

УДК 578.74

# Анализ В-клеточных эпитопов гемагглютинаина вирусов гриппа

Д. Н. Щербинин\*, С. В. Алексеева, М. М. Шмаров, Ю. А. Смирнов, Б. С. Народицкий,  
А. Л. Гинцбург

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии  
им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской  
Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

\*E-mail: dim284@inbox.ru

Поступила в редакцию 16.08.2015

Принята к печати 09.12.2015

**РЕФЕРАТ** Вакцинация давно и успешно применяется для профилактики гриппа. Основным антигеном современных гриппозных вакцин является гемагглютинин (НА) вируса гриппа, вызывающий гуморальный иммунный ответ в организме человека и защищающий от гриппа. Однако периодически появляются новые сезонные и пандемические варианты вируса с измененной структурой НА. Это позволяет возбудителю избежать нейтрализации антителами, которые образовались в ответ на ранее проведенную вакцинацию. Разработка вакцины с новыми вариантами НА в качестве антигена занимает продолжительное время, поэтому в период эпидемии важно иметь в качестве профилактики и терапии средства для пассивной иммунизации, которыми могут служить моноклональные или однодоменные антитела с универсальной специфичностью (широкого спектра действия). В качестве универсальных антител рассматривают антитела к консервативным эпитопам антигенов вируса гриппа. Мы попытались охарактеризовать основные В-клеточные эпитопы гемагглютинаина и обобщить собственные и опубликованные данные об антителах с широкой нейтрализующей активностью. С использованием различных баз данных проведен компьютерный анализ наиболее известных конформационных эпитопов НА вирусов гриппа. Результаты анализа свидетельствуют, что мишенью поиска и создания антител широкого спектра действия к вирусу гриппа может быть стержневая часть молекулы НА, антитела к которой обладают выраженной гетеросубтипической активностью.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус гриппа, гемагглютинин, конформационные эпитопы, моноклональные антитела широкого спектра действия, однодоменные антитела широкого спектра действия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** НА – гемагглютинин вируса гриппа; Н1–Н18 – подтипы гемагглютинаина вируса гриппа.

## ВВЕДЕНИЕ

Гемагглютинин (НА) – основной антигенный компонент вирусов гриппа, представляет собой гомотримерный поверхностный гликопротеин с грибоподобной формой, мономер которого состоит из двух фрагментов, связанных дисульфидным мостиком: НА1 (330 аминокислот) – глобулярная часть, дистальная от вирусной мембраны, и НА2 (220 аминокислот) – стержневая часть, закрепленная в вирусной мембране. В природе найдено 18 подтипов НА вирусов гриппа А [1].

Вируснейтрализующие антитела, индуцированные НА, составляют основу гуморального иммунитета, защищающего организм человека от гриппозной инфекции [2]. Антигенная структура НА постоянно изменяется в результате селективного давления иммунной системы организма-хозяина,

что приводит к появлению и селекции новых вариантов вируса, способных избежать нейтрализующего эффекта существующих антител и преодолевать специфическую иммунную защиту человека. Этот механизм – антигенный дрейф – снижает эффект противогриппозной вакцинации [3]. При появлении пандемических штаммов вируса гриппа А, когда вирус с новым антигенным подтипом НА попадает в человеческую популяцию (антигенный шифт) [2, 4], существующие вакцины оказываются неэффективными. Эти обстоятельства объясняют необходимость поиска новых подходов к созданию противогриппозных препаратов с широким спектром активности [5]. Один из таких подходов – поиск и характеристика консервативных антигенных детерминант в молекуле НА вируса гриппа, получение нейтрализующих антител широкого спектра действия. Такие антите-

ла могут использоваться для экстренной пассивной иммунизации или терапии при проведении противоэпидемических мероприятий.

