

Разработка и исследование биологической активности *in vitro* IgA1- и IgG1-изотипов универсального антитела FM08 против вируса гриппа А

Д.А. Фалалеева, В.С. Монахова, М.А. Плотникова, В.А. Олейник, Е.А. Романовская-Романько,
С.А. Клотченко
Научно-исследовательский институт гриппа им. А.А. Смородинцева, Санкт-Петербург, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. По данным Всемирной организации здравоохранения, сезонный грипп вызывает приблизительно от 3 до 5 млн случаев тяжёлой формы заболевания, требующей госпитализации, из которых от 290 до 650 тыс. заканчиваются летальным исходом. Одним из наиболее современных перспективных препаратов, позволяющих проводить эффективную терапию при гриппе, являются рекомбинантные антитела.

Цель исследования. Оценить свойства, специфичность и вируснейтрализующую активность рекомбинантного антитела FM08, направленного против стволового домена гемагглютинина вируса гриппа в формате IgA1 и IgG1.

Методы. Молекулярно-генетическими методами получены экспрессионные плазмиды. Методом транзientной экспрессии в культуре клеток HEK293 в бессывороточной среде накоплены экспериментальные образцы антитела FM08 IgA1- и IgG1-изотипов. Для сравнительной оценки биологической активности применяли электрофоретическое разделение, иммуоферментный анализ, реакцию микронейтрализации. В работе также использованы штаммы вируса гриппа А подтипов H1N1pdm, H2N2, H3N2, H5N1 и штаммы вируса гриппа В (обеих генетических линий).

Результаты. Показано, что полученные генетические конструкции позволяют накапливать рекомбинантные антитела FM08 IgA1- и IgG1-изотипов в эукариотических культурах клеток. Оба изотипа антитела FM08 имели практически идентичный паттерн связывания и, начиная с концентрации 16 нг/мкл, взаимодействовали со штаммами обеих филогенетических групп вируса гриппа А, за исключением штамма H1N1 1934 года. 50% ингибирующая концентрация (IC₅₀) антитела составила 1,49 мкг/мл. Антитела FM08 как IgA1-, так и IgG1-изотипов нейтрализовали вирус гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm09) при значениях IC₅₀ 1–4 мкг/мл и вирус гриппа A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2) при значении IC₅₀ 20 мкг/мл.

Заключение. Получение и исследование биологической активности экспериментальных образцов антитела FM08 изотипов IgA1 и IgG1 *in vitro* показало его высокий потенциал в качестве противовирусного средства.

Ключевые слова: рекомбинантные антитела; антитела широкого спектра действия; иммуноглобулины класса G; иммуноглобулины класса А; вирус гриппа; противовирусные препараты; пассивная иммунотерапия; вируснейтрализующая активность.

КАК ЦИТИРОВАТЬ:

Фалалеева Д.А., Монахова В.С., Плотникова М.А., Олейник В.А., Романовская-Романько Е.А., Клотченко С.А. Разработка и исследование биологической активности *in vitro* IgA1- и IgG1-изотипов универсального антитела FM08 против вируса гриппа А // Цитокины и воспаление. 2025. Т. 22, № 4. С. XXX–XXX. DOI: 10.17816/CI698077 EDN: KEUWQR

Статья получена: 07.12.2025

Статья одобрена: 23.12.2025

Опубликована online: 24.12.2025

Development and *in vitro* study of biological activity of IgA1 and IgG1 isotypes of the broadly neutralizing antibody FM08 against influenza A virus

Daria A. Falaleeva, Varvara S. Monakhova, Marina A. Plotnikova, Veronika A. Oleynik, Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko, Sergey A. Klotchenko
Smorodintsev Research Institute of Influenza, Saint Petersburg, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: According to the World Health Organization, seasonal influenza causes approximately 3 to 5 million cases of severe illness requiring hospitalization, of which 290,000 to 650,000 result in death. One of the most modern and promising drugs enabling effective influenza therapy are recombinant antibodies.

AIM: To evaluate the properties, specificity, and virus-neutralizing activity of the recombinant antibody FM08, targeting the stem domain of influenza virus hemagglutinin, in IgA1 and IgG1 formats.

METHODS: Expression plasmids were constructed using molecular genetic techniques. Experimental samples of the IgA1- and IgG1-isotype FM08 antibody were produced by transient expression in HEK293 cells cultured in serum-free medium. Electrophoretic separation, ELISA, and a microneutralization assay were used for the comparative assessment of biological activity. The study also employed influenza A virus strains of the H1N1pdm, H2N2, H3N2, and H5N1 subtypes, as well as influenza B virus strains (from both genetic lineages).

RESULTS: It was shown that the obtained genetic constructs enable the production of recombinant FM08 antibodies of the IgA1 and IgG1 isotypes in eukaryotic cell cultures. Both antibody isotypes exhibited nearly identical binding patterns and, starting from a concentration of 16 ng/ μ l, interacted with strains from both phylogenetic groups of influenza A virus, with the exception of the 1934 H1N1 strain. The 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the antibody was 1.49 μ g/ml. FM08 antibodies of both IgA1 and IgG1 isotypes neutralized the influenza A/California/07/09 (H1N1pdm09) virus with IC₅₀ values of 1–4 μ g/ml and the influenza A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2) virus with IC₅₀ values of 20 μ g/ml.

CONCLUSION: Production and study of the *in vitro* biological activity of experimental samples of the IgA1 and IgG1 isotypes of antibody FM08 demonstrated its high potential as an antiviral agent.

Keywords: Recombinant Antibodies; Broadly Neutralizing Antibodies; Immunoglobulin G; Immunoglobulin A; Influenza A virus; Antiviral Agents; Passive Immunotherapy; Neutralization Tests.

