

DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-105-110

УДК 616.98:578.834.1

Г.В. Куклина, С.С. Ипатов, А.С. Горшков, Д.В. Печенкин, А.В. Еремкин, А.В. Кузнецовский,  
А.С. Туманов, И.В. Дармов

### Получение и характеристика гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам коронавируса SARS-CoV-2

Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), Киров, Российская Федерация

**Цель работы** – получить и охарактеризовать гибридомы-продуценты моноклональных антител к антигенам коронавируса SARS-CoV-2, перспективных для конструирования диагностических иммунохимических тестов. **Материалы и методы.** Для иммунизации мышей линии BALB/c использовали рекомбинантные антигены NP и RBD SARS-CoV-2. Антигенные препараты сорбировали на геле алюминия гидроксида и вводили подкожно мышам линии BALB/c с интервалом 7 дней. Слияние иммунных спленоцитов с клетками миеломной опухоли SP2/0-Ag14 проводили с помощью ПЭГ-1450. Отбор гибридом, секретирующих анти-NP- и анти-RBD-антитела, проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) в 96-луночных планшетах с сорбированными препаратами NP и RBD. Для клонирования гибридом использовали метод предельных разведений. Изучение секреторных свойств полученных клонов проводили при культивировании *in vitro* в 24-луночных культуральных планшетах. Иммуноасцитические жидкости получали при культивировании гибридных клеток в брюшной полости мышей линии BALB/c. Моноклональные антитела очищали методом аффинной хроматографии на сорбенте протеин А-сефарозе, конъюгировали с пероксидазой хрена и проверяли возможность использования в сэндвич-варианте ИФА для детекции инактивированного коронавируса SARS-CoV-2 штамма «Изолят В». **Результаты и обсуждение.** В результате гибридизаций и отбора клонов получены гибридомы-продуценты моноклональных антител к NP и RBD коронавируса SARS-CoV-2. При культивировании *in vitro* и *in vivo* клоны характеризовались стабильностью пролиферативной и антителопродуцирующей активности. Использование моноклонального антитела 415D12 в качестве захватывающего и конъюгированного с пероксидазой хрена 411D12 в качестве детекторного моноклонального антитела в ИФА позволяет выявить коронавирус SARS-CoV-2 в минимальной концентрации  $1 \cdot 10^3$  БОЕ/мл.

**Ключевые слова:** коронавирус SARS-CoV-2, гибридомы, моноклональные антитела, иммуноферментный анализ.

Корреспондирующий автор: Печенкин Денис Валериевич, e-mail: 23527@mil.ru.

Для цитирования: Куклина Г.В., Ипатов С.С., Горшков А.С., Печенкин Д.В., Еремкин А.В., Кузнецовский А.В., Туманов А.С., Дармов И.В. Получение и характеристика гибридом-продуцентов моноклональных антител к антигенам коронавируса SARS-CoV-2. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2023; 1:105–110. DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-105-110

Поступила 30.12.2022. Принята к публ. 19.01.2023.

G.V. Kuklina, S.S. Ipatov, A.S. Gorshkov, D.V. Pechenkin, A.V. Eremkin, A.V. Kuznetsovsky,  
A.S. Tumanov, I.V. Darmov

### Obtaining and Characterization of Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies against Coronavirus SARS-CoV-2

Affiliated Branch of the “48<sup>th</sup> Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation (Kirov), Kirov, Russian Federation

**Abstract. The aim** of the work was to obtain and characterize hybridomas producing monoclonal antibodies to antigens of coronavirus SARS-CoV-2, promising for the construction of diagnostic immunochemical tests. **Materials and methods.** Recombinant nucleocapsid and receptor binding fragment of spike protein of SARS-CoV-2 were used for immunization of BALB/c mice. Antigens were absorbed on aluminium hydroxide gel and injected subcutaneously to BALB/c mice at a 7-day-interval. Immune splenocytes and myeloma cells SP2/0-Ag14 were fused by polyethylene glycol 1450. Cell cultures producing specific antibodies against nucleocapsid and receptor binding fragment were selected applying indirect ELISA in 96-well plates sensitized by desired antigens. Clones of hybridomas were obtained using the method of limiting dilutions. Production properties were studied through *in vitro* cultivation in 24-well culture plates. Immune-ascitic fluids were collected during the cultivation of hybrid cells in peritoneal cavities of BALB/c mice. Monoclonal antibodies were purified by affinity chromatography on protein A sepharose sorbent, conjugated with horseradish peroxidase, and tested for the possibility to be used in sandwich ELISA for detection of inactivated SARS-CoV-2 coronavirus strain “Isolate B”. **Results and discussion.** As a result of hybridization and selection of clones, hybridomas producing monoclonal antibodies to nucleocapsid and receptor binding fragment of SARS-CoV-2 have been obtained. During the *in vitro* and *in vivo* cultivation the clones maintained the consistent proliferative and antibody producing activity. The application of monoclonal antibody 415D12 as a capture one and 411D12 antibody conjugated with horseradish peroxidase as a detector antibody in ELISA allows for identifying SARS-CoV-2 coronavirus at a minimum concentration of  $1 \cdot 10^3$  PFU per ml.

