

DOI: <https://doi.org/10.17816/C1698077>

EDN: KEUWQR



# 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 ежегодно приводит к 3–5 млн случаев тяжелой формы заболевания, требующего госпитализации. При этом количество летальных исходов оценивается в 290–650 тыс. Рекомбинантные антитела являются одним из наиболее перспективных средств для лечения гриппа.

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

**Методы.** Молекулярно-генетическими методами получены экспрессионные плазмиды. В режиме транзientной экспрессии в культуре клеток НЕК293 в бессывороточной среде накоплены экспериментальные образцы рекомбинантных антител FM08 IgA1- и IgG1-изотипов. Для сравнительной оценки биологической активности применяли иммуоферментный анализ и реакцию микронейтрализации. В работе были использованы штаммы вируса гриппа А подтипов H1N1pdm, H2N2, H3N2, H5N1 и штаммы вируса гриппа В (обеих филогенетических линий).

**Результаты.** Показано, что полученные генетические конструкции позволяют накапливать рекомбинантные антитела FM08 IgA1- и IgG1-изотипов в эукариотических культурах клеток. Оба изотипа рекомбинантного антитела FM08 имели практически идентичный паттерн связывания и, начиная с концентрации 16 нг/мкл, взаимодействовали со штаммами обеих генетических групп вируса гриппа А, за исключением штамма H1N1 1934 года. Рекомбинантные антитела FM08 как IgA1-, так и IgG1-изотипов нейтрализовали вирус гриппа A/California/07/2009 (H1N1pdm09) при значениях IC<sub>50</sub> 1–4 мкг/мл и вирус гриппа A/Cambodia/e0826360/2020 (H3N2) при значении IC<sub>50</sub> 20 мкг/мл.

**Заключение.** Исследование *in vitro* биологической активности выявило высокий противовирусный потенциал полученных экспериментальных образцов рекомбинантных антител FM08 IgA1- и IgG1-изотипа.

**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. 164–173. DOI: 10.17816/C1698077 EDN: KEUWQR

DOI: <https://doi.org/10.17816/Ci698077>

EDN: KEUWQR

# Development and *In Vitro* Biological Activity Assessment of IgA1 and IgG1 Isotypes of the Universal Anti-Influenza A Antibody FM08

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:** The World Health Organization estimates that seasonal influenza causes 3 to 5 million severe cases requiring hospitalization each year, resulting in 290,000 to 650,000 deaths. Recombinant antibodies represent one of the most advanced and promising treatment options for the effective management of influenza.

**AIM:** This study aimed to evaluate characteristics, specificity, and virus-neutralizing activity of the IgA1 and IgG1 isotypes of the recombinant FM08 antibody, which targets the influenza hemagglutinin stem domain.

**METHODS:** Expression plasmids were obtained using molecular genetic techniques. The transient expression technique was used to accumulate experimental samples of the IgA1 and IgG1 isotypes of the FM08 antibody in a serum-free HEK293 cell culture. The biological activities were compared using electrophoretic separation, enzyme-linked immunosorbent assay, and microneutralization reaction. The study also used influenza A strains, including the H1N1pdm, H2N2, H3N2, and H5N1 subtypes, as well as influenza B strains from both genetic lines.

**RESULTS:** The resulting genetic constructs accumulate recombinant FM08 antibodies of the IgA1 and IgG1 isotypes in eukaryotic cell cultures. The binding patterns of two FM08 antibody isotypes were virtually identical. Starting at a concentration of 16 ng/ $\mu$ L, both isotypes interacted with strains from both influenza A virus phylogenetic groups, except for the 1934 H1N1 strain. The IgA1 and IgG1 FM08 isotypes neutralized the influenza A/California/07/2009 (H1N1pdm09) virus with  $IC_{50}$  of 1–4  $\mu$ g/mL and the influenza A/Cambodia/E0826360/2020 (H3N2) virus with  $IC_{50}$  of 20  $\mu$ g/mL.

**CONCLUSION:** *In vitro* studies of the biological activity of the experimental FM08 antibody samples of the IgA1 and IgG1 isotypes revealed their high potential as antiviral agents.