Молекулярные исследования антигенной структуры HA показали, что участки, взаимодействующие с антителами, расположены главным образом в глобулярном домене субъединицы HA1 [6]. Аминокислотные последовательности данных сайтов чрезвычайно вариабельны и различаются не только у разных подтипов HA, но и внутри одного подтипа. В субъединице HA2 обнаружены консервативные детерминанты [7–10]. Эти данные позволили предположить, что консервативные антигенные сайты в молекуле HA могут индуцировать образование антител с широкой перекрестно нейтрализующей активностью. Это предположение подтверждено Y. Okuno и соавт. [11], которые впервые получили и охарактеризовали моноклональное антитело к HA подтипа H2, обладающее нейтрализующей активностью в отношении штаммов вирусов гриппа А с HA H2 и H1. Это моноклональное антитело (С179) распознает конформационный эпитоп в стержневом регионе молекулы HA, консервативный у вирусов гриппа А подтипов H2 и H1. Известно, что вирусы гриппа птиц подтипов H5 и H6 филогенетически близки к штаммам подтипов H1 и H2 [12, 13]. Широкий спектр действия мышиного антитела С179 выявлен в НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского и показано, что это антитело реагирует с вирусами подтипов H1, H2 и H5 (и даже с HA подтипа H6 в его не вполне зрелой форме) [14, 15].

В качестве многообещающего средства пассивной иммунизации против гриппа рассматривают однодоменные антитела. Однодоменные антитела малы, стабильны и просты в производстве. Показано, что интраназальное введение полученных от ламы одноцепочечных фрагментов вариабельных доменов иммуноглобулинов, обладающих нейтрализующей активностью *in vitro* против вирусов гриппа H5N1, могут контролировать репликацию вируса, а также снижать заболеваемость и смертность мышей, зараженных вирусом гриппа H5N1. Хотя исследование было сосредоточено на однодоменных антителах, которые распознают эпитоп около домена связывания с рецептором, подчеркивается принципиальная возможность отбора молекул антител широкого спектра действия, которые связываются с другими эпитопами HA, в том числе консервативными [16].

В другой работе получено однодоменное антитело к HA вируса гриппа А и сконструирован рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий данное антитело. Введение такого рекомбинантного аденовируса в интервале от 48 ч до 14 дней до заражения способно полностью защищать мышей от вируса гриппа А [17].

Таким образом, совершенно очевидна необходимость поиска средств пассивной иммунизации с универсальной специфичностью, которые позволяют преодолеть антигенную изменчивость вируса гриппа [18].

Возможно, что направление поиска путей пассивной иммунизации, обеспечивающей защиту от широкого спектра вирусов гриппа, начатое совместно японскими и российскими учеными и продолжаемое сейчас в ряде лабораторий, окажется наиболее перспективным.

