

ГЕКСОН КАК ОСНОВНОЙ БЕЛОК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ВЫЯВЛЯЮЩИХ АДЕНОВИРУСЫ РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ

Т.А. Тимошичева¹, Я.А. Забродская^{1,2}, И.В. Амосова¹

¹ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

² НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Инфекционные заболевания вирусной этиологии являются одной из важнейших проблем здравоохранения. В России ежегодно регистрируется около 50 млн случаев инфекционных заболеваний, до 90% из которых приходится на долю острых респираторных вирусных инфекций. В неэпидемические по гриппу сезоны в качестве основных возбудителей ОРВИ выступают аденовирусы, респираторно-синцитиальный вирус, вирусы парагриппа и др. Инфекционные заболевания, вызванные аденовирусами, характеризуется полиморфизмом проявлений, что делает их интересными для изучения и в то же время сложными для клинической диагностики. Применение быстрых, чувствительных и специфичных тестов является актуальным для рутинной клинической лабораторной практики. Для дифференциальной диагностики аденовирусных инфекций в России широко применяются иммуноферментный и иммунофлуоресцентный анализ с применением поликлональных специфичных сывороток, характер и спектр реагирования которых зависит от особенностей иммунного ответа животного-производителя и состава вырабатываемых антител. Включение в состав современных иммунологических тестов моноклональных антител, направленных к определенным антигенным детерминантам в составе вируса, определяет высокую чувствительность, специфичность и необходимый уровень стандартизации препаратов. Гексон аденовирусов содержит родоспецифические антигены и обладает достаточно консервативной аминокислотной последовательностью среди аденовирусов разных типов. Кроме того, этот белок синтезируется в инфицированных клетках в больших количествах и может быть получен в нативной форме, что определило его использование в качестве иммуногена для получения моноклональных антител, способных выявлять аденовирусы различных типов. Получена панель моноклональных антител к гексону аденовируса. Изучены их биологические и диагностические свойства. По результатам вестерн блоттинга можно заключить, что все моноклональные антитела связываются с олигомерами гексона в составе аденовируса. Специфическая активность новых моноклональных антител в отношении аденовирусов разных типов исследована методами иммуноферментного и непрямого иммунофлуоресцентного анализа. Наибольшей специфической активностью в иммуноферментном анализе обладают моноклональные антитела 4В7 и 6В12, титр антител составил 10^{-6} . Наибольшей активностью в отношении различных типов аденовирусов в непрямом иммунофлуоресцентном анализе обладали моноклональные антитела 6В12, при использовании которых в инфицированных аденовирусами 3, 4, 6 и 19 типов клетках наблюдалась яркая гранулярная флуоресценция

Адрес для переписки:

Тимошичева Татьяна Александровна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России.
Тел.: 8 (812) 499-15-84.
E-mail: tatianatim@mail.ru

Contacts:

Tatyana A. Timoshicheva
117997, Russian Federation, St. Petersburg, prof. Popov str., 15/17,
Smorodintsev Research Institute of Influenza.
Phone: +7 (812) 499-15-84.
E-mail: tatianatim@mail.ru

Библиографическое описание:

Тимошичева Т.А., Забродская Я.А., Амосова И.В. Гексон как основной белок для получения моноклональных антител, выявляющих аденовирусы различных типов // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 1. С. 47–56. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-47-56

Citation:

Timoshicheva T.A., Zabrodskaya Ya.A., Amosova I.V. Hexon-based scaffold for generation of diagnostic monoclonal antibodies against diverse adenovirus types // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 1, pp. 47–56. doi: 10.15789/2220-7619-2019-1-47-56

преимущественно ядерной локализации. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования новых моноклональных антител 4B7 и 6B12 для конструирования современных диагностических тест-систем.

Ключевые слова: аденовирус, гексон, моноклональные антитела, диагностика, иммуноферментный анализ, иммунофлуоресцентный анализ.

HEXON-BASED SCAFFOLD FOR GENERATION OF DIAGNOSTIC MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST DIVERSE ADENOVIRUS TYPES

Timoshicheva T.A.^a, Zabrodskaya Ya.A.^{a,b}, Amosova I.V.^a

^a Smorodintsev Research Institute of Influenza of the Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russian Federation

^b Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC "Kurchatov Institute", St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Infectious diseases hold one of the most crucial places in healthcare. In Russia, annual prevalence of infectious diseases comprises around 50 million cases, wherein acute respiratory viral infections cover up to 90%. In non-influenza (non-peak) season, adenoviruses, respiratory syncytial virus, parainfluenza viruses etc. represent the main infectious cause of acute respiratory viral infections. Adenovirus-induced infections are characterized by heterogeneous manifestations posing them both as an interesting challenge, yet difficult in clinical diagnostics. Use of rapid, sensitive and specific tests is of high priority for routine clinical laboratory practice. In Russia, differential diagnostics of adenoviral infections includes a widely used ELISA and immunofluorescence analysis based on polyclonal specific sera. Importantly, a pattern and range of specific reactions depend on origin of animal-derived antibodies and their composition. Introduction of monoclonal antibodies specific to certain viral antigenic epitopes ensures high sensitivity and specificity allowing to reach an expected standardization level for such diagnostic products. Adenovirus hexon protein bears genus-specific antigens and relatively conserved amino acid sequence among diverse adenoviruses. Moreover, it is produced at high amount in infected cells and may be purified in a native form. Moreover, it is produced at high amount in infected cells and may be purified in a native form, thereby posing it as a promising antigen for producing monoclonal antibodies able to detect various adenoviruses types. A panel of adenovirus hexon-specific monoclonal antibodies was generated, which were further examined for biological and diagnostics properties. Western blotting data allowed to conclude that all of monoclonal antibodies generated by us were able to bind to adenovirus hexon oligomers. Specific activity of the new monoclonal antibodies against various adenovirus types was examined by ELISA and indirect immunofluorescence assay. In particular, monoclonal antibodies 4B7 and 6B12 were shown display top specific activity measured by ELISA (antibody titers comprised as high as 10^{-6}). Moreover, monoclonal antibody 6B12 exhibited peak hexon-specific activity assessed in indirect immunofluorescence assay (against various adenovirus types), which resulted in prominent granular nuclear fluorescence in cells infected with adenovirus types 3, 4, 6, and 19. Thus, the data obtained evidence that monoclonal antibodies developed 4B7 and 6B12 may be potentially used for developing high-quality adenovirus-specific diagnostic assays.

