



УДК 602.68:578.23

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ТЕРАПИИ И ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ

© 2022 г. Ю. А. Меркульева*, #, Д. Н. Щербаков*, А. А. Ильичев*

*Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии “Вектор” Роспотребнадзора, Центр геномных исследований мирового уровня по обеспечению биологической безопасности и технологической независимости в рамках Федеральной научно-технической программы развития генетических технологий, Россия, 630559 Новосибирская обл., Кольцово

Поступила в редакцию 18.05.2021 г.

После доработки 07.06.2021 г.

Принята к публикации 17.06.2021 г.

Вирусная угроза может возникнуть неожиданно и где угодно, быстро перейти в стадию эпидемии или пандемии, и тогда потребуются в короткие сроки разработать эффективные средства терапии и профилактики. Разработка вакцины занимает десятилетия, а применение противовирусных соединений часто малоэффективно и небезопасно. Быстрым ответом может быть использование иммунных сывороток переболевших лиц, однако ряд сложностей, связанных с их использованием, заставил исследователей переключиться на разработку более безопасных и эффективных препаратов на основе моноклональных антител (мАТ). Для того чтобы обеспечить защиту, подобные препараты должны обладать ключевой характеристикой – нейтрализующими свойствами, т.е. способностью блокировать заражение клеток вирусом. В настоящее время в арсенале исследователей имеется ряд подходов для получения мАТ, однако ни один из них нельзя назвать эталоном, каждый подход имеет собственные достоинства и недостатки. Выбор того или иного метода зависит как от особенностей вируса, так и от временных и технических ограничений. В предлагаемом обзоре проведен сравнительный анализ современных методов получения нейтрализующих мАТ, описаны актуальные тенденции дизайна антител для терапии и профилактики вирусных заболеваний.

Ключевые слова: моноклональные антитела, вирусные инфекции, гибридная технология, дисплейные методы, сортировка В-клеток

DOI: 10.31857/S0132342322020166

СОДЕРЖАНИЕ

МЕХАНИЗМЫ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ АНТИТЕЛАМИ.....280

ИСТОЧНИК МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ.....282

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ.....283

Дисплейные методы.....285

Сортировка единичных В-клеток и клонирование генов VH/VL.....287
Иммортализация В-клеток.....287
Культуры одиночных В-клеток.....288
Новое поколение методов: высокопроизводительное секвенирование, протеомика и вычислительные технологии.....289
МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН АНТИТЕЛ.....290
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....292
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....292

ВВЕДЕНИЕ

Более века назад сыворотки крови человека и животных начали использовать для терапии и профилактики инфекционных заболеваний. Несмотря на успехи серотерапии, надежды на “волшебную пулю” оправдали себя не полностью. Так, сыворотки часто обладали слабой эффективностью, поскольку кроме специфических антител содержали большое количество неспецифических иммуноглобулинов и других белков, приводящих

Сокращения: ADCC – антителозависимая клеточная цитотоксичность; ADCP – антителозависимый клеточный фагоцитоз; ADCVI – антителозависимое клеточно-опосредованное вирусное ингибирование; APR – области, склонные к агрегации; FACS – сортировка флуоресцентно-активированных клеток; CDC – комплемент-зависимая цитотоксичность; Ig – иммуноглобулин; IL – интерлейкин; VL – переменный домен легкой цепи иммуноглобулина; VH – переменный домен тяжелой цепи иммуноглобулина; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; мАТ – моноклональные антитела; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; оцАТ – одноцепочечные антитела.

Автор для связи: (тел.: +7 (923) 777-15-86; эл. почта: j.a.merkulyeva@gmail.com).

к нежелательным эффектам в виде анафилактического шока или сывороточной болезни.

С появлением вакцин и антибиотиков серотерапия существенно сдала свои позиции. Спустя десятилетия антитела вновь заявили о себе после разработки G. Köhler и С. Milstein гибридной технологии получения моноклональных антител (мАТ) [1]. мАТ представляют собой иммуноглобулины, вырабатываемые клетками одного клона и связывающиеся с конкретным эпитопом целевого антигена. Использование мАТ исключало недостатки серотерапии, однако первые мАТ были получены из клеток мышей и потому часто вызвали иммунную реакцию при введении человеку. Позже благодаря развитию методов генной инженерии появилась возможность получать гуманизированные (химерные) мАТ [2]. Это в существенной степени снимало проблему нежелательного иммунного ответа.

Впоследствии новые технологии открыли возможность для получения мАТ человека, а также позволили менять биологические и физико-химические свойства антител и получать их варианты, которые не способна вырабатывать иммунная система.

Текущие активные разработки в области мАТ в существенной степени направлены на лечение онкологических заболеваний. В то же время вирусные заболевания, для которых нет доступных вакцин (например, ВИЧ-инфекция, лихорадка Ласса и Зика), заболевания, для которых эффективность противовирусных препаратов недостаточно выражена (COVID-19, грипп, бешенство и ряд других), также выступают объектом внимания многих ученых во всем мире [3].

На сегодняшний день ВОЗ и FDA одобрили к применению шесть препаратов на основе противовирусных мАТ (табл. 1). Несмотря на то, что первым одобренным мАТ был Palivizumab против респираторно-синцитиального вируса [4], все последующие разработки были сосредоточены на неинфекционных заболеваниях. Ежегодно десятки и сотни препаратов антител получали одобрение, но ни одного противовирусного мАТ одобрено не было. Однако в 2018 г. противовирусные антитела вновь заявили о себе. Впервые после долгого перерыва одобрен противовирусный препарат мАТ для лечения ВИЧ-инфекции, а в 2020 г. – сразу два препарата мАТ против вируса Эболы [5–8]. В 2020 г. FDA были одобрены мАТ Bamlanivimab и коктейль антител REGEN-COV для экстренного использования против новой коронавирусной инфекции COVID-19. Позже при расширенном исследовании было показано, что Bamlanivimab непригоден в качестве монотерапии (отмена разрешения FDA в апреле 2021 г.), но эффективен при совместном введении с Etesevimab [9–12]. Появление препаратов мАТ против SARS-CoV-2 стало опытом быстрой и эффективной разработки мАТ в условиях экстренной угрозы и напоминанием об эффективности терапии

мАТ для лечения и профилактики вирусных инфекций.

МЕХАНИЗМЫ НЕЙТРАЛИЗАЦИИ ВИРУСНЫХ ПАТОГЕНОВ АНТИТЕЛАМИ

Антитела (иммуноглобулины, Ig) представляют собой гликопротеины, которые обладают антиген-связывающей активностью, а также рядом эффекторных функций: способностью активировать систему комплемента, взаимодействовать с различными типами клеток, усиливать фагоцитоз. Антитела продуцируются плазматическими клетками в ответ на попадание в организм антигена и присутствуют в виде мембраносвязанных рецепторов на поверхности В-лимфоцитов и свободных антител в сыворотке крови [13].

Нейтрализующими принято считать антитела, которые блокируют вирус на этапах, предшествующих транскрипции и трансляции вирусной нуклеиновой кислоты, и тем самым снижают его инфекционность [14]. Для защиты организма от вирусных инфекций этого может быть достаточно, однако в ряде случаев антитела действуют совместно с клеточным иммунитетом.

При нейтрализации оболочечных вирусов антитела блокируют прикрепление или проникновение вируса в клетку-мишень (рис. 1). Антитела могут связываться с поверхностными белками вируса и тем самым блокировать прикрепление к клетке-мишени (1) или вмешиваться в уже установившийся контакт белков вируса и клетки (2). Если адсорбция уже произошла, антитела могут помешать проникновению, связываясь с фьюзогенными белками вируса (3). После проникновения вируса в эндосому антитела могут блокировать слияние с везикулярной мембраной – такой эффект возможен и для суперкапсидных, и для лишенных капсида вирусов (4). В случае безоболочечных вирусов антитела могут связываться после прикрепления вируса и мешать экстракции вирусного генома (5) [14, 15].

Недавно был открыт еще один механизм нейтрализации, который реализуется после проникновения вируса в клетку. В цитозоле клеток обнаружен белок TRIM21 – внутриклеточный рецептор убиквитинлигазы и антител, который связывается с IgG с более высокой аффинностью, чем любой другой рецептор в организме человека, быстро рекрутирует комплекс патоген–антитело и направляет его на протеасомную деградацию (6) [16].

Обычно нейтрализующую активность антител измеряют в отсутствие комплемента, однако часто допускают опосредованное комплементом усиление нейтрализации [15]. Следует заметить, что антитела могут блокировать проникновение вируса в клетку и за счет связывания с клеточными рецепторами, в таком случае корректнее ис-

Таблица 1. Препараты мАТ, одобренные для терапии и/или профилактики вирусных инфекций

№	Препарат мАТ (торговое название)	Применение	Мишень	Вариант антитела	Технология	Производитель	Год/Статус
1	Palivizumab (Synagis)	Респираторно-синци- тиальный вирус, про- филактика инфекции у младенцев из группы высокого риска	Гликопротеин F	Гуманиз. (IgG1)	Гибридная технология	MedImmune Inc.	Одобен FDA в 1998 г. [4]
2	Ibalizumab (Trodatzo)	ВИЧ-1, лечение инфек- ции у взрослых при множественной лекар- ственной устойчивости ВИЧ-1	Рецептор CD4	Гуманиз. (IgG4)	Гибридная технология	TaiMed Biologics Inc., Theratech- nologies Inc.	Одобен FDA в 2018 г. [5]
3	Ansuvimab (Ebanga)	Эболавирус Заир, лече- ние инфекции у взрос- лых и детей	Гликопротеин (GP)	Чел. (IgG1)	Иммортализа- ция В-клеток вирусом Эпш- тейна–Барр	Ridgeback Bio- therapeutics	Одобен FDA в 2020 г. [6, 7]
4	Atoltivimab, Maffivimab и Odesivimab-ebgn (Inmazeb)	Эболавирус Заир, лече- ние инфекции у взрос- лых и детей	Гликопротеин (GP)	Чел. (IgG1)	Гибридная технология (генно-модифи- цированные мыши)	Regeneron Phar- maceuticals	Одобен FDA в 2020 г. [8]
5	Etesevimab и Bamlanivimab	SARS-CoV-2, лечение инфекции любой степени тяжести	Гликопротеин S (домен RBD)	Чел. (IgG1)	Нет данных	Eli Lilly and Com- pany	Разрешен FDA для экстренного использования в 2021 г. [9, 10]
6	Casirivimab и Imdevimab (REGEN-COV)	SARS-CoV-2, экстренное использо- вание у амбулаторных пациентов из группы риска развития серьез- ных осложнений	Гликопротеин S (домен RBD)	Чел. (IgG1)	Сортировка еди- ничных В-кле- ток и ОТ-ПЦР (человек и генно-модифи- цированные мыши)	Regeneron Phar- maceuticals	Разрешен FDA для экстренного использования в 2021 г. [11, 12]

Примечание: Гуманиз. — гуманизированное антитело, Чел. — антитело человека, RBD — рецептор-связывающий домен.