**Key words:** SARS-CoV-2 coronavirus, hybridomas, monoclonal antibodies, enzyme linked immunosorbent assay.

*Conflict of interest:* The authors declare no conflict of interest.

*Corresponding author:* Denis V. Pechenkin, e-mail: 23527@mil.ru.

*Citation:* Kuklina G.V., Ipatov S.S., Gorshkov A.S., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kuznetsovsky A.V., Tumanov A.S., Darmov I.V. Obtaining and Characterization of Hybridomas Producing Monoclonal Antibodies against Coronavirus SARS-CoV-2. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2023; 1:105–110. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2023-1-105-110

Received 30.12.2022. Accepted 19.01.2023.

Kuklina G.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5429-6295>  
Ipatov S.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2881-4730>  
Gorshkov A.S., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5164-3645>

Pechenkin D.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8277-3573>  
Eremkin A.V., ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3133-1921>

Пандемия коронавирусной инфекции, продолжаясь уже несколько лет, затронула все континенты и страны, привела к рецессии мировой экономики. Ввиду эпидемиологических особенностей COVID-19, волнообразной динамики заболеваемости и постоянного появления новых вариантов вируса преждевременно прогнозировать окончание пандемии. С момента начала распространения SARS-CoV-2 в популяции выявлено большое количество антигенных вариантов вируса. На основании биологических свойств ВОЗ предложила объединять вирусные варианты в группы VOC – variant of concern (варианты, вызывающие обеспокоенность) и VOI – variant of interest (варианты, вызывающие интерес). Вирусные штаммы из группы VOC, наряду с мутациями, обладают биологическими свойствами, повышающими контагиозность и патогенность или снижающими нейтрализующую активность антител. Вследствие особой эпидемической значимости таких штаммов необходима непрерывная работа по их выделению и изучению, а также созданию новых диагностических и лечебных препаратов.

В соответствии с актуальными методическими рекомендациями (Временные методические рекомендации «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Версия 15 (22.02.2022)», на сегодняшний день основное значение для этиологической диагностики COVID-19 имеет выявление РНК SARS-CoV-2 с помощью метода амплификации нуклеиновых кислот, а также выявление антигенов коронавируса методами иммуноанализа. Для выявления антигенов коронавируса с использованием иммунохимических методов необходимы моноклональные антитела (МКАТ), при этом чем больше будет получено различных вариантов МКАТ к различным антигенным детерминантам вирусных изолятов SARS-CoV-2, тем полнее и объективнее будет иммунодиагностика инфекции с учетом постоянной изменчивости возбудителя COVID-19.

Антигены коронавируса в настоящее время изучены достаточно полно. Информация об аминокислотных последовательностях белков и соответствующих им нуклеотидных последовательностях генов представлена на различных открытых информационных ресурсах, в том числе NCBI [1]. Структурными белками вируса SARS-CoV-2 являются S (spike), E (envelope), M (membrane) и N (nucleocapsid). При этом белок N часто именуют также NP (nucleocapsid protein). Иммунный ответ при инфицировании коронавирусом вырабатывается на все его структурные антигены, но наиболее значимыми

иммуногенами являются белки S и NP, антитела к которым характеризуются наибольшими протективными свойствами [2, 3]. По причине вовлеченности в процесс инфицирования особое значение имеет рецептор-связывающий домен S-белка, именуемый receptor binding domain (RBD), антитела к которому являются протективными [3, 4].

В настоящее время в Российской Федерации ведется активная работа по получению МКАТ, специфичных к различным антигенным детерминантам SARS-CoV-2, при этом в открытой печати имеется информация о получении антител к коронавирусам как классическими методами гибридной технологии [5–7], так и молекулярно-генетическими методами [8, 9]. Несмотря на определенные преимущества антител, полученных молекулярно-генетическими методами, например фагового дисплея, классическая гибридная технология остается не только самостоятельной технологией получения МКАТ, но и первым этапом при получении рекомбинантных гуманизированных антител.

