✉, Сегал О.Л., Печелюлько А.А., Яковлева Д.А., Личутина М.В., Дмитриев Д.А., Дмитриев А.Д.

Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова, Москва, Россия

Аннотация

Моноклональные антитела широко используются во всех областях биологии и медицины. Появление и развитие технологии их получения произвело революцию в иммунологии и позволило создать не только новые методы диагностики, но и множество эффективных лекарственных препаратов. **Целью** нашего обзора стали анализ и обобщение актуальных данных, затрагивающих технологию получения моноклональных антител. Нами проведён анализ информации из 70 современных источников литературы, посвящённых различным методам их получения, в том числе классической гибридомной технологии. В настоящей работе мы попытались охватить весь спектр методов, используемых для получения моноклональных антител.

Ключевые слова: *моноклональные антитела, гибридомная технология, рекомбинантная ДНК, рекомбинантные антитела, фаговый дисплей, вирус Эпштейна–Барр, NGS, CRISPR/Cas9, вирус гепатита С*

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

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

Для цитирования: Массино Ю.С., Тараканова Ю.Н., Сегал О.Л., Печелюлько А.А., Яковлева Д.А., Личутина М.В., Дмитриев Д.А., Дмитриев А.Д. Технология получения моноклональных антител. 50 лет развития. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2024;101(3):412–427.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-486
EDN: https://www.elibrary.ru/iwenhg

Review
https://doi.org/10.36233/0372-9311-486

Monoclonal antibody techniques. 50 years of development

Yulia S. Massino, Yulia N. Tarakanova✉, Olga L. Segal, Anastasia A. Pechelyulko, Dinora A. Yakovleva, Maria V. Lichutina, Dmitriy A. Dmitriev, Alexander D. Dmitriev

I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia

Abstract

Monoclonal antibodies are widely used in all fields of biology and medicine. The emergence and development of the technology for their production revolutionized immunology and allowed the creation of not only new diagnostic methods, but also many effective drugs. The **purpose** of our review is to analyze and summarize relevant data concerning the technology of obtaining monoclonal antibodies. We have analyzed information from 70 modern literary sources devoted to various methods of obtaining them. In this review, we tried to cover the entire range of methods used to obtain monoclonal antibodies today.

Keywords: *monoclonal antibodies, hybridoma technology, recombinant DNA, recombinant antibodies, phage display, Epstein–Barr virus, NGS, CRISPR/Cas9, hepatitis C virus*

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

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

For citation: Massino Yu.S., Tarakanova Yu.N., Segal O.L., Pechelyulko A.A., Yakovleva D.A., Lichutina M.V., Dmitriev D.A., Dmitriev A.D. Monoclonal antibody techniques. 50 years of development. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2024;101(3):412–427.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-486
EDN: https://www.elibrary.ru/iwenhg

© Массино Ю.С., Тараканова Ю.Н., Сегал О.Л., Печелюлько А.А., Яковлева Д.А., Личутина М.В., Дмитриев Д.А., Дмитриев А.Д., 2024
© Massino Yu.S., Tarakanova Yu.N., Segal O.L., Pechelyulko A.A., Yakovleva D.A., Lichutina M.V., Dmitriev D.A., Dmitriev A.D., 2024

Введение

Одним из самых выдающихся изобретений XX в. в области биологических наук и биотехнологий по праву считается метод получения моноклональных антител (МКА) с помощью гибридизации соматических клеток, за который его авторам — C. Milstein и G. Köhler — в 1984 г. была вручена Нобелевская премия. До изобретения в конце 1970-х гг. гибридомной технологии (ГТ) исследователям в основном были доступны поликлональные антитела (ПКА), выделяемые из сыворотки крови человека или животных[1]. Такие ПКА, даже после их аффинной очистки, являются смесями молекул иммуноглобулинов, образованных разными В-лимфоцитами. Они отличаются и по структуре своих вариабельных участков, ответственных за связывание с антигеном, и по специфичности к различным эпитопам антигена. Причём партии ПКА, полученные от разных доноров, имеют различный состав и иммунохимические характеристики (в отношении специфичности и аффинности). ГТ, являющаяся блестящим практическим подтверждением клонально-селекционной теории гуморального иммунитета, позволяет в неограниченном количестве получать потомство индивидуальных В-лимфоцитов, секретирующих антитела, направленные к индивидуальному эпитопу на молекуле антигена, — МКА [1].

Появление гибридомной технологии

Процесс получения МКА по ГТ, как он был описан G. Köhler и C. Milstein, в общих чертах сводится к следующим основным этапам:

1. Иммунизация животного (лабораторной мыши) антигеном.

2. Гибридизация (после получения иммунного ответа) лимфоцитов селезёнки мыши с помощью специального сливающего агента, например, вируса Сендай или полиэтиленгликоля (ПЭГ), с клетками миеломы мыши, несущей генетический дефект — мутацию гена, кодирующего фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазу, что приводит к утрате так называемого «запасного» пути синтеза нуклеотидов.

3. Селекция полученной после слияния смеси клеток на культуральных планшетах с ростовой средой, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимидин (так называемая среда ГАТ) для отбора гибридных клеток. Среда ГАТ содержит аминоптерин, блокирующий основной путь синтеза нуклеотидов, на ней могут выживать только клетки, способные использовать «запасной» путь. Поэтому родительские клетки миеломы на этой среде гибнут. В-лимфоциты и другие клетки селезёнки мыши являются короткоживущими (в отличие от миеломных клеток) и также быстро гибнут при культивировании *in vitro*. В результате вырастают только колонии гибридных клеток, среди которых есть потомки гибридов от слияния В-лимфоцитов (продуцирующих МКА к антигену) и клеток миеломы. Таким образом, эти В-лимфоциты получают «бессмертие» от злокачественных клеток миеломы.

4. Тестирование выросших колоний гибридных клеток на способность секретировать в культуральную среду МКА к антигену.

5. Неоднократный процесс клонирования отобранных гибридом — продуцентов МКА с целью получить чистую клеточную линию, состоящую из клеток — потомков одного-единственного В-лимфоцита, обретшего «бессмертие» за счёт слияния с клеткой миеломы.

6. В результате примерно через 5–6 мес после слияния получают клонированные гибридомные клеточные линии, которые могут размножаться в больших количествах (при сохранении части клеток в жидком азоте) и служить нескончаемым источником однородных МКА.

Изобретению описанной технологии предшествовал ряд достижений в области клеточной биологии. В частности, 1960–1970-е гг. — это время развития генетики соматических клеток, в которое адаптировали методы, ранее разработанные в области генетики бактерий и вирусов, для использования с культивируемыми клетками млекопитающих — как нормальными клетками первичных культур, так и злокачественными (трансформированными) клеточными линиями. Были разработаны методы гибридизации соматических клеток и получен ряд генетически маркированных клеточных линий, использование которых в гибридизации позволило проводить отбор гибридов с помощью специальных селективных сред. Самой первой селективной системой (в дальнейшем оказавшейся и наиболее применяемой) была среда ГАТ, изобретенная в 1962 г. Вацлавом и Элизабет Шибальскими[2]. Дж. Литтлфилд в 1964 г. описал успешное использование среды ГАТ для отбора гибридов соматических клеток[3]. Впервые для отбора гибридов после соматической гибридизации среду ГАТ применил Дж. Литтфилд в 1964 г. [2]. В тот же период происходит широкое внедрение методов дифференциальной окраски хромосом, позволяющей детально изучать закономерности изменения хромосомного состава соматических гибрид-

[1] Глуханюк Е., Горяйнова О. Краткая история открытия и применения антител. Биомолекула. 2018. URL: https://biomolecula.ru/articles/kratkaia-istoriia-otkrytiia-i-primeneniia-antitel (дата обращения: 11.06.2024).

[2] Szybalska E.H., Szybalski W. Genetics of human cell line. IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1962;48(12):2026–2034.

[3] Littlefield J.W. Selection of hybrids from matings of fibroblasts in vitro and their presumed recombinants. *Science*. 1964;145:709–710.

ных клеток, часто отличающихся нестабильностью кариотипа (особенно при слиянии соматических клеток разных видов животных или животных и человека) [2]. C. Milstein, которого называют «отцом гибридомной технологии» [3], в течение ряда лет изучал экспрессию иммуноглобулинов в культурах клеток, в том числе используя методы соматической гибридизации [2]. И эти исследования, конечно, послужили важным подготовительным этапом к выдающемуся изобретению по получению секретирующих МКА клеточных линий (названных «гибридомом»), сделанному C. Milstein вместе с работавшим в его лаборатории немецким иммунологом G. Köhler.

Большой заслугой C. Milstein перед международным научным сообществом оказалось и то, что это изобретение не было им запатентовано. Метод был описан в открытой научной публикации (к разочарованию Маргарет Тэтчер, тогдашнего премьера Британии, озабоченной финансовыми интересами британской биотехнологии), и, более того, Мильштейн позволил использовать полученную им линию клеток миеломы мыши X-63 и в других лабораториях для внедрения гибридомной технологии [1]. Атмосфера тех лет в биологической науке на Западе была более свободна от давления интересов коммерции, и считалось важным в интересах развития науки оставлять научные достижения в свободном доступе для широких кругов учёных.

В результате ГТ стала быстро распространяться в разных странах. В частности, в 1970–1980-е гг. в ряде научных центров СССР (например, в лаборатории иммунохимии Всесоюзного онкологического научного центра, возглавляемой известным иммунохимиком Г.И. Абелевым, и др.) также начинает активно развиваться ГТ с использованием линии миеломы мыши X-63, щедро предоставленной C. Milstein. Некоторые из авторов этого обзора также получили в этот период свои первые гибридомы, работая на базе Всесоюзного научного центра психического здоровья [4].

Разработка гибридомного метода примерно совпала по времени с таким важным достижением в области иммунохимии, как изобретение метода иммуноферментного анализа [5]. Все эти направления быстро соединились, дав мощный импульс развитию биотехнологической индустрии по производству разнообразных МКА и основанных на них тест-систем (с различным дизайном) для исследовательских и диагностических целей (в том числе для диагностики инфекций, опухолевых маркеров и др.) [5].