**Keywords:** antibodies, recombinant; antibodies, broadly neutralizing; immunoglobulin G; immunoglobulin A; influenza virus; antiviral agents; immunization, passive; virus neutralization.

## To cite this article:

Falaleeva DA, Monakhova VS, Plotnikova MA, Oleynik VA, Romanovskaya-Romanko EA, Klotchenko SA. Development and *In Vitro* Biological Activity Assessment of IgA1 and IgG1 Isotypes of the Universal Anti-Influenza A Antibody FM08. *Cytokines and Inflammation*. 2025;22(4):164–173. DOI: 10.17816/Ci698077 EDN: KEUWQR

## ОБОСНОВАНИЕ

Ежегодные эпидемии, вызываемые вирусом гриппа А штаммов H1N1 и H3N2 и вирусом гриппа В, приводят примерно к 1 млрд случаев инфицирования, 3–5 млн случаев тяжелой формы заболевания, требующей 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 гемагглютинаина (HA) 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 HA вируса гриппа, содержащий пептид слияния. Такие антитела способны блокировать расщепление белка слияния и предотвращать формирование требуемой для инфицирования конформации HA [8]. Прямое нейтрализующее действие антител, направленных к стволу HA, менее выражено по сравнению с антителами, мишенью которых является глобулярный участок HA, 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 эффекторные свойства антитела зависят от структуры входящей в его состав тяжелой цепи, определяющей класс антитела [10]. В зависимости от класса — IgG, IgA, IgM, IgD 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 (pAT) 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 стволу домену HA, а также изучены их биологические свойства *in vitro* [5]. Исследование R.M. Mallory и соавт. [14] продемонстрировало безопасность и хорошую переносимость однократного внутривенного введения препарата на основе pAT MEDI8852 у здоровых людей, что является обоснованием для его дальнейшей разработки в качестве терапевтического средства для профилактики и лечения гриппа. Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей FM08 находятся в открытом доступе [5].

## ЦЕЛЬ

Получить и оценить свойства, специфичность и вируснейтрализующую активность pAT FM08, направленного против стволового домена гемагглютинаина 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, Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки коров (Gibco, США), истощенной на сорбенте с белком А, в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при 37 °C во влажной атмосфере, содержащей 6% CO<sub>2</sub>. Для проведения трансфекции клетки засеивали в культуральные флаконы площадью 175 см<sup>2</sup> (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 расчета 40 мкг плазмидной ДНК (суммарно кодирующей тяжелые и легкие цепи антитела) на один культуральный флакон при соотношении ДНК : трансфекционный реагент 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 pAT проводили методом аффинной хроматографии с помощью хроматографической системы AKTA pure (Cytiva, США) на колонке KappaSelect (1 мл, Cytiva, США) объемом 1 мл (Seraph, Китай). Колонку промывали 10 CV (объем 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 мМ 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 фракций отбирали пик с оптической плотностью выше 0,05 AU. К собранному материалу добавляли 1 М раствор Tris-HCl (pH 8.8, 20 мкл на 1 мл) и 4 М 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 (ЗФ-ПААГ) проводили по методу Лэммли [15] в восстанавливающих (в присутствии β-меркаптоэтанола) и невосстанавливающих условиях. Использовали 10-луночный градиентный предзалитый гель Apy kD (Bio-Rad, США). Перед нанесением образца в лунки ПААГ его смешивали с четырёхкратным 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 (Thermo Fisher Scientific, США). Для антител использовали режим IgG, при котором значение E 1%=13,70. Электрофоретическое разделение белков проводили при постоянной силе тока (40 мА 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 Microton 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 однократного 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 однократном PBS-T (далее «блокирующий реагент») при температуре 37 °C в течение 1 ч и проводили отмывку. Затем в лунки микропланшета вносили тестируемые pAT 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 GAH-HRP (#1721033, Bio-Rad, США) или IgA GAH-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 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> измеряли оптическую плотность на длинах волн 450 нм (OD<sub>450</sub>) и 620 нм (OD<sub>620</sub>) 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 OD<sub>450</sub> и OD<sub>620</sub> 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 здравоохранения<sup>1</sup>. Для этого готовили последовательные двукратные разведения антитела в питательной среде α-MEM (#1.3.9.1., Биолот, Россия), смешивали с равным объёмом вируса, содержащего 100 ТИД<sub>50</sub>/50 мкл, и инкубировали при 37 °C в течение 1 ч. Вирусосодержащую жидкость разводили до нужной концентрации в той же среде с добавлением 1 мкг/мл трипсина, обработанного TPCK (#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

<sup>1</sup> 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.