TO CITE THIS ARTICLE:

Falaleeva DA, Monakhova VS, Plotnikova MA, Oleynik VA, Romanovskaya-Romanko EA, Klotchenko SA. Development and *in vitro* Characterization of the IgA1 and IgG1 Isotypes of the Broadly Neutralizing Antibody FM08 Against Influenza A Virus. *Cytokines and Inflammation*. 2025;22(4):XXX-XXX. DOI: 10.17816/CI698077 EDN: KEUWQR

Submitted: 07.12.2025

Accepted: 23.12.2025

Published online: 24.12.2025

ОБОСНОВАНИЕ

Ежегодные эпидемии гриппа, вызываемые вирусом гриппа А штаммов H1N1 и H3N2 и вирусом гриппа В, приводят примерно к 1 млрд случаев инфицирования, 3–5 млн случаев тяжёлого заболевания, требующих госпитализации, и до 0,5 млн летальных исходов по всему миру [1]. Современная стратегия противодействия гриппу в значительной степени опирается на вакцинопрофилактику. Тем не менее в связи со спорадическим появлением штаммов вируса гриппа, устойчивых к противовирусным препаратам, а также отсутствием универсальных вакцин актуальной задачей становится разработка альтернативных подходов к лечению. Одним из наиболее перспективных направлений считается использование моноклональных антител широкого спектра действия [2].

За последнее 10-летие из В-клеток памяти вакцинированных или переболевших пациентов были идентифицированы новые противогриппозные моноклональные антитела [3–6], которые способны нейтрализовать широкий спектр штаммов вируса гриппа.

Большинство вируснейтрализующих антител против гриппа связываются с глобулярной головкой гемагглютинина (НА) вируса и распознают гомологичные штаммы в пределах данного подтипа [3, 7]. Связываясь с антигеном, такие антитела блокируют (делают недоступным) взаимодействие вируса с его рецептором — сиаловой кислотой на поверхности клетки, что препятствует интернализации вируса [7]. Существует другой тип антител, также обладающих широкой специфичностью и нейтрализующей активностью, направленных на стволовой домен НА вируса гриппа, содержащий пептид слияния. Такие антитела способны блокировать расщепление белка слияния и предотвращать формирование требуемой для инфицирования конформации НА [8]. Прямое нейтрализующее действие антител, направленных к стволу НА, менее выражено по сравнению с антителами, мишенью которых является глобулярный участок НА, но, как было показано, такие антитела [3, 5, 9] индуцируют сильную антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) инфицированных клеток как *in vitro*, так и *in vivo*.

Известно, что эффекторное свойства антител зависят от структуры входящей в его состав тяжёлой цепи, определяющей изотип [10]. В зависимости от изотипа — IgG, IgA, IgM, IgA или IgE — иммуноглобулины способны взаимодействовать с разным набором иммунных клеток и в разной степени проявлять Fc-зависимые функции [11], такие как антителозависимый клеточный фагоцитоз, трогоцитоз, ADCC, нетоз и т. п. [12]. Усовершенствования дизайна и вариантов применения могут сделать рекомбинантные антитела ключевым инструментом в борьбе с гриппом [13].

В рамках данного исследования были получены иммуноглобулины в двух форматах — IgG1- и IgA1-изотипов (мономерная форма) — на основе описанных в литературе переменных участков нейтрализующего антитела широкого спектра действия FM08 (MEDI8852), направленного к стволовому домену НА, а также изучены их свойства *in vitro*. Предыдущие исследования [14] продемонстрировали безопасность и хорошую переносимость однократного внутривенного введения препарата на основе антитела MEDI8852 у здоровых людей, что является обоснованием для его дальнейшей разработки в качестве терапевтического средства для профилактики и лечения гриппа. Последовательности переменных областей тяжёлой и лёгкой цепей FM08 находятся в открытом доступе [5].

ЦЕЛЬ

Получить и оценить свойства, специфичность и вируснейтрализующую активность рекомбинантного антитела FM08, направленного против стволового домена гемагглютинина вируса гриппа А в формате IgA1 и IgG1.

МЕТОДЫ

НАКОПЛЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ IgA1- и IgG1-ИЗОТИПОВ

Исследование проведено в период с 01.02.2025 по 30.11.2025. Клетки линии HEK293 культивировали в среде DMEM (Биолот) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США), истощённой на сорбенте с белком А, в CO₂-инкубаторе при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 6% CO₂. Для проведения трансфекции клетки заседали в культуральные флаконы площадью 175 см² (Jet Biofil, Китай) с целью достижения суточного 100% монослоя,

после чего трансфицировали с помощью трансфекционного реагента GenJect-39 (Молекта, Россия) согласно инструкции производителя. Трансфекцию проводили из расчёта 40 мкг плазмидной ДНК (суммарно кодирующей тяжёлые и лёгкие цепи антитела) на один культуральный флакон при соотношении ДНК : трансфекционный агент 1:1 (м/о). Клетки после трансфекции культивировали в течение 12 сут, поддерживая концентрацию глюкозы не менее 6 г/л.

ХРОМАТОГРАФИЧЕСКАЯ ОЧИСТКА РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ

Хроматографическую очистку рекомбинантных антител проводили методом аффинной хроматографии с помощью хроматографической системы АКТА pure (Cytiva, США) на колонке KarraSelect (1 мл, Cytiva, США) объёмом 1 мл (Seraх, Китай). Колонку промывали 10 CV (объёмов колонки, column volume) стартового буфера (1× PBS) при скорости потока 1 мл/мин. 50 мл культуральной жидкости, предварительно профильтрованной через шприцевой фильтр Sartorius (размер пор — 0,45 мкм, материал мембраны — полиэфирсульфон), вносили в хроматограф через насос для ввода образцов на скорости потока 0,5 мл/мин. Далее колонку промывали 10 CV стартового буфера при скорости потока 1 мл/мин. Антитела элюировали 100% элюирующим буфером (20 mM глицин, pH 3.0) в объёме 15 CV на скорости потока 1 мл/мин. Мониторинг осуществляли по оптическому поглощению на длине волны 280 нм. На этапе элюции при помощи автоматического коллектора отбирали пик с оптической плотностью выше 0,05 AU. К собранному материалу добавляли 1 M раствор Tris-HCl (pH 8.8, 20 мкл на 1 мл) и 4 M раствор хлорида натрия (40 мкл на 1 мл). Для увеличения стерильности и предупреждения деградации и контаминации полученный препарат фильтровали при помощи шприцевого фильтра Sartorius (размер пор — 0,45 мкм, материал мембраны — полиэфирсульфон) и использовали для дальнейших исследований.