Key words: adenovirus, hexon, monoclonal antibodies, diagnostics, enzyme-linked immunosorbent assay, immunofluorescence assay.

Инфекционные заболевания вирусной этиологии остаются одной из важнейших проблем здравоохранения. В России ежегодно регистрируется около 50 млн случаев инфекционных заболеваний, до 90% из которых приходится на долю острых респираторных вирусных инфекций (ОРВИ) [3]. В неэпидемические по гриппу сезоны в качестве основных возбудителей ОРВИ выступают аденовирусы (АВ), респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), вирусы парагриппа и др. [19].

АВ обычно вызывают инфекционные заболевания, поражающие верхний или нижний отделы дыхательного тракта, глотку, конъюнктиву или желудочно-кишечный тракт. Вспышки АВ инфекций (АВИ) могут возникать в течение всего года не только среди лиц с ослабленным иммунитетом, но и среди здоровых детей или взрослых в закрытых коллективах (в частнос-

ти, военнослужащих), а также в домах престарелых, специализированных медицинских учреждениях и летних лагерях. Доля АВ среди детей и молодых людей призывного возраста в общей структуре ОРВИ может достигать 30 и 64,6% соответственно [4, 20]. В большинстве случаев для заболеваний, вызванных АВ, характерно благоприятное течение в виде респираторных заболеваний. Однако случаи развития диссеминированной инфекции или пневмонии с фатальными последствиями могут возникать как у иммунокомпетентных пациентов, так и у пациентов с ослабленным иммунитетом.

По биологическим, химическим, иммунологическим и морфологическим свойствам АВ делятся на 7 групп (А-Г). Патогенными для человека являются около 50 типов АВ, что определяет многообразие клинических проявлений АВИ (табл. 1) [1].

Таблица 1. Клинические проявления аденовирусной инфекции в зависимости от типа аденовируса

Table 1. Adenovirus type-specific clinical manifestations

Группа АВ AV group	Типы АВ AV types	Характер заболевания Course of the disease	Группы риска Risk groups
A	12, 18, 31, 61	Гепатиты, гастроэнтериты Hepatitis, gastroenteritis	Дети, пациенты с трансплантацией органов Children, organ transplantation patients
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	ОРВИ, острый геморрагический цистит, гастроэнтериты ARVI, acute hemorrhagic cystitis, gastroenteritis	Новобранцы, курсанты военных училищ, дети Recruits, military school cadets, children
C	1, 2, 5, 6	Фарингиты Pharyngitis	Дети Children
D	8–10, 13, 15, 17, 19, 19a, 19p, 20, 22–30, 32, 33, 36–39, 42–49, 51	Эпидемические и спорадические кератоконъюнктивиты Epidemic and sporadic keratoconjunctivitis	Все группы населения All human cohorts
E	4	ОРВИ, фолликулярные конъюнктивиты ARVI, follicular conjunctivitis	Новобранцы, курсанты военных училищ, все группы населения Recruits, military school cadets, all human cohorts
F	40	Гастроэнтериты Gastroenteritis	Дети младшего возраста Young children
G	41, 52	Гастроэнтериты Gastroenteritis	Дети младшего возраста Young children

В настоящее время для дифференциальной диагностики АВИ в клинических материалах используют методы обнаружения ДНК [полимеразная цепная реакция (ПЦР)] и специфических вирусных антигенов [метод иммунофлуоресценции (ИФЛ); иммуноферментный анализ (ИФА)]. В России широко применяются ИФА и ИФЛ с применением поликлональных специфичных сывороток. Основным недостатком этого типа иммунореагентов является нестабильность их антигенового состава, зависящая от особенностей иммунного ответа продуцента. Включение в состав современных иммунологических тестов моноклональных антител (МКА), направленных к определенным антигенным детерминантам в составе вируса, определяет высокую чувствительность, специфичность и необходимый уровень стандартизации препаратов [10].

Аденовирус представляет собой ДНК-содержащий вирус, вирион которого имеет правильную геометрическую форму икосаэдра, образованного белками гексона, пентона и фибриллы. В каждой вирусной частице содержится по 12 молекул белков пентона и фибриллы, которые несут в своем составе типоспецифичные антигены, что не позволяет выявлять разные типы обширного семейства АВ с помощью МКА, направленных к этим белкам. Белок гексона составляет около 60% массы вирионов АВ и несет в своем составе обширный консервативный участок с родоспецифическими детерминантами. Вариабельность аминокислотного состава этого участка гексона составляет менее 15% [8]. В инфицированных клетках гексон

синтезируется в избытке: только 20–30% белка используется для сборки вирусных частиц, что дает возможность сравнительно легко получать гексон в нативной форме и использовать полученные к нему МКА для детекции АВ различных типов в клинических материалах.

В лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России получена панель МКА, направленных к гексону АВ, исследованы их биологические свойства.

Материалы и методы

Клеточные культуры и вирусы. Клеточные культуры А 549 (карцинома легкого человека), МА-104 (эпителий почки эмбриона макаки), АВ 3, 4, 6 и 19 типов и РСВ (штамм Long) получены из коллекции ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Получение очищенных вирусных концентратов. АВ накапливали в культуре клеток А 549 в течение 72 ч, РСВ — в культуре клеток МА-104 в течение 120 ч при 37°C до появления выраженного цитопатического действия вирусов. Из вирусосодержащей культуральной жидкости (ВКЖ) методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности сахарозы получали очищенные АВ и РСВ [17].

Получение очищенного гексона. Гексон получали из ВКЖ АВ 6 типа согласно [7].

Оптическая микроскопия проводилась на световом микроскопе Axiovert 40C при увеличении ×100 (Karl Zeiss, Германия).