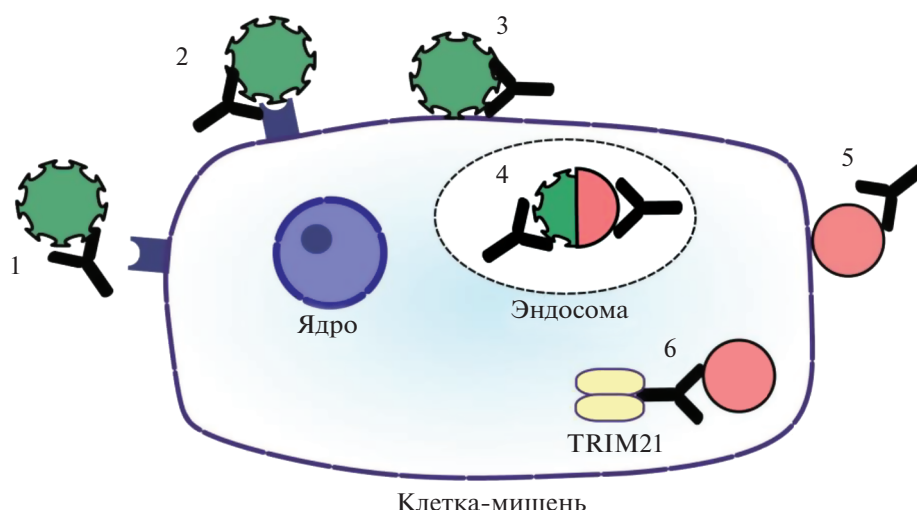


Рис. 1. Механизмы нейтрализации суперкапсидных (1–4) и безоболочечных (4–6) вирусов антителами.

пользовать термин “антитело, блокирующее инфекцию” [14].

Антитела, не обладающие нейтрализующей активностью, также могут препятствовать вирусной репликации, активируя механизмы клеточного иммунитета. Опсонизация вирусных частиц и инфицированных клеток антителами через Fc-рецептор запускает комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC), антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). В результате этих процессов разрушается вирусная оболочка или активируется фагоцитоз зараженных клеток [15, 17, 18]. Антитела также способны препятствовать вирусной инфекции за счет антителозависимого клеточно-опосредованного вирусного ингибирования (ADCVI). ADCVI включает большее количество механизмов и может объединять цитолитическую активность ADCC, фагоцитоз иммунных комплексов и нецитолитические механизмы – секрецию вирус-ингибирующих хемокинов (рис. 2) [19]. Кроме того, появляется все больше свидетельств иммуномодулирующего (вакциноподобного) эффекта препаратов моноклональных антител [20].

В последнее время большое внимание приковано к так называемым “супер-антителам” – антителам, обладающим высокой эффективностью и/или широкой перекрестной реактивностью и способным, вопреки устоявшемуся мнению, быть эффективными не только до и вскоре после заражения, но и воздействовать на текущую инфекцию [21].

ИСТОЧНИК МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

Разработка препарата мАТ, как правило, состоит из следующих этапов: 1) выделение антите-

ла с нужными свойствами, 2) инженерия белка для улучшения его целевых свойств, 3) получение продуцентов со стабильной продукцией антител, 4) подбор условий культивирования продуцентов и очистки мАТ.

Противовирусные мАТ получают, как правило, из крови инфицированных или иммунизированных доноров, а также из синтетических библиотек, представляющих собой набор вариативных фрагментов иммуноглобулинов.

Иммунная система донора (человека или животного), инфицированного патогеном, вырабатывает огромное количество антител ко всем возможным эпитопам, к тому же такие антитела проходят созревание в организме, что увеличивает их аффинность и специфичность. В-клетки памяти инфицированных доноров успешно используют для выделения антител. Однако не всегда при заражении вирусом развивается сильный иммунный ответ, и часто необходимо искать более подходящих доноров либо их вовсе нет. В таком случае прибегают к иммунизации донора самим патогеном или его антигенами. Повторные иммунизации позволяют стимулировать вторичный иммунный ответ и получить антитела, обладающие большей аффинностью.

Несмотря на то, что использование иммунных библиотек предпочтительнее, для получения противовирусных мАТ иногда используют наивный репертуар антител, основное преимущество которого – огромное разнообразие антител. Это делает его универсальным источником антител против любого антигена и дает возможность обнаружить антитела против антигенов, которые не вызывают сильный иммунный ответ [22].

В отличие от источников естественных антител, библиотеки синтетических фрагментов антител обладают уникальными преимуществами, включая полный контроль над дизайном библио-

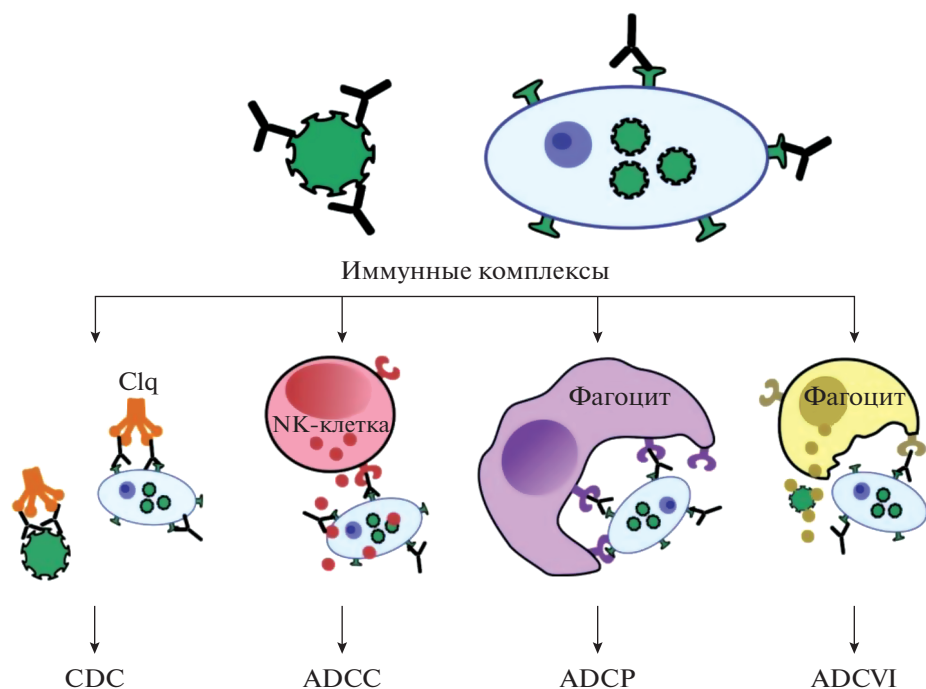


Рис. 2. Механизмы ингибирования репликации вирусов ненейтрализующими антителами: CDC – комплемент-зависимая цитотоксичность, ADCP – антителозависимый клеточный фагоцитоз, ADCC – антителозависимая клеточная цитотоксичность, ADCVI – антителозависимое клеточно-опосредованное вирусное ингибирование.

теки и условиями отбора. Технология позволяет генерировать огромное разнообразие антител, которое не может быть выработано иммунной системой донора. Однако такой вариант сопряжен с рисками получения антител, небезопасных для организма и неспособных выполнять свои функции *in vivo*. Несмотря на указанные недостатки, была продемонстрирована возможность применения мАТ, полученных из синтетических библиотек, для борьбы с вирусами и бактериальными токсинами [23].

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ АНТИТЕЛ

При выборе стратегии выделения антител необходимо учитывать ряд параметров: источник антител, желаемый уровень аффинности и область применения антител, временные и бюджетные ограничения. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки (табл. 2).

Первые мАТ были получены в 1976 г. с помощью гибридной технологии, предложенной G. Köhler и C. Milstein [1]. Данная технология заключается в получении специализированных клеток для продукции мАТ – гибридом. Для этого выделяют В-лимфоциты из селезенки донора и гибридируют с клеточной линией бессмертной миеломы с помощью агента, нарушающего клеточные мембраны, например, полиэтиленгликоля или вируса Сендай (рис. 3).

Далее клетки культивируют *in vitro* в селективной среде, где выживают только гибридные клетки, способные потенциально бесконечно расти и размножаться (как миелома) и синтезировать антитела (как В-лимфоциты). Индивидуальные клоны можно получить, например, методом предельного разведения, затем проводят скрининг индивидуальных клонов на наличие специфической активности антител и отбирают положительные варианты [24]. С помощью гибридной технологии было получено первое противовирусное мАТ – Palivizumab [4].

Преимущество данной технологии заключается в использовании зрелых В-клеток, которые позволяют получить антитела, прошедшие селекцию и аффинное созревание в организме и обладающие естественным спариванием Н-, L-цепей [25]. Такие антитела с большей вероятностью проявляют активность *in vivo*.

Вместе с тем этот подход имеет и ряд недостатков. Так, было показано, что гибридомы в ~32% случаев синтезируют дополнительные Н- и L-цепи иммуноглобулинов, а это значит, что такие антитела не будут моноспецифичными [26].

Недостаток также заключается в трудоемкости технологии и низком выходе гибрида (~0.43% от всех В-клеток), а зависимость процесса от митоза замедляет сроки разработки мАТ [27].