### АНТИТЕЛА К ГЛОБУЛЯРНОЙ ЧАСТИ МОЛЕКУЛЫ HA

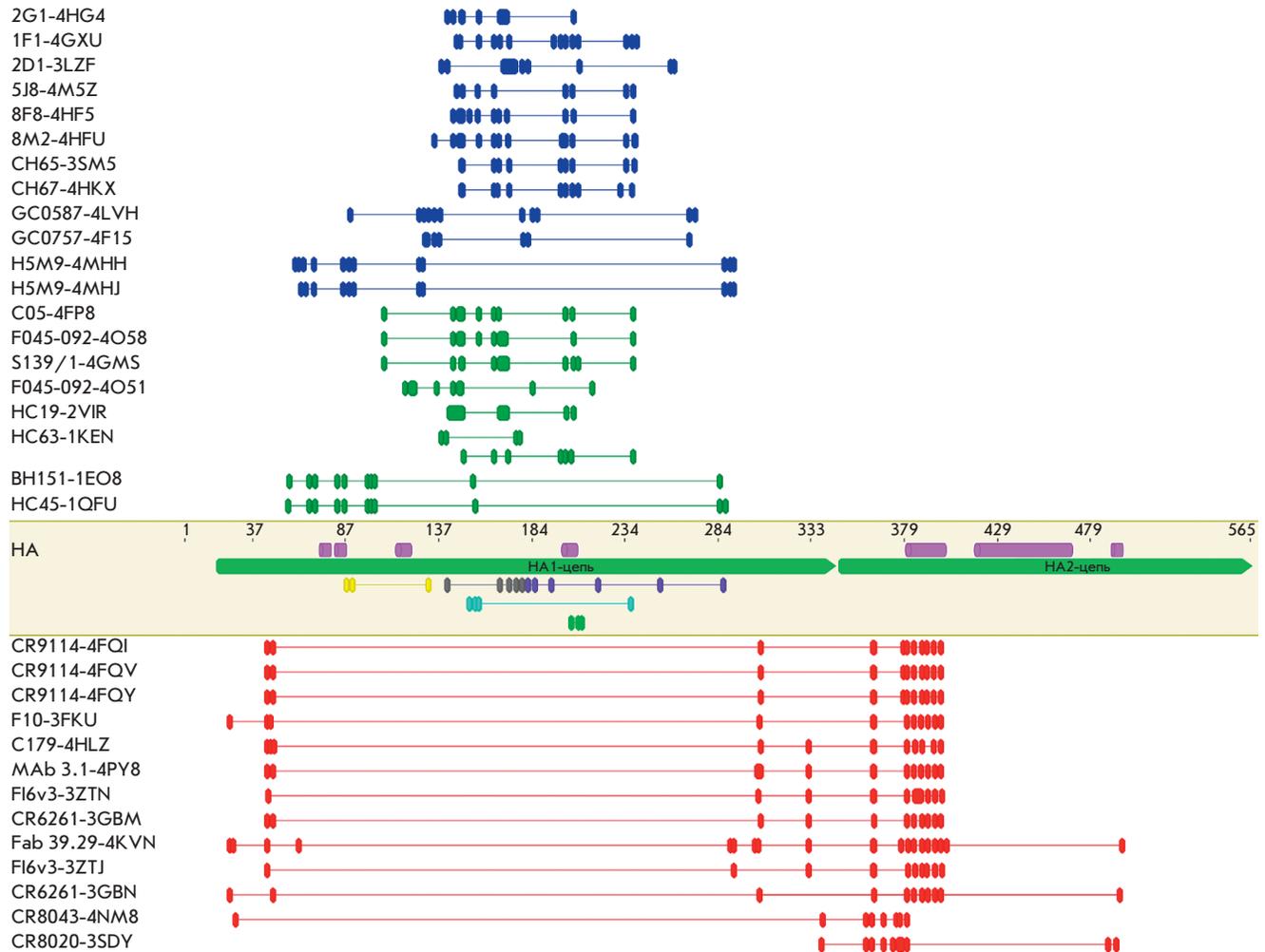
Наибольшее количество вируснейтрализующих антител, вырабатываемых естественным или искусственным путем, связывается с глобулярной частью HA, что приводит к блокированию прикрепления вирионов к клеткам. Однако вследствие того, что ген HA быстро мутирует, возникают аминокислотные замены, которые приводят к формированию новых сайтов гликозилирования, что, в свою очередь, вызывает изменения поверхностной структуры белка. Следовательно, эти антигенные сайты высоковариабельны и антитела к ним штаммоспецифичны. Отчасти это объясняет, почему иммунитет после натурального заражения или вакцинации в основном ограничивается циркулирующим штаммом. Например, антитела 2D1, связывающие Sa-антигенный сайт, расположенный в глобулярной части молекулы HA, распознают только пандемические вирусы H1N1 1918 и 2009 годов, эпитопы которых являются антигенно подобными, хотя их разделяет почти столетие [19]. Другие штаммы подтипа H1, например PR8, такие антитела не способны распознавать (табл. 1, рисунок).