Вместе с тем с самого начала изобретения ГТ у исследователей было стремление применить её для получения терапевтических МКА, которые можно было бы использовать при лечении рака и других опасных заболеваний. С МКА связывались большие надежды, как с некими «волшебными пулями». В 1986 г. Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) одобрило первое терапевтическое МКА (Muromonab-CD3). Это мышиное МКА предназначено для снижения реакции отторжения при трансплантации почек [6].

К сожалению, за первым энтузиазмом вскоре последовало разочарование. Мышиные МКА, полученные с помощью ГТ, давали сильную иммунную реакцию при введении в организм человека, и их эффективность быстро подавлялась. У них также был относительно короткий период полувыведения по сравнению с человеческим IgG (вследствие слабого связывания с человеческим FcRn-рецептором). Наконец, мышиные МКА проявляют слабую способность вызывать антителозависимую клеточную цитотоксичность и комплементзависимую цитотоксичность при введении в организм человека, что снижает эффективность мышиных МКА, особенно при онкологических показаниях к их применению [7]. Даже стали раздаваться голоса скептиков, сомневающихся, что МКА окажутся полезными для широкого применения в медицине в качестве лекарственных препаратов [6].

Рекомбинантные антитела и методы их получения

Однако в результате эти первые неудачи только послужили стимулом к важным усовершенствованиям в области ГТ. В частности, для преодоления проблем, связанных с иммуногенностью мышиных МКА, привлекли технологии рекомбинантных ДНК [8–10]. Оказалось, что если с помощью методов генной инженерии у мышиных МКА заменить константные участки лёгких и тяжёлых цепей на таковые IgG человека, то проблема с иммуногенностью во многом преодолевается. Такие МКА получили название «химерных». Ещё менее иммуногенными могут быть так называемые «гуманизированные МКА», у которых от исходных мышиных МКА остаются только гипервариабельные участки CDR (complementarity determing regions — области молекулы иммуноглобулина, определяющие её комплементарность к антигену), а все остальные части молекулы соответствуют IgG человека. Генетические конструкты, соответствующие МКА с такой изменённой структурой, можно экспрессировать в культуре клеток, для чего часто используют линию клеток яичников китайского хомячка CHO и некоторые другие линии. После трансформации клеток векторами, включающими гены рекомбинантных МКА, такие культуры сами становятся «фабриками» по производству МКА (наподобие гибридомных клеточных линий)[4]. По данным за 2022 г., в

[4] Ясный И. Биотехнология антител. Биомолекула. 2018. URL: https://biomolecula.ru/articles/biotekhnologiia-antitel (дата об-

мире насчитывалось 162 МКА, одобренных для терапевтического применения по крайней мере одним регулятором (включая 112 МКА, одобренных FDA и 114 МКА, одобренных в Европе) [11]. Значительная доля этих МКА по своему происхождению являются рекомбинантными антителами (химерными или гуманизированными), производными мышиных гибридомных МКА [6, 10].

И это далеко не единственное усовершенствование методов получения МКА, известное в настоящее время. Условно эти усовершенствования можно разделить на две большие категории. К первой группе относятся технологические усовершенствования, которые вносятся в «старую» («классическую») ГТ, восходящую к изобретению C. Milstein и G. Köhler. Ко второй группе относятся такие технологии получения МКА, которые отошли от собственно создания гибридом и основаны на иных принципах. Ниже будут сначала кратко рассмотрены эти «негибридомные» методы, с тем чтобы потом снова вернуться к ГТ.

Фаговый дисплей

Из таких «негибридомных» методов прежде всего следует упомянуть метод «фагового дисплея», разработанный несколько лет спустя изобретения гибридом [9, 12, 13]. За это изобретение его авторы G.P. Smith и G.P. Winter в 2018 г. получили Нобелевскую премию. Собственно, этот метод позволяет получать не только МКА, но вообще специфичные рецепторы к лигандам (или, наоборот, лиганды к рецепторам). Впервые этот подход был описан G.P. Smith в 1985 г. А в начале 1990-х годов G.P. Winter и соавт. использовали его для получения МКА [14]. В применении к получению МКА суть этого метода в общих чертах состоит в следующем. Из В-лимфоцитов, например, человека, выделяют мРНК и синтезируют кДНК, кодирующую лёгкие и тяжёлые цепи вариабельных участков антител (V_L и V_H). Эту кДНК встраивают в экспрессирующий вектор на основе нитевидного фага M13 в соединении с участком, кодирующим поверхностный белок фага. При этом в геноме фагового вектора кодирующие последовательности V_L и V_H комбинируются в пары случайным образом. При молекулярном клонировании путём заражения полученным фаговым вектором бактериальных клеток в них формируются вирусные частицы, на поверхности которых собираются Fab-фрагменты антител (отсюда название метода — «фаговый дисплей»). Далее частицы фагов выделяют из бактерий, и из множества фагов производят отбор тех вариантов, которые экспрессируют на своей поверхности Fab-фрагменты, специфичные к избранному антигену. Для этого фаговые частицы вводят в соприкосновение с антигеном, прикреплённым к твёрдой фазе (например, к пластиковой поверхности). Если на поверхности фага представлены Fab-фрагменты, специфичные к антигену, такой фаг прикрепится к антигену, в противном случае он просто будет удалён с поверхности при отмывке. Отобранные частицы фагов можно снова размножить в бактериях и повторить селекцию на антигене. В результате отбирают клон фаговых частиц, несущих высокоаффинные Fab-фрагменты на своей поверхности и, соответственно, содержащие в своем геноме кодирующие их гены [9, 12, 13]. Как сказал G.P. Smith в своей речи при вручении Нобелевской премии, «эта искусственная селекция в чашке Петри очень похожа на естественную эволюцию»[5]; видимо, он имел в виду процесс естественного отбора (при котором через фенотип отбирается генотип).

На следующем этапе с помощью ПЦР и других технологий рекомбинантных ДНК можно получить векторы для экспрессии последовательностей ДНК, кодирующих отобранные Fab-фрагменты, в клетках CHO (или других клеточных линий) для наработки (в том числе в больших количествах, в биореакторах) рекомбинантных МКА в формате Fab-фрагментов. Или, в зависимости от задач, можно создать рекомбинантные конструкты, позволяющие экспрессировать МКА той же специфичности, но в формате Fab_2-фрагментов или целых молекул IgG человека. Также технологию фагового дисплея используют и для получения одноцепочечных (single chain) фрагментов вариабельных участков (scFv). Таким образом, метод фагового дисплея в сочетании с другими технологиями генной инженерии в конечном счете позволяет получать разнообразные рекомбинантные МКА [9, 13].

Важно, что метод фагового дисплея теоретически позволяет преодолевать ряд ограничений, связанных с ГТ. Например, он позволяет получать МКА к высокотоксичным антигенам, т. к. он не требует иммунизации животных, или к слабо иммуногенным антигенам, к которым не вырабатывается гуморального ответа в организме. С другой стороны, для создания изначальной генной библиотеки антител можно использовать антитела иммунного донора, чтобы увеличить вероятность отбора антител нужной специфичности, или, наоборот, искусственно созданные (синтетические) библиотеки нуклеотидных последовательностей для повышения разнообразия представленных дисплеем вариантов V_L/V_H пар. В настоящее время этот метод также претерпел развитие, в частности, в качестве «дисплея» используют не только фаги, но и бактерии, дрожжи и даже клетки млекопитающих (что представляет

ращения: 11.06.2024).

[5] Smith G.P. Phage Display: Simple Evolution in a Petri Dish. Nobel Lecture. 2018. URL: https://nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/smith/lecture/ (дата обращения: 11.06.2024).

дополнительные возможности с точки зрения формата представляемых на поверхности клеток молекул) [9, 15, 16]. По данным на 2022 г. уже успешно прошли клинические испытания и получили одобрение для использования в терапии (аутоиммунных и онкологических заболеваний) 17 МКА, полученных с использованием метода дисплея [16, 17]. Много таких МКА находятся в стадии изучения и клинического испытания, среди них особо следует отметить МКА, обладающие широкой нейтрализующей способностью в отношении вируса иммунодефицита человека [17].

Методы получения моноклональных антител из индивидуальных В-клеток

Другое активно развивающееся в настоящее время направление, не относящееся непосредственно к ГТ, — это получение МКА из индивидуальных В-клеток. Оно существует в различных модификациях, будучи тесно связанным также с методами генетической инженерии [18, 19]. С этим направлением связаны большие надежды в отношении получения нейтрализующих антител широкого спектра (broadly neutralizing antibodies — bNAbs) для терапии опасных инфекционных болезней, таких как инфекция вирусом иммунодефицита человека, вирусный гепатит С и др. [18–21]. Ниже описаны некоторые примеры таких методов, часто упоминаемые в публикациях.

1. Культивирование отдельных В-лимфоцитов. В последние годы были разработаны методы, позволяющие поддерживать выживание и размножение В-лимфоцитов в культуре существенно дольше, чем это было возможно ранее. В частности, В-лимфоциты из клеток крови могут жить, размножаться и секретировать антитела в течение определённого времени при культивировании вместе со специальными «кормящими» (фидерными) клетками, экспрессирующими стимулирующую В-клетки молекулу — лиганд CD40 (CD40L) и в присутствии некоторых цитокинов в культуральной среде (например, интерлейкина-21) [18, 19, 22].