Проблема получения мАТ человека при помощи гибридной технологии заключается в отсутствии подходящей клеточной линии для слия-

Таблица 2. Сравнительная характеристика методов получения антител

№	Метод	Время	Относительная стоимость	Специфичность мАТ	Исходный репертуар антител	Источник антител	Плюсы	Минусы
1	Фатовый дисплей	2–3 недели	Низкая	Низкая	$10^{10} - 10^{13}$ (иммунная система и синтетические библиотеки)	Человек, животные, синтетические библиотеки	Легко доступен ген, кодирующий VH/VL	Нет естественного спаривания VH/VL, ограничения бактериальной системы экспрессии
2	Гибридная технология	6–8 месяцев	Средняя	Средняя	$10^{10} - 10^{11}$ (иммунная система)	Человек и животные	Высокая вероятность работы мАТ <i>in vivo</i>	Часто необходимо гуманизировать, синтезируются дополнительные цепи Ig, низкая выживаемость клонов
3	Культуры одноклеточных В-клеток	2–3 недели	Высокая	Высокая	$10^{10} - 10^{11}$ (иммунная система)	Человек и животные	Прямой функциональный скрининг	Смертность клонов, нет возможности обогатить
4	Иммортализованные В-клетки	2–3 недели	Высокая	Высокая	$10^{10} - 10^{11}$ (иммунная система)	Человек и животные	Прямой функциональный скрининг	Онкогенные вирусы и прочие технические сложности, низкий выход итоговых клонов
5	Сортировка В-клеток	1–2 недели	Высокая	Высокая	$10^{10} - 10^{11}$ (иммунная система)	Человек и животные	Обогащенное разнообразие специфических антител	Необходима разработка антигена

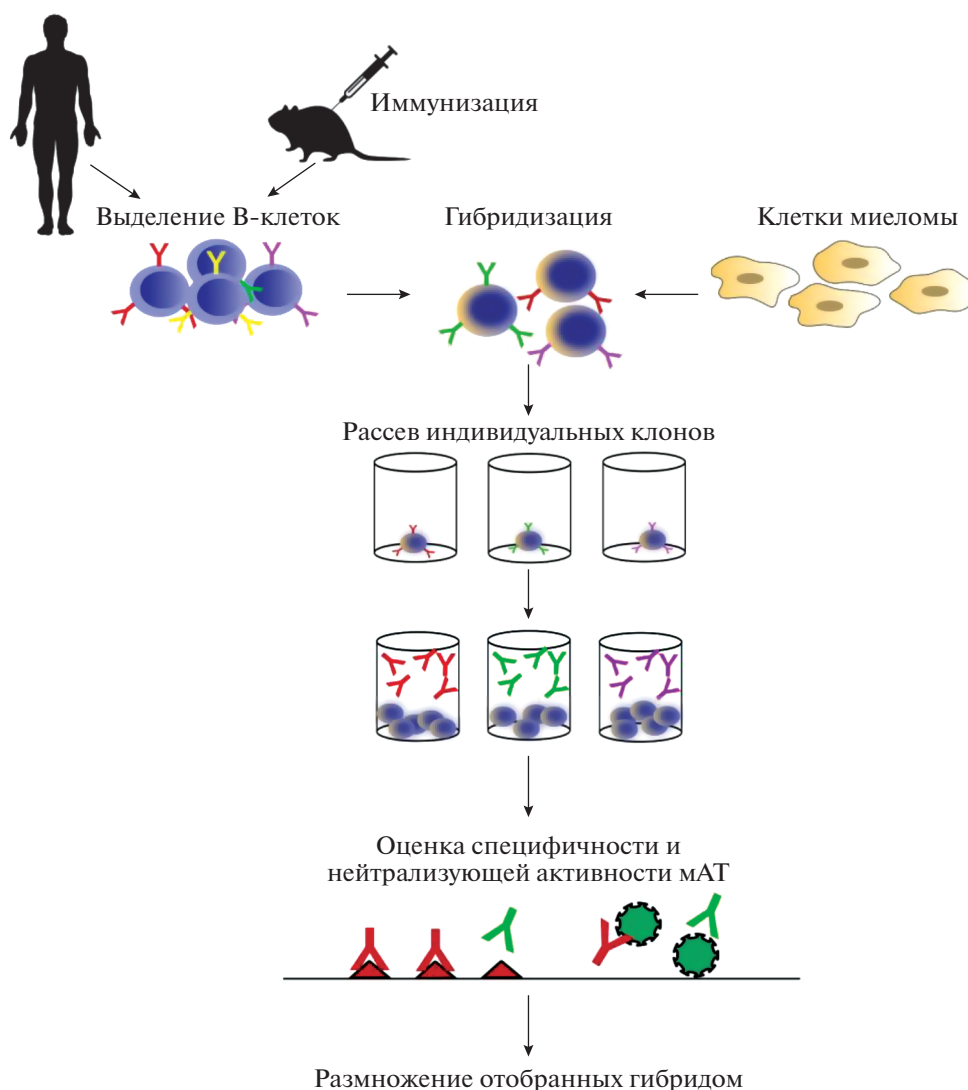


Рис. 3. Схема получения моноклональных антител с помощью гибридомной технологии.

ния с В-клетками. Некоторые группы исследователей получали стабильные гибридомы при слиянии В-клеток человека с несекретирующими гетеромиеломами мыши (например, НММА 2.5 [28]).

Несмотря на существующие недостатки, гибридомная технология с использованием методов генной инженерии остается весьма популярной. Так, с ее помощью был разработан ZMarr – препарат трех моноклональных антител, предназначенный для лечения инфекции, вызванной вирусом Эбола [29].

Дисплейные методы

Впервые концепцию пептидного фагового дисплея предложил в 1985 г. G.P. Smith. Подход заключается в получении популяции нитчатых фагов, экспонирующих на своей поверхности исследуемые белки, слитые с капсидным белком РЗ

фаговой частицы. Отбор целевых молекул проводят методом аффинной селекции с использованием специфических лигандов (рис. 4) [30].

Первые антитела с использованием фагового дисплея были получены в 1990-е гг. [31]. Для получения фаговой библиотеки из лимфоцитов донора выделяют мРНК, в реакции обратной транскрипции получают фрагменты кДНК, кодирующие разнообразие VH- и VL-доменов иммуноглобулинов, и встраивают в фагмидный вектор. Такой вектор представляет собой минимальную плазмиду, содержащую ген фагового белка рIII, слитый с нуклеотидной последовательностью фрагмента антитела, фактор резистентности к селективному антибиотику и сайт упаковки генома фага M13. Библиотекой фагмид трансформируют клетки *Escherichia coli*, а затем инфицируют фагом-помощником. Фаг-помощник содержит полный геном M13, кодирующий

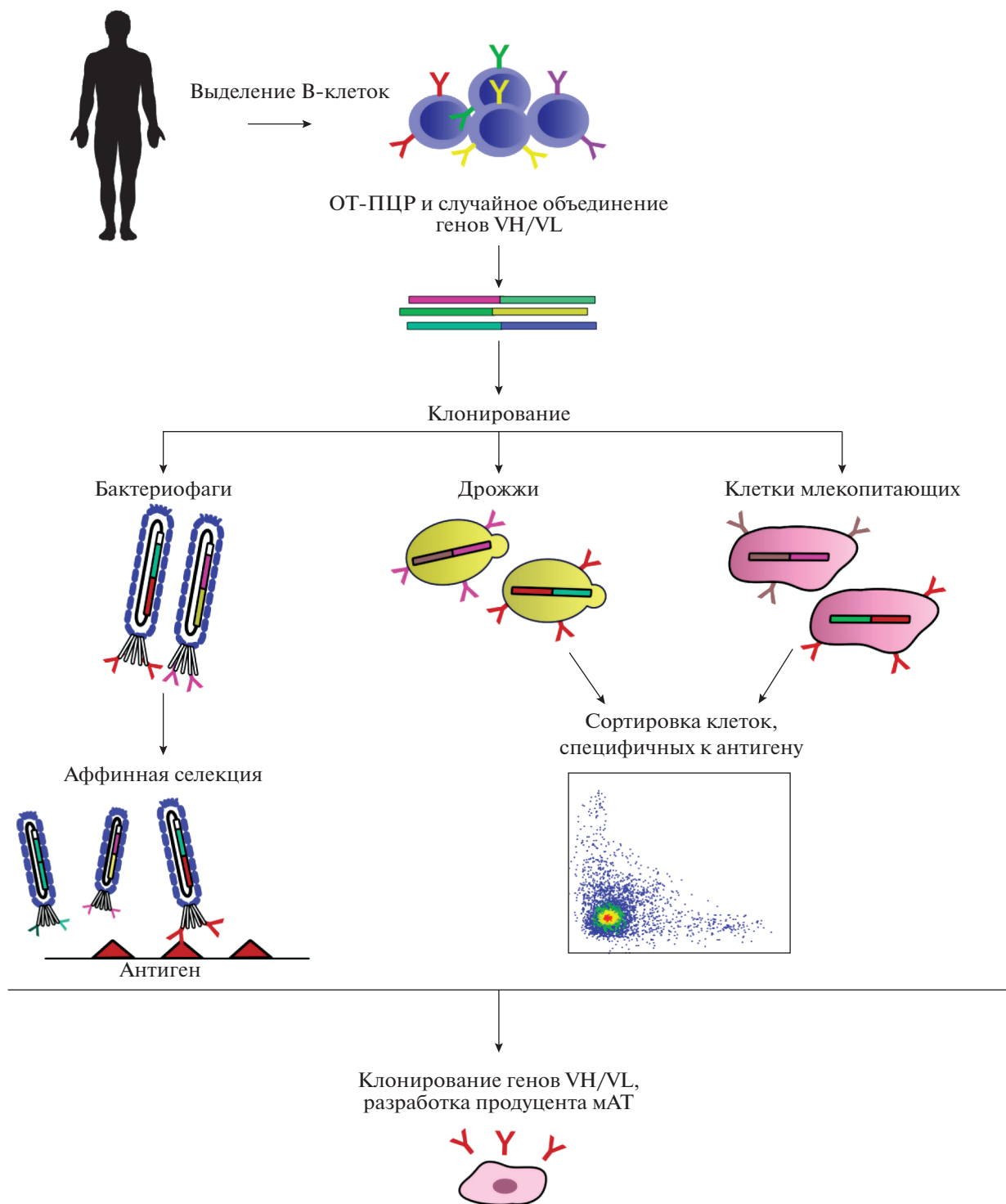


Рис. 4. Дисплейные методы для получения моноклональных антител.

все фаговые белки, но имеет дефектный сигнал упаковки. При сборке новых частиц рПД дикого типа и химерный белок рПД конкурируют за включение в фаг. Таким образом получают огромную коллекцию фаговых частиц с упакованной фагмидной ДНК, несущих (в подавляющем большинстве) только одну копию фрагмента

антитела. Далее проводят аффинную селекцию с использованием целевых антигенов, а отобранные варианты фрагментов антител реконструируют в полноразмерные mAb [32].