ЭЛЕКТРОФОРЕЗ БЕЛКОВ В ПОЛИАКРИЛАМИДНОМ ГЕЛЕ

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ЭФ-ПААГ) проводили по методу Лэммли [15] в восстанавливающих (в присутствии β-меркаптоэтанола) и невосстанавливающих условиях. Использовали 10-луночный градиентный предзалитый гель Any kD (Bio-Rad, США). Перед нанесением образца в лунки ПААГ его смешивали с 4-кратным буфером Лэммли, после чего проводили денатурацию белка при 95 °C в твёрдотельном термостате «Гном» (ДНК-Технология, Россия) в течение 10 мин (восстанавливающие условия). В каждую лунку вносили по 1–5 мкг образца белка. Концентрацию белков оценивали на спектрофотометре NanoDrop ND-1000 (для антител использовали режим IgG, при котором значение E 1%=13,70). Электрофоретическое разделение белков проводили при постоянной силе тока (40 mA на гель) в течение 45 мин в вертикальной электрофоретической ячейке Mini-PROTEAN Tetra (Bio-Rad, США). Окрашивание геля выполняли коллоидным раствором Кумасси. Изображение окрашенного геля получали на гель-документирующей станции Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad, США).

ПРОВЕРКА СВЯЗЫВАНИЯ И СПЕЦИФИЧНОСТИ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ МЕТОДОМ НЕПРЯМОГО ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА

Для проведения непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) вирусным материалом, разведённым в фосфатно-солевом буфере (PBS) до нужной концентрации (обычно до 2 мкг/мл), сенсibilizировали лунки 96-луночного планшета Microlon High Binding (#655061, Greiner Bio-One, Германия) в объёме 100 мкл на лунку и инкубировали при температуре 4 °C в течение ночи (12–18 ч). После этого проводили отмывку в приборе BioTek 405 TS Washer (Agilent Technologies, США) путём удаления содержимого лунок и трёхкратной отмывки несвязавшихся компонентов внесением 1-кратного раствора PBS-T (PBS с добавлением Tween 20 до 0,05%) по 300 мкл в лунку с последующим удалением раствора. Далее сорбирующую поверхность лунок блокировали 5% раствором сухого обезжиренного молока (Blotting-Grade Blocker, #1706404, Bio-Rad, США) в 1-кратном PBS-T (далее «блокирующий реагент») при температуре 37 °C в течение 1 ч и проводили отмывку. Затем в лунки микропланшета вносили тестируемые рекомбинантные антитела в объёме 100 мкл в концентрации от 2 мкг/мл до 4 нг/мл, разведённые на блокирующем реагенте, инкубировали при температуре 37 °C в течение 1 ч и проводили отмывку. Связавшиеся с антигеном антитела детектировали с помощью пероксидазного конъюгата IgG GAN-HRP (#172-1033, Bio-Rad, США) или IgA GAN-HRP (#A0295, Sigma-Aldrich, США), разведённого 1 к 1000 на блокирующем реагенте, при температуре 37 °C в течение 1 ч, по 100 мкл в лунку. Далее

проводили отмывку и проявляли пероксидазную реакцию добавлением в каждую лунку 100 мкл субстрата тетраметилбензидина (ТМБ) (#R055, Хема, Россия). После остановки цветной реакции добавлением в каждую лунку по 100 мкл 2Н H₂SO₄ измеряли оптическую плотность на длинах волн 450 нм (OD₄₅₀) и 620 нм (OD₆₂₀) на микропланшетном ридере Multiskan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, США). Дальнейшую обработку результатов проводили с использованием программ Microsoft Office Excel и GraphPad Prism 6. Для учёта фонового сигнала сначала находили разницу соответствующих величин оптической плотности OD₄₅₀ и OD₆₂₀ для каждой лунки. В качестве порогового значения (limit of detection, LOD) брали среднее значение (mean value) по всем отрицательным контролям (лунки с растворителем PBS-T) плюс три стандартных отклонения (SD) данной величины.

РЕАКЦИЯ МИКРОНЕЙТРАЛИЗАЦИИ

Реакцию микронейтрализации проводили по стандартной методике, рекомендуемой Всемирной организацией здравоохранения¹. Для этого готовили последовательные двукратные разведения антитела в питательной среде Alpha MEM (#1.3.9.1., Биолот, Россия), смешивали с равным объёмом вируса, содержащего 100 ТИД₅₀/50 мкл, и инкубировали при 37 °С в течение 1 ч. Вирусосодержащую жидкость разводили до нужной концентрации в той же среде с добавлением 1 мкг/мл трипсина, обработанного ТРСК (#T1426, Sigma-Aldrich, США), и 1% антибиотика-антимикотика (#152400, Gibco, США). Далее смесь переносили на суточный монослой клеток почки собаки Мадина–Дарби (MDCK). Клетки культивировали в среде α-MEM с добавлением 2 mM L-глутамина и 10% эмбриональной сыворотки коров (Биолот) в 96-луночной планшете (по 100 мкл в лунку) и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO₂ в течение 72 ч. Учёт развития инфекции проводили с помощью реакции гемагглютинации с использованием 0,5% суспензии куриных эритроцитов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения и накопления рекомбинантных антител FM08 IgA1- и IgG1-изотипов варибельные области тяжёлых и лёгких цепей были клонированы в высокоэкспрессионные векторы pcDNA3.4 и pIRESpuo3, предназначенные для накопления белков в эукариотических клеточных линиях. Константные участки тяжёлых цепей традиционно состояли из доменов CH1-hinge region-CH2-CH3, их аминокислотные последовательности были полностью идентичны описанным в базе данных UniProt [16] последовательности P01857 для IgG1 и P01876 для IgA1 человека. Константные области лёгкой цепи, идентичной для обоих изотипов антитела FM08, полностью соответствовали последовательности каппа-цепи человека UniProt P01834. Для секретируемой иммуноглобулина обе тяжёлых цепи содержали на N-конце сигнальную последовательность MEFGLSWVFLVALFRGVQC, а лёгкая — MDMRVPAQLLGLLLWLSGARC, описанные ранее в литературе [17]. Схемы разработанных плазмид представлены на рис. 1, а.