Однако за последнее время были описаны и охарактеризованы несколько антител, специфичных к глобулярной части HA и обладающих при этом вируснейтрализующей активностью против нескольких штаммов вируса гриппа в пределах одного подтипа. Эти эпитопы консервативны у различных штаммов вирусов и, следовательно, распознаются одним и тем же антителом. Примечательно, что эпитопы таких антител могут располагаться в различных антигенных сайтах. Например, антитела H5M9 взаимодействуют с консервативным эпитопом HA подтипа H5, который локализуется в рудиментарном эстеразном субдоме близости от рецепторсвязывающего сайта и частично перекрывает антигенный сайт Сb [20]. Антитела H5M9 эффективно защищают мышей от летальных доз различных штаммов подтипа H5. Антитела HC45 и VH151 также взаимодействуют с подобным антигенным сайтом (рисунок), однако их способность взаимодействовать с раз-

Таблица 1. Известные антитела к В-клеточным эпитопам НА вирусов гриппа А и В

Антигенный сайт	Антитело	PDB ID	Источник антител	Подтип антител	Источник антигена	Ссылка
Р.с.к.	CH65, CH67	3SM5	Н. s.	IgG1	A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	[27, 33]
Р.с.к.	CH65	3SM5	Н. s.	IgG1	A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	[27]
Р.с.к.	CH67	4HKX	Н. s.	IgG1	A/Solomon Islands/3/2006(H1N1)	[33]
Sa-сайт	2D1	3LZF	Н. s.	?	A/South Carolina/1/1918(H1N1)	[19]
Р.с.к.	1F1	4GXU	Н. s.	?	A/South Carolina/1/1918(H1N1)	[28]
	GC0757	4F15	М. m.	?	A/California/04/2009(H1N1)	[45]
	GC0587	4LVH	М. m.	?	A/California/04/2009(H1N1)	[23]
Р.с.к.	5J8	4M5Z	Н. s.	?	A/California/07/2009(H1N1)	[26]
Р.э.с.	H5M9	4MHH	М. m.	IgG1	A/Viet Nam/1203/2004 (H5N1)	[20]
	H5M9	4MHJ			A/goose/Guangdong/1/1996(H5N1)	[20]
Р.с.к.	8F8	4HF5	Н. s.	?	A/Japan/305+/1957(H2N2)	[29]
Р.с.к.	8M2	4HFU	Н. s.	?	A/Japan/305+/1957(H2N2)	[29]
Р.с.к.	2G1	4HG4	Н. s.	?	A/Japan/305+/1957(H2N2)	[29]
Р.э.с.	BH151	1EO8	М. m.	IgG1	A/X-31(H3N2)	[22]
Р.э.с.	HC45	1QFU	М. m.	IgG1	A/X-31(H3N2)	[21]
Р.с.к.	C05	4FP8 4FQR	Н. s.	?	A/Hong Kong/1/1968(H3N2)	[30]
Р.с.к.	S139/1	4GMS	М. m.	IgG2a	A/Victoria/3/1975(H3N2)	[31]
Р.с.к.	F045-092	4O58	Н. s.	?	A/Victoria/3/1975(H3N2)	[32]
Р.с.к.	F045-092	4O5I	Н. s.	?	A/Singapore/H2011.447/2011(H3N2)	[32]
Р.с.к.	HC63	1KEN	М. m.	?	A/X-31(H3N2)	[46]
Р.с.к.	HC19	2VIR	М. m.	IgG1	A/X-31(H3N2)	[47]
		2VIS 2VIT				
	IIB4		М. m.	?	A/Philippines/2/1982(H3N2)	[48]
	Fab 26/9	1FRG	М. m.	IgG2a	A/Victoria/3/1975(H3N2)	[49]
	CR8071	4FQJ	Н. s.	IgG1	B/Florida/4/2006	[44]
	CR8059	4FQK	Н. s.	IgG1	B/Brisbane/60/2008	[44]
С.т.	FI6v3	3ZTJ	Н. s.	?	A/Aichi/2/1968(H3N2)	[42]
	FI6v3	3ZTN	Н. s.	?	A/California/04/2009(H1N1)	[42]
	MAb 3.1	4PY8	Н. s.	IgG1	A/South Carolina/1/1918(H1N1)	[39]
	CR6261	3GBN	М. m.	IgG1	A/Brevig Mission/1/1918(H1N1)	[37, 50]
	CR6261	3GBM	М. m.	IgG1	A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)	[37]
	CR8020	3SDY	Н. s.	?	A/Hong Kong/1/1968(H3N2)	[40]
	F10	3FKU	Н. s.	IgG1	A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)	[38]
	C179	4HLZ	М. m.	IgG2a	A/Japan/305/1957(H2N2)	[11, 15, 36]
	CR8043	4NM8	Н. s.	IgG1	A/Hong Kong/1/1968(H3N2)	[41]
	CR9114	4FQI	Н. s.	IgG1	A/Viet Nam/1203/2004(H5N1)	[44]
	CR9114	4FQV	-/-/-/-	-/-/-/-	A/Netherlands/219/2003(H7N7)	[44]
	CR9114	4FQY	-/-/-/-	-/-/-/-	A/Hong Kong/1/1968(H3N2)	[44]
		Fab 39.29	4KVN	Н. s.	?	A/Perth/16/2009(H3N2)