Такой подход стал популярным благодаря эффективности, простоте и низкой стоимости. Разнообразие комбинаторных библиотек составляет

$>10^{10}$ молекул. Эффективность подхода была продемонстрирована при исследовании вирусов гриппа. В работе были получены редкие антитела, нейтрализующие вирусы гриппа с использованием уникального механизма, что открывает новые возможности для разработки средств терапии и вакцин [33].

С помощью технологии фагового дисплея получен ряд противовирусных антител, например, m102.4 для профилактики и лечения заболеваний, вызванных вирусами Нипа и Хендра, Dridavumab против вируса гриппа и Foravirumab против вируса бешенства [34–36].

Важный недостаток фагового дисплея – проблемы, связанные с бактериальной системой экспрессии, основные из них – некорректный фолдинг молекул антител и отсутствие некоторых посттрансляционных модификаций (например, гликозилирования и образования дисульфидных связей) [37].

Второй по популярности дисплейный метод – дрожжевой дисплей, в котором фрагменты антител экспрессируются на поверхности дрожжевых клеток. Специфические антитела отбирают через последовательные раунды мутагенеза и точной контролируемой селекции клеток с помощью проточной цитометрии [38]. Преимущество дрожжевой библиотеки – эукариотический посттрансляционный процессинг секретируемых белков. На сегодняшний день разработаны линии дрожжевых клеток, обеспечивающие более корректное гликозилирование антител [39].

Также для получения мАТ предложены дисплейные методы на основе фага λ и вируса осповакцины, дисплей на поверхности бактериальных клеток, а также бесклеточные дисплейные системы на основе мРНК и рибосом [40–44].

Разработаны дисплейные системы и на основе клеток млекопитающих. Этот подход обеспечивает получение терапевтических мАТ, отличающихся высоким уровнем экспрессии в клетках млекопитающих и сохраняющих нативный фолдинг, биологические и физико-химические свойства, однако данный подход ограничен меньшим размером библиотеки. Предложен ряд улучшений (например, использование дисплея на поверхности клеток млекопитающих в сочетании с соматической гипермутацией *in vitro*, совершенствование трансфекции и использование сортировки флуоресцентно-активированных клеток – FACS), позволяющих получать варианты антител с более высокой аффинностью [45, 46].

Существенный недостаток всех дисплейных методов – потеря нативного VH/VL-спаривания исходного репертуара антител. Поскольку было показано, что антитела с нативными легкими цепями с большей вероятностью связывают антиген, чем антитела с ненативным спариванием, считается, что дисплейные библиотеки содержат большой процент низкоаффинных антител и, как

следствие, требуют многократных циклов созревания аффинности, отнимающих много времени [47, 48].

Для решения этой проблемы в дисплейных методах используют инкапсулирование единичных В-клеток в водно-жидкостной эмульсии с последующей амплификацией генов в эмульсионной ПЦР. Затем такое нативное разнообразие антител воспроизводят с помощью фагового дисплея [49].

Сортировка единичных В-клеток и клонирование генов VH/VL

В 1996 г. был предложен эффективный способ получения мАТ, основанный на сортировке единичных В-клеток (рис. 5) [50]. Отдельные клетки, как правило, выделяют с помощью FACS-сортировки [51]. При этом используют антигены, меченные флуоресцентным красителем. Специфические В-клетки связываются с меченым белком и сортируются в отдельные ячейки. Затем из единичных В-клеток методом ОТ-ПЦР получают последовательности VH/VL-генов иммуноглобулинов и конструируют полноразмерные мАТ. ОТ-ПЦР с единичных клеток сохраняет пары VH/VL, к тому же этот метод позволяет получать мАТ в короткие сроки [52].

Еще один подход к изоляции отдельных клеток – микрофлюидные технологии на основе микрокапель и клапанных систем – приобрел популярность благодаря использованию небольших количеств входного материала, низкой стоимости процесса, его высокой скорости и точному контролю [51, 53, 54].

Иммортализация В-клеток

Использование вируса Эпштейна–Барр для иммортализации В-клеток человека впервые было описано более 40 лет назад. Технология заключается в получении В-клеток памяти доноров, демонстрирующих эффективный иммунный ответ, и последующем заражении клеток вирусом Эпштейна–Барр. Далее выделяют клоны В-клеток, продуцирующие антитела. Культуральную жидкость, содержащую секретируемые антитела, используют для скрининга специфичности и нейтрализующей активности. Прямой функциональный скрининг значительно сокращает временные затраты и повышает вероятность получения антител, обладающих желаемыми свойствами [55]. Этот подход был применен к выделению нейтрализующих антител против вируса бешенства, SARS-CoV и других вирусов [56, 57]. Однако применение метода осложнено рисками, связанными с онкогенностью вируса Эпштейна–Барр и низким выходом иммортализованных клеток. Последние улучшения (например, использование агониста TLR9) позволили увеличить выход иммортализованных клеток более чем до 30%. С помощью такой технологии получен ряд высокоэффектив-

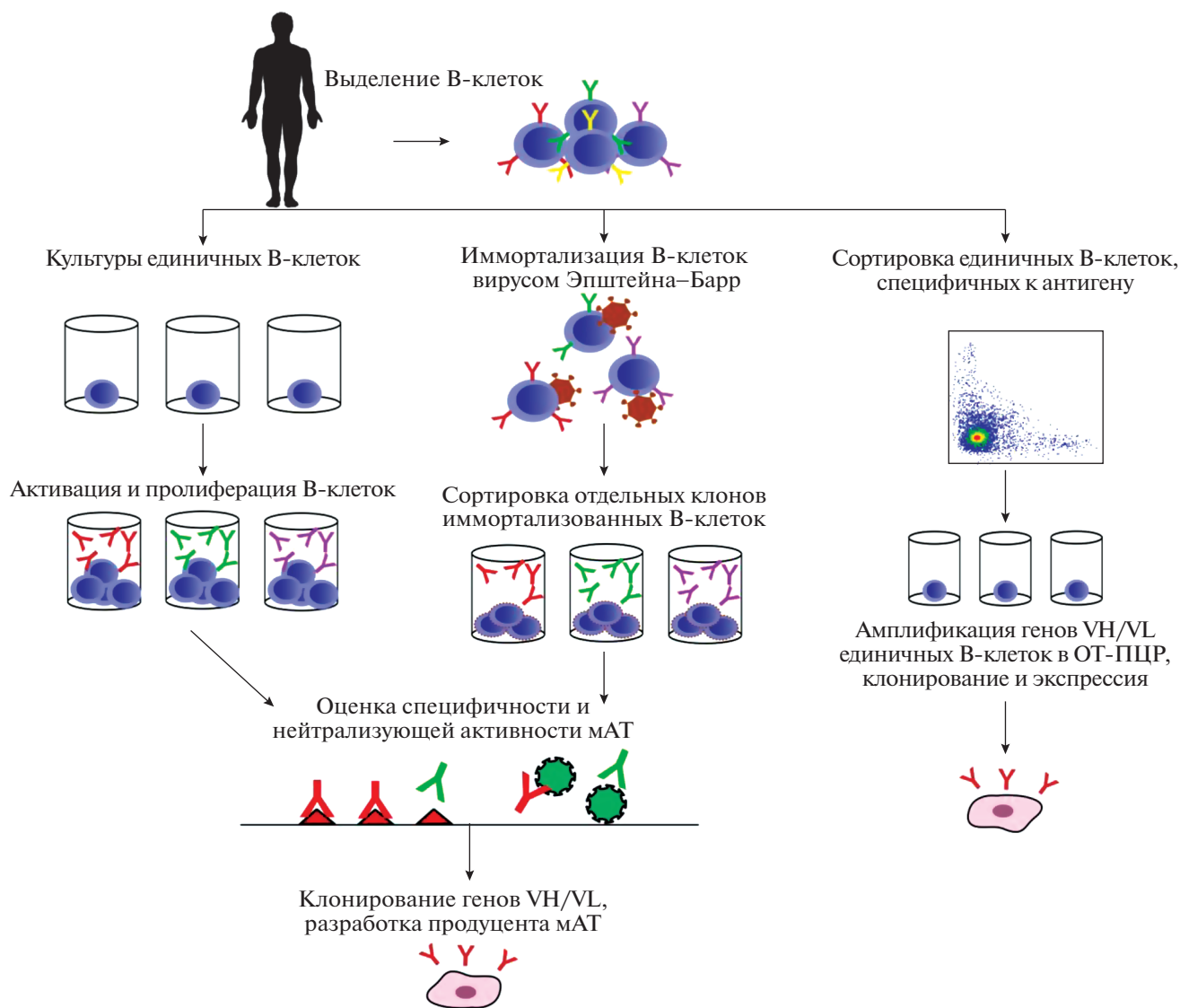


Рис. 5. Получение моноклональных антител из В-клеток памяти: культуры единичных В-клеток, иммортализация и сортировка В-клеток.

ных широконейтрализующих МАТ против вируса бешенства, SARS-CoV и других вирусов [58–60].

Культуры одиночных В-клеток

Использование иммортализации В-клеток считалось необходимым для получения функциональных В-клеточных культур. Однако был предложен альтернативный метод получения долгоживущих культур первичных одиночных В-клеток. Для этого В-клетки помещают на фидерный слой клеток, несущих на своей поверхности рецептор CD40L, а в питательную среду добавляют цитокины IL-2, IL-4, IL-21. В таких условиях одиночные В-клетки активируются и формируют клеточную культуру, продуцирующую МАТ. Далее проводят прямой функциональный скрининг культуральной среды, из отобранных клонов ме-

тодом ОТ-ПЦР получают нуклеотидные последовательности генов VH/VL и конструируют МАТ [61, 62]. Этот подход был применен для выделения нейтрализующих антител против ВИЧ-1, вирусов Денге и гриппа H1N1 [63–65].