с добавлением 2 мМ L-глутамина и 10% эмбриональной сыворотки коров (Биолот, Россия) в 96-луночном планшете (по 100 мкл в лунку) и инкубировали при 37 °С в атмосфере 5% CO<sub>2</sub> в течение 72 ч. Учёт развития инфекции проводили с помощью реакции гемагглютинации с использованием 0,5% суспензии куриных эритроцитов.

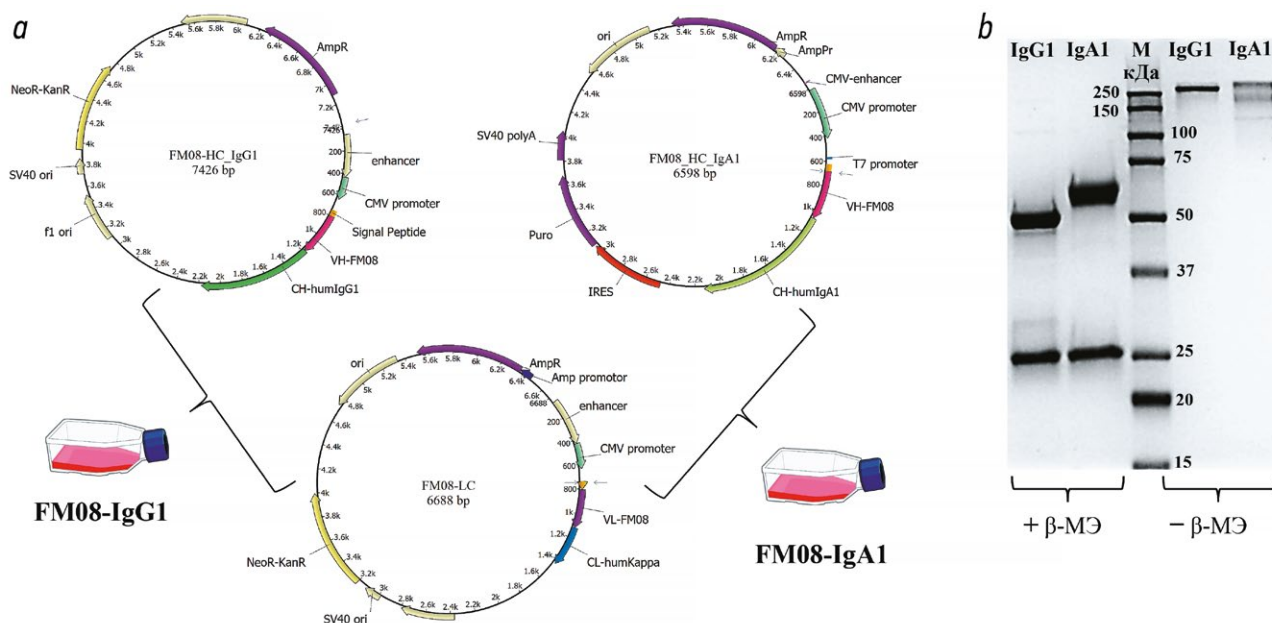
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Для получения и накопления рАТ FM08 IgA1- и IgG1-изотипов варибельные области тяжёлых и лёгких цепей FM08 были клонированы в высокоэкспрессионные векторы pсDNA3.4 и pIRESpuro3, 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] последовательностям P01857 для IgG1 и P01876 для IgA1 человека. Константная область лёгкой цепи, идентичная для обоих исследуемых изотипов рАТ FM08, полностью соответствовала последовательности каппа-цепи человека (UniProt P01834). Для секреции иммуноглобулина тяжёлые цепи обоих исследуемых изотипов содержали на N-конце сигнальную последовательность MEFGLSWVFLVALFRGVQC,

а лёгкая — MDMRVPAQLLGLLLLWLSGARC, описанные ранее в литературе [17]. Схемы разработанных плазмид представлены на рис. 1, а.