Примечания. Информация о наиболее известных конформационных В-клеточных эпитопах НА вирусов гриппа получена из базы данных иммунологических эпитопов (IEDB – Immune Epitope DataBase and analysis resource; www.iedb.org), а также из базы данных белков (PDB – Protein Data Bank; www.rcsb.org). Синим выделена H1-подгруппа вирусов гриппа (H1, H5 и H2), зеленым – H3-подгруппа, красным – антитела к стержневой части НА различных вирусов гриппа. С.т. – стержневая часть, Р.с.к. – рецепторсвязывающий карман, Р.э.с. – сайт, локализованный в рудиментарном эстеразном субдомене, Н. s. – *Homo sapiens*, М. m. – *Mus musculus*.



Схематичное расположение В-клеточных эпитопов на аминокислотной последовательности гемагглютинаина HA. Рисунок получен с использованием программного обеспечения Geneious 9.0.2 следующим образом: аминокислотные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа, распознающиеся соответствующими антителами (табл. 1), выровнены друг относительно друга, на каждой последовательности картирован эпитоп, распознающийся соответствующим антителом. Информация о В-клеточных эпитопах HA получена из базы данных иммунологических эпитопов. В центре представлено HA с расположенными на нем элементами. Снизу вверх представлены цепи HA1 и HA2 (зеленые),  $\alpha$ -спирали (розовые), антигенные сайты – Сb (желтые), Са1 (фиолетовые), Са2 (голубые), Sa (серые), Sb (зеленые). Над и под HA показана локализация В-клеточных эпитопов HA вирусов гриппа А (см. табл. 1): сверху эпитопы к глобулярной части HA, подгруппы H1 (темно-синие), подгруппы H3 (темно-зеленые); снизу эпитопы к стержневой части HA (темно-красные). Антигенные сайты картированы согласно A.J. Caton [51]

личными штаммами не определена [21, 22]. Такие антитела, как GC0757 и GC0587, взаимодействуют с одним и тем же эпитопом, расположенным в глобулярной части HA, и распознают различные штаммы подтипа H1 [23]. Эти антитела взаимодействуют с неизвестным ранее эпитопом, который не располагается в известных антигенных сайтах [23].

Группа других антител, взаимодействующих с несколькими штаммами вируса гриппа, распознает ре-

цепторсвязывающий сайт в глобулярной части HA. Поскольку рецепторсвязывающийся сайт функционально консервативен, его аминокислотное разнообразие ограничено, и он рассматривается в качестве привлекательной мишени для антител широкого спектра действия [24].

Рецепторсвязывающий сайт представляет собой широкий, неглубокий карман, локализованный в верхней части глобулярного домена. Границы ре-

цепторсвязывающего сайта формируют петли 130, 150, 220 и  $\alpha$ -спираль 190, которые обозначают позиции в аминокислотной последовательности HA [25]. Структурная характеристика нескольких антител, связанных с рецепторсвязывающим сайтом, показала, что все антитела встраивают переменную петлю в рецепторсвязывающий сайт и таким образом прямо блокируют взаимодействие HA с клеточными сиаловыми кислотами [26–32]. Однако из-за компактности этого сайта большинство антител встраиваются только с помощью одной петли, и лишь некоторые антитела взаимодействуют двумя петлями. Поскольку сайт связывания с рецептором находится в глобулярной части HA, это не создает стерических преград для формирования антител к этому антигенному сайту.