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) проводили в денатурирующих условиях согласно [13] с использованием 8% разделяющего и 4% концентрирующего гелей. Образцы (гексон АВ 6 типа в концентрации 0,2 мг/мл; очищенный концентрат АВ 6 типа в концентрации 0,5 мг/мл) подготавливали в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях, с добавлением или без добавления бета-меркаптоэтанола в буфер Лэммли соответственно, денатурацию проводили при 70°C в течение 20 мин. Для получения олигомеров гексона в частично денатурирующих условиях очищенный концентрат АВ 6 типа в буфере Лэммли без бета-меркаптоэтанола выдерживали при +4°C в течение 1,5 ч [9]. На дорожку 15-луночного геля наносили по 5 мкл образца. В качестве маркера молекулярных масс использовали Precision Plus Protein Unstained Standards (Bio-Rad, США). После окончания ЭФ гель окрашивали коллоидным раствором Кумасси согласно [5]. Изображения геля визуализировали при помощи системы ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США). Электрофоретическую подвижность окрашенных зон оценивали по маркеру молекулярных масс в программном обеспечении прибора.

Масс-спектрометрия. Ферментативный гидролиз белков в геле трипсином проводили согласно [15], минуя этап восстановления дисульфидных связей и их модификации йод-ацетамидом. Вырезанные фрагменты геля, содержащие интересующие окрашенные зоны, отмывали от красителя дважды по 15 мин 30 мМ NH₄HCO₃, 40% ацетонитрилом и обезвоживали ацетонитрилом. После полного испарения ацетонитрила к гелю добавляли 20 мкг/мл свиного трипсина (Promega, США) в 50 мМ NH₄HCO₃. Ферментативный гидролиз проводили в течение 5 ч при 37°C. Реакцию останавливали раствором 0,5% трифторуксусной кислоты с 10% ацетонитрила. Полученные триптические пептиды смешивали с матрицей HCCA (Bruker, США), наносили на мишень GroundSteel (Bruker, США) и анализировали на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре ultrafleXtreme (Bruker, США) в режиме регистрации положительных ионов. Для каждого спектра суммировали 5000 импульсов лазера. Идентификация белков осуществлялась с использованием MASCOT (matrixscience.com) при обращении к базе данных NCBI (National Center of Biotechnology Information, ncbi.nlm.nih.gov). В качестве переменных модификаций указывали окисление метионинов. Погрешность ограничили 20 ppm.

Приготовление тест-объектов (ТО). Монослойные клеточные культуры А 549 и МА-104, выращенные в 96-луночных культуральных

планшетах (Nunc, Дания), заражали АВ (3, 4, 6 и 19 типов) и РСВ, соответственно, в дозе 100 ТЦД₅₀ и инкубировали в СО₂-инкубаторе при температуре 37°C. Через 72 ч после заражения планшеты фиксировали 80% охлажденным ацетоном и хранили при температуре 4°C в течение месяца.

Получение гибридом-продуцентов МКА к гексону АВ. МКА получены в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России по методу [12]. Мышей линии BALB/c двукратно иммунизировали гексоном по 50 и 30 мкг на мышью с интервалом в 6 недель. Через 3 дня после второй иммунизации проводили гибридизацию спленоцитов иммунизированных мышей с клетками мышиной миеломы. Через 2 недели после слияния проводили тестирование антител, продуцируемых гибридомами.

Метод микрокультурального ИФА (мКИФА) использован для первичного тестирования гибридом-продуцентов МКА [2]. Культуральную среду, содержащую исследуемые МКА, наносили на ТО по 100 мкл/лунку. Связавшиеся МКА детектировали при помощи пероксидазного конъюгата к IgG мыши (Sigma, США) с последующим добавлением субстратной смеси, содержащей тетраметилбензидин. Оптическую плотность регистрировали при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀).

Получение МКА к гексону АВ в асцитной форме. Гибридомы, продуцирующие МКА с требуемым спектром реагирования, реклонировали и вводили в мышью линии BALB/c для накопления МКА в асцитной форме. Фракции иммуноглобулинов из асцитной жидкости выделяли двукратным высаливанием сульфатом аммония.

Вестерн блоттинг. Неокрашенный ПААГ после ЭФ, нитроцеллюлозную мембрану (0,2 мкм, Bio-Rad, США) и фильтровальную бумагу для блоттинга (Bio-Rad, США) инкубировали 15 мин в 49,7 мМ трис, 38,6 мМ глицин, 0,0375% додецилсульфат натрия, 20% этанол. Полусухой перенос проводили 40 мин в ячейке Trans-Blot Turbo (Bio-Rad, США) по протоколу производителя. Перенос белков на мембрану подтверждали ее окрашиванием ATX Ponceau S red (Fluka, Германия). Мембрану отмывали дважды фосфатно-солевым буфером (ФСБ), содержащим 0,5% твин-20 (ФСБТ), после чего инкубировали в 5% блокирующем реагенте (Bio-Rad, США), разведенном в ФСБТ, в течение 16 ч. Исследуемые МКА и вторичные антитела GAM-HRP (Bio-Rad, США), разбавляли в 5% блокирующем реагенте (Bio-Rad, США), разведенном в ФСБТ, и инкубировали по 1 ч с промежуточной отмывкой ФСБТ. Для последующей визуализации маркера молекулярных

масс вместе со вторыми антителами добавляли StrepTactin-HRP conjugate (Bio-Rad, США). Мембраны проявляли Clarity Western ECL (Bio-Rad, США), хемилюминесценцию регистрировали на ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad, США).

Определение специфической активности МКА методом ИФА. В 96-луночные планшеты (Медполимер, Россия), предварительно сенсibilизированные очищенным АВ 6 типа в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 16 ч, вносили 10-кратные разведения МКА, начиная с концентрации 5 мкг/мл. Связавшиеся с АВ антигеном МКА детектировали с помощью пероксидазного конъюгата антител к IgG мыши (Sigma, США). В качестве отрицательного контроля использовали очищенный РСВ в концентрации 2,5 мкг/мл.