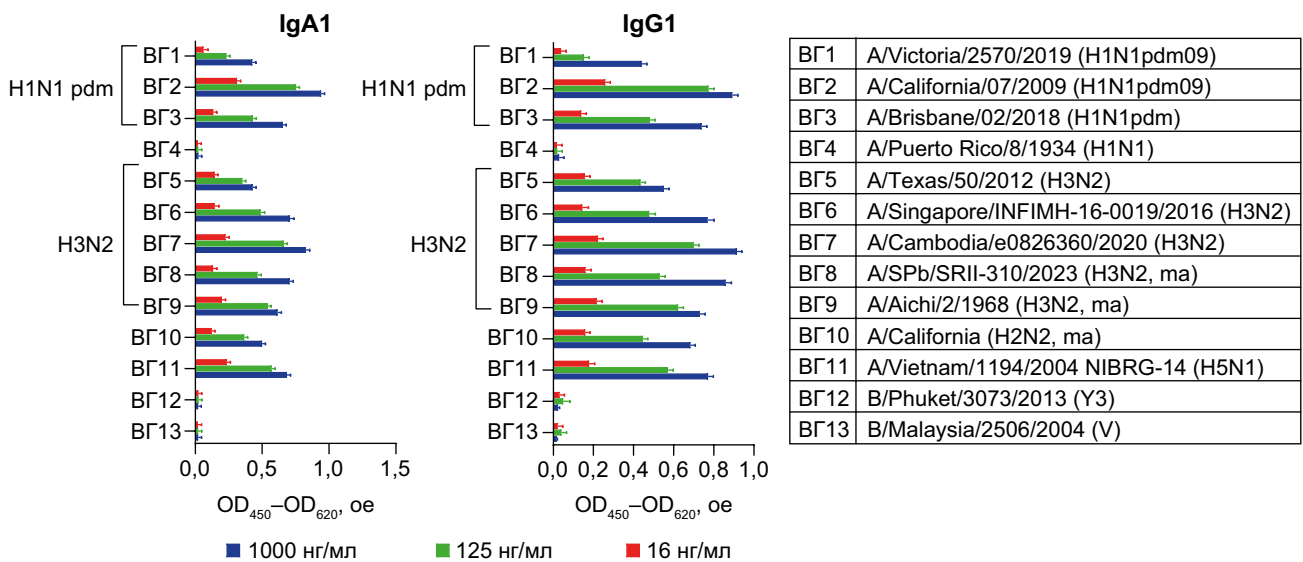
Биосинтез экспериментальных образцов рАТ FM08 обоих исследуемых изотипов был выполнен с использованием культуры адгезионных клеток HEK293 в режиме транзientной экспрессии в бессывороточной среде. После хроматографической очистки препараты иммуноглобулинов анализировали методом ЭФ-ПААГ по методу Лэммли [15]. Для дальнейшей сравнительной оценки биологических свойств получено не менее 0,5 мг рАТ FM08 каждого изотипа (IgA1 и IgG1). Результаты ЭФ-ПААГ 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.

После анализа целостности и подтверждения молекулярной массы накопленных препаратов рАТ исследована их вирус-связывающая активность. Способность рАТ FM08 изотипов IgA1 и IgG1 связываться с вирусными антигенами была проанализирована методом ИФА. Для этого в качестве сорбирующих лигандов использована панель вирусов гриппа, содержащих различные подтипы поверхностных гликопротеинов HA и NA. Исследовано



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

**Fig. 1.** Construction and characterization of IgA1 and IgG1 isotypes of FM08. *a*, Schematic representation of plasmids for transient expression of FM08 IgA1 and IgG1. The maps were created using the UGENE software [18]. *b*, Results of protein electrophoresis of the recombinant FM08 antibody (IgG1 and IgA1 isotypes) in a polyacrylamide gel under reducing (+ β-ME) and non-reducing (– β-ME) conditions. β-ME refers to β-mercaptoethanol. M is a molecular weight marker from the Precision Plus Protein Kaleidoscope Prestained Protein Standards kit (Bio-Rad, USA). The lanes on the left side of the gel show bands that are consistent with the heavy and light chains of FM08.