Биосинтез экспериментальных образцов рекомбинантного антитела FM08 обоих изотипов был выполнен с использованием культуры адгезионных клеток HEK293 в режиме транзientной экспрессии в бессывороточной среде. После хроматографической очистки препараты иммуноглобулинов анализировали методом ЭФ-ПААГ по методу Лэммли [15]. Для дальнейшей сравнительной оценки свойств получено не менее 0,5 мг рекомбинантного антитела FM08 каждого изотипа. Результаты электрофореза представлены на рис. 1, б. В восстанавливающих условиях для обоих образцов наблюдаются полосы около 50–55 кДа, соответствующие тяжёлым цепям, а также полосы около 25–27 кДа, соответствующие лёгким цепям иммуноглобулинов.

¹ World Health Organization. Serological diagnosis of influenza by microneutralization assay. B: World Health Organization [Internet]. Geneva, Switzerland, 2010. Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/serological-diagnosis-of-influenza-by-microneutralization-assay> Дата обращения: 24.12.2025.

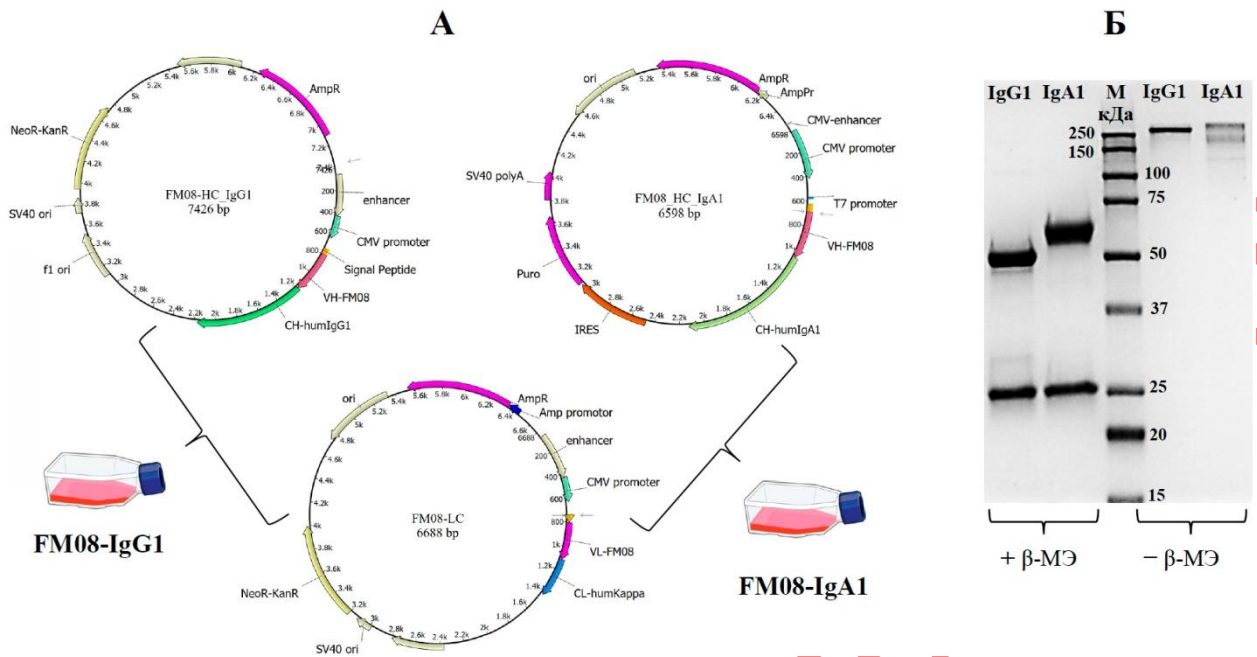


Рис. 1. Конструирование и анализ рекомбинантного антитела FM08 изотипов IgA1 и IgG1. *a* — схемы плазмид, используемых для транзientной экспрессии антитела FM08 IgA1- и IgG1-изотипов. Карты созданы в программе UGENE [18]; *b* — результаты электрофореза белков в полиакриламидном геле рекомбинантного антитела FM08 IgG1- и IgA1-изотипов в восстанавливающих (+β-МЭ) и невосстанавливающих (-β-МЭ) условиях. β-МЭ — β-меркаптоэтанол. М — маркер молекулярных масс Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Bio-Rad, США). На дорожках в левой части геля видны полосы, соответствующие тяжёлой (HC) и лёгкой (LC) цепям антитела FM08.

Fig. 1. Design and analysis of the recombinant FM08 antibody in IgA1 and IgG1 isotypes. *a* — Plasmid maps used for the transient expression of the FM08 antibody in IgA1 and IgG1 isotypes. Maps were generated using the UGENE software [18]. *b* — SDS-PAGE analysis of the recombinant FM08 antibody (IgG1 and IgA1 isotypes) under reducing (+β-ME) and non-reducing (-β-ME) conditions. β-ME — β-mercaptoethanol. M — molecular weight marker Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Bio-Rad, USA). In the left lanes of the gel, bands corresponding to the heavy (HC) and light (LC) chains of the FM08 antibody are visible.

После анализа целостности и подтверждения молекулярных масс накопленных препаратов исследована их вирус-связывающая активность. Способность антитела FM08 разных изотипов связываться с заявленными антигенами была проанализирована методом ИФА. Для этого в качестве сорбирующих лигандов использована панель вирусов гриппа, содержащих различные подтипы поверхностных гликопротеинов HA и NA. Исследовано вирус-связывающее действие обоих изотипов с 13-ю штаммами вируса гриппа, два из которых относились к типу В. Согласно полученным нами результатам (рис. 2) оба изотипа антитела FM08 имели практически идентичный паттерн связывания с исследуемыми вирусами, значения оптической плотности также были сопоставимы. Оба изотипа эффективно выявляли сезонно циркулирующие в настоящее время в человеческой популяции подтипы вирусов H1N1pdm и H3N2. Также наблюдался достаточно высокий сигнал связывания с подтипом H5N1, потенциально обладающим высоким пандемическим потенциалом, и H2N2. Примечательно, что антитело FM08 не проявляло связывающей активности с вирусом гриппа H1N1 1934 года, что в целом сопоставимо с литературными данными [19]. Ни изотип IgA1, ни изотип IgG1 антитела FM08 не связывали штаммы вируса гриппа В. Наблюдалась зависимость уровня сигнала детекции от количества антитела, взятого в ИФА, однако даже минимальная концентрация антитела 16 нг/мл позволяла специфически детектировать вирус, с которым происходило связывание и при более высоких концентрациях.