Непрямой иммунофлуоресцентный анализ (ИИФЛ). Двукратные разведения МКА, начиная с концентрации 20 мкг/мл, вносили в лунки ТО. Через 30 мин связавшиеся с АВ антигеном МКА детектировали конъюгатом флуоресцеин изотиоцианата (ФИТЦ) с антимышиными антителами (Sigma, США). Окрашенные ТО анализировали под люминесцентным микроскопом Axioskop 40 (Karl Zeiss, Германия) при увеличении $\times 400$.

Получение пероксидазных конъюгатов МКА осуществляли периодатным методом в соответствии с [16].

Конкурентный ИФА. 96-луночные планшеты (Медполимер, Россия) сенсibilизировали очищенным АВ 6 типа в концентрации 2,5 мкг/мл в течение 16 ч при 4°C. Затем в лунки вносили равные объемы 10-кратных разведений МКА и пероксидазных конъюгатов МКА в различных сочетаниях. Для оценки степени ингибирования связывания пероксидазных конъюгатов МКА в присутствии немеченых МКА сравнивали активность маркерного фермента иммунокомплекса, связанного с твердой фазой, в лунках с добавлением и без добавления МКА.

Результаты и обсуждение

Гексон АВ содержит родоспецифические антигены и обладает достаточно консервативной аминокислотной последовательностью среди АВ различных типов. Кроме того, этот белок синтезируется в инфицированных клетках в больших количествах и может быть получен в нативной форме, что определяет перспективность его использования в качестве иммуногена для получения МКА, способных выявлять АВ всех типов.

Гексон АВ 6 типа в кристаллическом виде (рис. 1) был получен в лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России.

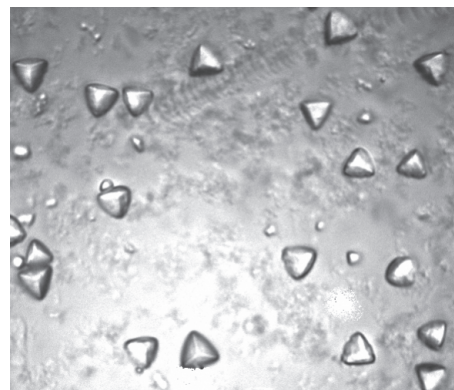


Рисунок 1. Очищенный гексон АВ 6 типа в кристаллическом виде

Figure 1. Crystallized purified AV type 6 hexon

Примечание. Световая микроскопия, увеличение $\times 100$
Note. Light microscopy, magnification $\times 100$

Для подтверждения аминокислотной последовательности и чистоты полученного гексона АВ 6 типа был проведен ЭФ в ПААГ (рис. 2) с последующей масс-спектрометрической идентификацией белков. В качестве контроля использовали очищенный АВ 6 типа. Оба образца были подготовлены в условиях образования мономера и олигомера гексона.

При окрашивании ПААГ раствором Кумасси (рис. 2) были выявлены белковые зоны, по элек-

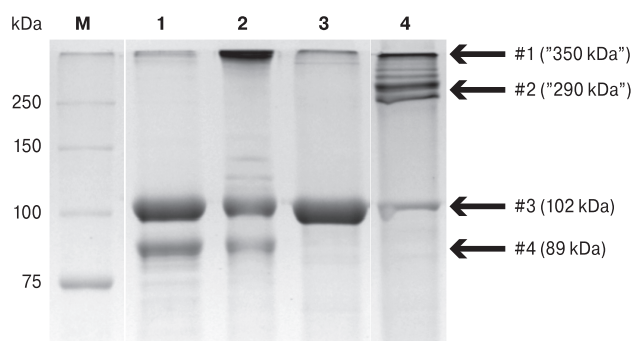


Рисунок 2. Результаты ЭФ в ПААГ. Окрашивание коллоидным раствором Кумасси

Figure 2. Hexon-based polyacrylamide gel electrophoresis data. Stained with colloidal Coomassie solution

1 — очищенный гексон в условиях образования мономера;
2 — очищенный гексон в условиях образования олигомера;
3 — очищенный концентрат АВ в условиях образования мономера гексона; 4 — очищенный концентрат АВ в условиях образования олигомера гексона.
M — маркер молекулярных масс.

1 — purified hexon under monomer-forming conditions;
2 — purified hexon under oligomer-forming conditions;
3 — purified AV under hexon monomer-forming conditions;
4 — purified AV under hexon oligomer-forming conditions.
M — molecular weight marker.