Для предотвращения роста самих фидерных клеток (что может мешать выживанию В-лимфоцитов) их подвергают облучению или воздействию цитостатиков (например, митомицина) [22]. Описано несколько протоколов таких методов, включая использование трансфецированных фидерных клеток, способных экспрессировать CD40L и интерлейкины, необходимые для стимуляции В-лимфоцитов [22, 23]. Показано, что В-клетки, активированные *in vitro* с помощью CD40L и интерлейкинов, не только пролиферируют, но в них запускается активный синтез антител. Антитела, продуцируемые такими лимфоцитами, можно выявить в культуральной среде и изучать их свойства (например, нейтрализирующую способность в отношении вирусов и др.). Более того, поскольку синтез антител сопровождается повышением уровня мРНК, кодирующей Ig, это упрощает амплификацию и последующее секвенирование генов Ig из единичных В-клеток. Поэтому стимулированные *in vitro* лимфоциты рассматриваются как «удобные объекты для определения полных последовательностей ДНК, сопряжённых лёгких и тяжёлых цепей Ig и для создания на их основе новых человеческих моноклональных антител» [22].

Некоторые фирмы предлагают наборы для культивирования В-клеток, включающие специально обработанные фидерные клетки[6]. Предпринимаются также усилия по дальнейшему усовершенствованию подобных систем путём создания 3D-моделей лимфоидных органов. Показано, что такие 3D-клеточные модели (основанные, например, на использовании синтетических гелей в качестве матрикса) могут ещё больше поддерживать выживаемость и пролиферацию В-лимфоцитов человека (имитируя формирование зародышевых центров лимфоидных органов), а также усиливать функциональную дифференцировку В-клеток памяти в секретирующие антитела В-лимфоциты [24]. Важно, что одновременно в тех же культурах наблюдали и дифференцировку наивных В-клеток в секретирующие антитела лимфоциты, причём с переключением изотипов антител. Предполагается, что дальнейшая оптимизация подобных 3D-культур может предоставить возможность воспроизведения *in vitro* и таких процессов, характерных для зародышевых центров лимфоидных органов, как возрастание аффинности антител в отношении специфического антигена по механизму гипермутагенеза [24].

2. Получение В-клеток, продуцирующих МКА, с помощью приборов для флуоресцентной клеточной сортировки (варианта проточной цитометрии), или, применяя другую терминологию, — метода «сортировки флуоресцентно-активированных клеток» (Fluorescence-activated Cell Sorting, FACS). Этот подход основан на том, что на поверхности В-лимфоцитов, относящихся к клеткам памяти, содержатся рецепторы той же специфичности, что и антитела, которые эта клетка способна секретировать после её активации антигеном. На практике метод состоит примерно в следующем: В-клетки памяти (специально выделенные или находящиеся в составе мононуклеарных клеток крови) приводятся в соприкосновение с антигеном, несущим флуоресцентную метку, и с помощью прибора для флуоресцентной клеточной сортировки («клеточ-

[6] APExBIO. Human B Cell Culture and Expansion Kit. Catalog No. BC1001. URL: https://apexbt.com/human-b-cell-culture-and-expansion-kit.html (дата обращения: 11.06.2024).

ного сортера») отбираются только те клетки, которые связали антиген своими поверхностными В-клеточными рецепторами (BCR), специфичными к данному антигену. Клеточный сортер распределяет отобранные клетки в лунки микропланшета. Далее тактика может быть разной. ДНК клеток может непосредственно использоваться для получения рекомбинантных МКА (причём с сохранением с помощью специального линкора данного ценного индивидуального сочетания V_L и V_H), или В-клетки могут какое-то время культивироваться, чтобы лучше изучить секретируемые ими МКА, например, в отношении их нейтрализующей способности (если исследование связано с поиском антител к патогенным вирусам) [18, 19].

Однако одна из сложностей, возникающих при использовании указанных методов культивировании В-лимфоцитов *in vitro*, заключается в том, что чем эффективнее происходит стимуляция В-лимфоцитов, тем быстрее они превращаются в терминально дифференцированные плазматические клетки, не способные к дальнейшему росту [22]. В работе M.J. Kwakkenbos и соавт. удалось преодолеть эту сложность путём генетического перепрограммирования В-лимфоцитов (взятых из крови донора) [25]. С помощью ретровирусной трансдукции в лимфоциты переносили гены, кодирующие траскрипционные факторы BCL-6 и BCL-XL, которые играют важную роль в поддержании размножения В-клеток в зародышевых центрах. В результате В-лимфоциты приобретали способность размножаться, образовывать клоны и секретировать МКА по крайней мере в течение месяца, в присутствии стимулирующего фидера. Кроме того, у них обнаруживали экспрессию фермента активационнозависимой цитидиндезаминазы, обеспечивающей соматический гипермутагенез при созревании аффинности антител в зародышевых центрах [25]. Важно, что трансдуцированные лимфоциты (например, В-клетки памяти, выделенные из крови доноров, иммунизированных столбнячным анатоксином), не только секретировали антитела, но и сохраняли на своей поверхности BCR. Это позволило применить флуоресцентный клеточный сортер для обнаружения В-лимфоцитов, продуцирующих МКА к столбнячному токсину, и получить клоны В-лимфоцитов, секретирующие МКА к данному антигену. Авторы показали, что с помощью описанного подхода можно получать МКА с нейтрализирующей активностью к вирусам (например, к респираторно-синцитиальному вирусу и др.) [25]. Метод можно использовать для получения не только МКА человека, но и разных видов млекопитающих.

Ещё одна часто используемая возможность для получения потомства индивидуальных В-клеток человека — это иммортализация В-клеток с помощью вируса Эпштейна–Барр (EBV) для получения трансформированных (лимфобластоидных) клеточных линий, которые можно дополнительно стабилизировать путём слияния с клетками миеломы человека или гибридной линии (полученной от слияния клеток миеломы человека с миеломой мыши) [18, 26]. Подробнее об этом подходе, который отчасти снова возвращается к ГТ для получения МКА человека, будет сказано ниже.

Микрожидкостные технологии при получении моноклональных антител

Технологии получения МКА из единичных В-клеток в настоящее время используются в двух вариантах: макроварианте (с обычным лабораторным оборудованием для культивирования клеток) и микроварианте, основанном на микрожидкостных (микрофлюидных) технологиях [18]. Макровариантны в общих чертах описаны выше. Микрожидкостные технологии существуют в разных форматах, сначала описанных в научных статьях в качестве изобретений научных лабораторий, но теперь ряд зарубежных биотехнологических компаний уже специализируется на выпуске такого оборудования. Один из вариантов технологий для отбора В-клеток человека, секретирующих МКА, сводится примерно к следующему. Взвесь клеток, потенциальных продуцентов МКА, в жидкой среде запускается в микрожидкостную камеру прибора. Туда же вносится специальный масляный раствор. При смешивании в микроканалах прибора взвеси клеток с маслом образуются водно-масляные микрокапли (по размеру соответствующие пико- и нанообъёмным частицам), которые включают внутри себя В-клетку. Капли стабилизируют поверхностно-активным веществом (сурфактантом). Кроме того, внутрь капель помещают реактивы, представляющие собой частицы, покрытые антигеном, и антитела к Ig человека, связанные с флуоресцентной меткой (микрофлюидные технологии позволяют производить различные манипуляции с такими каплями, варьируя их размер и содержимое). Если клетка продуцирует специфические антитела, то они прикрепятся к поверхности частицы с антигеном, а к ним присоединятся уже меченые флуоресцентные антитела, т. е. поверхность наночастицы, находящейся внутри микрокапли, покроется иммунными комплексами: антиген–специфические МКА–вторые антитела с флюоресцентной меткой. В этом случае от наночастицы будет исходить свечение, т. е. внутри капли возникнет светящаяся точка. Встроенный в прибор клеточный сортер отберёт такие микрокапли и распределит их по нанолункам специального культурального микропланшета (с лунками очень малых объёмов). В лунках капли лопаются от соприкосновения с культуральной средой, и клетка оказывается в среде, где может какое-то время расти и делиться. Далее среда может быть дополнительно

DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-486

проверена на наличие секретированных МКА, которые могут накапливаться в высоких концентрациях, благодаря миниатюрным размерам лунок. Технология позволяет за несколько часов анализировать десятки миллионов В-клеток, находящихся в образце [18, 27, 28].

Некоторые микрожидкостные системы, выпускаемые биотехнологическим компаниями, используют для детекции не флуоресценцию на наночастицах, а явление, известное как «резонансный перенос энергии по Фёрстеру» (Forster Resonance Energy Transfer) или, по другой терминологии, «индуктивно резонансный перенос энергии». Он предполагает наличие в реакционной смеси двух белковых молекул, несущих разные флуоресцентные метки, называемые флуорофорами, одна из которых может испускать энергию (являться донором), а другая — поглощать её (служить акцептором) при сближении молекул меченых белков. Если в микрокапле вместе с В-клеткой из крови человека, секретирующей антитела класса IgG, содержатся меченные разными флуорохромами молекулы антигена и вторых антител (к IgG человека), то при образовании иммунных комплексов (меченные флуорохромом антиген-специфические антитела к антигену — вторые антитела, меченные другим флуорохромом) донорные и акцепторные молекулы сближаются, происходит испускание энергии донорской молекулой и изменение свечения молекулы акцептора, что улавливается прибором [29].

Дальнейшие манипуляции с инкапсулированными в микрокапли В-лимфоцитами (секретирующими нужные антитела) могут включать создание рекомбинантных МКА (на основе генов, кодирующих секретированные В-клеткой МКА) или получение лимфобластоидных линий с помощью трансформации EBV с последующей стабилизацией путём слияния с клетками миеломы (о чём подробнее будет сказано ниже). Это только один из возможных описанных форматов таких методов, могут быть и другие варианты, в зависимости от поставленных задач. Например, если стоит задача вести отбор В-клеток по связыванию антигена с мембранным рецептором на поверхности В-клеток памяти, то предлагаются несколько иной дизайн и состав реактивов внутри микрокапель [29]. Используя подобные методы, исследователям удаётся в одном раунде добиться, например, 800-кратного увеличения доли лимфоцитов, секретирующих антитела к антигену [29]. Микрокапли с заключёнными в них В-лимфоцитами (например, взятые у людей, перенёсших вирусное заболевание), можно использовать для определения последовательностей генов, кодирующих V_L и V_H участки антител, образованных индивидуальными В-лимфоцитами, с целью создания соответствующих рекомбинантных МКА. Технологии высокопроизводительного секвенирования нового поколения (next-generation sequencing, NGS) в сочетании с методами биоинформатики позволяют также определить наиболее часто встречающиеся последовательности вариабельных участков. Предполагается, что они принадлежат антителам, специфичным к возбудителю данного заболевании. Далее на основании этой информации можно создать рекомбинантное МКА с последующим изучением его биологических свойств, например, способности нейтрализовать вирус и др. [9, 18, 19].