**Цель работы** – получить и охарактеризовать гибридомы-продуценты моноклональных антител к антигенам SARS-CoV-2, перспективных для конструирования диагностических иммунохимических тестов.

## Материалы и методы

Для иммунизации мышей линии BALB/c использовали препараты рекомбинантных коронавирусных белков NP (SARS-CoV-2 Nucleoprotein) и RBD (SARS-CoV-2 Spike RBD) производства ООО «ХайТест» (Россия). Схема иммунизации включала три подкожные инъекции антигенных препаратов, сорбированных на гель алюминия гидроксида, с интервалом введения 7 дней. Дозы препаратов составили 10, 20, 40 мкг на инъекцию. Через 10 дней после последней инъекции осуществляли взятие крови у лабораторных животных из параорбитального синуса и определяли титр специфических антител в непрямом твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА).

Для этого рекомбинантные белки сорбировали в лунках 96-луночного планшета (Nunc, Дания) в концентрации 20 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере, pH 9,6, в течение 18 часов при 4 °С. Лунки отмывали трехкратно фосфатно-солевым буфером PBS, pH 7,2 (Amresco, США) с 0,05 % Твин 20 (Sigma Aldrich, США) и вносили иммунные сыворотки в разведениях от 1:1000 до 1:64000. Пробы инкубировали в те-

чение 1 часа при 37 °С. После трехкратной отмывки PBS в лунки вносили антитела против иммуноглобулинов мыши, меченные пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, США), на 30 мин при 37 °С. После трехкратной отмывки PBS в лунки вносили хромоген-субстратную смесь на основе ортофенилендиамина (Sigma Aldrich, США) на 20 мин, останавливали реакцию 1 М серной кислотой и учитывали оптическую плотность при 492 нм на планшетном ридере Multiskan FC (Thermo Scientific, США). Результат анализа считали положительным в том случае, если оптическая плотность хромоген-субстратной смеси в лунках с исследуемыми сыворотками в два раза и более превышала таковую в лунках с отрицательным контролем (отмывочным буфером – PBS).

Далее животным с наибольшим уровнем продукции антител (титр в ИФА 1:16000 и более) через 20 дней после иммунизации вводили внутрибрюшинно бустерную дозу антигена в количестве 40 мкг. На четвертые сутки с момента бустерной инъекции селезенку асептически извлекали, спленоциты получали путем перфузии средой RPMI-1640 (Sigma Aldrich, США).

Процедуру слияния спленоцитов иммунных мышей BALB/c с клетками миеломной опухоли SP2/0-Ag14 проводили по методике, предложенной G. Köhler и C. Milstein [10], в модификации S.F. de StGroth и D. Scheidegger [11], а также с учетом собственного опыта проведения гибридизаций. В качестве индуктора слияния клеток использовали 50 % раствор полиэтиленгликоля с молекулярной массой 1450 (Sigma Aldrich, США). Сразу после слияния полученные клетки рассеивали в 96-луночные культуральные планшеты (Eppendorf, Германия) с фидерным слоем из перитонеальных макрофагов мышей линии BALB/c. Культивирование осуществляли в CO<sub>2</sub>-инкубаторе (Lamsystems, Россия) при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5 % CO<sub>2</sub>. Для выращивания клеток использовали среду RPMI-1640 с 2 мМ L-глутамина, 1 мМ пирувата натрия (Sigma Aldrich, США), 10 % фетальной телячьей сыворотки (Thermo Scientific, США) и 80 мг/мл гентамицина. Селекцию гибридных клеток проводили сразу после слияния путем добавления в ростовую среду однократного раствора НАТ (Sigma-Aldrich, США). После 10-х суток культивирования селекционную среду заменяли на щадящую (без аминокпертина) с 2 мМ гипоксантина и 2 мМ тимидина (Sigma-Aldrich, США), а после 20-х суток клетки поддерживали на ростовой среде без селекционных добавок. Ежедневно проводили визуальный контроль морфофункционального состояния клеток с использованием инвертированного микроскопа «Микромед-И» (ООО «Микромед», Россия). С момента появления колоний гибридных клеток на 10–14-е сутки проводили первичный иммунологический скрининг.