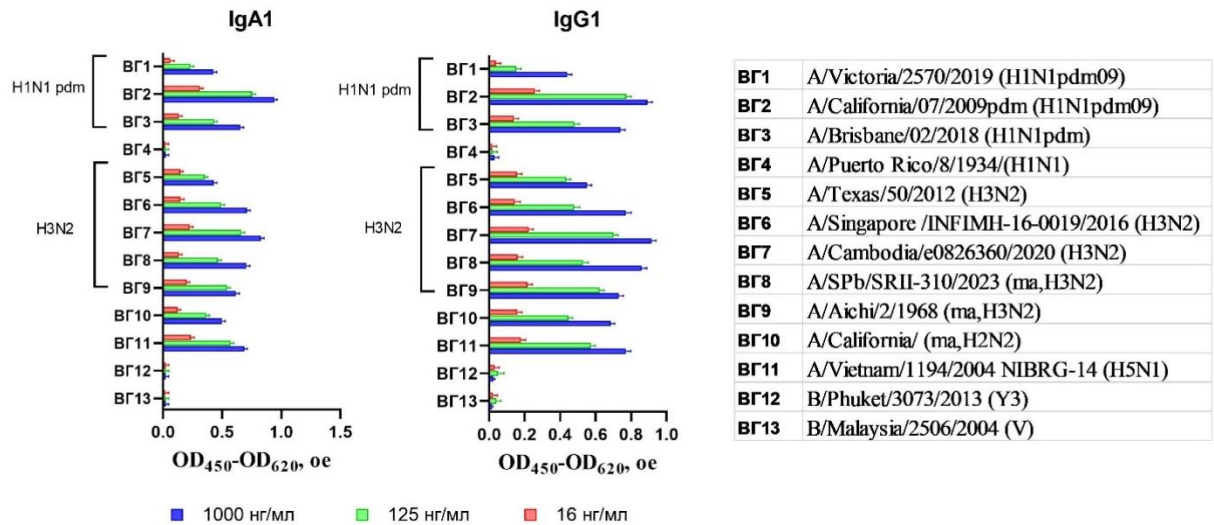


Рис. 2. Результаты анализа связывания антитела FM08 IgA1- и IgG1-изотипов при концентрации 1000 нг/мл (показана синим цветом), 125 нг/мл (зелёным цветом) и 16 нг/мл (красным цветом) с вирусами гриппа А и В. Столбцы отражают средние значения оптической плотности ($\Delta OD_{450;620}$) по двум повторам \pm стандартное отклонение (SD). Справа в таблице представлены полные названия и подтипы вируса гриппа, использованные при сорбции. ВГ — вирус гриппа.

Fig. 2. Results of the binding analysis of FM08 antibody IgA1 and IgG1 isotypes at concentrations of 1000 ng/mL (shown in blue), 125 ng/mL (green), and 16 ng/mL (red) to influenza A and B viruses. The bars represent the mean optical density values ($\Delta OD_{450;620}$) from two replicates \pm standard deviation (SD). The table on the right lists the full names and subtypes of the influenza viruses used in the sorption assay. ВГ — influenza virus.

Заключительный этап исследования был посвящён сравнительной оценке вируснейтрализующей активности антитела FM08, полученного в форматах IgA1- и IgG1-изотипов. Исследована способность нейтрализовать антителом FM08 инфекционные вирусы гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm09), A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1), A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2) *in vitro* на культуре перmissive клеток MDCK.

Детекцию степени ингибирования цитопатического действия вируса гриппа оценивали методом реакции гемагглютинации. По результатам построения кривой «доза — эффект» на основании трёх независимых повторов рассчитана 50% ингибирующая концентрация (IC₅₀) в отношении протестированных штаммов (рис. 3).

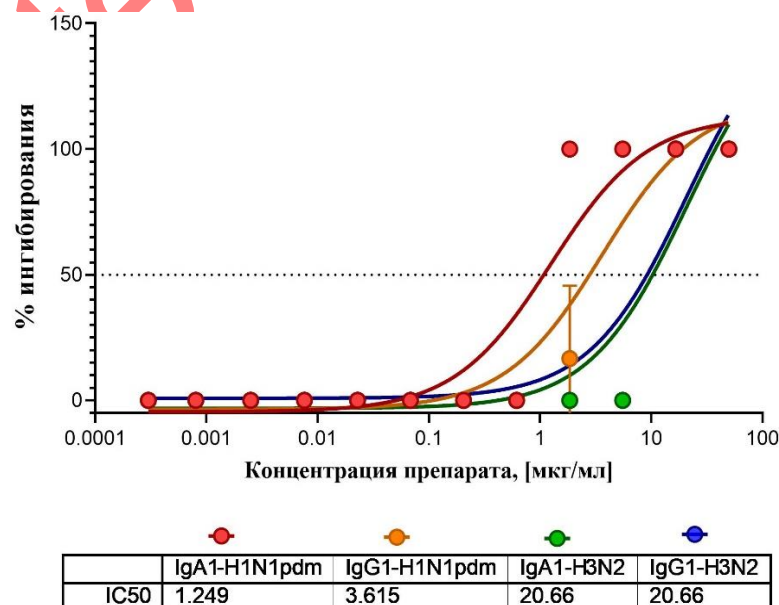


Рис. 3. Нейтрализующая активность антитела FM08 двух изоформ — IgA1 и IgG1. Определение титра нейтрализующих антител выполнено в трёх повторах, для каждой точки на графике представлено среднее значение процента ингибирования. В таблице под рисунком представлены рассчитанные значения IC_{50} .