Неоспоримое преимущество методов, основанных на скрининге В-клеток, — прямой функциональный анализ антител, полученных из естественных антителопродуцирующих клеток, что снижает ряд рисков, связанных с использованием других подходов (например, изменения структуры молекул антител или потеря некоторых вариантов антител из-за особенностей гетерологичной экспрессии). Тем не менее метод не лишен недостатков, среди которых низкая представленность специфичных В-клеток в сыворотке крови донора и их низкая выживаемость. Для повышения эффективности используют культуры плазм-

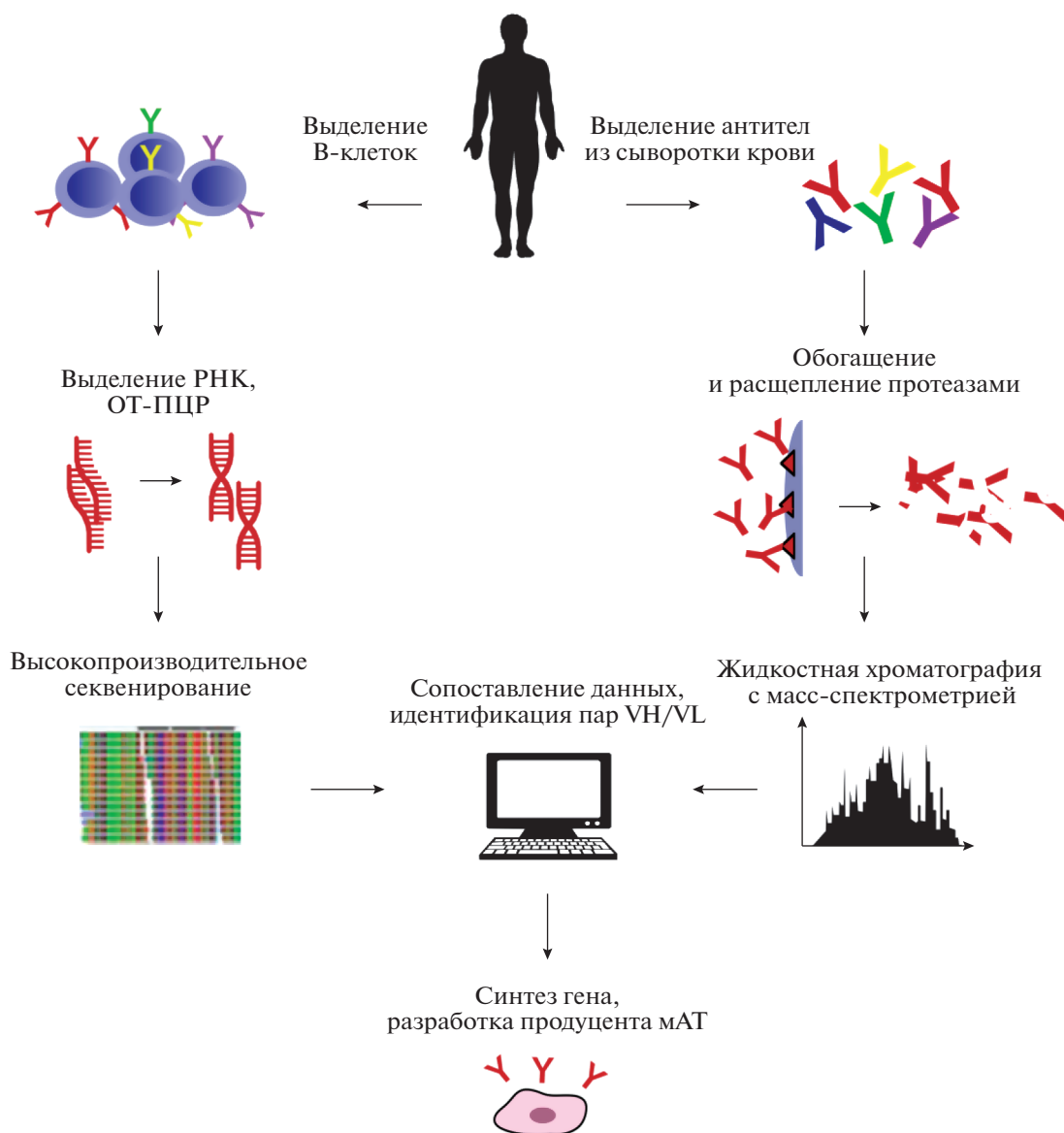


Рис. 6. Схема получения моноклональных антител с помощью методов высокопроизводительного секвенирования и протеомики.

матических клеток. Эти клетки содержат как минимум в 100 раз больше мРНК иммуноглобулинов и продуцируют антитела в конечной точке антиген-зависимого соматического гипермутационеза, что повышает вероятность обнаружения антитела, обладающего высокой аффинностью и специфичностью [66]. Дополнительно повысить эффективность скрининга позволяет автоматизация процесса [62].

Новое поколение методов: высокопроизводительное секвенирование, протеомика и вычислительные технологии

Методы высокопроизводительного секвенирования позволяют получать обширную инфор-

мацию о разнообразии репертуаров антител, которую используют для обнаружения специфических МАТ (рис. 6). Полагают, что частоты встречаемости последовательностей, полученных в результате секвенирования, отражают представленность клонов В-клеток в организме и, таким образом, дают материал для конструирования антител.

Так, на основе результатов массового параллельного секвенирования репертуара генов VH/VL плазматических клеток иммунизированных мышей были обнаружены наиболее часто встречающиеся аминокислотные последовательности VH и VL, на основе соразмерной распространенности они были объединены в пары, и получены scFv-фрагменты антител, из которых большая часть была специфична к антигену [67].

В другой работе из единичных В-клеток в перекрывающейся ОТ-ПЦР получали ДНК-фрагменты, кодирующие пары VH/VL, и секвенировали все полученные варианты. В результате было выявлено несколько наиболее широко представленных последовательностей антител, на основе которых были получены антитела, специфичные к гликопротеину вируса Эбола [68].

Сочетание методов геномики и протеомики также дает возможность идентифицировать специфичные МАТ из комбинаторного разнообразия репертуара антител донора. В таком случае данные секвенирования служат референсом/основой для интерпретации результатов, полученных при помощи масс-спектрометрии. Также для обнаружения антител объединяют результаты секвенирования с данными, полученными с использованием биоинформатических методов [69]. Например, используя известную последовательность антитела 10E8 против ВИЧ-1 и данные секвенирования репертуара нуклеотидных последовательностей VH/VL ВИЧ-положительного донора, построили эволюционные филогенетические деревья и на основе относительных генетических расстояний от дикого типа 10E8 осуществили селективное спаривание цепей *in silico*. В результате было выделено 11 функциональных 10E8-подобных МАТ с нейтрализующей активностью [70]. Позже с использованием этой стратегии из репертуара другого ВИЧ-положительного донора также было выделено несколько широконейтрализующих МАТ [71].

Биоинформатические подходы использовали для быстрого поиска антител против нового коронавируса SARS-CoV-2. Для этого были созданы модели взаимодействия вирусного S-белка с антителами, специфичными к SARS-CoV – наиболее близкому по антигенному составу коронавирусу. На основе результатов моделирования было выбрано антитело CR3022, специфичное к SARS-CoV, способное взаимодействовать с S-белком SARS-CoV-2. Специфичность взаимодействия этого антитела подтвердили *in vitro* [72].

Последние достижения в вычислительных методах позволяют не только сократить время и затраты на обнаружение антител, но и строго контролировать параллельный скрининг нескольких физико-химических свойств. Ожидается, что развитие этих методов позволит, в конечном счете, разрабатывать антитела с необходимыми свойствами *de novo* [73].

МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ДИЗАЙН АНТИТЕЛ

В последнее время активно развиваются методы, позволяющие проводить рациональный дизайн антител и изменять такие их свойства, как аффинность, число и специфичность паратопов, молекулярный вес, изоэлектрическая точка, подвижность молекулы и потенциальная иммуногенность, а также эффекторные свойства и время полужизни молекулы.

Необходимость инженерии антител возникла еще при получении первых МАТ, поскольку гибридная технология позволяла получать только антитела мыши, которые могли вызывать иммунный ответ в организме человека. В середине 1980-х гг. этот недостаток был частично устранен получением химерных, а затем и полностью гуманизированных (гиперхимерных) антител [74]. Под химерным антителом понимают молекулу иммуноглобулина животного, в которой структура белка модифицирована так, чтобы увеличить сходство с антителом человека. Как правило, заменяют константную область антитела животного на область антитела человека. В гиперхимерных антителах от иммуноглобулина животного остаются только петли гипервариабельных регионов (CDRs). Позже стало возможным получение антител человека с помощью технологий фагового дисплея и сортировки В-клеток, а также с использованием трансгенных животных [75].

Следует отметить, что последние пять лет в клиническую практику в основном вводятся именно антитела человека [76]. Тенденция характерна и для препаратов противовирусных антител. Согласно международной базе данных IMGT (www.imgt.org), подавляющее большинство препаратов противовирусных антител – это антитела человека или гуманизированные антитела (рис. 7).

Биологические свойства антител зависят от структуры Fc-фрагмента, поэтому данный регион часто подвергают модификациям. Для большинства терапевтических применений желателен длительный период полужизни антител в сыворотке, т.к. это уменьшает необходимость повторных инъекций и сродство Fc-области к различным рецепторам. Регулировать эти процессы удается благодаря аминокислотным заменам белкового остова молекулы [77, 78]. Изменения сродства к рецепторам позволяет также добиться гликоинженерия антител. Предполагается, что дефукозилированные антитела обладают повышенной аффинностью к некоторым рецепторам, однако клинические эффекты еще предстоит исследовать [79].

Растворимость антител и способность к агрегации также становятся управляемыми характеристиками. Аминокислотные замены в областях, склонных к агрегации (APR), экспериментально показали увеличение растворимости антител, что подтверждает правильность этой инженерной стратегии [80].

Получение фрагментов антител различного размера (рис. 8) помогло усовершенствовать МАТ под конкретные цели [81]. Фрагменты антител имеют несколько преимуществ по сравнению с полноразмерными МАТ: более низкую стоимость препарата, сниженную иммуногенность, высокую способность проникновения в ткани, что дает возможность молекуле достигать труднодоступных мест [82]. В настоящее время разрабатываются одноцепочечные антитела (оцАТ) против

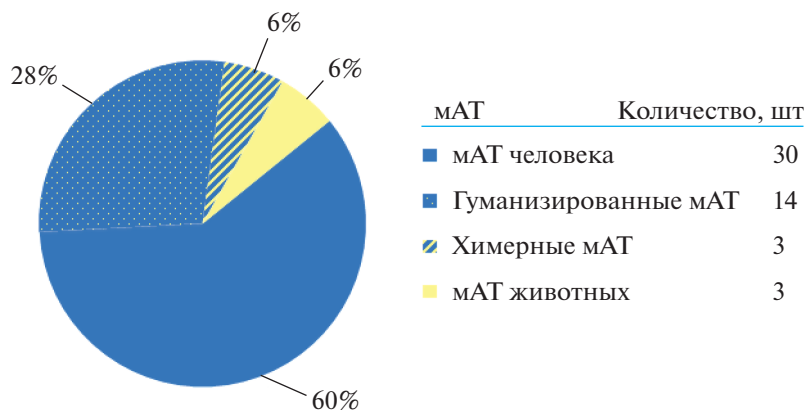


Рис. 7. Соотношение мАТ различной степени гуманизации, разработанных для терапии/профилактики вирусных инфекций (<https://www.imgt.org>, данные на ноябрь 2021 г.).