Специфическую активность антителопродукции гибридных культур определяли в культуральной жидкости без разведения методом твердофаз-

ного ИФА, как описано выше, трижды с интервалом 2–3 дня по мере роста клеток. Получение клонов гибридных культур, секретирующих анти-NP- и анти-RBD-антитела, проводили методом предельных разведений при расчетной посевной концентрации – одна клетка на лунку. Клонирование повторяли не менее двух раз, отбирая на каждой стадии клоны с наибольшей пролиферативной активностью и устойчивым синтезом специфических антител. Клетки отобранных клонов размножали в достаточном количестве и криоконсервировали в фетальной телячьей сыворотке с добавлением диметилсульфоксида (Sigma-Aldrich, США) до 8 % по объему, а затем помещали на хранение в сосуд Дьюара с жидким азотом.

Секреторные свойства полученных клонов изучали в процессе культивирования *in vitro* в 24-луночных культуральных планшетах (Eppendorf, Германия) на протяжении восьми пассажей. Гибридные клетки засеивали в лунки планшетов в концентрациях 50, 100 и 200 тыс. клеток в 1 мл. Культивирование осуществляли в ростовой среде в течение четырех суток. Культуральные жидкости получали от гибридных культур в логарифмической фазе роста, когда отмечался максимальный уровень продукции антител. Исследование секреторных свойств проводили путем определения титра специфических антител в ИФА, как описано выше. Для исследования использовали культуральные жидкости в разведениях от 1:1000 до 1:512000.

Для получения иммуоасцитических жидкостей (далее – ИАЖ) гибридные клетки выращивали в культуральных флаконах T25 (Eppendorf, Германия) и вводили внутрибрюшинно предварительно праймированным пристаном (Sigma-Aldrich, США) мышам линии BALB/c в дозе 2·10<sup>6</sup> клеток/мышь. Начиная с 7-х суток контролировали приживание гибридных клеток. При увеличении размеров брюшной полости мышей в два раза и более производили забор перитонеального экссудата. Клеточные компоненты, содержащиеся в асцитических жидкостях, удаляли центрифугированием. Титр специфических антител определяли методом ИФА, как описано выше. Для исследования использовали асцитические жидкости в разведениях от 1:10000 до 1:5120000. Специфические иммуноглобулины выделяли методом аффинной хроматографии на колонке с протеин А-сефарозой (GE Healthcare, США). Из полученных иммуноглобулинов изготавливали конъюгаты с пероксидазой хрена методом периодатного окисления [12].

Исследование возможности использования полученных МКАТ для детекции антигенов коронавируса SARS-CoV-2 проводили в ИФА. В работе использован вирус SARS-CoV-2, штамм «Изолят В», соответствующий референсной последовательности NC\_045512.2 (Wuhan seafood market pneumonia virus isolate Wuhan-Hu-1, complete genome). Суспензия вирионов данного штамма, инактивированная про-

пиолактоном, получена из Специализированной коллекции ФГБУ «48 ЦНИИ» Минобороны России. Наличие генетического материала вируса в данной суспензии подтверждено с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (набор ПЦР-РВ-2019-nCov производства ЗАО «Синтол», Россия).

Для выполнения анализа в лунках 96-луночных планшетов сорбировали антитела в концентрации 20 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере, pH 9,6, в течение 18 часов при 4 °С. После трехкратной отмывки отмывочным буфером в лунки вносили аликвоты инактивированной вирусной биомассы SARS-CoV-2 в концентрациях  $1 \cdot 10^6$ ,  $5 \cdot 10^5$ ,  $1 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^4$ ,  $1 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^3$ ,  $2,5 \cdot 10^3$ ,  $1 \cdot 10^3$  и  $1 \cdot 10^2$  БОЕ/мл. Пробы инкубировали в течение 1 часа при 37 °С. После трехкратной отмывки PBS в лунки вносили конъюгированные МКАТ на 30 мин при 37 °С. Далее постановку осуществляли, как описано выше. Результаты анализа принимали к учету в том случае, если оптическая плотность хромоген-субстратной смеси в лунках с исследуемыми образцами превышала величину 0,3. При этом оптическая плотность в условиях отсутствия аналита в лунках не должна превышать значение 0,15.

Работы с микроорганизмами проводились в соответствии с СанПиН 3.3686-21 «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней». Работы с лабораторными животными проводились в соответствии с международными этическими нормами, законодательством Российской Федерации и нормативными документами учреждения.