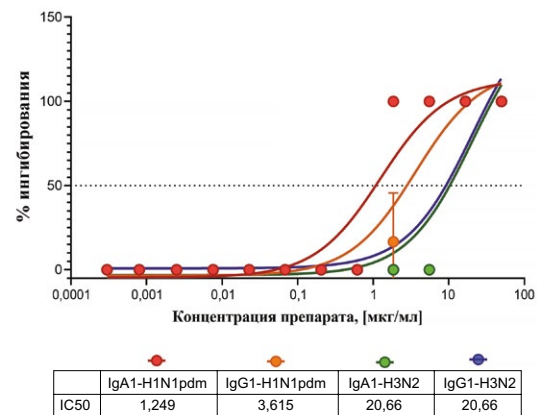
**Рис. 2.** Результаты анализа связывания рАТ FM08 IgA1- и IgG1-изотипов при концентрации 1000 нг/мл (показана синим цветом), 125 нг/мл (зелёным цветом) и 16 нг/мл (красным цветом) с вирусами гриппа А и В. Столбцы отражают средние значения оптической плотности ( $\Delta OD_{450;620}$ ) по двум повторам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

**Fig. 2.** The binding assay of the FM08 antibody of the IgA1 and IgG1 isotypes at concentrations of 1000 ng/mL (blue), 125 ng/mL (green), and 16 ng/mL (red) with influenza A and B viruses. The columns represent the mean optical density values ( $\Delta OD_{450;620}$ ) of two replicates  $\pm$  standard deviation (SD). The table on the right lists the complete names and subtypes of the influenza viruses used in the sorption process. ВГ, the influenza virus, ma, mouse adapted.

вирус-связывающее действие рАТ FM08 изотипов IgA1 и IgG1 с 13-ю штаммами вируса гриппа, два из которых относились к типу В. Согласно полученным нами результатам (рис. 2) оба изотипа рАТ FM08 имели практически идентичный паттерн связывания с исследуемыми вирусами, значения оптической плотности также были сопоставимы. Оба изотипа эффективно выявляли сезонные 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 рАТ FM08 не проявляло связывающей активности с вирусом гриппа H1N1 1934 года, что в целом сопоставимо с литературными данными [19]. Экспериментальные образцы рАТ FM08 изотипов IgA1 и IgG1 не связывали штаммы вируса гриппа В. Наблюдалась зависимость уровня сигнала детекции от количества рАТ, взятого в ИФА, при этом даже минимальная концентрация рАТ 16 нг/мл позволяла специфически детектировать вирус, с которым происходило связывание и при более высоких концентрациях.

Заключительный этап исследования был посвящён сравнительной оценке вируснейтрализующей активности рАТ FM08 изотипов IgA1 и IgG1. Исследована способность нейтрализовать рАТ FM08 инфекционные вирусы гриппа A/California/07/2009 (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 ( $IC_{50}$ ) в отношении протестированных штаммов (рис. 3).



**Рис. 3.** Нейтрализующая активность рАТ FM08 изотипов IgA1 и IgG1. Определение титра нейтрализующих антител выполнено в трёх повторях, 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 titer of neutralizing antibodies was determined in triplicate; the mean percentage of inhibition is presented for each point on the graph. The table below the figure shows the calculated  $IC_{50}$  values.

Согласно полученным результатам рАТ FM08 изотипов IgA1 и IgG1 проявляли нейтрализующую активность в отношении эталонных штаммов вируса гриппа. Показатели IC<sub>50</sub> для вируса гриппа H1N1pdm в зависимости от изотипа варьировали в диапазоне 1–4 мкг/мл. Для вируса H3N2 значение IC<sub>50</sub> было больше — 20 мкг/мл. Значимых различий между полученными значениями IC<sub>50</sub> для рАТ FM08 IgA1- и IgG1-изотипов выявлено не было. Важно отметить, что для вируса H1N1 1934 года значение IC<sub>50</sub> определить не удалось (IC<sub>50</sub> >50 мкг/мл). Этот результат согласуется с отсутствием достоверного связывания рАТ FM08 изотипов IgA1 и IgG1 с данным штаммом в непрямом ИФА.