ряда вирусов, включая ВИЧ-1, вирусы гриппа и гепатита С, респираторно-синцитиальный вирус и энтеровирусы [83]. Хотя оцАТ – очень сильные ингибиторы вирусных инфекций, ни одно из них не было одобрено для клинического использования против вирусной инфекции.

Еще один перспективный вариант мАТ – одноклоновые антитела (наноантитела) и их производные. Такие антитела состоят из единственного вариабельного домена и способны связывать труднодоступные антигены, к тому же они обла-

дают хорошей стабильностью и растворимостью [84]. Прообразом для их создания послужили неканонические иммуноглобулины животных семейства Camelidae (верблюд, лама) и хрящевых рыб, полностью лишенные L-цепей [85, 86].

Несмотря на достоинства различных рекомбинантных фрагментов антител, почти все одобренные к применению мАТ на данный момент представляют собой полноразмерные иммуноглобулины (рис. 9).

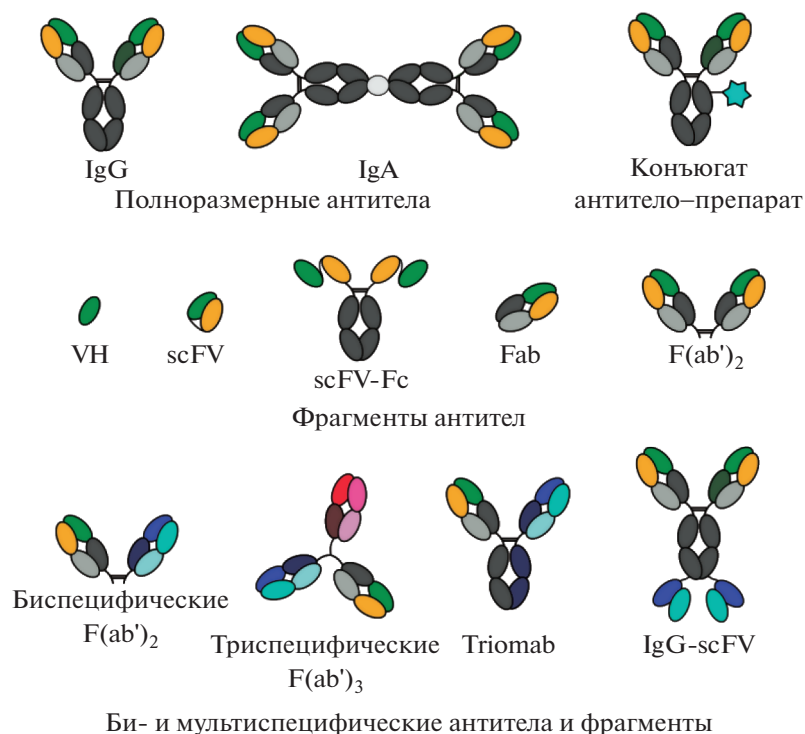


Рис. 8. Схематическое изображение некоторых вариантов рекомбинантных моноклональных антител, фрагментов антител и их производных.

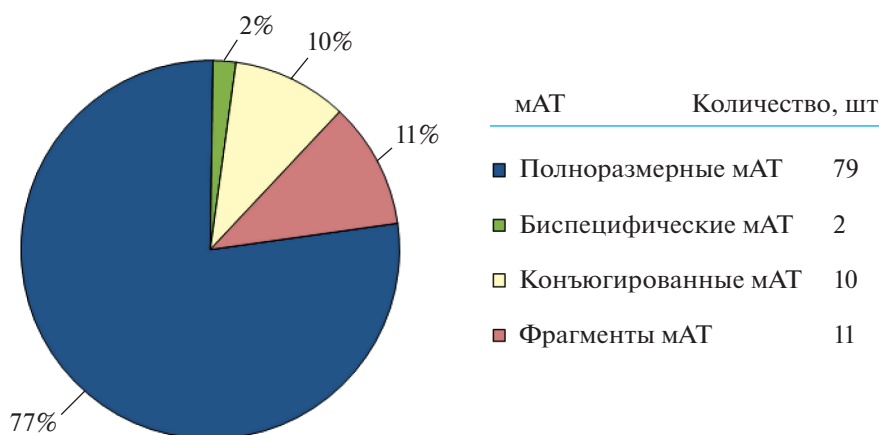


Рис. 9. Соотношение вариантов мАТ, одобренных для использования в терапии (<https://www.imgt.org>, данные на ноябрь 2021 г.).

Антитела можно использовать и как средство таргетной доставки лекарственного средства или токсина в конкретный участок, что может быть особенно полезно для уничтожения зараженных клеток [87].

Иммуноконъюгаты активно исследовали при лечении рака, несколько вариантов получили одобрение FDA [88]. В настоящее время разработано несколько конъюгатов на основе антител для эффективной и высокоспецифичной терапии различных вирусов, включая ВИЧ, цитомегаловирус, герпесвирусы, вирусы гриппа и бешенства [89].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день терапевтические мАТ – быстрорастущий класс биофармацевтических препаратов, демонстрирующий высокую эффективность в отношении многих онкологических, воспалительных и аутоиммунных заболеваний. Несомненные преимущества мАТ – их предсказуемое действие, высокая специфичность и чистота.

Несмотря на скромный опыт применения в противовирусной терапии, использование нейтрализующих мАТ остается одним из самых перспективных направлений в борьбе с вирусными инфекциями. При возникновении новых вирусных эпидемий или биотеррористических угроз получение и применение антител, несомненно, наиболее рациональное стратегическое решение.

В настоящее время улучшение и появление новых подходов к получению антител позволяет в кратчайшие сроки получать высокоэффективные мАТ, а рациональный дизайн с использованием методов геномной инженерии и биоинформатики открывает безграничные возможности их совершенствования.

ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (соглашение № 075-15-2019-1665).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Köhler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. P. 495–497. <https://doi.org/10.1038/256495a0>
2. Riechmann L., Clark M., Waldmann H., Winter G. // *Nature*. 1988. V. 332. P. 323–327. <https://doi.org/10.1038/332323a0>
3. Zeitlin L., Cone R.A., Moench T.R., Whaley K.J. // *Microbes Infect.* 2000. V. 2. P. 701–708. [https://doi.org/10.1016/s1286-4579\(00\)00355-5](https://doi.org/10.1016/s1286-4579(00)00355-5)
4. Pollack P., Groothuis J.R. // *J. Infect. Chemotherapy*. 2002. V. 8. P. 201–206. <https://doi.org/10.1007/s10156-002-0178-6>
5. Rizza S.A., Bhatia R., Zeuli J., Temesgen Z. // *Drugs Today (Barc)*. 2019. V. 55. P. 25–34. <https://doi.org/10.1358/dot.2019.55.1.2895651>
6. Corti D., Misasi J., Mulangu S., Stanley D.A., Kanekiyo M., Wollen S., Ploquin A., Doria-Rose N.A., Staube R.P., Bailey M., Shi W., Choe M., Marcus H., Thompson E.A., Cagigi A., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B., Perez L., Sallusto F., Vanzetta F., Agatic G., Cameroni E., Kisalu N., Gordon I., Ledgerwood J.E., Mascola J.R., Graham B.S., Muyembe-Tamfun J.J., Trefry J.C., Lanzavecchia A., Sullivan N.J. // *Science*. 2016. V. 351.