У микрожидкостных методов есть немало преимуществ. Это и огромная пропускная способность, позволяющая за несколько часов анализировать миллионы клеток, и экономия сред и реагентов. Важно, что подобные технологии позволяют достигать высоких концентраций МКА, полученных даже от одной В-клетки. При использовании этих методов можно вести поиск МКА без привязки к заранее выделенному известному антигену. Например, можно выяснить как МКА, секретируемые в культуральную среду, влияют на способность инфекционных вирусных частиц заражать клетки-мишени, т. е. обладают ли эти МКА нейтрализующими свойствами [9, 18, 19].

Преимущества классической гибридомной технологии

Возвращаясь к гибридомам, следует отметить, что, несмотря на перспективность новых «негибридомных» методов, ни один из них не нашёл ещё такого широкого применения, как «старая» ГТ. В частности, на это обстоятельство нередко обращают внимание в ряде зарубежных обзоров, посвящённых описанию прогресса в области получения МКА [3, 6, 30]. Действительно, этот «старый» подход, изобретённый уже более полувека назад (первая работа по получению гибридом опубликована в 1975 г.), продолжает очень широко использоваться.

Сохранение популярности старой ГТ, по-видимому, можно объяснить двумя основными причинами. Первая причина связана со свойствами самого продукта — МКА, образованных гибридомами. А именно, ГТ позволяет получать МКА природного происхождения, возникающие в результате дифференцировки В-лимфоцитов в зародышевых центрах лимфоидных органов, например, селезёнки мыши (если речь идёт о мышиных гибридомах), где вариабельные участки антител подвергаются супермутагенезу с отбором антител с наиболее аффинными сочетаниями V_H и V_L пар, также происходит класс-переключение антител с IgM на другие изотипы. Таким образом, гибридомная технология позволяет получать «обессмерченные» (иммортализованные) линии клеток, способные секретировать в культуральную среду МКА со структурой природных антител. Такие антитела отличаются стабильностью, их удобнее использовать в исследовательских це-

лях и для конструирования различных иммунохимических тест-систем, чем, например, образуемые с помощью метода фаг-дисплея фрагменты антител (которые могут потребовать дальнейшей доработки с помощью генной инженерии) [3, 6, 30]. Все эти свойства присущи и МКА, продуцируемым упомянутым выше гибридомам человека. Таким образом, делается ненужным процесс гуманизации антител (если стоит задача получения терапевтического МКА), а получение, при необходимости, рекомбинантных МКА (на основе природных) сильно упрощается. Важно также, что в организме происходит негативный отбор В-клеток, продуцирующих антитела к собственным антигенам белковой и другой биохимической природы, что уменьшает вероятность нежелательных аутоиммунных реакций при использовании МКА с «природными» сочетаниями вариабельных участков (V_L и V_H) в терапии. Напротив, Fab-фрагменты и другие формы антител, образованные в результате случайного спаривания V_H и V_L в технологии фагового дисплея, как считается, с большей вероятностью могут проявлять кроссреактивность по отношению к аутоантигенам и обладать большей иммуногенностью [3, 6, 13].

Вторая причина сохраняющейся популярности ГТ — очевидно, чисто практического и финансового свойства. Метод получения гибридом не требует сложного и дорогого лабораторного оборудования, и в силу своей «биологичности» он может легко осваиваться не только сотрудниками биотехнологических фирм, но и специалистами научных лабораторий, относящихся к самым разным направлениям в области биологических наук. Для получения внутрилабораторных МКА для конкретных исследовательских целей научной группы (например, физиологического профиля) не требуются специализация в области технологий рекомбинантных ДНК, соответствующее специальное оборудование и дорогостоящие реагенты.

«Негибридомные» методы получения МКА, напротив, требуют специализации в области генной инженерии, дорогостоящего оснащения лаборатории и обеспечения реагентами, поэтому они доступны немногим лабораториям и крупным биотехнологическим компаниям. Кроме того, эти методы нередко запатентованы и трудно воспроизводимы, в том числе из-за отнесения части информации к области «коммерческой тайны» биотехнологических компаний, производящих с помощью этих методов МКА или специальное оборудование (например, микрожидкостные системы) для получения МКА. Однако с учётом перспективности этих новых направлений авторы многих обзоров поднимают вопрос о необходимости сделать указанные технологические достижения более доступными для широкого научного сообщества в разных областях биологии, в том числе путём проведения специальных практических семинаров, тренингов и т.п., способствующих более широкому освоению этих технологий [13, 18].

Современная модификация метода G. Köhler и C. Milstein

В то же время и старая ГТ восприняла ряд современных усовершенствований, что, по мнению ряда авторов, может придать ей второе дыхание, открыть новые возможности [3, 6]. Ниже приведены некоторые примеры ряда важных усовершенствований, предлагаемых в области ГТ.

Во-первых, для выделения специфических гибридом после слияния всё большее применение находят стерильные флуоресцентные клеточные сортеры. Показано, что на поверхности секретирующих МКА клеток мышиных гибридом представлены BCR с вариабельными участками той же специфичности, что и секретируемые этими клетками МКА [31]. Поэтому вместо того, чтобы проводить трудоёмкое тестирование на специфичность отдельных колоний гибридом после слияния (с последующим многократным клонированием отобранных гибридом), можно прибегнуть к селекции и клонированию гибридом, используя стерильные клеточные сортеры [31]. Смесь слившихся клеток после отбора гибридных клеток на среде ГАТ (для удаления неслившихся клеток) можно связать с антигеном, несущим флуоресцентную метку, и подвергнуть отбору на клеточном сортере. Устройство отберёт меченые клетки (которые связали антиген через свои поверхностные BCR) и разместит их по отдельным лункам культуральных микропланшетов. Таким образом сразу возможно произвести и отбор гибридом, секретирующих МКА к антигену, и их первоначальное клонирование. Это не только намного сокращает время получения гибридомной клеточной линии, экономит среды, культуральную посуду и т. п., но и резко увеличивает пропускную способность технологии. Можно охватить тестированием большие популяции лимфоцитов от нескольких иммунных мышей, что увеличивает шанс найти наиболее подходящие МКА. Этот метод используется и для отбора и клонирования гибридом человека, однако ограничением является то обстоятельство, что линии, полученные из В-лимфоцитов человека, трансформированных EBV, нередко могут слабо экспрессировать мембранные BCR [26]. Также для отбора МКА-секретирующих гибридом и их быстрого клонирования можно использовать микрожидкостные системы типа описанных выше на примере отбора индивидуальных В-лимфоцитов, продуцирующих антитела [27].

Другим усовершенствованием, часто упоминаемым в обзорах, посвящённых развитию ГТ, является использование полужидких сред для отбора и

клонирования гибридом [6, 26]. В такие среды можно добавить, например, наночастицы с антигеном и вторые антитела, несущие флуоресцентную метку. В полужидких средах гибридомные клетки растут в виде отдельных колоний (клонов), а секретируемые ими МКА концентрируются вокруг этих колоний. За счёт образования иммунных комплексов вокруг клонов гибридом, секретирующих нужные МКА, при флуоресцентной микроскопии будет обнаруживаться свечение. Эти клоны можно извлечь из полужидкой среды для дальнейших манипуляций. Метод позволяет одновременно выявлять и клонировать секретирующие МКА гибридомы и препятствует вытеснению клонов, активно продуцирующих МКА, нескретирующими, но быстро растущими клетками. Ряд фирм выпускает специальное оборудование, делающее более удобным для исследователей использование этого метода.

Кроличьи гибридомы

Важным направлением является создание гибридом на основе клеток других видов животных (не мышиных). Вскоре после появления ГТ у исследователей возникло ожидаемое стремление приложить этот метод к такому животному, как кролик. Поликлональные кроличьи антитела отличаются высокой аффинностью, и иммунная система кролика способна давать более сильный гуморальный иммунный ответ по сравнению с мышью. Однако получение кроличьих МКА с помощью ГТ оказалось нелёгким делом, т. к. не было в наличии подходящего партнера для слияния с В-лимфоцитами. Оказалось, что у кроликов не возникает миелом, из которых можно было бы создать клеточную линию (подобно созданию линий мышиных миеломных клеток, используемых для получения мышиных МКА). Межвидовые же гибридомы от слияния В-лимфоцитов кролика и миеломы мыши были очень нестабильны, быстро теряли хромосомы, утрачивая способность образовывать МКА. Все же, благодаря специальным усилиям, некоторым исследователям с использованием генетически модифицированных кроликов удалось в 1995 г. получить клеточную линию 240E-W (наподобие мышиной миеломы), относительно пригодную для получения кроличьих гибридом [32]. В дальнейшем, на протяжении 1997–2001 гг., были предприняты усилия по улучшению качества этой линии как партнера для гибридизации (в частности, пришлось избавляться от секреции этими клетками собственных иммуноглобулинов и решать ряд проблем с культивированием и стабильностью гибридом), и в 2013 г. на улучшенный вариант этой линии (240E-W2) был выдан международный патент [32]. Таким образом, в отличие от клеток миеломы мыши, щедро предоставленных C. Milstein для пользования международному научному сообществу, кроличья линия — аналог мышиных миелом — охраняется патентованием.

В настоящее время ряд биотехнологических компаний специализируются на производстве и продаже кроличьих МКА. FDA одобрило несколько кроличьих МКА для применения в диагностических целях. Кроме того, ряд терапевтических МКА, исходно являющихся продуктами кроличьих гибридом, проходят в настоящее время клинические испытания [32]. Тем не менее отмечается, что получение кроличьих гибридом остаётся технически более сложной задачей, чем в случае мышиных гибридом. Кроличьи гибридомы, по-видимому, всё же менее стабильны, более сложны в культивировании, и к тому же есть проблемы с патентной охраной линии миеломных кроличьих клеток, используемых в качестве партнера для слияния [32].