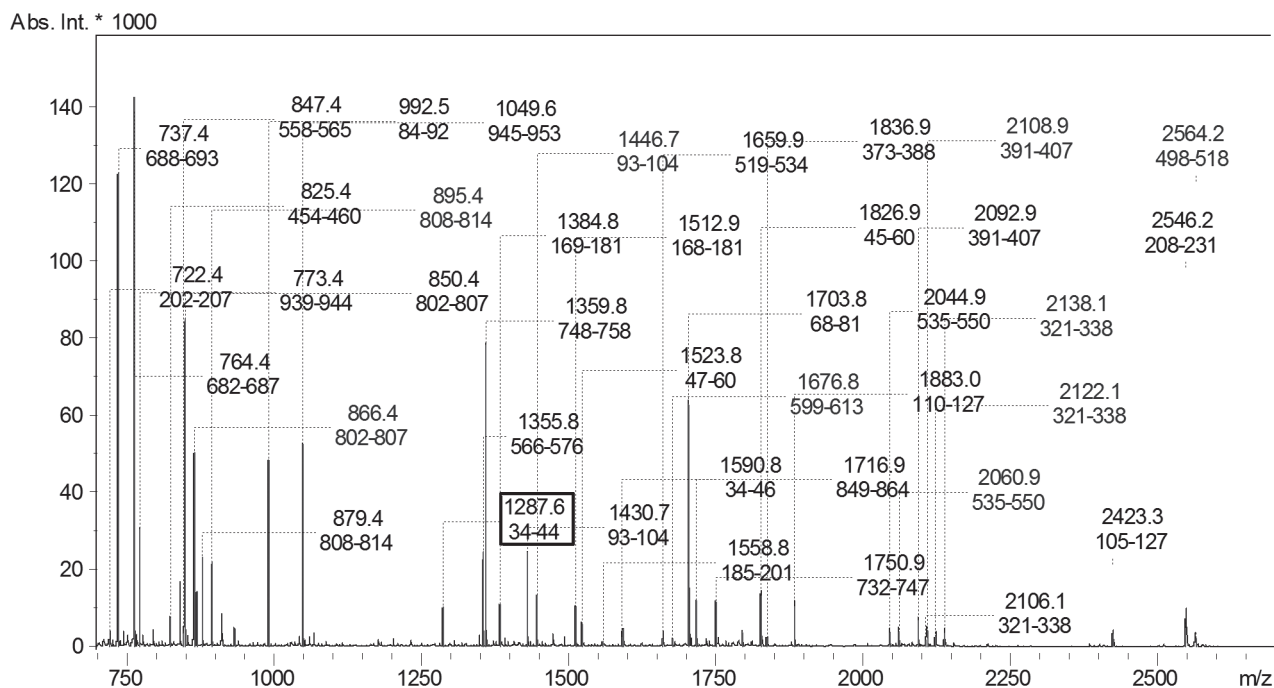


Рисунок 3. Фрагмент характерного MALDI масс-спектра, по которому был достоверно идентифицирован гексон АВ 6 типа

Figure 3. Hexon MALDI mass spectral fragmentation pattern. A hexon of AV type 6 was reliably identified

Примечание. Отмечены ионы, найденные в последовательности белка. Для каждого иона указаны его m/z (Da) и номер соответствующего ему аминокислотного остатка.

Note. Hexon-specific ions including m/z (Da) and position of relevant amino acid residue are denoted.

трофоретической подвижности соответствующие 90–100 kDa (#3 и #4) и около 300 kDa (#1 и #2) и представляющие собой по литературным данным мономеры и олигомеры гексона соответственно [11].

Для подтверждения аминокислотной последовательности гексона и его присутствия в зонах ПААГ, отмеченных стрелками на рисунке 2, они были вырезаны и подвергнуты масс-спектрометрическому исследованию. Характерный масс-спектр представлен на рисунке 3.

Методом MALDI масс-спектрометрии во всех образцах был достоверно идентифицирован белок «hexon [Human adenovirus 6]». Величина Score составила 412 при пороговом значении 76 (в случае, если Score превышает пороговое значение, идентификация считается достоверной, $p < 0,05$). На рисунке 3 отмечены ионы, найденные в последовательности белка. Для каждого иона указаны его m/z и номер соответствующего ему аминокислотного остатка (а.о.). Так, m/z обведенного в рамку иона — 1287,6 Da, а номера соответствующих ему а.о. в последовательности гексона — 34–44.

Очищенный гексон далее был использован для иммунизации мышей с целью получения специфичных к гексону МКА. При слиянии спленоцитов иммунизированных мышей с клетками миеломы было получено 11 гибридом, первичный скрининг которых проведен

методом мКИФА с использованием АВ, принадлежащих к различным группам (АВ 3 типа — группа В, АВ 4 типа — группа Е, АВ 6 типа — группа С, АВ 19 типа — группа D). Результаты мКИФА представлены в таблице 2.

При анализе результатов мКИФА положительными считали пробы, значение ОП₄₅₀ в которых превышало значение ОП₄₅₀ отрицательных контролей (неинфицированная клеточная культура А 549, гетерологичный РСВ) более, чем в 2 раза. МКА 2С3, 4G10, 6G10 взаимодействовали только с АВ 6 типа. МКА 2Н7, 3F12, 4В7, 5D4, 5E11, 6В12 специфически реагировали с АВ 3, 4, 6 и 19 типов. МКА 5А8 неспецифически взаимодействовал с отрицательными контролями. МКА 3F6 не обладали активностью в мКИФА.

Таким образом, по результатам первичного скрининга было отобрано 9 гибридом, продуцирующих МКА, специфично реагирующие с АВ 6 типа при отсутствии неспецифического взаимодействия с гетерологичным вирусом (РСВ) и неинфицированными клетками А 549.

Направленность полученных МКА к гексону была подтверждена методом вестерн-блоттинга (рис. 4).

По результатам вестерн-блоттинга можно заключить, что все МКА связываются преимущественно с олигомерами гексона в составе АВ, полученными в частично денатурирую-

Таблица 2. Результаты первичного скрининга моноклональных антител в микрокультуральном иммуноферментном анализе

Table 2. Baseline monoclonal antibody screening by cell-ELISA

МКА* MAbs*	ОП ₄₅₀ при тестировании клонов/OD ₄₅₀ signal					
	Типы АВ AV types				Отрицательные контроли Negative controls	
	АВ3 AV3	АВ6 AV6	АВ4 AV4	АВ19 AV19	РСВ RSV	А 549 A 549
2С3	0,040	0,91	0,058	0,051	0,052	0,054
2Н7	0,126	1,177	0,178	0,328	0,040	0,054
3F12	0,165	1,021	0,636	1,009	0,046	0,049
4В7	0,131	1,436	1,094	0,554	0,030	0,057
4G10	0,039	0,253	0,052	0,040	0,023	0,056
5D4	0,172	0,662	0,316	0,444	0,056	0,044
5E11	0,099	0,975	0,175	0,155	0,044	0,049
6B12	0,105	1,374	0,282	0,138	0,057	0,051
6G10	0,047	1,113	0,033	0,074	0,042	0,046
5A8	0,963	0,809	0,569	0,447	0,555	0,585
3F6	0,049	0,069	0,040	0,050	0,049	0,058

Примечание. *Культуральная гибридная жидкость в разведении 1:10.

Note. *Hybridoma-derived culture medium diluted at 1:10 ratio.