- P. 1339–1342.
<https://doi.org/10.1126/science.aad522413>
7. Lee A. // *Drugs*. 2021. V. 81. P. 595–598.
<https://doi.org/10.1007/s40265-021-01483-4>
 8. Sivapalasingam S., Kamal M., Slim R., Hosain R., Shao W., Stoltz R., Yen J., Pologe L.G., Cao Y., Partridge M., Sumner G., Lipsich L. // *Lancet Infect Dis*. 2018. V. 18. P. 884–893.
[https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30397-9](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30397-9)
 9. Gottlieb R.L., Nirula A., Chen P., Boschia J., Heller B., Morris J., Huhn G., Cardona J., Mocherla B., Stosor V., Shawa I., Kumar P., Adams A.C., Van Naarden J., Custer K.L., Durante M., Oakley G., Schade A.E., Holzer T.R., Ebert P.J., Higgs R.E., Kallewaard N.L., Sabo J., Patel D.R., Klekotka P., Shen L., Skovronsky D.M. // *JAMA*. 2021. V. 325. P. 632–644.
<https://doi.org/10.1001/jama.2021.0202>
 10. Jones B.E., Brown-Augsburger P.L., Corbett K.S., Westendorf K., Davies J., Cujec T.P., Wiethoff C.M., Blackburne J.L., Heinz B.A., Foster D., Higgs R.E., Balasubramaniam D., Wang L., Bidshahri R., Kraft L., Hwang Y., Zentelis S., Jepson K.R., Goya R., Smith M.A., Collins D.W., Hinshaw S.J., Tycho S.A., Pellacani D., Xiang P., Muthuraman K., Sobhanifar S., Piper M.H., Triana F.J., Hendle J., Pustilnik A., Adams A.C., Berens S.J., Baric R.S., Martinez D.R., Cross R.W., Geisbert T.W., Borisevich V., Abiona O., Belli H.M., de Vries M., Mohamed A., Dittmann M., Samanovic M., Mulligan M.J., Goldsmith J.A., Hsieh C.L., Johnson N.V., Wrapp D., McLellan J.S., Barnhart B.C., Graham B.S., Mascola J.R., Hansen C.L., Falconer E. // *Sci. Transl. Med*. 2021. V. 13. P. eabf1906.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abf1906>
 11. Hansen J., Baum A., Pascal K.E., Russo V., Giordano S., Wloga E., Fulton B.O., Yan Y., Koon K., Patel K., Chung K.M., Hermann A., Ullman E., Cruz J., Rafique A., Huang T., Fairhurst J., Libertiny C., Malbec M., Lee W.Y., Welsh R., Farr G., Pennington S., Deshpande D., Cheng J., Watty A., Bouffard P., Babb R., Levenkova N., Chen C., Zhang B., Romero Hernandez A., Saotome K., Zhou Y., Franklin M., Sivapalasingam S., Lye D.C., Weston S., Logue J., Haupt R., Frieman M., Chen G., Olson W., Murphy A.J., Stahl N., Yancopoulos G.D., Kyratous C.A. // *Science*. 2020. V. 369. P. 1010–1014.
<https://doi.org/10.1126/science.abd082711>
 12. Weinreich D.M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S., Gao H., Bhore R., Musser B.J., Soo Y., Rofail D., Im J., Perry C., Pan C., Hosain R., Mahmood A., Davis J.D., Turner K.C., Hooper A.T., Hamilton J.D., Baum A., Kyratous C.A., Kim Y., Cook A., Kampman W., Kohli A., Sachdeva Y., Graber X., Kowal B., DiCioccio T., Stahl N., Lipsich L., Braunstein N., Herman G., Yancopoulos G.D. // *N. Engl. J. Med*. 2021. V. 384. P. 238–251.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa2035002>
 13. Поём А. // Основы иммунологии. М.: Мир, 1991. 328 с.
 14. Klasse P.J. // *Adv. Biol*. 2014. V. 2014. P. 1–24.
<https://doi.org/10.1155/2014/157895>
 15. Mandel B. // *Adv. Virus Res*. 1978. V. 23. P. 205–268.
[https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)60101-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)60101-3)
 16. Mallery D., McEwan W.A., Bidgood S.R., Towers G.J., Johnson C.M., James L.C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. P. 19985–19990.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1014074107>
 17. von Bredow B., Arias J.F., Heyer L.N., Moldt B., Le K., Robinson J.E., Zolla-Pazner S., Burton D.R., Evans D.T. // *J. Virol*. 2016. V. 90. P. 6127–6139.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00347-16>
 18. Linscott W.D., Levinson W.E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1969. V. 64. P. 520–527.
<https://doi.org/10.1073/pnas.64.2.520>
 19. Schmaljohn A.L. // *Curr. HIV Res*. 2013. V. 11. P. 345–353.
<https://doi.org/10.2174/1570162x113116660057>
 20. Pelegrin M., Naranjo-Gomez M., Piechaczyk M. // *Trends Microbiol*. 2015. V. 23. P. 653–665.
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2015.07.005>
 21. Walker L.M., Burton D.R. // *Nat. Rev. Immunol*. 2018. V. 18. P. 297–308.
<https://doi.org/10.1038/nri.2017.148>
 22. Chan S.K., Rahumatullah A., Lai J.Y., Lim T.S. // *Adv. Exp. Med. Biol*. 2017. V. 1053. P. 35–59.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-72077-7_3
 23. Wu Y., Li S., Du L., Wang C., Zou P., Hong B., Yuan M., Ren X., Tai W., Kong Y., Zhou C., Lu L., Zhou X., Jiang S., Ying T. // *Emerg. Microbes Infect*. 2017. V. 6. P. e89.
<https://doi.org/10.1038/em.2017.79>
 24. Little M., Kipriyanov S.M., Le Gall F., Moldenhauer G. // *Immunol. Today*. 2000. V. 21. P. 364–370.
[https://doi.org/10.1016/S0167-5699\(00\)01668-6](https://doi.org/10.1016/S0167-5699(00)01668-6)
 25. Zaroff S., Tan G. // *Biotechniques*. 2019. V. 67. P. 90–92.
<https://doi.org/10.2144/btn-2019-0054>
 26. Bradbury A.R.M., Trinklein N.D., Thie H., Wilkinson I.C., Tandon A.K., Anderson S., Bladen K.L., Jones B., Force Aldred S., Bestagno M., Burrone O., Maynard J., Ferrara F., Trimmer J.S., Gornemann J., Glanville J., Wolf P., Frenzel A., Wong J., Koh X.Y., Eng H.Y., Lane D., Lefranc M.P., Clark M., Dübel S. // *MAbs*. 2018. V. 10. P. 539–546.
<https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1445456>
 27. Yu X., McGraw P.A., House F.S., Crowe J.E. // *J. Immunol. Methods*. 2008. V. 336. P. 142–151.
<https://doi.org/10.1016/j.jim.2008.04.008>
 28. Gorny M. // *Antib. Technol. J*. 2012. V. 2. P. 1–5.
<https://doi.org/10.2147/ANTI.S30489>
 29. Qiu X., Wong G., Audet J., Bello A., Fernando L., Alimonti J.B., Fausther-Bovendo H., Wei H., Aviles J., Hiatt E., Johnson A., Morton J., Swope K., Bohorov O., Bohorova N., Goodman C., Kim D., Pauly M.H., Velasco J., Pettitt J., Olinger G.G., Whaley K., Xu B., Strong J.E., Zeitlin L., Kobinger G.P. // *Nature*. 2014. V. 514. P. 47–53.
<https://doi.org/10.1038/nature13777>
 30. Smith G.P. // *Science*. 1985. V. 228. P. 1315–1317.
<https://doi.org/10.1126/science.4001944>
 31. McCafferty J., Griffiths A.D., Winter G., Chiswell D.J. // *Nature*. 1990. V. 348. P. 552–554.
<https://doi.org/10.1038/348552a0>
 32. Ledsgaard L., Kilstrup M., Karatt-Vellatt A., McCafferty J., Laustsen A.H. // *Toxins*. 2018. V. 10. P. 236.
<https://doi.org/10.3390/toxins10060236>
 33. Lerner R.A. // *Mol. BioSystems*. 2011. V. 7. P. 1004–1012.
<https://doi.org/10.1039/C0MB00310G>
 34. Zhu Z., Bossart K.N., Bishop K.A., Crameri G., Dimitrov A.S., McEachern J.A., Feng Y., Middleton D., Wang L.-F., Broder C.C., Dimitrov D.S. // *J. Infect. Dis*. 2008. V. 197. P. 846–853.
<https://doi.org/10.1086/528801>
 35. Nachbagauer R., Shore D., Yang H., Johnson S.K., Gabbard J.D., Tompkins S.M., Wrammert J., Wilson P.C., Stevens J., Ahmed R., Krammer F., Ellebedy A.H. // *J. Virol*. 2018. V. 92. P. e00949-18.
<https://doi.org/10.1128/JVI.00949-18>