### Результаты и обсуждение

Проведено два эксперимента по слиянию спленоцитов мышей линии BALB/c, иммунизированных препаратом белка NP вируса SARS-CoV-2, с клетками миеломной опухоли SP2/0-Ag14 и два эксперимента по слиянию спленоцитов животных, иммунизированных препаратом белка RBD вируса SARS-CoV-2.

Через 10 дней в 90 % лунок 96-луночных культуральных планшетов отмечено появление колоний гибридных клеток. Культуральные жидкости из лунок с интенсивно растущими гибридными клетками протестированы в ИФА с соответствующими антигенными препаратами SARS-CoV-2. По результатам первичного иммунологического скрининга выявлено 25 лунок с гибридными клетками, продуцирующими анти-NP-антитела, и 12 лунок с гибридами, продуцирующими анти-RBD-антитела. Из них наибольшей антителопродуцирующей активностью в ИФА обладали 7 культур пролиферирующих гибридных клеток, синтезирующих анти-NP-антитела, и 5 культур гибридных клеток, синтезирующих анти-RBD-антитела.

Полученные культуры гибридных клеток были клонированы. Процедуру клонирования каждой гибридной клеточной линии повторяли не менее двух раз до достижения стабильной антителопродукции у 100 % клеток в популяции. В результате выбраны по 3–4 клон от каждой клеточной линии. Полученные культуры размножали путем пассирования в 24-луночных культуральных планшетах и затем в культуральных флаконах возрастающего объема. Специфическая активность продуцируемых моноклонами антител сохранялась на протяжении восьми пассажей *in vitro* (срок наблюдения). При тестировании в ИФА в культуральной жидкости от гибридом 404A11, 405B9, 411B5, 411D12, 413D7, 414G12, 415D10, 415D12 определялись титры антител к антигену NP в диапазоне разведений культуральной жидкости от 1:32000 до 1:256000. При этом с вирусной биомассой реагировали только культуральные жидкости, полученные от гибридом 404A11, 411D12, 414G12, 415D12, на уровне титров антител в ИФА от 1:4000 до 1:32000. Аналогичная зависимость отмечена также при тестировании ИАЖ: с вирусной биомассой реагировали ИАЖ, полученные от мышей при культивировании *in vivo* гибридом 404A11, 411D12, 414G12, 415D12 (табл. 1).

Таблица 1 / Table 1

Характеристики гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к антигену NP коронавируса SARS-CoV-2  
Characteristics of hybridomas producing monoclonal antibodies to NP antigen of SARS-CoV-2 coronavirus

Гибридома-продуцент МКАТ Hybridoma producing monoclonal antibodies	Титр МКАТ к NP в культуральной жидкости Titers of monoclonal antibodies to NP in culture fluid	Титр МКАТ к вирусной биомассе SARS-CoV-2 в культуральной жидкости Titers of monoclonal antibodies to SARS-CoV-2 biomass in culture fluid	Титр МКАТ к NP в иммуноасцитической жидкости Titers of monoclonal antibodies to NP in immune-ascitic fluid	Титр МКАТ к вирусной биомассе SARS-CoV-2 в иммуноасцитической жидкости Titers of monoclonal antibodies to SARS-CoV-2 biomass in immune-ascitic fluid
404A11	1:64000	1:4000	1:1280000	1:80000
405B9	1:128000	Нет титров / No titers	1:1280000	Нет титров / No titers
411B5	1:32000	Нет титров / No titers	1:1280000	Нет титров / No titers
411D12	1:64000	1:16000	1:2560000	1:320000
413D7	1:128000	Нет титров / No titers	1:2560000	Нет титров / No titers
414G12	1:64000	1:16000	1:2560000	1:160000
415D10	1:256000	Нет титров / No titers	1:2560000	Нет титров / No titers
415D12	1:128000	1:32000	1:2560000	1:640000

Таблица 2 / Table 2

**Характеристики гибридом, продуцирующих моноклональные антитела к антигену RBD коронавируса SARS-CoV-2**  
**Characteristics of hybridomas producing monoclonal antibodies to RBD antigen of SARS-CoV-2 coronavirus**

Гибридома-продуцент МКАТ Hybridoma producing monoclonal antibodies	Титр МКАТ к RBD в культуральной жидкости Titers of monoclonal antibodies to RBD in culture fluid	Титр МКАТ к вирусной биомассе SARS-CoV-2 в культуральной жидкости Titers of monoclonal antibodies to SARS-CoV-2 biomass in culture fluid	Титр МКАТ к RBD в иммуноасцитической жидкости Titers of monoclonal antibodies to RBD in immune-ascitic fluid	Титр МКАТ к вирусной биомассе SARS-CoV-2 в иммуноасцитической жидкости Titers of monoclonal antibodies to SARS-CoV-2 biomass in immune-ascitic fluid
406C7	1:64000	1:1600	1:1280000	1:8000
408D2	1:32000	1:400	1:1280000	1:4000
408F12	1:16000	1:200	1:160000	1:2000
408G2	1:32000	1:400	1:2560000	1:4000
409D10	1:8000	1:200	1:160000	1:1000