## ОБСУЖДЕНИЕ

В то время как антигенная специфичность иммуноглобулина 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 иммуноглобулины класса G [11]. Тем не менее показано, что эффективность антител класса IgA 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 противовирусной терапии.

Наше исследование было посвящено получению, характеристике, а также сравнительной оценке биологической активности *in vitro* рАТ FM08 двух форматов — IgA1- и IgG1-изотипов. FM08 — это человеческое моноклональное антитело широкого спектра действия, направленное против HA вируса гриппа A обеих генетических групп [21]. Эффективная нейтрализация вируса гриппа достигается за счёт воздействия рАТ FM08 на начальные и завершающие этапы жизненного цикла вируса. В частности, FM08 связывается с аминокислотными остатками в гидрофобной бороздке домена слияния HA и стабилизирует его конформацию, ингибируя pH-опосредованное слияние вируса с эндосомой [2]. Известно, что антитела с такими свойствами 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 препаратом, представляющим собой рАТ MEDI8852 (FM08), конъюгированное с ингибитором нейраминидазы занамивиром. Показано, что Fc-фрагмент человеческого иммуноглобулина IgG1-изотипа увеличил период полувыведения в кровотоке низкомолекулярного противовирусного препарата, обеспечив полную защиту мышей от летальной экспериментальной гриппозной инфекции.

Поэтому сравнительный анализ противовирусной активности разных изотипов одного моноклонального антитела представляет особую практическую ценность для выбора оптимальной лекарственной формы.

Нами были получены плазмидные конструкции для сборки рАТ FM08 IgA1- и IgG1-изотипов в эукариотических клетках. Каждое рАТ собрано с использованием двух плазмид, кодирующих тяжёлую и лёгкую цепи. При этом лёгкая цепь (а также кодирующая её плазмидная конструкция) являлась общей для обоих исследуемых изотипов и принадлежала к каппа-типу. Известно, что в соответствии с принципом аллельного исключения, каждый зрелый B-лимфоцит экспрессирует иммуноглобулины только с одним типом лёгкой цепи — либо каппа, либо ламбда. Принадлежность к тому или другому типу детерминируют константные каппа- и ламбда-домены лёгких цепей, которые функционально эквивалентны и не определяют специфичность антитела [23]. Мы выбрали каппа-цепь, поскольку исходное антитело, выделенное от пациента, содержало лёгкую цепь именно такого типа [24]. Кроме того, использование лёгкой каппа-цепи позволило унифицировать очистку рАТ FM08 IgA1- и IgG1-изотипов, поскольку оба изотипа могли быть очищены на одном аффинном носителе, специфичном к каппа-цепи.

Электрофоретический анализ очищенных препаратов рАТ FM08 изотипов IgA1 и IgG1 подтвердил наличие полос, соответствующих по молекулярной массе тяжёлой и лёгкой цепям иммуноглобулинов. При электрофорезе в восстанавливающих условиях под действием β-меркаптоэтанола рАТ диссоциируют на тяжёлые (~50 кДа) и лёгкие (~25 кДа) цепи, что согласуется с теоретически предсказанными значениями. В невозстанавливающих условиях рАТ FM08 IgG1-изотипа мигрировали в геле в виде единого гетеротетрамера, а рАТ FM08 IgA1-изотипа — в виде двух полос, что может быть связано с артефактами ПЛАГ и неприменимостью метода Лэммли для анализа целостности и чистоты препаратов иммуноглобулинов в нативных условиях (оба экспериментальных образца рАТ FM08 мигрируют выше маркера размером 250 кДа, тогда как их ожидаемая молекулярная масса составляет не более 150–170 кДа). Следует отметить, что в работе была получена только мономерная форма рАТ FM08 изотипа IgA1. Известно, что в сыворотке крови IgA присутствует главным образом в мономерной форме, хотя также обнаруживаются димерные (dIgA) и полимерные (pIgA) формы, которые преимущественно секретируются на слизистых оболочках [25]. В кровотоке преобладают иммуноглобулины класса G, способные взаимодействовать с Fc-рецепторами на поверхности иммунных клеток, запуская тем самым реализацию их эффекторных функций, в то время как на слизистых оболочках основную роль играет секреторный IgA, который обеспечивает первую линию защиты за счёт иного механизма — нейтрализации патогенов и их элиминации, что делает IgA ключевым фактором защиты на входных воротах инфекции [26].