Fig. 3. Neutralizing activity of the FM08 antibody of two isotypes — IgA1 and IgG1. The neutralizing antibody titer was determined in triplicate; the mean value of the inhibition percentage is shown for each data point on the graph. The calculated IC_{50} values are presented in the table below the figure.

Согласно полученным результатам оба изоформа антитела FM08 проявляли нейтрализующую активность в отношении эталонных штаммов вируса гриппа. Показатели IC_{50} для вируса гриппа H1N1pdm в зависимости от изоформа варьировали в диапазоне 1–4 мкг/мл. Для вируса H3N2 значение IC_{50} было больше — 20 мкг/мл. Значимых различий между полученными значениями IC_{50} для антитела FM08 IgA1- и IgG1-изоформ выявлено не было. Важно отметить, что для вируса H1N1 значение IC_{50} определить не удалось ($IC_{50} > 50$ мкг/мл). Этот результат согласуется с отсутствием достоверного связывания антитела FM08 обоих изоформ с данным штаммом в непрямом ИФА.

ОБСУЖДЕНИЕ

В то время как антигенная специфичность антитела определяется переменными доменами, *in vivo* нейтрализация патогенов в значительной степени зависит от его Fc-опосредованных эффекторных функций. В настоящее время в качестве основы для терапевтических антител используют изоформ IgG1 [11]. Тем не менее показано, что эффективность антител IgA-изоформ на слизистых оболочках, таких как эпителий дыхательных путей и кишечника, значительно выше, чем у IgG [20]. Таким образом, различия в Fc-опосредованных функциях иммуноглобулинов могут играть существенную роль в эффективности терапии.

Наше исследование было посвящено получению, характеристике, а также сравнительной оценке биологической активности *in vitro* антитела FM08 двух форматов — IgA1- и IgG1-изоформ. FM08 — это человеческое моноклональное антитело широкого спектра действия, направленное против гемагглютинина вируса гриппа А обеих филогенетических групп [21]. Эффективная нейтрализация гриппа достигается за счёт воздействия FM08 на начальные и завершающие этапы жизненного цикла вируса. В частности, FM08 связывается с аминокислотными остатками в гидрофобной бороздке в домене слияния HA и стабилизирует его конформацию, ингибируя рН-опосредованное слияние вируса с эндосомой [2]. Известно, что такие антитела менее эффективны при прямой нейтрализации вируса по сравнению с антителами, направленными к глобулярному домену HA, однако они обеспечивают защиту *in vivo* посредством Fc-зависимых эффекторных функций [8]. В 2025 году опубликовано исследование [22], посвящённое комбинаторной терапии гриппа В препаратом, представляющим собой рекомбинантное антитело MEDI8852, конъюгированное с ингибитором нейраминидазы занамивиром. Показано, что Fc-фрагмент человеческого иммуноглобулина IgG1 увеличил период полувыведения в кровотоке препарата, обеспечив полную защиту мышей от летальной экспериментальной гриппозной инфекции.

Поэтому сравнительный анализ противовирусной активности разных изоформ одного антитела представляет особую практическую ценность для выбора оптимальной терапевтической формы. Нами были получены плазмидные конструкции для сборки рекомбинантных антител FM08 IgA1- и IgG1-изоформ в эукариотических клетках. Каждое антитело было собрано с использованием двух плазмид, кодирующих тяжёлую и лёгкую цепи. При этом лёгкая цепь (а также кодирующая её плазмидная конструкция) являлась общей для обоих изоформ и принадлежала к каппа-типу. Известно, что в соответствии с принципом аллельного исключения, В-лимфоциты экспрессируют только один тип лёгкой цепи иммуноглобулина — каппа или лямбда, функционально идентичные друг другу [23]. Мы выбрали каппа-цепь ввиду того, что изначально выделенное от пациента антитело содержало именно этот тип [24]. Кроме того, использование лёгкой цепи каппа-типа позволило унифицировать очистку рекомбинантных антител IgA1- и IgG1-изоформ, поскольку оба изоформа могли быть очищены на одном аффинном носителе, специфичном к каппа-цепи.

Электрофоретический анализ очищенных препаратов антител подтвердил наличие полос, соответствующих по молекулярной массе тяжёлой и лёгкой цепям иммуноглобулинов. В восстанавливающих условиях под действием β-меркаптоэтанола наблюдается диссоциация антител на тяжёлые (~50 кДа) и лёгкие (~25 кДа) цепи, что согласуется с теоретически предсказанными значениями. В невосстанавливающих условиях оба изоформа антитела FM08

мигрировали в геле в виде единого гетеротетрамера. Следует отметить, что в работе была получена только мономерная форма антитела FM08 изотипа IgA1. Известно, что в сыворотке крови IgA в основном присутствует в виде мономера, хотя также существуют димерные dIgA и полимерные pIgA формы [25]. Мономерные антитела, изобилирующие в сыворотке крови, способны взаимодействовать с Fc-рецепторами на поверхности иммунных клеток, запуская тем самым реализацию их эффекторных функций [26].

Нами показано, что оба изотипа антитела FM08 высокоэффективно связывали штаммы вируса гриппа А, относящиеся к обеим филогенетическим группам (по подтипам гемагглютинина). Генетически существует 18 подтипов HA вируса гриппа А, которые образуют группу 1 (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17, H18) и группу 2 (H3, H4, H7, H10, H14, H15) [27, 28]. Антитела, полученные в результате вакцинации или заражения, нейтрализуют в первую очередь гомологичные штаммы вируса гриппа. Антитела широкой специфичности, способные нейтрализовать несколько подтипов вируса из разных филогенетических групп, обладают высоким терапевтическим потенциалом.