При тестировании в ИФА культуральной жидкости гибридом к RBD определялись титры антител в диапазоне разведений от 1:8000 до 1:64000. Иммуноасцитические жидкости, полученные от мышей при культивировании *in vivo* гибридом 406C7, 408D2, 408F12, 408G2, 409D10, также реагировали с рекомбинантным белком RBD; титры специфических антител составили от 1:160000 до 1:2560000 (табл. 2). При этом культуральные и иммуноасцитические жидкости от данных гибридом проявляли низкую иммунореактивность в ИФА к антигенам вирусной биомассы SARS-CoV-2 (табл. 2) и не использовались в дальнейшей работе.

На заключительном этапе исследований определена возможность использования полученных МКАТ для детекции вирусных частиц SARS-CoV-2 методом ИФА. Для исследования использовали МКАТ, реагировавшие в ИФА с антигенами вирусной биомассы SARS-CoV-2. По результатам данного эксперимента установлена возможность выявления вирионов SARS-CoV-2 в концентрации от  $1 \cdot 10^3$  до  $1 \cdot 10^6$  БОЕ/мл с использованием МКАТ 404A11, 411D12, 414G12 и 415D12. При этом использование МКАТ 415D12 в качестве захватывающего и конъюгированного с пероксидазой хрена 411D12 в качестве детекторного МКАТ позволяет выявлять вирионы SARS-CoV-2 штамма «Изолят В» в концентрации  $1 \cdot 10^3$  БОЕ/мл (табл. 3).

В результате проведенных гибридизаций, селекций и последующих клонирований получены 7 гибридом,

продуцирующих МКАТ к NP SARS-CoV-2: 404A11, 405B9, 411B5, 411D12, 413D7, 414G12, 415D10, 415D12; 5 гибридом, продуцирующих МКАТ к RBD SARS-CoV-2: 406C7, 408D2, 408F12, 408G2, 409D10. Из них только гибридомы 404A11, 411D12, 414G12, 415D12 (специфичные к антигену NP) проявляли иммунореактивность к антигенам вирусной биомассы SARS-CoV-2, достаточную для разработки на их основе иммунохимических тестов. Вероятно, это связано с тем, что в составе вириона SARS-CoV-2 нуклеокапсидный белок в процентном соотношении преобладает над другими белками [13], поэтому чувствительность иммунохимических тестов для выявления SARS-CoV-2, основанных на анти-NP-антителах, оказывается выше чувствительности аналогичных тестов, основанных на анти-RBD-антителах. Причиной низкой иммунореактивности полученных анти-RBD-МКАТ к нативным вирионам может также служить конформационная «закрытость» антигенных эпитопов из состава нативного S-белка вирионов SARS-CoV-2, к которым были получены анти-RBD-МКАТ. В этом случае проблему возможно решить путем проведения дополнительных процедур гибридизации и получения МКАТ.

Все полученные гибридомы характеризовались стабильностью пролиферативной и антителопродуцирующей активности на протяжении 8 пассажей *in vitro* (срок наблюдения). При введении в брюшную полость мышей BALB/c получены иммуноасцитиче-

Таблица 3 / Table 3

**Результаты сэндвич-ИФА при выявлении вирусной биомассы SARS-CoV-2**  
**Results of sandwich-ELISA during the detection of SARS-CoV-2 biomass**

МКАТ, сорбируемые в планшетах, от гибридом ... Monoclonal antibodies from hybridomas, adsorbed in plates ...	Минимальная выявляемая концентрация вирусной биомассы SARS-CoV-2 методом ИФА при использовании конъюгированных МКАТ от гибридом, БОЕ/мл Minimum detected concentration of SARS-CoV-2 biomass in sandwich ELISA using monoclonal antibodies conjugated with horseradish peroxidase, PFU per ml			
	404A11	411D12	414G12	415D12
404A11	$1 \cdot 10^6$	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^3$
411D12	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^3$
414G12	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^3$
415D12	$2,5 \cdot 10^3$	$1 \cdot 10^3$	$2,5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^4$

ские жидкости, из которых выделены моноклональные антитела. Использование моноклональных антител к NP SARS-CoV-2 позволяет методом ИФА выявлять вирусные частицы коронавируса SARS-CoV-2, штамм «Изолят В», в концентрации  $1 \cdot 10^3$  БОЕ/мл и более. Гибридомы-продуценты и моноклональные антитела планируется использовать при изготовлении диагностических препаратов, предназначенных для детекции антигенов коронавируса SARS-CoV-2.