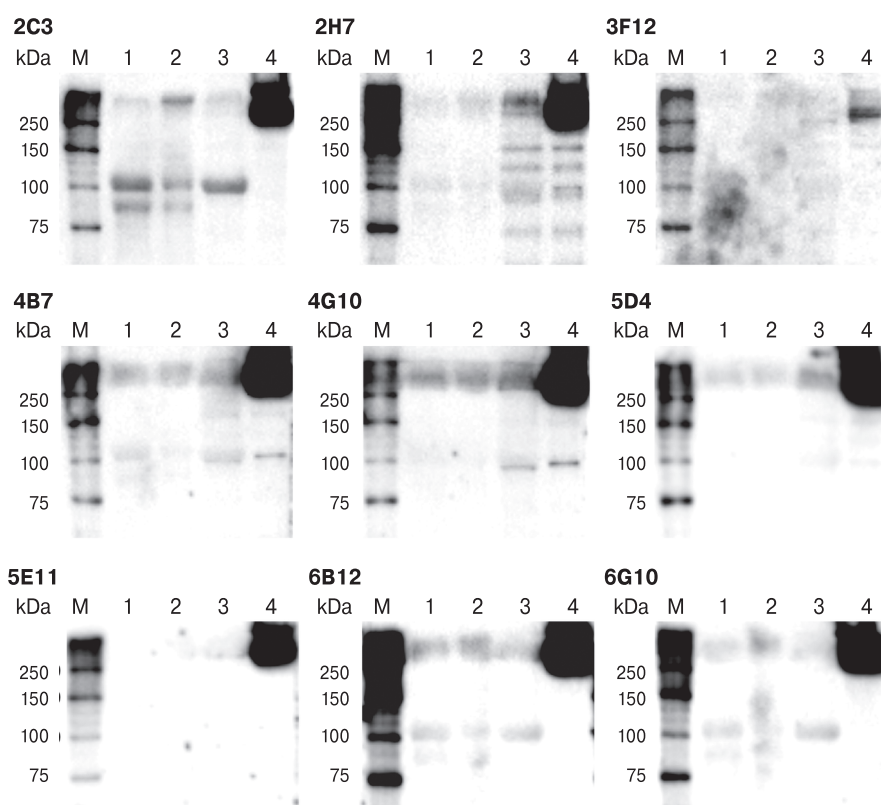
**Рисунок 4. Результаты изучения связывания полученных МКА с гексоном АВ 6 типа методом вестерн-блоттинга**

Figure 4. AV type 6 hexon-specific binding of monoclonal antibodies examined by Western blot

1 — очищенный гексон в условиях образования мономера; 2 — очищенный гексон в условиях образования олигомера; 3 — очищенный концентрат АВ в условиях образования мономера гексона; 4 — очищенный концентрат АВ в условиях образования олигомера гексона. М — маркер молекулярных масс.

1 — purified hexon under monomer-forming conditions; 2 — purified hexon under oligomer-forming conditions; 3 — purified AV under hexon monomer-forming conditions; 4 — purified AV under hexon oligomer-forming conditions. M — molecular weight marker.

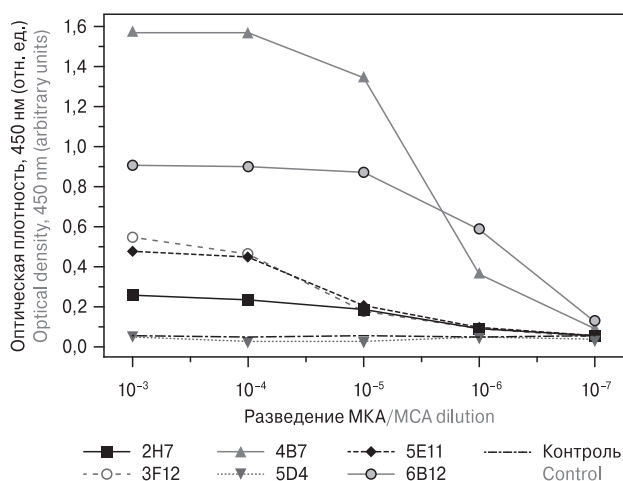


Рисунок 5. Активность выделенных из асцитной жидкости МКА (ОП₄₅₀) в отношении АВ 6 типа в зависимости от их разведения, определенная методом ИФА

Figure 5. Activity of ascites-derived AV type 6-specific serially diluted monoclonal antibodies assessed by ELISA (OD₄₅₀)

Примечание. На стадии захвата использован очищенный АВ 6 типа в концентрации 2,5 мкг/мл, на стадии детекции — пероксидазный конъюгат антител к IgG мыши (Sigma, США). В качестве отрицательного контроля выступал гетерологичный РСВ.

Note. For primary capture, purified AV 6 type was used at a concentration of 2.5 µg/ml. For detection, peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma, USA) were used. RSV was used as a negative (heterologous) control.

ших условиях (дорожки 4, зона, соответствующая электрофоретической подвижности более 250 kDa). В то же время эффективного связывания МКА с мономерной и олигомерной формой очищенного гексона в денатурирующих условиях не наблюдается. Следует отметить, что олигомеры очищенного гексона в денатурирующих условиях формируются за счет образования дисульфидных связей, чего не наблюдается в гексоне в составе АВ, что может объяснять отсутствие связывания этих олигомеров в вестерн блоттинге. Иными словами, полученные МКА связываются с пространственными эпитопами в составе олигомерной формы гексона АВ.

Таблица 3. Результаты тестирования МКА, выделенных из асцитной жидкости, методом непрямой иммунофлуоресценции

Table 3. Ascite-derived anti-adenovirus specific monoclonal antibody activity examined by indirect immunofluorescence

МКА* MAbs*	Типы АВ/AV types				Неинфицированная культура А 549 Uninfected A 549 cell line
	6	3	4	19	
4B7	++	+	+	+	-
6B12	++	++	++	++	-

Примечание. *Концентрация МКА 10 мкг/мл.

Note. *MAbs were used at concentration of 10 µg/ml.

МКА 2H7, 3F12, 4B7, 5D4, 5E11, 6B12, специфически реагирующие по результатам первичного скрининга с АВ различных типов, были переведены в асцитную форму. Активность МКА, выделенных из асцитной жидкости, была оценена методом ИФА с очищенным АВ 6 типа (рис. 5).

Наибольшей специфической активностью, определенной методом ИФА, обладали МКА 4B7 и 6B12 (титр антител составил 10⁻⁶), МКА 3F12 и 5E11 обладали меньшей активностью (титр антител составил 10⁻⁴), активность МКА 2H7 и 5D4 была слабовыраженной.