Куриные и межвидовые гибридомы

В литературе описаны отдельные куриные гибридомы, продуцирующие куриные МКА класса IgY; эти линии были получены от слияния В-лимфоцитов иммунных кур с клетками куриной миеломы [6]. Интерес к куриным IgY-антителам связан с тем, что, как считается, они могут иметь ряд преимуществ перед антителами млекопитающих вследствие эволюционной отдалённости птиц [33]. Так, предполагается, что в некоторых случаях у кур можно рассчитывать получить иммунный ответ на ряд антигенов, на которые иммунная система млекопитающих не реагирует. Однако широко ГТ для получения МКА кур не используется, скорее для получения рекомбинантных МКА кур применяется технология фагового дисплея [6].

То же относится и к сообщениям о получении гибридом некоторых других видов животных, например коров [6]. Из млекопитающих, наряду с мышью, изначально достаточно широкое распространение получила практика получения МКА крыс с использованием клеток миеломы крысы или миеломы мыши для слияния с В-клетками крысы (в отличие от нестабильных гибридов соматических клеток мыши и кролика, быстро теряющих хромосомы и секрецию МКА, межвидовые гибриды мышь × крыса более стабильны) [34].

Человеческие гибридомы

Особого рассмотрения заслуживает такое направление, как получение человеческих гибридом, секретирующих человеческие МКА. Это направление давно привлекло внимание исследователей и как путь изучения, например, аутоиммунных нарушений в патогенезе различных заболеваний, и как возможный источник терапевтических МКА, имеющих структуру и свойства неизменённых (природных) МКА [6, 19, 26]. Для получения таких гибридом можно использовать В-клетки из крови чело-

века. Однако эта задача во многом остаётся весьма технически непростой, несмотря на достигнутые в этом направлении успехи. Это связано с несколькими причинами. Во-первых, отсутствует клеточная линия, способная при слиянии поддерживать секрецию МКА в гибридах столь же эффективно и стабильно, как это происходит в мышиных гибридомах (а межвидовые гибриды В-лимфоцитов человека с клетками миеломы мыши отличаются сильной нестабильностью генома, быстро теряя хромосомы человека и, соответственно, способность секреции МКА). Во-вторых, в крови человека содержание В-лимфоцитов, секретирующих антитела искомой специфичности, очень мало по сравнению, например, с селезёнкой иммунной мыши. В попытках преодоления технических сложностей обратились к трансформации В-клеток крови с помощью EBV для получения трансформированных лимфоидных клеточных линий, продуцирующих МКА. Однако при этом трансформацию претерпевала небольшая доля клеток, и такие линии быстро утрачивали секрецию МКА. В дальнейшем эффективность вирусной трансформации удалось повысить, используя дополнительные активаторы В-лимфоцитов (например, CpG-содержащие олигонуклеотиды и интерлейкины) [6, 19, 26].

Для стабилизации трансформированных вирусом линий эти клетки дополнительно сливают с клетками гибридных линий, полученных, например, от слияния клеток миелом человека и клеток мышиной миеломы. По-видимому, такие гибридные линии лучше обеспечивают стабильную секрецию МКА в конечных гибридах, чем использование в качестве партнера для слияния с EBV-трансформированными В-клетками просто клеток линий миелом человека, которые удалось получить в настоящее время [26]. Однако всё же ГТ в приложении к клеткам человека значительно уступает по своей эффективности технологии мышиной гибридомы, являясь значительно более сложной задачей [6, 26].

Новые методы гибридизации клеток

Дальнейшее повышение эффективности технологии получения гибридом связывают, в частности, с новыми методами гибридизации клеток, основанными на использовании электрических импульсов. Электрические методы для слияния клеток уже широко применяются для получения гибридом, позволяя значительно увеличить частоту слияния — по разным данным, от 2 до нескольких десятков раз [3, 6, 26, 35, 36]. Ряд лабораторий описали применение приборов для электрослияния собственного изготовления, однако такое оборудование уже выпускается рядом биотехнологических компаний. Например, по сообщению T. Kobayashi и соавт., частота выхода мышиных и крысиных гибридом, секретирующих МКА к антигену, при электрослиянии (с помощью прибора японской фирмы) оказалась в 5 раз выше, чем при использовании ПЭГ [36]. Интересно, что когда вместо клеток селезёнки иммунных животных (мышей и крыс) при электрослиянии использовали лимфоузлы, то по сравнению с обычным протоколом (слияние клеток селезёнки с клетками миеломы с помощью ПЭГ) количество гибридом — продуцентов нужных МКА — возросло в 50 раз [36]. Авторы считают, что такие модификации могут значительно повышать эффективность метода, в том числе уменьшая число использованных животных. Эти данные подтверждают более ранние сообщении о полезности использования в ГТ не только клеток селезёнки иммунных животных (наиболее частая практика), но и клеток лимфоузлов и, по некоторым данным, костного мозга, богатого плазматическими клетками, секретирующими антитела. Причём, по некоторым данным, В-лимфоциты из разных органов иммунной системы могут различаться по спектру антител, которые они продуцируют [37].

Особенно большие надежды связывают с новейшими методами соматической гибридизации клеток на основе, например, лазерных и микрожидкостных технологий. Наибольшую эффективность слияния обещает привлечение микрожидкостных технологий [3, 38]. Если частота слияния при использовании ПЭГ составляет в лучшем случае примерно 1 на 10^4 клеток, то в отношении этих новых методов сообщается о возможности достижения частоты слияния около 80–95% клеток при сохранении жизнеспособности более половины гибридных клеток [3, 38]. Высокая частота слияния (с сохранением жизнеспособности гибридов) очень важна при получении человеческих гибридом, когда число В-лимфоцитов, способных секретировать МКА нужной специфичности, в крови донора может быть очень низким (и при низкой частоте слияния такие клетки просто будут потеряны).

Трансгенные животные

Другим способом получения МКА человека с помощью ГТ является использование трансгенных животных, чаще всего лабораторных мышей [6]. Например, получены трансгенные мыши, у которых гены иммуноглобулинов мыши заменены на гены, отвечающие за образование антител у человека. Эти животные способны давать гуморальный ответ на иммунизацию антигеном с образованием антител, которые прошли через созревание аффинности в результате супермутагенеза и отбора В-клеток в зародышевых лимфоидных центрах, и их В-лимфоциты можно сливать с миеломой мыши обычным способом с получением мышиных гибридом, продуцирующих человеческие МКА [7]. Однако способность обеспечивать разнообразие антител у трансгенных мышей ниже, чем в организме чело-

века (отчасти это можно компенсировать путём получения гибридом от нескольких иммунных животных) [6]. Также в организме мыши хуже может быть «контроль качества антител», чем в организме человека, в отношении, например, аутоиммунных реакций [6]. Поэтому использование трансгенных мышей вряд ли может полностью заменить получение МКА человека с помощью гибридомы человека, хотя само создание таких животных может облегчиться с использованием новых эндонуклеазных методов редактирования генома, особенно CRISPR/Cas9 [39]. Получены также трансгенные животные других видов (например, куры и кролики), способные образовывать антитела человека [6]. Однако использование В-лимфоцитов этих животных для получения гибридом ограничивается техническими сложностями, главным образом из-за особенностей линий клеток, которые возможно использовать в качестве партнеров для соматической гибридизации [6].

Модификация иммунизации животных

Важные изменения касаются также начального этапа в получении МКА путём ГТ — иммунизации. Самый распространённый способ иммунизации мышей при получении мышиных МКА, например, к белковым антигенам — это введение очищенного антигена (нативного или рекомбинантного белка) с адъювантом. Однако под воздействием адъюванта может изменяться конформация молекулы белка-антигена. Предполагают, что именно с этим связан тот факт, что большинство гибридом, получаемых после иммунизации мышей описанным способом, секретируют МКА, распознающие линейные эпитопы, т. е. определённые аминокислотные последовательности в структуре белков-антигенов [6, 40]. Вместе с тем при получении, например, терапевтических МКА часто необходимо добиться, чтобы отобранные МКА распознавали конформационные эпитопы, т. е. какие-то участки на вторичной, третичной и четвертичной структуре антигена. Например, такая задача может стоять при получении нейтрализирующих МКА к вирусным антигенам с целью препятствовать взаимодействию вируса с клеточным рецептором, с помощью которого он проникает в клетку (как это происходит, например, в случае коронавируса SARS-CoV-2 и многих других).

Одним из подходов, применяемых для решения этой задачи, является иммунизация животных (например, мышей) с помощью ДНК-векторов (например, в виде плазмид), кодирующих данный белковый антиген [6, 40]. Другой путь — использование вирусоподобных частиц, во многом сохраняющих структуру вирусов, но лишённых инфекционности, т. к. они не содержат вирусного генома [41, 42]. Для получения МКА к конформационным эпитопам используют также иммунизацию клеточными «дисплеями», на поверхности которых экспрессируются антигены, сохраняющие нативную структуру. Такой путь способствует получению МКА, например, к различным рецепторным белкам. В качестве дисплеев используют клетки млекопитающих и рекомбинантных дрожжей, экспрессирующих на своей поверхности антигены [6]. Следует отметить, что здесь задачи ГТ во многом совпадают с задачами, стоящими при разработке вакцин, где также используют подходы в поисках путей получения адекватного иммунного ответа [41].