**Конфликт интересов.** Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

### Список литературы

1. SARS-CoV-2-related data provided by the Protein Domains resource [Электронный ресурс]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/SARS-CoV-2.html> (дата обращения 15.08.2022).
2. Guo L., Ren L., Yang S., Xiao M., Chang D., Yang F., Dela Cruz C.S., Wang Y., Wu C., Xiao Y., Zhang L., Han L., Dang S., Xu Y., Yang Q.W., Xu S.Y., Zhu H.D., Xu Y.C., Jin Q., Sharma L., Wang L., Wang J. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15):778–5. DOI: 10.1093/cid/ciaa310.
3. Shanmugaraj B., Siriwananon K., Wangkanont K., Phoolcharoen W. Perspectives on monoclonal antibody therapy as potential therapeutic intervention for Coronavirus disease-19 (COVID-19). *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2020; 38(1):10–8. DOI: 10.12932/AP-200220-0773.
4. Wang C., Li W., Drabek D., Okba N.M.A., van Haperen R., Osterhaus A.D.M.E., van Kuppeveld F.J.M., Haagmans B.L., Grosveld F., Bosch B.J. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):2251. DOI: 10.1038/s41467-020-16256-y.
5. Шевиakov А.Г. Получение мышинных моноклональных антител к нуклеокапсиду нового коронавируса SARS-CoV-2. *Проблемы медицинской микологии.* 2021; 23(2):164.
6. Xie C., Ding H., Ding J., Xue Y., Lu S., Lv H. Preparation of highly specific monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and the preliminary development of antigen detection test strips. *J. Med. Virol.* 2022; 94(4):1633–40. DOI: 10.1002/jmv.27520.
7. Чуркин И.А., Ручко С.В., Суровяткина И.В., Лебедев В.Н., Панкова Е.И., Сыромятникова С.И., Степанов Н.Н., Харченко В.А., Максимов В.А. Штамм гибридных клеток T2/S-6E11 животных *Mus musculus L.*, продуцирующих моноклональные антитела к коронавирусу – возбудителю тяжелого острого респираторного синдрома. Патент РФ № 2291195, опублик. 10.01.2007.
8. Шахпаронов М.И., Павлюков М.С., Антипова Н.В. Моноклональное антитело к RBD фрагменту в составе S белка вируса SARS-CoV-2. Патент РФ № 2744274, опублик. 04.03.2021.
9. Есмагамбетов И.Б., Шебляков Д.В., Лебедин Ю.С., Фаворская И.А., Должикова И.В., Деркаев А.А., Рябова Е.И., Прокофьев В.В., Алексеева И.А., Воронина Д.В., Зорков И.Д., Ковыршина А.В., Илюхина А.А., Ботиков А.Г., Карпов А.П., Лубенец Н.Л., Зубкова О.В., Семихин А.С., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. Гуманизированное моноклональное антитело, специфически связывающееся с RBD S белка вируса SARS-CoV-2, средство и способ для терапии и экстренной профилактики заболеваний, вызываемых вирусом SARS-CoV-2. Патент РФ № 2765731, опублик. 02.02.2022.
10. Köhler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495–7. DOI: 10.1038/256495a0.
11. de StGroth S.F., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods.* 1980; 35(1-2):1–21. DOI: 10.1016/0022-1759(80)90146-5.
12. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91. DOI: 10.1177/22.12.1084.
13. Lu R.-M., Ko S.-H., Chen W.-Y., Chang Y.-L., Lin H.-T., Wu H.-C. Monoclonal antibodies against nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 variant for detection of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(22):12412. DOI: 10.3390/ijms222212412.