36. Frenzel A., Schirrmann T., Hust M. // MAbs. 2016. V. 8. P. 1177–1194.
https://doi.org/10.1080/19420862.2016.1212149
37. Joseph B.C., Pichaimuthu S., Srimeenakshi S., Murthy M., Selvakumar M., Ganesan M., Manjunath S.R. // J. Cell Sci. Ther. 2015. V. 6. P. 221.
https://doi.org/10.4172/2157-7013.1000221
38. Sun Y., Ban B., Bradbury A., Ansari G.A.S., Blake D.A. // Anal. Chem. 2016. V. 88. P. 9181–9189.
https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b02334
39. Li H., Sethuraman N., Stadheim T. A., Zha D., Prinz B., Ballew N., Bobrowicz P., Choi B.K., Cook W.J., Cukan M., Houston-Cummings N.R., Davidson R., Gong B., Hamilton S.R., Hoopes J.P., Jiang Y., Kim N., Mansfield R., Nett J.H., Rios S., Strawbridge R., Wildt S., Gerngross T.U. // Nat. Biotechnol. 2006. V. 24. P. 210–215.
https://doi.org/10.1038/nbt1178
40. Huse W.D., Sastry L., Iverson S.A., Kang A.S., Alting-Mees M., Burton D.R., Benkovic S.J., Lerner R.A. // Science. 1989. V. 246. P. 1275–1281.
https://doi.org/10.1126/science.2531466
41. Daugherty P.S., Chen G., Olsen M.J., Iverson B.L., Georgiou G. // Protein Eng. 1998. V. 11. P. 825–832.
https://doi.org/10.1093/protein/11.9.825
42. Smith E., Zauderer M. // Curr. Drug Discov. Technol. 2014. V. 11. P. 48–55.
https://doi.org/10.2174/157016381101140124163634
43. Kanamori T., Fujino Y., Ueda T. // Biochim. Biophys. Acta – Prot. Proteomics. 2014. V. 1844. P. 1925–1932.
https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2014.04.007
44. Lipovsek D., Plückerthun A. // J. Immunol. Methods. 2004. V. 290. P. 51–67.
https://doi.org/10.1016/j.jim.2004.04.008
45. King D., Bowers P., Kehry M., Horlick R. // Curr. Drug Discov. Technol. 2014. V. 11. P. 56–64.
https://doi.org/10.2174/15701638113109990037
46. Zhou C., Jacobsen F.W., Cai L., Chen Q., Shen W.D. // MAbs. 2010. V. 2. P. 508–518.
https://doi.org/10.4161/mabs.2.5.12970
47. Adler A.S., Bedinger D., Adams M.S., Asensio M.A., Edgar R.C., Leong R., Leong J., Mizrahi R.A., Spindler M.J., Bandi S.R., Huang H., Tawde P., Brams P., Johnson D.S. // MAbs. 2018. V. 10. P. 431–443.
https://doi.org/10.1080/19420862.2018.1426422
48. Hu D., Hu S., Wan W., Xu M., Du R., Zhao W., Gao X., Liu J., Liu H., Hong J. // PLoS One. 2015. V. 10. P. e0129125.
https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129125
49. Rajan S., Kierny M.R., Mercer A., Wu J., Tovchigrechko A., Wu H., Dall'Acqua W.F., Xiao X., Chowdhury P.S. // Commun. Biol. 2018. V. 1. P. 1–8.
https://doi.org/10.1038/s42003-017-0006-2
50. Babcook J.S., Leslie K.B., Olsen O.A., Salmon R.A., Schrader J.W. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 7843–7848.
https://doi.org/10.1073/pnas.93.15.7843
51. Perry S.T., Keogh E., Morton M., Koudstaal W., Pascual G. // J. Vis. Exp. 2019. V. 150. P. e59809.
https://doi.org/10.3791/59809
52. Thorsen T., Roberts R., Arnold F.H., Quake S.R. // Phys. Rev. Lett. 2001. V. 86. P. 4163–4166.
https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.86.4163
53. Honjo T., Alt F., Neuberg M. // Molecular Biology of B Cells. Academic Press, 2003. 600 p.
54. Singhal A., Haynes C.A., Hansen C.L. // Anal. Chem. 2010. V. 82. P. 8671–8679.
https://doi.org/10.1021/ac101956e
55. Lanzavecchia A., Corti D., Sallusto F. // Curr. Opin. Biotechnol. 2007. V. 18. P. 523–528.
https://doi.org/10.1016/j.copbio.2007.10.011
56. Traggiai E., Becker S., Subbarao R., Kolesnikova L., Uematsu Y., Gismondo M.R., Murphy B.R., Rappuoli R., Lanzavecchia A. // Nat. Med. 2004. V. 10. P. 871–875.
https://doi.org/10.1038/nm1080
57. Ueki Y., Goldfarb I.S., Harindranath N., Gore M., Koprrowski H., Notkins A.L., Casali P. // J. Exp. Med. 1990. V. 171. P. 19–34.
https://doi.org/10.1084/jem.171.1.19
58. Traggiai E., Becker S., Subbarao K., Kolesnikova L., Uematsu Y., Gismondo M.R., Murphy B.R., Rappuoli R., Lanzavecchia A. // Nat. Med. 2004. V. 10. P. 871–875.
https://doi.org/10.1038/nm1080
59. Ueki Y., Goldfarb I.S., Harindranath N., Gore M., Koprrowski H., Notkins A.L., Casali P. // J. Exp. Med. 1990. V. 171. P. 19–34.
https://doi.org/10.1084/jem.171.1.19
60. Corti D., Lanzavecchia A. // Annu. Rev. Immunol. 2013. V. 31. P. 705–742.
https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-095916
61. Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Obata T., Kondo S., Kinoshita K., Kadowaki S., Takahashi K., Sugiyama T., Kishi H., Muraguchi A. // Nat. Med. 2009. V. 15. P. 1088–1092.
https://doi.org/10.1038/nm.1966
62. Huang J., Doria-Rose N.A., Longo N.S., Laub L., Lin C.-L., Turk E., Kang B.H., Migueles S.A., Bailer R.T., Mascola J.R., Connors M. // Nat. Protoc. 2013. V. 8. P. 1907–1915.
https://doi.org/10.1038/nprot.2013.117
63. Dejnirattisai W., Wongwiwat W., Supasa S., Zhang X., Dai X., Rouvinski A., Jumnainsong A., Edwards C., Than Ha Quyen N., Duangchinda T., Grimes J.M., Tsai W.Y., Lai C.Y., Wang W.K., Malasit P., Farrar J., Simmons C.P., Zhou Z.H., Rey F.A., Mongkolsapaya J., Screaton G.R. // Nat. Immunol. 2015. V. 16. P. 170–177.
https://doi.org/10.1038/ni.3058
64. Wrammert J., Smith K., Miller J., Langley W.A., Kokko K., Larsen C., Zheng N.-Y., Mays I., Garman L., Helms C., James J., Air G.M., Capra J.D., Ahmed R., Wilson P.C. // Nature. 2008. V. 453. P. 667–671.
https://doi.org/10.1038/nature06890
65. Walker L.M., Phogat S.K., Chan-Hui P.-Y., Wagner D., Phung P., Goss J.L., Wrin T., Simek M.D., Fling S., Mitcham J.L., Lehrman J.K., Priddy F.H., Olsen O.A., Frey S.M., Hammond P.W., Protocol G Principal Investigators, Kaminsky S., Zamb T., Moyle M., Koff W.C., Poirgard P., Burton D.R. // Science. 2009. V. 326. P. 285–289.
https://doi.org/10.1126/science.1178746
66. Herzenberg L.A., De Rosa S.C. // Immunol. Today. 2000. V. 21. P. 383–390.
https://doi.org/10.1016/s0167-5699(00)01678-9
67. Reddy S.T., Ge X., Miklos A.E., Hughes R.A., Hyun Kang S., Hon Hoi K., Chrysostomou C., Hunicke-Smith S.P., Iverson B.L., Tucker P.W., Ellington A.D., Georgiou G. // Nat. Biotechnol. 2010. V. 28. P. 965–969.
https://doi.org/10.1038/nbt.1673
68. Wang B., Kluwe C.A., Lungu O.I., DeKosky B.J., Kerr S.A., Johnson E.L., Tanno H., Lee C.-H., Jung J., Rezig A.B., Carroll S.M., Reyes A.N., Bentz J.R., Villanueva I., Altman A.L., Davey R.A., Ellington A.D., Georgiou G. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 13926.
https://doi.org/10.1038/srep13926

69. Parola C., Neumeier D., Reddy S.T. // *Immunology*. 2018. V. 153. P. 31–41.
https://doi.org/10.1111/imm.12838
70. Zhu J., Ofek G., Yang Y., Zhang B., Louder M.K., Lu G., McKee K., Pancera M., Skinner J., Zhang Z., Parks R., Eudailey J., Lloyd K.E., Blinn J., Alam S.M., Haynes B.F., Simek M., Burton D.R., Koff W.C., NISC Comparative Sequencing Program, Mullikin J.C., Mascola J.R., Shapiro L., Kwong P.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 6470–6475.
https://doi.org/10.1073/pnas.1219320110
71. Zhu J., Wu X., Zhang B., McKee K., O'Dell S., Soto C., Zhou T., Casazza J.P., Mullikin J.C., Kwong P.D., Mascola J.R., Shapiro L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. E4088–E4097.
https://doi.org/10.1073/pnas.1306262110
72. Tian X., Li C., Huang A., Xia S., Lu S., Shi Z., Lu L., Jiang S., Yang Z., Wu Y., Ying T. // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9. P. 382–385.
https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1729069
73. Sormanni P., Aprile F.A., Vendruscolo M. // *Chem. Soc. Rev.* 2018. V. 47. P. 9137–9157.
https://doi.org/10.1039/c8cs00523k
74. McCarthy M. // *The Lancet*. 1997. V. 349. P. 405.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)80027-X
75. Lonberg N. // *Handb. Exp. Pharmacol.* 2008. V. 181. P. 69–97.
https://doi.org/10.1007/978-3-540-73259-4_4
76. Grilo A.L., Mantalaris A. // *Trends Biotechnol.* 2019. V. 37. P. 9–16.
https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2018.05.014
77. Vaccaro C., Zhou J., Ober R.J., Ward E.S. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1283–1288.
https://doi.org/10.1038/nbt1143
78. Lazar G.A., Dang W., Karki S., Vafa O., Peng J.S., Hyun L., Chan C., Chung H.S., Eivazi A., Yoder S.C., Vielmetter J., Carmichael D.F., Hayes R.J., Dahiyat B.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. P. 4005–4010.
https://doi.org/10.1073/pnas.0508123103
79. Irvine E.B., Alter G. // *Glycobiology*. 2020. V. 30. P. 241–253.
https://doi.org/10.1093/glycob/cwaa018
80. van der Kant R., Karow-Zwick A.R., Van Durme J., Blech M., Gallardo R., Seeliger D., Aßfalg K., Baatsen P., Comper-nolle G., Gils A., Studts J.M., Schulz P., Garidel P., Schymkowitz J., Rousseau F. // *J. Mol. Biol.* 2017. V. 429. P. 1244–1261.
https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.03.014
81. Holliger P., Hudson P.J. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 1126–1136.
https://doi.org/10.1038/nbt1142
82. Bates A., Power C.A. // *Antibodies*. 2019. V. 8. P. 28.
https://doi.org/10.3390/antib8020028
83. Wu Y., Jiang S., Ying T. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 1802.
https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01802
84. Туллиб С.В. // *Мол. биология*. 2020. Т. 54. № 3. P. 362–373.
https://doi.org/10.31857/S0026898420030167
85. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hammers C., Bajyana Songa E., Bendahman N., Hammers R. // *Nature*. 1993. V. 363. P. 446–448.
https://doi.org/10.1038/363446a0
86. Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E.C., Flajnik M.F. // *Nature*. 1995. V. 374. P. 168–173.
https://doi.org/10.1038/374168a0
87. Bakhtiar R. // *Biotechnol. Lett.* 2016. V. 38. P. 1655–1664.
https://doi.org/10.1007/s10529-016-2160-x
88. Chau C.H., Steeg P.S., Figg W.D. // *The Lancet*. 2019. V. 394. P. 793–804.
https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)31774-X
89. Spiess K., Jakobsen M.H., Kledal T.N., Rosenkilde M.M. // *J. Leukoc. Biol.* 2016. V. 99. P. 911–925.
https://doi.org/10.1189/jlb.2MR1015-468R

Methods for Obtaining Monoclonal Antibodies for the Prevention and Treatment of Viral Infections

Iu. A. Merkuleva*, #, D. N. Shcherbakov*, and A. A. Ilyichev*

#Phone: +7 (923) 777-15-86; e-mail: j.a.merkulyeva@gmail.com

*State Research Center of Virology and Biotechnology “Vector”, Rospotrebnadzor, World-Class Genomic Research Center for Biological Safety and Technological Independence, Federal Scientific and Technical Program on the Development of Genetic Technologies, Koltsovo, Novosibirsk region, 630559 Russia

The viral threat can arise suddenly and quickly turn into a major epidemic or pandemic. In this case, it will be necessary to develop effective means of therapy and prevention in a short time. Vaccine development takes decades, and the use of antiviral compounds is often ineffective and unsafe. A quick response may be use of convalescent plasma but a number of difficulties associated with their use forced researchers to switch to the development of safer and more effective drugs based on monoclonal antibodies (mAb). In order to provide protection, such drugs must have a key characteristic – neutralizing properties, i.e. the ability to block viral infection. Currently, in the arsenal of researchers there are a number of approaches for obtaining mAbs, however, none of them is not standard. Each approach has its own advantages and disadvantages. The choice of method depends both on the characteristics of the virus and on time constraints and technical challenges. This review provides a comparative analysis of modern methods for the obtaining of neutralizing mAbs, and describes the current trends in the design of antibodies for therapy and prevention of viral diseases.

Keywords: monoclonal antibodies, viral infections, hybridoma technology, display technology, B-cell sorting