Активность МКА 4B7 и 6B12 в отношении различных типов АВ была также изучена методом ИФА (табл. 3, рис. 6).

МКА 4B7 и 6B12 выявляли АВ 3, 4, 6 и 19 типов в инфицированных клетках при отсутствии неспецифических реакций, однако интенсивность взаимодействия при этом была различной. При использовании МКА 6B12 наблюдалась яркая гранулярная флуоресценция преимущественно ядерной локализации в отношении всех исследованных типов АВ. Активность МКА 4B7, определенная методом ИФА, была менее выраженной, в отличие от высокой активности, показанной по результатам ИФА. Так, при исследовании ТО АВ 4 и 6 типов наблюдалась умеренная флуоресценция, а ТО АВ 3 и 19 типов флуоресценция была слабовыраженной. Это может быть связано с погружением вирусных эпитопов внутрь молекулы гексона в процессе формирования вторичных структур и их экранированием другими белковыми молекулами.

Перекрестная реактивность МКА 4B7 и 6B12 была изучена с помощью конкурентного ИФА. Экспериментальные серии пероксидазных конъюгатов МКА 4B7 (4B7-ПХК) и 6B12 (6B12-ПХК) использовали для исследования конкурентного ингибирования МКА.

При исследовании комбинаций МКА 4B7 с 4B7-ПХК и МКА 6B12 с 6B12-ПХК наблюдалось 90 и 93% ингибирование соответственно по сравнению с контролем (соответствующий пероксидазный конъюгат). При исследовании комбинации МКА 6B12 с 4B7-ПХК наблюдалось ингибирование на 16%. При исследовании

комбинации МКА 4В7 с 6В12-ПХК степень ингибирования достигала 79%. Вероятно, МКА 4В7 и 6В12 направлены к перекрывающимся пространственным эпитопам в составе гексона. Существенные различия в степени ингибирования при использовании разных комбинаций меченых и не меченых МКА могут быть объяснены более высокой авидностью к гексону МКА 4В7 по сравнению с МКА 6В12. В связи с этим МКА 4В7 быстрее специфически реагировали с антигенным эпитопом, препятствуя последующему связыванию с ним МКА 6В12.

Заключение

В настоящее время для получения МКА используется как гибридомная технология в практически неизменном виде с момента разработки ее авторами G. Köhler и S. Milstein [12], так и альтернативные методы, например, метод фагового дисплея [6]. МКА могут быть получены практически к любой молекуле белковой природы, углеводам, нуклеиновым кислотам и гаптенам, некоторые МКА обладают каталитической активностью [18], что делает потенциальный спектр применения МКА довольно широким.

МКА используются как для научных исследований, так и в медицинской практике. Одним из перспективных направлений является получение терапевтических МКА к возбудителям вирусных и бактериальных инфекций. Препараты на основе МКА успешно применяются при лечении некоторых видов рака (рак толстого кишечника, немелкоклеточный рак легких, глиобластома, метастазирующий рак почки) и аутоиммунных заболеваний (ревматоидный артрит, псориаз, болезнь Крона), а также для подавления иммунной системы после трансплантации органов [14].

В медицинской диагностике МКА являются обычным инструментом при проведении таких исследований как вестерн блоттинг, иммуногистохимия, иммуноцитохимия, ИФА, ИФЛ и проточный цитометрический анализ. Создание современных диагностических систем отечественного производства является од-

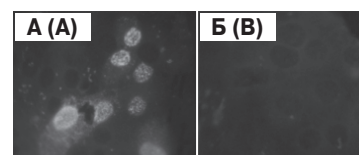


Рисунок 6. Характер специфической флуоресценции при использовании метода ИФЛ с применением МКА 6В12

Figure 6. Specific 6B12 monoclonal antibody-related fluorescent signal examined by indirect immunofluorescent analysis

Примечание. А — культура клеток А 549, зараженная АВ 6 типа, Б — неинфицированная культура клеток А 549. Увеличение $\times 400$.

Note. А — А 549 cells infected with AV type 6; В — mock infected A 549 cells. Magnification $\times 400$.

ним из приоритетных направлений, обозначенных в Комплексной программе развития биотехнологий в Российской Федерации на период до 2020 г.

Полученные МКА специфичны к гексону АВ, который является общим антигеном для всех представителей обширного семейства *Adenoviridae*. Изучены их биологические и диагностические свойства. Специфическая активность новых МКА в отношении респираторных АВ исследована в различных иммунологических реакциях. Результаты свидетельствуют о перспективности использования новых МКА для конструирования современных диагностических тест-систем.

Благодарности

Авторы выражают глубокую и искреннюю благодарность Царевой Татьяне Радистовне и Сорокину Евгению Валентиновичу за неоценимую помощь в работе с гибридомами-продуцентами моноклональных антител, Эдварду Рэмзи за помощь в работе над текстом статьи.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, Соглашение № 14.604.21.0180, уникальный идентификационный номер проекта RFMEFI60417X0180.

Список литературы/References

- Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Егорова А.А., Мусаева Т.Д., Писарева М.М., Едер В.А., Львов Н.И. Генетическое разнообразие аденовирусов, циркулирующих среди военнослужащих Северо-Западного региона // Вопросы вирусологии. 2017. Т. 6, № 62. С. 283–287. [Amosova I.V., Timoshicheva T.A., Egorova A.A., Musaeva T.D., Pisareva M.M., Eder V.A., Lvov N.I. Genetic diversity of adenoviruses circulating among the military in the North-West region. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2017, vol. 62, no. 6, pp. 283–287. doi: 10.18821/0507-4088-2017-62-6-283-287 (In Russ.)]
- Амосова И.В., Тимошичева Т.А., Сверлова М.В., Бузицкая Ж.В., Егорова А.А., Львов Н.И. Использование микрокультурального иммуноферментного анализа и модифицированного метода иммунофлуоресценции для диагностики аденовирусной инфекции // Клиническая лабораторная диагностика. 2017. Т. 62, № 4. С. 230–235. [Amosova I.V., Timoshicheva T.A., Sverlova M.V., Buzitskaya J.V., Egorova A.A., Lvov N.I. The application of micro-cultural enzyme-linked