В этой связи хотелось бы особо остановиться на таком новом направлении, как использование для иммунизации целых рекомбинантных дрожжей, экспрессирующих антиген [43–47]. Оказывается, дрожжевые клетки (относящиеся к видам, используемым в кулинарии и пищевой промышленности) обладают мощными адъювантными свойствами, успешно индуцируя сигналы врождённого иммунитета (например, через толл-подобные рецепторы), при этом стимулируется и адаптивный иммунный ответ, как клеточный, так и гуморальный [44]. Причём интересно, что, как показано в некоторых работах, для иммунизации можно использовать не только антигены, представленные на поверхности дрожжей (формат дисплея), но и антигены, находящиеся внутри целых рекомбинантных клеток [44, 47]. Например, была показана индукция гуморального ответа при пероральной иммунизации мышей целыми клетками рекомбинантных дрожжей, экспрессирующими (внутри клеток) вирусный антиген — капсидный белок вируса некроза нервной ткани красного морского окуня (Red grouper nervous necrosis virus, RGNNV). RGNNV — это один из представителей более обширной группы вирусов некроза нервной ткани, вызывающих заболевание у многих видов рыб [48]. Затем эффективность этого метода иммунизации была продемонстрирована непосредственно на рыбах [49]. Показана также возможность индукции значительного гуморального и клеточного ответа к антигенам вируса геморрагической лихорадки денге при внутрибрюшинной [50] и пероральной иммунизации мышей целыми рекомбинантными дрожжами, экспрессирующими вирусные белки [51].

Указанные подходы с использованием целых рекомбинантных дрожжевых клеток обсуждаются в литературе как возможное новое перспективное направление для вакцинологии [43–47]. Причём способность вызывать иммунный ответ проявляют не только свежие, но и высушенные рекомбинантные дрожжи — продуценты антигена. Рекомбинантные дрожжи в высушенном виде сохраняют антиген даже при высоких температурах, что важно для проведения вакцинации в жарких странах. Также их можно использовать для оральной иммунизации. Производство и использование таких вакцин (с учётом затрат на хранение при транспортировке), полученных на основе синтезирующих антиген це-

лых дрожжевых клеток, может оказаться более дешевым, что имеет немалое практическое значение [43–47]. Этот пример интересен тем, что здесь развитие нового метода идёт не по пути усложнения технологии, а, скорее, направлено в сторону некоторого упрощения (например, не требуется очистка антигена). Можно предположить, что этот подход представляет интерес не только для вакцинологии, но и для ГТ (последнее утверждение требует, однако, экспериментальной проверки).

Для получения МКА к конформационным эпитопам важен не только этап иммунизации, но и этап селекции гибридом, секретирующих наиболее специфичные и аффинные МКА. При часто используемом твёрдофазном иммуноферментном анализе для выявления продуцентов специфических антител антиген прикрепляют к поверхности пластиковых планшетов, при этом конформационное состояние белковой молекулы может изменяться и многие конформационные эпитопы могут утрачиваться [31]. Одним из подходов к преодолению этой проблемы является использование флуоресцентных клеточных сортеров. Этот метод позволяет не только ускорить отбор и клонирование гибридом (как описано выше), но и отбирать гибридомы, продуцирующие МКА к конформационным эпитопам [31]. Действительно, в этом случае отбираются гибридомные клетки, на поверхности которых экспрессируются BCR (с вариабельными частями, идентичными МКА, секретируемым этими клетками), взаимодействующие с антигеном в растворе (что способствует сохранению естественной конформации белковой молекулы) [31].

Сочетание различных методов получения МКА на примере антител к HCV

В настоящее время не существует какого-то метода получения МКА, который мог бы считаться однозначно методом наилучшего выбора, неким «золотым стандартом» [6]. Разные методы могут дополнять друг друга при получении МКА, используемых в исследованиях одного и того же объекта. Это можно проиллюстрировать на примере вируса гепатита С (HCV).

Вскоре после открытия HCV для изучения белков этого вируса стали использовать и МКА, получаемые с помощью ГТ [52]. В частности, в этот период были получены МКА к белку нуклеокапсида HCV, получившего название ядерного антигена HCV (HCV core antigen, HCVcAg) [53]. На основе некоторых из этих МКА позднее была создана и внедрена в практику диагностики HCV иммуноферментная тест-система (устроенная по типу сэндвич-метода) для выявления в крови HCVcAg. Такой тест, в настоящее время выпускаемый 5 фармацевтическими компаниями (наиболее признанным тестом является одобренная в Евросоюзе хемилюминесцентая диагностическая система «Abbott ARCHITECT HCV»), может использоваться как для подтверждения наличия инфекции после выявления антител к вирусу, так и для обнаружения вируса в крови на раннем этапе инфекции, когда антитела к нему ещё не выработались (другими словами, данный тест может способствовать более раннему обнаружению заражённости HCV) [54]. Преимущество заключается в том, что данная тест-система проста в исполнении, не требует специального оборудования помещения и дорогостоящих приборов, что может быть особенно полезно в развивающихся странах с ограниченным бюджетом здравоохранения.

Однако в руководстве ВОЗ, посвящённом диагностике и лечению гепатита С, отмечается, что всё же изученность результатов применения данного теста меньше, чем диагностики, основанной на выявлении вирусной РНК с помощью ПЦР; кроме того иммуноферментный тест отличается относительно высокой стоимостью, что снижает его доступность для национальных систем здравоохранения небогатых стран[7]. Также, хотя чувствительность, например, системы Abbott ARCHITECT HCV относительно высока, все же она уступает чувствительности метода ПЦР, и риск пропустить инфекцию, получив ложноотрицательный результат выше [55]. В связи с этим продолжаются поиск и исследования новых МКА к HCVcAg с целью создания новых тест-систем для выявления этого вирусного белка. Например, в 2023 г. была опубликована работа испанских авторов, в которой описано получение с помощью ГТ панели мышиных МКА к HCVcAg и показана их потенциальная перспективность для создания новой иммуноферментной системы для определения этого антигена [56]. В этой связи следует отметить, что у HCVcAg обнаружены сильные иммуносупрессивные свойства [57]. Возможно, с этим связан тот факт, что только очень ограниченное число биотехнологических компаний осуществляют производство систем для определения HCVcAg, т. к. получение высокоаффинных МКА к данному антигену, по-видимому, оказывается на практике более сложной задачей, чем получение МКА к другим известным вирусным антигенам, например, поверхностному антигену вируса гепатита В (HBVsAg) [42].

Большую роль различные технологии получения МКА играют в исследованиях по поиску, получению и изучению эпитопов антител широкого нейтрализующего действия. Предполагается, что такие МКА могли бы способствовать терапии HCV [52, 58, 59]. С другой стороны, изучение, с опорой на биоинформатику, эпитопов нейтрализующих антител широкого спектра рассматривается как один

[7] Unitaid. Hepatitis C diagnostics technology landscape; 2019. URL: https://unitaid.org/assets/HepC-Dx-Tech-Landscape_May2019.pdf (дата обращения: 11.06.2024).

из подходов к созданию эффективной вакцины, являясь перспективным направлением так называемой «обратной вакцинологии» [59–61]. Поиск нейтрализирующих МКА получил особенно сильный стимул к развитию в связи с разработкой 2 клеточных систем, позволяющих изучать взаимодействие антител с HCV на модели вирусных псевдочастиц (HCVpp), экспрессирующих поверхностные белки HCV, и рекомбинантных вирусов, способных размножаться в культивируемых клетках (HCVcc) [62, 63]. В 2001 г. с помощью ГТ были получены мышиные МКА A33 к вирусному поверхностному белку E2, которые, как оказалось, проявляют очень сильные широко нейтрализирующие свойства при испытаниях на моделях HCVpp и HCVpp [64]. Позднее были также получены широко нейтралирующие МКА человека, направленные к антигену E2, при этом эпитопы некоторых из человеческих МКА частично перекрываются с эпитопом мышиных МКА [59]. Среди описанных разными авторами человеческих антител с широкой нейтрализующей активностью по отношению к HCV есть МКА, выделенные разными методами, например, на основе изолированных В-клеток с помощью ГТ [63], с применением фагового дисплея [65, 66] и путём анализа генов вариабельных участков антител из крови инфицированных людей методами NGS с последующим конструированием рекомбинантного МКА [67]. Однако пока не удалось получить МКА с доказанной терапевтической активностью в клинических испытаниях, исследования в этом направлении продолжаются.

Технология *in silico*

Наконец, рассмотрение методов получения МКА было бы неполным без хотя бы краткого упоминания такого подхода, как технология *in silico* (в компьютере). Данные о трёхмерной структуре антител, их комплексов с антигеном могут быть получены как с использованием экспериментальных методов (рентгеноструктурный анализ или ядерный магнитный резонанс), так и с помощью моделирования *in silico*. Этот метод позволяет предсказывать трёхмерную структуру антител, идентифицировать аминокислоты, которые вносят наибольший вклад во взаимодействие молекул антитела и антигена, и анализировать последствия их замены, например, в результате мутагенеза (метод рационального дизайна), для создания антител с увеличенным аффинитетом [8].

Заключение

Несмотря на развитие методов компьютерного моделирования, как показывает практика, результаты, полученные с помощью экспериментальных подходов, до сих пор более надёжны. В некоторых случаях получение антител со свойствами, превышающими их природный аналог, трудно осуществимо и связано с тем, что в ходе естественного созревания антител в организме и их отбора уже была выбрана их оптимальная структура [8].