### References

1. SARS-CoV-2-related data provided by the Protein Domains resource. (Cited 15 Aug 2022). [Internet]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/SARS-CoV-2.html>.
2. Guo L., Ren L., Yang S., Xiao M., Chang D., Yang F., Dela Cruz C.S., Wang Y., Wu C., Xiao Y., Zhang L., Han L., Dang S., Xu Y., Yang Q.W., Xu S.Y., Zhu H.D., Xu Y.C., Jin Q., Sharma L., Wang L., Wang J. Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* 2020; 71(15):778–5. DOI: 10.1093/cid/ciaa310.
3. Shanmugaraj B., Siriwananon K., Wangkanont K., Phoolcharoen W. Perspectives on monoclonal antibody therapy as potential therapeutic intervention for Coronavirus disease-19 (COVID-19). *Asian Pac. J. Allergy Immunol.* 2020; 38(1):10–8. DOI: 10.12932/AP-200220-0773.
4. Wang C., Li W., Drabek D., Okba N.M.A., van Haperen R., Osterhaus A.D.M.E., van Kuppeveld F.J.M., Haagmans B.L., Grosveld F., Bosch B.J. A human monoclonal antibody blocking SARS-CoV-2 infection. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):2251. DOI: 10.1038/s41467-020-16256-y.
5. Sheviakov A.G. [Development of mouse monoclonal antibodies specific for nucleocapsid of novel coronavirus SARS-CoV-2]. *Problemy Meditsinskoy Mikologii [Problems in Medical Mycology]*. 2021; 23(2):164.
6. Xie C., Ding H., Ding J., Xue Y., Lu S., Lv H. Preparation of highly specific monoclonal antibodies against SARS-CoV-2 nucleocapsid protein and the preliminary development of antigen detection test strips. *J. Med. Virol.* 2022; 94(4):1633–40. DOI: 10.1002/jmv.27520.
7. Churkin I.A., Ruchko S.V., Surovyatkina I.V., Lebedev V.N., Pankova E.I., Syromyatnikova S.I., Stepanov N.N., Kharchenko V.A., Maksimov V.A. [Strains of hybrid cells T2/S-6E11 of *Mus musculus L.*, producing monoclonal antibodies to coronavirus – causative agent of severe acute respiratory syndrome]. RF Patent No. 2291195, publ. January 10, 2007.
8. Shakhparonov M.I., Pavlyukov M.S., Antipova N.V. [Monoclonal antibody to RBD-fragment in S-protein of SARS-CoV-2]. RF Patent No. 2744274, publ. March 04, 2021.
9. Esmagambetov I.B., Sheblyakov D.V., Lebedin Yu.S., Favorskaya I.A., Dolzhikova I.V., Derkaev A.A., Ryabova E.I., Prokof'ev V.V., Alekseeva I.A., Voronina D.V., Zorkov I.D., Kovyryshina A.V., Ilyukhina A.A., Botikov A.G., Karpov A.P., Lubenets N.L., Zubkova O.V., Semikhin A.S., Naroditsky B.S., Logunov D.Yu., Gintsburg A.L. [Humanized monoclonal antibody specifically binding to RBD of S-protein of SARS-CoV-2, means and method for therapy and emergency prevention of diseases caused by SARS-CoV-2 virus]. RF Patent No. 2765731, publ. February 02, 2022.
10. Köhler G., Milstein C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256(5517):495–7. DOI: 10.1038/256495a0.
11. de StGroth S.F., Scheidegger D. Production of monoclonal antibodies: strategy and tactics. *J. Immunol. Methods.* 1980; 35(1-2):1–21. DOI: 10.1016/0022-1759(80)90146-5.
12. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugated. *J. Histochem. Cytochem.* 1974; 22(12):1084–91. DOI: 10.1177/22.12.1084.
13. Lu R.-M., Ko S.-H., Chen W.-Y., Chang Y.-L., Lin H.-T., Wu H.-C. Monoclonal antibodies against nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 variant for detection of COVID-19. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22(22):12412. DOI: 10.3390/ijms222212412.

### Authors:

Kuklina G.V., Ipatov S.S., Gorshkov A.S., Pechenkin D.V., Eremkin A.V., Kuznetsovsky A.V., Tumanov A.S., Darmov I.V. Affiliated Branch of the “48<sup>th</sup> Central Research Institute” of the Ministry of Defense of the Russian Federation (Kirov). 119, Oktyabrsky Avenue, Kirov, 610017, Russian Federation. E-mail: 23527@mil.ru.

### Об авторах:

Куклина Г.В., Ипатов С.С., Горшков А.С., Печенкин Д.В., Еремкин А.В., Кузнецовский А.В., Туманов А.С., Дармов И.В. Филиал ФГБУ «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров). Российская Федерация, 610017, Киров, Октябрьский пр-т, 119. E-mail: 23527@mil.ru.