- immunosorbent assay of modified immunofluorescence technique for diagnostic of adenovirus infection. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2017, vol. 62, no. 4, pp. 230–235. doi: 10.18821/0869-2084-2017-62-4-230-235 (In Russ.)
3. Горностаева Ю.А., Романова Т.С. Актуальные вопросы профилактики респираторных инфекций // Медицинский совет. 2012. № 7. С. 98–103. [Gornostaeva Y.A., Romanova T.S. Current issues in prevention of respiratory infections. *Meditsinskiy sovet = Medical Council*, 2012, no. 7, pp. 98–103. (In Russ.)]
 4. Яцышина С.Б., Агеева М.Р., Воробьева Н.С., Валдохина А.В., Елькина М.А., Горелов А.В., Малеев В.В., Покровский В.И. Аденовирусы в этиологической структуре острых респираторных вирусных инфекций в Москве в 2004–2014 гг. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2015. № 5. С. 50–57. [Yatsyshina S.B., Ageeva M.R., Vorobieva N.S., Valdokhina A.V., Elkina M.A., Gorelov A.V., Maleev V.V., Pokrovsky V.I. Adenoviruses in the etiological structure of acute respiratory viral infection in Moscow in 2004–2014. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2015, no. 5, pp. 50–57. (In Russ.)]
 5. Candiano G., Bruschi M., Musante L., Santucci L., Ghiggeri G.M., Carnemolla B., Orecchia P., Zardi L., Righetti P.G. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 2004, vol. 25, no. 9, pp. 1327–1333. doi: 10.1002/elps.200305844
 6. Chan C.E., Lim A.P., MacAry P.A., Hanson B.J. The role of phage display in therapeutic antibody discovery. *Int. Immunol.*, 2014, vol. 26, no. 12, pp. 649–657. doi: 10.1093/intimm/dxu082
 7. Döhner L., Dieckmann U. Antigenic composition of adenovirus hexons. *Acta Biol. Med. Ger.*, 1978, vol. 37, no. 11–12, pp. 1735–1740.
 8. Ebner K., Pinsker W., Lion T. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical implications. *J. Virol.*, 2005, vol. 79, no. 20, pp. 12635–12642. doi: 10.1128/JVI.79.20.12635-12642.2005
 9. Fortsas E., Petric M., Brown M. Electrophoretic migration of adenovirus hexon under non-denaturing conditions. *Virus Res.*, 1994, vol. 31, no. 1, pp. 57–65. doi: 10.1016/0168-1702(94)90071-X
 10. Irmen K.E., Kelleher J.J. Use of monoclonal antibodies for rapid diagnosis of respiratory viruses in a community hospital. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2000, vol. 7, no. 3, pp. 396–403. doi: 10.1128/CDLI.7.3.396-403.2000
 11. Khilko S.N., Kirasova M.A., Kiseleva E.K., Tikchonenko T.I. Comparison of adenoviral hexon polypeptides (monomers) and of native hexons (trimers) by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. *Acta Microbiol. Hung.*, 1990, vol. 37, no. 2, pp. 233–245.
 12. Köhler G., Milstein C. Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur. J. Immunol.*, 1976, vol. 6, no. 7, pp. 511–519. doi: 10.1002/eji.1830060713
 13. Laemmli U.K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, no. 5259, pp. 680–685. doi: 10.1038/227680a0
 14. Magalhaes L.G., Ferreira L.L.G., Andricopulo A.D. Recent advances and perspectives in cancer drug design. *An. Acad. Bras. Cienc.*, 2018, vol. 90, no. 1, suppl. 2, pp. 1233–1250. doi: 10.1590/0001-3765201820170823
 15. Målen H., Berven F.S., Fladmark K.E., Wiker H.G. Comprehensive analysis of exported proteins from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Proteomics*, 2007, vol. 7, no. 10, pp. 1702–1718. doi: 10.1002/pmic.200600853
 16. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.*, 1974, vol. 22, no. 12, pp. 1084–1091. doi: 10.1177/22.12.1084
 17. Orvell C. Structural polypeptides of mumps virus. *J. Gen. Virol.*, 1978, vol. 41, no. 3, pp. 527–539. doi: 10.1099/0022-1317-41-3-527
 18. Pollack S.J., Jacobs J.W., Schultz P.G. Selective chemical catalysis by an antibody. *Science*, 1986, vol. 234, no. 4783, pp. 1570–1573. doi: 10.1126/science.3787262
 19. Walter J.M., Wunderink R.G. Severe respiratory viral infections: new evidence and changing paradigms. *Inf. Dis. Clin. North Am.*, 2017, vol. 31, no. 3, pp. 455–474. doi: 10.1016/j.idc.2017.05.004
 20. Zdanov K.V., Lvov N.I., Maltsev O.V., Peredelsky E.V., Pisareva M.M. Main aetiological features of acute respiratory viral diseases in young people of draft age and conscripts during the 2013–2014 epidemic season. *Int. Rev. Arm. Forc. Med. Serv.*, 2016, vol. 89, no. 2, pp. 58–63.

Авторы:

Тимошичева Т.А., младший научный сотрудник лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Забродская Я.А., научный сотрудник лаборатории системной вирусологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия; младший научный сотрудник лаборатории биофизики макромолекул НИЦ «Курчатовский институт» — ПИЯФ, Санкт-Петербург, Россия;
Амосова И.В., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории биотехнологии диагностических препаратов ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Timoshicheva T.A., Junior Researcher, Biotechnology Laboratory of Diagnostic Products, Smorodintsev Research Institute of Influenza Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russian Federation;
Zabrodskaya Ya.A., Researcher, Laboratory of System Virology, Smorodintsev Research Institute of Influenza Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russian Federation; Junior Researcher, Laboratory of Macromolecule Biophysics, Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of NRC Kurchatov Institute, St. Petersburg, Russian Federation;
Amosova I.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Biotechnology Laboratory of Diagnostic Products, Smorodintsev Research Institute of Influenza Ministry of Healthcare, St. Petersburg, Russian Federation.