В завершение мы подтвердили гетеросубтипичную нейтрализующую активность обоих изотипов полученного нами антитела FM08 в отношении вируса гриппа подтипов H1N1pdm и H3N2. Показано, что антитело FM08 как изотипа IgA1, так и изотипа IgG1 эффективно нейтрализует вирусы гриппа A/California/07/09 (H1N1pdm09) и A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2) и предотвращает инфицирование клеток MDCK вирусами гриппа А. Значения IC₅₀, полученные *in vitro* для антитела FM08 обоих изотипов, являются сопоставимыми и типичными [5] для препаратов с высокой противовирусной активностью.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами получены экспериментальные образцы рекомбинантных антител IgA1- и IgG1-изотипов, содержащие варибельные домены моноклонального антитела человека FM08. Для этого произведён дизайн плазмид, кодирующих тяжёлые и лёгкие цепи иммуноглобулинов, их экспрессия в эукариотических системах и последующая очистка. При тестировании *in vitro* экспериментальные препараты антител проявили выраженную противовирусную активность, что указывает на их высокий терапевтический потенциал. Получение рекомбинантных широконейтрализующих антител против гриппа создаёт перспективу для разработки универсальных терапевтических и профилактических препаратов.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Д.А. Фалалеева — проведение исследования, анализ данных, написание черновика рукописи; В.С. Монахова — проведение исследования, анализ данных; М.А. Плотникова — разработка методологии, проведение исследования, анализ данных, визуализация, написание черновика рукописи; В.А. Олейник — проведение исследования, анализ данных; Е.А. Романовская-Романько — проведение исследования, анализ данных, написание черновика рукописи; С.А. Клотченко — определение концепции, руководство исследованием, привлечение финансирования, пересмотр и редактирование рукописи. Все авторы одобрили рукопись (версию для публикации), а также согласились нести ответственность за все аспекты работы, гарантируя надлежащее рассмотрение и решение вопросов, связанных с точностью и добросовестностью любой её части.

Этическая экспертиза. Неприменимо.

Источники финансирования. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации (регистрационный номер НИОКТР в ЕГИСУ НИОКТР 124021200034-5).

Раскрытие интересов. Авторы заявляют об отсутствии отношений, деятельности и интересов за последние три года, связанных с третьими лицами (коммерческими и некоммерческими), интересы которых могут быть затронуты содержанием статьи.

Оригинальность. При создании настоящей работы авторы не использовали ранее опубликованные сведения (текст, иллюстрации, данные).

Доступ к данным. Редакционная политика в отношении совместного использования данных к настоящей работе неприменима, новые данные не собирали и не создавали.

Генеративный искусственный интеллект. При создании настоящей статьи технологии генеративного искусственного интеллекта не использовали.

Рассмотрение и рецензирование. Настоящая работа подана в журнал в инициативном порядке и рассмотрена по обычной процедуре. В рецензировании участвовали два члена редакционного совета.

ADDITIONAL INFORMATION

Author contributions: D.A. Falaleeva: investigation, formal analysis, writing—original draft; V.S. Monakhova: investigation, formal analysis; M.A. Plotnikova: methodology, investigation, formal analysis, visualization, writing—original draft; V.A. Oleynik: investigation, formal analysis; E.A. Romanovskaya-Romanko: investigation, formal analysis, writing—original draft; S.A. Klotchenko: conceptualization, supervision, funding acquisition, writing—review & editing. All the authors approved the version of the manuscript to be published and agreed to be accountable for all aspects of the work, ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

Ethics approval: Not applicable.

Funding sources: This study was supported by the Ministry of Health of the Russian Federation (assignment no. 124021200034-5).

Disclosure of interests: The authors have no relationships, activities, or interests for the last three years related to for-profit or not-for-profit third parties whose interests may be affected by the content of the article.

Statement of originality: No previously obtained or published material (text, images, or data) was used in this study or article.

Data availability statement: The editorial policy regarding data sharing does not apply to this work, and no new data was collected or created.

Generative AI: No generative artificial intelligence technologies were used to prepare this article.

Provenance and peer-review: This paper was submitted unsolicited and reviewed following the standard procedure. The peer review process involved two members of the editorial council.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primers*. 2018;4(1):3. doi: [10.1038/s41572-018-0002-y](https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y) EDN: HSUGDB
2. Laursen NS, Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza viruses. *Antiviral Res*. 2013;98(3):476–483. doi: [10.1016/j.antiviral.2013.03.021](https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.021)
3. Corti D, Voss J, Gamblin SJ, et al. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*. 2011;333(6044):850–856. doi: [10.1126/science.1205669](https://doi.org/10.1126/science.1205669)
4. Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, et al. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science*. 2012;337(6100):1343–1348. doi: [10.1126/science.1222908](https://doi.org/10.1126/science.1222908)
5. Kallewaard NL, Corti D, Collins PJ, et al. Structure and function analysis of an antibody recognizing all influenza A subtypes. *Cell*. 2016;166(3):596–608. doi: [10.1016/j.cell.2016.05.073](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.073)
6. Momont C, Dang HV, Zatta F, et al. A pan-influenza antibody inhibiting neuraminidase via receptor mimicry. *Nature*. 2023;618(7965):590–597. doi: [10.1038/s41586-023-06136-y](https://doi.org/10.1038/s41586-023-06136-y) EDN: WJVTLD
7. Gamblin SJ, Vachieri SG, Xiong X, et al. Hemagglutinin structure and activities. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2021;11(10):a038638. doi: [10.1101/cshperspect.a038638](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038638) EDN: ZDUBUX
8. Morgan SB, Holzer B, Hemmink JD, et al. Therapeutic administration of broadly neutralizing FI6 antibody reveals lack of interaction between human IgG1 and pig Fc receptors. *Front Immunol*. 2018;9:865. doi: [10.3389/fimmu.2018.00865](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00865)
9. DiLillo DJ, Tan GS, Palese P, Ravetch JV. Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus in vivo. *Nat Med*. 2014;20(2):143–151. doi: [10.1038/nm.3443](https://doi.org/10.1038/nm.3443)