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Абелев Г.И. Моноклональные антитела. *Соросовский образовательный журнал.* 1998;1:16–20. Abelev G.I. Monoclonal antibodies. *Soros Educ. J.* 1998;1:16–20.
2. Рингерц Н., Сэвидж Р. *Гибридные клетки.* Пер. с англ. М.;1979. Ringertz N.R., Savage R.E. *Cell Hybrids.* New York;1976.
3. Steele T. Life begins at forty — hybridomas: ageing technology holds promise for future drug discoveries. *GaBI J.* 2016;5(1): 21–6. DOI: https://doi.org/10.5639/gabij.2016.0501.006
4. Массино Ю.С., Цибезов В.В., Дмитриев А.Д., Коляскина Г.И. Получение и характеристика моноклональных антител к α-эндорфину человека. *Биотехнология*. 1987;3(6):730–4. Massino Yu.S., Tsibezov B.B., Dmitriev A.D., Kolyaskina G.I. Preparation and characterization of monoclonal antibodies to human α-endorphin. *Biotechnology*. 1987;3(6):730–4.
5. Тараканова Ю.Н., Дмитриев А.Д., Дмитриев Д.А. и др. Твердофазный иммуноферментный анализ: история, теория и практическое использование. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019;96(3):117–25. Tarakanova Yu.N., Dmitriev A.D., Dmitriev D.A., et al. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): history, theory and application. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2019;96(3):117–25. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-3-117-125 EDN: https://elibrary.ru/bwqjkj
6. Parray H.A., Shukla S., Samal S., et al. Hybridoma technology a versatile method for isolation of monoclonal antibodies, its applicability across species, limitations, advancement and future perspectives. *Int. Immunopharmacol.* 2020;85:106639. DOI: https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106639
7. Buss N.A., Henderson S.J., McFarlane M., et al. Monoclonal antibody therapeutics: history and future. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2012;12(5):615–22. DOI: https://doi.org/10.1016/j.coph.2012.08.001
8. Альтшулер Е.П., Серебряная Д.В., Катруха А.Г. Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности. *Успехи биологической химии.* 2010;50:203–58. Al'tshuler E.P., Serebryanaya D.V., Katrukha A.G. Obtaining recombinant antibodies and ways to increase their affinity. *Biochemistry (Moscow).* 2010;50:203–58.
9. Меркульева Ю.А., Щербаков Д.Н., Ильичев А.А. Методы получения моноклональных антител для терапии и профилактики вирусных инфекций. *Биоорганическая химия*. 2022;48(3):279–95. Merkul'eva Yu.A., Shcherbakov D.N., Il'ichev A.A. Methods for obtaining monoclonal antibodies for the prevention and treatment of viral infection. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry.* 2022;48(3):279–95. DOI: https://doi.org/10.31857/S0132342322020166 EDN: https://elibrary.ru/wdrbhb
10. Loyau J., Rousseau F. Cloning, reformatting, and small-scale expression of monoclonal antibody isolated from mouse, rat, or hamster hybridoma. *Methods Mol. Biol.* 2014;1131:207–28. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-992-5_13
11. Lyu X., Zhao Q., Hui J., et al. The global landscape of approved antibody therapies. *Antib. Ther.* 2022;5(4):233–57. DOI: https://doi.org/10.1093/abt/tbac021
12. Koenig P., Fuh G. Selection and screening using antibody phage display libraries. *Methods Mol. Biol.* 2014;1131:133–49. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-62703-992-5_9
13. Laustsen A.H., Greiff V., Karatt-Vellatt A., et al. Animal immunization, *in vitro* display technologies, and machine learning for

antibody discovery. *Trends Biotechnol.* 2021;39(12):1263–73. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2021.03.003
14. Winter G., Griffiths A.D., Hawkins R.E., Hoogenboom H.R. Making antibodies by phage display technology. *Annu. Rev. Immunol.* 1994;12:433–55. DOI: https://doi.org/10.1146/annurev.iy.12.040194.002245
15. Zhang Y. Evolution of phage display libraries for therapeutic antibody discovery. *MAbs*. 2023;15(1):2213793. DOI: https://doi.org/10.1080/19420862.2023.2213793
16. Valldorf B., Hinz S.C., Russo G., et al. Antibody display technologies: selecting the cream of the crop. *Biol. Chem.* 2021;403(5-6):455–77. DOI: https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0377
17. Chikaev A.N., Rudometov A.P., Merkulyeva Yu.A., Karpenko L.I. Phage display as a tool for identifying HIV-1 broadly neutralizing antibodies. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding.* 2021;25(5):562–72. DOI: https://doi.org/10.18699/VJ21.063
18. Pedrioli A, Oxenius A. Single B cell technologies for monoclonal antibody discovery. *Trends Immunol.* 2021;42(12):1143–58. DOI: https://doi.org/10.1016/j.it.2021.10.008
19. Лушова А.А., Бязрова М.Г., Прилипов А.Г. и др. Новое поколение методов получения человеческих моноклональных антител. *Молекулярная биология.* 2017;51(6): 899–906. Lushova A.A., Byazrova M.G., Prilipov A.G., et al. Next-generation techniques for discovering human monoclonal antibodies. *Molecular Biology.* 2017;51(6):782–7. DOI: https://doi.org/10.1134/S0026893317060103 EDN: https://elibrary.ru/xxcred
20. Оксанич А.С., Никонова А.А., Зверев В.В. Рекомбинантные антитела в противовирусной терапии: достижения и перспективы. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2018;95(6):114–23. Oksanich A.S., Nikonova A.A., Zverev V.V. Recombinant antibodies in anti-viral therapy: achievements and perspectives. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology.* 2018;95(6):114–23. DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-114-123 EDN: https://elibrary.ru/ccgvsi
21. Otsubo R., Yasui T. Monoclonal antibody therapeutics for infectious diseases: Beyond normal human immunoglobulin. *Pharmacol. Ther.* 2022;240:108233. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2022.108233
22. Бязрова М.Г., Астахова Е.А., Спиридонова А.Б. и др. Стимуляция В-лимфоцитов человека *in vitro* с помощью ИЛ-21/CD40L и их характеристика. *Иммунология*. 2020;41(6): 501–10. Byazrova M.G., Astakhova E.A., Spiridonova A.B., et al. IL-21/CD40L stimulation of human B-lymphocytes *in vitro* and their characteristics. *Immunologiya*. 2020;41(6):501–10. DOI: https://doi.org/10.33029/0206-4952-2020-41-6-501-510 EDN: https://elibrary.ru/vesnlu
23. Whaley R.E., Ameny S., Arkatkar T., et al. Generation of a cost-effective cell line for support of high-throughput isolation of primary human B cells and monoclonal neutralizing antibodies. *J. Immunol. Methods.* 2021;488:112901. DOI: https://doi.org/10.1016/j.jim.2020.112901
24. Braham M., van Binnendijk R., Buisman A.M., et al. A synthetic human 3D *in vitro* lymphoid model enhancing B-cell survival and functional differentiation. *iScience*. 2022;26(1):105741. DOI: https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.105741
25. Kwakkenbos M.J., Diehl S.A., Yasuda E., et al. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat. Med.* 2010;16(1):123–8. DOI: https://doi.org/10.1038/nm.2071
26. Smith S.A., Crowe J.E.Jr. Use of human hybridoma technology to isolate human monoclonal antibodies. *Microbiol. Spectr.* 2015;3(1):AID-0027-2014. DOI: https://doi.org/10.1128/microbiolspec.AID-0027-2014
27. Debs B.E., Utharala R., Balyasnikova I.V., et al. Functional single-cell hybridoma screening using droplet-based microfluidics. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2012;109(29):11570–5. DOI: https://doi.org/10.1073/pnas.1204514109
28. Seah Y.F.S., Hu H., Merten C.A. Microfluidic single-cell technology in immunology and antibody screening. *Mol. Aspects Med.* 2018;59:47–61. DOI: https://doi.org/10.1016/j.mam.2017.09.004
29. Rutkauskaite J., Berger S., Stavrakis S., et al. High-throughput single-cell antibody secretion quantification and enrichment using droplet microfluidics-based FRET assay. *iScience*. 2022;25(7):104515. DOI: https://doi.org/10.1016/j.isci.2022.104515
30. Moraes J.Z., Hamaguchi B., Braggion C., et al. Hybridoma technology: is it still useful? *Curr. Res. Immunol.* 2021;2:32–40. DOI: https://doi.org/10.1016/j.crimmu.2021.03.002
31. Sakaguchi A., Tanaka Y., Shoji E., et al. Rapid, simple, and effective strategy to produce monoclonal antibodies targeting protein structures using hybridoma technology. *J. Biol. Eng.* 2023;17(1):24. DOI: https://doi.org/10.1186/s13036-023-00345-9
32. Chen Z., Wang G. Progress and perspectives of rabbit monoclonal antibodies. *Blood&Genomics.* 2023;7(1):13–21. DOI: https://doi.org/10.46701/BG.2023012022038
33. Печелюлько А.А., Тараканова Ю.Н., Дмитриев Д.А. и др. Сравнительный анализ эффективности использования антител птиц и млекопитающих в сэндвич-методе определения HBsAg. *Прикладная биохимия и микробиология.* 2017;53(1):104–14. Pechelyul'ko A.A., Tarakanova Yu.N., Dmitriev D.A., et al. A comparative analysis of the efficiency of bird and mammalian antibodies in HBsAg sandwich assay. *Applied Biochemistry and Microbiology.* 2017;53(1):114–22. DOI: https://doi.org/10.1134/S0003683817010136 EDN: https://elibrary.ru/yvdkyr
34. Fang J.C., Bodeus M., Burtonboy G. Study on rat-rat hybridoma technique and production of rat monoclonal antibodies against HIV and HBsAg. *Chin. J. Biotechnol.* 1991;7(1):73–81.
35. Силкина М.В., Карцева А.С., Рябко А.К. и др. Оптимизация условий электрослияния для получения гибридом, синтезирующих человеческие моноклональные антитела. *Биотехнология*. 2021;37(2):65–75. Silkina M.V., Kartseva A.S., Ryabko A.K., et al. Optimization of electrofusion parameters for producing hybridomas synthesizing human monoclonal antibodies. *Biotechnology in Russia.* 2021;37(2):65–75. DOI: https://doi.org/10.21519/0234-2758-2021-37-2-65-75 EDN: https://elibrary.ru/avptei
36. Kobayashi T., Namba M., Kohno M., et al. An improved iliac lymph node method for production of monoclonal antibodies. *Dev. Growth Differ.* 2022;64(1):38-47. DOI: https://doi.org/10.1111/dgd.12766
37. Başalp A., Yücel F. Development of mouse hybridomas by fusion of myeloma cells with lymphocytes derived from spleen, lymph node, and bone marrow. *Hybrid. Hybridomics*. 2003;22(5): 329–31. DOI: https://doi.org/10.1089/153685903322538863
38. Dura B., Liu Y., Voldman J. Deformability-based microfluidic cell pairing and fusion. *Lab Chip.* 2014;14(15):2783–90. DOI: https://doi.org/10.1039/c4lc00303a
39. Колоскова Е.М., Каркищенко В.Н., Езерский В.А. и др. Трансгенные и нокаутные кролики в биомедицине и генотерапии. CRISPR/Cas9-технологии (обзор). *Биомедицина*. 2019;(4):12–33. Koloskova E.M., Karkishchenko V.N., Ezerskii V.A., et al. Rabbit biomodels of human diseases developed using new genomic technologies. CRISPR/Cas9. *Biomedicine*. 2019;(4):12–33. DOI: https://doi.org/10.33647/2074-5982-15-4-12-33 EDN: https://elibrary.ru/yrwzbt
40. Isozaki Y., Tsumoto K., Tomita M. Class-switching of B lymphocytes by DNA and cell immunization for stereospecific monoclonal antibodies against native GPCR. *Immuno*. 2021;1(4):432–41. DOI: https://doi.org/10.3390/immuno1040031