Нами показано, что оба исследуемых изоформа рАТ FM08 высокоэффективно связывали штаммы вируса гриппа А, относящиеся к обеим генетическим группам, разделяющимся по подтипам НА. Генетически существует 18 подтипов НА вируса гриппа А, которые образуют группу 1 (Н1, Н2, Н5, Н6, Н8, Н9, Н11, Н12, Н13, Н16, Н17, Н18) и группу 2 (Н3, Н4, Н7, Н10, Н14, Н15) [27, 28]. Антитела, полученные в результате вакцинации или заражения, нейтрализуют в первую очередь гомологичные штаммы вируса гриппа. Антитела широкого спектра действия, способные нейтрализовать несколько подтипов вируса из разных генетических групп, обладают высоким терапевтическим потенциалом.

В завершение мы подтвердили гетеросубтипичную нейтрализующую активность обоих исследуемых изоформ полученного нами рАТ FM08 в отношении вируса гриппа подтипов Н1N1pdm и Н3N2. Показано, что рАТ FM08 как изоформа IgA1, так и изоформа IgG1 эффективно нейтрализует вирусы гриппа A/California/07/2009 (Н1N1pdm09) и A/Cambodia/e0826360/2020 (Н3N2) и предотвращает инфицирование клеток MDCK вирусами гриппа А. Значения IC<sub>50</sub>, полученные *in vitro* для рАТ FM08 обоих исследуемых изоформ, являются сопоставимыми и типичными [5] для препаратов с высокой противовирусной активностью.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами получены экспериментальные образцы рАТ IgA1- и IgG1-изоформ, содержащие вариабельные домены моноклонального антитела человека FM08. Для этого проведён дизайн плазмид, кодирующих тяжёлые и лёгкие цепи исследуемых иммуноглобулинов, их экспрессия в эукариотических системах и последующая очистка. При тестировании *in vitro* экспериментальные препараты рАТ проявили выраженную противовирусную активность, что указывает на их высокий терапевтический потенциал. Получение рАТ широкого спектра действия против консервативных эпитопов белков вируса 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.** Этическую экспертизу протокола исследования не проводили. Основание — исследование не предполагало участие людей или лабораторных животных.

**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 использовались.

**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. Oleinik: 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:** The study protocol was not reviewed by an ethics committee. Reason: the study did not involve human or laboratory animal participants.

**Funding sources:** This work is part of the State Assignment of the Ministry of Health of the Russian Federation (R&D Registration No. 124021200034-5 in the Unified State Information System for Accounting of Research, Development, and Technological Work (EGISU NIOKTR)).

**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 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
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
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
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
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 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 EDN: ZDUBUX
8. Morgan SB, Holzer B, Hemmink JD, et al. Therapeutic administration of broadly neutralizing Fl6 antibody reveals lack of interaction between human IgG1 and pig Fc receptors. *Front Immunol*. 2018;9:865. doi: 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
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: PDJNJV
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. Reinhard D. *Recombinant production of IgA antibodies* [Doctoral Thesis]. Vienna, 2013. Available from: <https://epub.boku.ac.at/obvokhs/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

\* **Клотченко Сергей Анатольевич**, канд. биол. наук;  
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

**Фалалева Дарья Александровна**;  
ORCID: 0009-0002-6769-7044;  
eLibrary SPIN: 3812-8607;  
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

## AUTHORS' INFO

\* **Sergey A. Klotchenko**, Cand. Sci. (Biology);  
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: 3812-8607;  
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

**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

**Marina A. Plotnikova**, Cand. Sci. (Biology);

ORCID: 0000-0001-8196-3156;

eLibrary SPIN: 2986-9850;

e-mail: biomalinka@mail.ru

**Veronika A. Oleinik**;

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