10. de Sousa-Pereira P, Woof JM. IgA: structure, function, and developability. *Antibodies*. 2019;8(4):57. doi: 10.3390/antib8040057
11. Cottignies-Calamarte A, Tudor D, Bomsel M. Antibody Fc-chimerism and effector functions: when IgG takes advantage of IgA. *Front Immunol*. 2023;14:1037033. doi: 10.3389/fimmu.2023.1037033 EDN: QUHJQW
12. Goulet DR, Atkins WM. Considerations for the design of antibody-based therapeutics. *J Pharm Sci*. 2020;109(1):74–103. doi: 10.1016/j.xphs.2019.05.031 EDN: RLDGGZ
13. Mota KG, Moro AM. Monoclonal antibodies against influenza viruses: a clinical trials review. *Front Immunol*. 2025;16:1669073. doi: 10.3389/fimmu.2025.1669073 EDN: RAJZWA
14. Mallory RM, Ali SO, Takas T, et al. A phase 1 study to evaluate the safety and pharmacokinetics of MEDI8852, an anti-influenza A monoclonal antibody, in healthy adult volunteers. *Biologicals*. 2017;50:81–86. doi: 10.1016/j.biologicals.2017.08.007
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970;227(5259):680–685. doi: 10.1038/227680a0
16. Bairoch A, Apweiler R, Wu CH, et al. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res*. 2005;33(Database issue):D154–D159. doi: 10.1093/nar/gki070
17. Haryadi R, Ho S, Kok YJ, et al. Optimization of heavy chain and light chain signal peptides for high level expression of therapeutic antibodies in CHO cells. *PLoS One*. 2015;10(2):e0116878. doi: 10.1371/journal.pone.0116878
18. Okonechnikov K, Golosova O, Fursov M; UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166–1167. doi: 10.1093/bioinformatics/bts091 EDN: PDNJNV
19. Suguitan AL Jr, Zengel JR, Jacobson S, et al. Influenza H1N1pdm-specific maternal antibodies offer limited protection against wild-type virus replication and influence influenza vaccination in ferrets. *Influenza Other Respir Viruses*. 2014;8(2):169–176. doi: 10.1111/irv.12220
20. van Tetering G, Evers M, Chan C, et al. Fc engineering strategies to advance IgA antibodies as therapeutic agents. *Antibodies*. 2020;9(4):70. doi: 10.3390/antib9040070 EDN: ZEDUZA
21. Biswas M, Yamazaki T, Chiba J, Akashi-Takamura S. Broadly neutralizing antibodies for influenza: passive immunotherapy and intranasal vaccination. *Vaccines*. 2020;8(3):424. doi: 10.3390/vaccines8030424 EDN: ZRCZFI
22. Liu X, Balligand T, Le Gall C, Ploegh HL. A monoclonal anti-hemagglutinin stem antibody modified with zanamivir protects against both influenza A and B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2025;122(15):e2424889122. doi: 10.1073/pnas.2424889122 EDN: GTKZAJ
23. Abbas AK, Lichtman AH. *Basic immunology updated edition: functions and disorders of the immune system*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2011. ISBN: 978-1-4160-5569-3312
24. Beukenhorst AL, Rice KL, Frallicciardi J, et al. Intranasal administration of a panreactive influenza antibody reveals Fc-independent mode of protection. *Sci Rep*. 2025;15(1):10309. doi: 10.1038/s41598-025-94314-5 EDN: ITPJCH
25. Reinhart D. *Recombinant production of IgA antibodies* [Doctoral Thesis]. Vienna, 2013. Available from: <https://epub.boku.ac.at/obvbokhs/content/titleinfo/1931594/full.pdf>
26. Stacey HD, Golubeva D, Posca A, et al. IgA potentiates NETosis in response to viral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2021;118(27):e2101497118. doi: 10.1073/pnas.2101497118 EDN: WYWBBC
27. Tong S, Zhu X, Li Y, et al. New world bats harbor diverse influenza A viruses. *PLoS Pathog*. 2013;9(10):e1003657. doi: 10.1371/journal.ppat.1003657 EDN: SQPIGL
28. Wu Y, Wu Y, Tefsen B, et al. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol*. 2014;22(4):183–191. doi: 10.1016/j.tim.2014.01.010 EDN: SSRXOJ

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS' INFO

* Клотченко Сергей Анатольевич, канд.
биол. наук;

* Sergey A. Klotchenko, Cand. Sci. (Biology);

адрес: Россия, 197022, Санкт-Петербург, ул.
проф. Попова, д. 15/17, к. Б;
ORCID: 0000-0003-0289-6560;
eLibrary SPIN: 2632-6195;
e-mail: fosfatik@mail.ru

Фалалеева Дарья Александровна;
ORCID: 0009-0002-6769-7044;
eLibrary SPIN: XXXX-XXXX;
e-mail: f.daria@list.ru

Монахова Варвара Сергеевна, канд.
биол.наук;
ORCID: 0009-0002-9519-5316;
eLibrary SPIN: 2111-8493;
e-mail: varvara.bio@gmail.com

Плотникова Марина Александровна,
канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0001-8196-3156;
eLibrary SPIN: 2986-9850;
e-mail: biomalinka@mail.ru

Олейник Вероника Андреевна;
ORCID: 0009-0005-3081-0463;
eLibrary SPIN: 1299-6388;
e-mail: working.lyutik@gmail.com

**Романовская-Романько Екатерина
Андреевна,** канд. биол. наук;
ORCID: 0000-0001-7560-398X;
eLibrary SPIN: 1012-8043;
e-mail: romromka@yandex.ru

address: 15/17 Prof. Popova st, unit B, Saint
Petersburg, Russia, 197022;
ORCID: 0000-0003-0289-6560;
eLibrary SPIN: 2632-6195;
e-mail: fosfatik@mail.ru

Daria A. Falaleeva;
ORCID: 0009-0002-6769-7044;
eLibrary SPIN: XXXX-XXXX;
e-mail: f.daria@list.ru

Varvara S. Monakhova, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0009-0002-9519-5316;
eLibrary SPIN: 2111-8493;
e-mail: varvara.bio@gmail.com

Marina A. Plotnikova, Cand. Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0001-8196-3156;
eLibrary SPIN: 2986-9850;
e-mail: biomalinka@mail.ru

Veronika A. Oleynik;
ORCID: 0009-0005-3081-0463;
eLibrary SPIN: 1299-6388;
e-mail: working.lyutik@gmail.com

Ekaterina A. Romanovskaya-Romanko, Cand.
Sci. (Biology);
ORCID: 0000-0001-7560-398X;
eLibrary SPIN: 1012-8043;
e-mail: romromka@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author