41. Srivastava V., Nand K.N., Ahmad A., Kumar R. Yeast-based virus-like particles as an emerging platform for vaccine development and delivery. *Vaccines (Basel).* 2023;11(2):479. DOI: https://doi.org/10.3390/vaccines11020479
42. Pechelyulko A., Dmitriev D., Lavrov V., et al. A simple method to purify recombinant HCV core protein expressed in *Pichia pastoris* for obtaining virus-like particles and producing monoclonal antibodies. *Protein Expr. Purif.* 2021;183:105864. DOI: https://doi.org/10.1016/j.pep.2021.105864
43. Ardiani A., Higgins J.P., Hodge J.W. Vaccines based on whole recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells. *FEMS Yeast Res.* 2010;10(8):1060–9. DOI: https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00665.x
44. Kumar R., Kumar P. Yeast-based vaccines: new perspective in vaccine development and application. *FEMS Yeast Res.* 2019; 19(2):foz007. DOI: https://doi.org/10.1093/femsyr/foz007
45. Ivanova E. Yeasts in nanotechnology-enabled oral vaccine and gene delivery. *Bioengineered*. 2021;12(1):8325–35. DOI: https://doi.org/10.1080/21655979.2021.1985816
46. Silva A.J.D., Rocha C.K.D.S., de Freitas A.C. Standardization and key aspects of the development of whole yeast cell vaccines. *Pharmaceutics*. 2022;14(12):2792. DOI: https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122792
47. Austriaco N. Yeast oral vaccines against infectious diseases. *Front. Microbiol.* 2023; 14: 1150412. DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1150412
48. Kim H.J., Lee J.Y., Kang H.A., et al. Oral immunization with whole yeast producing viral capsid antigen provokes a stronger humoral immune response than purified viral capsid antigen. *Lett. Appl. Microbiol.* 2014;58(3):285–91. DOI: https://doi.org/10.1111/lam.12188
49. Cho S.Y., Kim H.J., Lan N.T., et al. Oral vaccination through voluntary consumption of the convict grouper *Epinephelus septemfasciatus* with yeast producing the capsid protein of red-spotted grouper nervous necrosis virus. *Vet. Microbiol.* 2017;204:159–64. DOI: https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.04.022
50. Pambudi S., Sulfianti A., Widayanti T., et al. Humoral and cellular immunity in mice immunized with whole recombinant yeast expressing complex NS2B/NS3 protein of dengue serotype 3. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.* 2021;913(1):012083. DOI: https://doi.org/10.1088/1755-1315/913/1/012083
51. Bal J., Luong N.N., Park J., et al. Comparative immunogenicity of preparations of yeast-derived dengue oral vaccine candidate. *Microb. Cell Fact.* 2018;17(1):24. DOI: https://doi.org/10.1186/s12934-018-0876-0
52. Tabll A., Abbas A.T., El-Kafrawy S., Wahid A. Monoclonal antibodies: Principles and applications of immmunodiagnosis and immunotherapy for hepatitis C virus. *World J. Hepatol.* 2015;7(22):2369–83. DOI: https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i22.2369
53. Aoyagi K., Ohue C., Iida K., et al. Development of a simple and highly sensitive enzyme immunoassay for hepatitis C virus core antigen. *J. Clin. Microbiol.* 1999;37(6):1802–8. DOI: https://doi.org/10.1128/JCM.37.6.1802-1808.1999
54. Freiman J.M., Tran T.M., Schumacher S.G., et al. Hepatitis C core antigen testing for diagnosis of hepatitis C virus infection. *Ann. Intern. Med.* 2016;165(5):345–55. DOI: https://doi.org/10.7326/M16-0065
55. Treatment Action Group. *2020 Pipeline Report: HCV Diagnostics.* New York; 2020.
56. Vidal-Alcántara E.J., Mas V., Yélamos M.B., et al. Production and characterization of monoclonal antibodies for the detection of the hepatitis C core antigen. *Front. Mol. Biosci.* 2023;10: 1225553. DOI: https://doi.org/10.3389/fmolb.2023.1225553
57. Jansons J., Sominskaya I., Petrakova N., et al. The immunogenicity in mice of HCV core delivered as DNA is modulated by its capacity to induce oxidative stress and oxidative stress response. *Cells*. 2019;8(3):208. DOI: https://doi.org/10.3390/cells8030208
58. Bailey J.R., Barnes E., Cox A.L. Approaches, progress, and challenges to hepatitis C vaccine development. *Gastroenterology*. 2019;156(2):418–30. DOI: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.08.060
59. Kinchen V.J., Cox A.L., Bailey J.R. Can broadly neutralizing monoclonal antibodies lead to a hepatitis C virus vaccine? *Trends Microbiol.* 2018;26(10):854–64. DOI: https://doi.org/10.1016/j.tim.2018.04.002
60. Moxon R., Reche P.A., Rappuoli R. Editorial: reverse vaccinology. *Front. Immunol.* 2019;10:2776. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.02776
61. Pantaleo G., Correia B., Fenwick C., et al. Antibodies to combat viral infections: development strategies and progress. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2022;21(9):676–96. DOI: https://doi.org/10.1038/s41573-022-00495-3
62. Kinchen V.J., Bailey J.R. Defining breadth of hepatitis C virus neutralization. *Front. Immunol.* 2018;9:1703. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01703
63. Desombere I., Mesalam A.A., Urbanowicz R.A., et al. A novel neutralizing human monoclonal antibody broadly abrogates hepatitis C virus infection *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res.* 2017;148:53–64. DOI: https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2017.10.015
64. Tarr A.W., Owsianka A.M., Jayaraj D., et al. Determination of the human antibody response to the epitope defined by the hepatitis C virus-neutralizing monoclonal antibody AP33. *J. Gen. Virol.* 2007;88(Pt. 11):2991–3001. DOI: https://doi.org/10.1099/vir.0.83065-0
65. Schofield D.J., Bartosch B., Shimizu Y.K., et al. Human monoclonal antibodies that react with the E2 glycoprotein of hepatitis C virus and possess neutralizing activity. *Hepatology*. 2005;42(5):1055–62. DOI: https://doi.org/10.1002/hep.20906
66. Yokokawa H., Shinohara M., Teraoka Y., et al. Patient-derived monoclonal antibody neutralizes HCV infection *in vitro* and *vivo* without generating escape mutants. *PLoS One.* 2022;17(9): e0274283. DOI: https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274283
67. Skinner N.E., Ogega C.O., Frumento N., et al. Convergent antibody responses are associated with broad neutralization of hepatitis C virus. *Front. Immunol.* 2023;14:1135841. DOI: https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1135841

Информация об авторах

Массино Юлия Сергеевна — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0002-1165-2712

Тараканова Юлия Николаевна✉ — к.б.н., зав. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, ytarakanova@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3226-5989

Сегал Ольга Леонидовна — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0002-6621-236X

Information about the authors:

Yulia S. Massino — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0002-1165-2712

Yulia N. Tarakanova✉ — Cand. Sci. (Biol.), Head, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, ytarakanova@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-3226-5989

Olga L. Segal — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0002-6621-236X

Печелюлько Анастасия Александровна — н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0002-6628-1576

Яковлева Динора Абдуллаевна — к.м.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0001-8771-4177

Личутина Мария Владимировна — м.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0001-9579-7865

Дмитриев Дмитрий Александрович — к.б.н., с.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0002-7397-6499

Дмитриев Александр Дмитриевич — д.б.н., в.н.с. лаб. диагностики вирусных инфекций отдела вирусологии НИИВС им. И.И. Мечникова, Москва, Россия, https://orcid.org/0000-0002-1132-3708

Участие авторов. *Массино Ю.С., Тараканова Ю.Н.* — концепция и дизайн исследования, сбор и анализ источников, написание и редактирование текста; *Сегал О.Л., Яковлева Д.А., Печелюлько А.А.* — сбор источников, редактирование текста; *Личутина М.В., Дмитриев Д.А., Дмитриев А.Д.* — редактирование текста. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 10.01.2024;
принята к публикации 08.04.2024;
опубликована 29.06.2024

Anastasia A. Pechelyulko — researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0002-6628-1576

Dinora A. Yakovleva — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0001-8771-4177

Maria V. Lichutina — junior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0001-9579-7865

Dmitriy A. Dmitriev — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0002-7397-6499

Alexander D. Dmitriev — D. Sci. (Biol.), leading researcher, Laboratory of diagnostics of viral infections, Department of virology, I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russia, https://orcid.org/0000-0002-1132-3708

Author contribution. *Massino Y.S., Tarakanova Yu.N.* — concept and design of the study, collection and analysis of sources, writing and editing the text of the article; *Segal O.L., Yakovleva D.A., Pechelyulko A.A.* — collection of sources, editing the text of the publication; *Lichutina M.V., Dmitriev D.A., Dmitriev A.D.* — editing the text of the publication. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 10.01.2024;
accepted for publication 08.04.2024;
published 29.06.2024