Антитела 1F1 получены от людей, перенесших пандемию гриппа 1918 года. Эти антитела способны ингибировать некоторые штаммы вируса гриппа А подтипа H1: изоляты 1918, 1943, 1947 и 1977 годов [28]. Изучение кристаллической структуры этих антител в комплексе с HA вируса гриппа 1918 года показало, что они взаимодействуют с аминокислотными остатками, принадлежащими к антигенным сайтам Sa, Sb и Ca<sub>2</sub>. Тяжелая цепь антитела 1F1 также контактирует с рецепторсвязывающим сайтом, взаимодействуя с аминокислотными остатками, принимающими участие в связывании сиаловых кислот.

Антитела SN65 и SN67 связывают и нейтрализуют вирусы гриппа подтипа H1, которые циркулируют в человеческой популяции начиная с 1986 года [27, 33]. Однако эти антитела не обладают активностью против пандемического вируса гриппа H1 2009 года. Антитела 5J8 активны против HA подтипов H1 как пандемических вирусов гриппа 1918 и 2009 годов, так и против сезонных вирусов гриппа А. Исследование кристаллической структуры антител SN65, SN67 и 5J8 в комплексе с HA обнаружило, что все они распознают эпитопы возле рецепторсвязывающего сайта и встраивают их HCDR3-петлю в рецепторсвязывающий карман.

Вирусы подтипа H2N2 циркулировали в человеческой популяции в течение 11 лет, с 1957 по 1968 год. Вследствие длительного отсутствия этих вирусов иммунитет у населения значительно снизился, а у лиц, родившихся после 1968 года, полностью отсутствует, поэтому вероятность возвращения вирусов этого подтипа очень высока, что, несомненно, вызывает беспокойство. С помощью гибридной технологии от доноров были получены антитела к подтипу H2N2 – 8F8, 8M2 и 2G1, которые распознают и нейтрализуют все подтипы HA H2, начиная с 1957 до 1968 года [29]. Анализ кристаллической структуры этих антител в комплексе с HA показал,

что они распознают рецепторсвязывающий карман. Антитела 8F8 встраивают их HCDR3-петлю в рецепторсвязывающий карман, тогда как антитела 8M2 и 2G1 – в HCDR2-петлю [29].

Описанные антитела к рецепторсвязывающему карману HA свидетельствуют о том, что этот участок глобулярной части HA более консервативен, чем такие антигенные сайты, как Sa или Sb, однако антитела к этому участку не способны распознавать HA различных подтипов. Тем не менее найдены антитела, распознающие рецепторсвязывающий карман и способные к гетеросубтипическому распознаванию HA.

Антитела C05 и S139/1 обладают гетеросубтипической активностью и могут связываться со множеством подтипов вируса гриппа, включая H1, H2 и H3 [30, 31]. Антитела S139/1 получены от мышей, иммунизированных вирусом H3N2. Это первые гетеросубтипические антитела, которые распознают рецепторсвязывающий карман, взаимодействуя с HA подтипов H1, H2, H3, H5, H9 и H13 [34]. В результате анализа кристаллической структуры этих антител в комплексе с HA установлено, что они взаимодействуют с рецепторсвязывающим пакетом при помощи петли HCDR2 [31]. Изучение связывания и нейтрализации вируса подтвердило, что антитела S139/1 действительно имеют гетеросубтипическую активность, хотя и с узкой специфичностью в пределах одного подтипа. Тем не менее эти результаты позволяют предположить, что разные штаммы разных подтипов вируса гриппа А могут содержать похожий эпитоп в рецепторсвязывающем сайте.

Другие антитела – C05 – найдены при помощи фаговой библиотеки, полученной на основе клеток, выделенных от лиц, зараженных сезонным вирусом гриппа [30]. C05 оказывают нейтрализующее действие в отношении вирусов H1, H2, H3 и H9 и имеют большую широту распознавания внутри этих подтипов по сравнению с S139/1-антителами. В отличие от других описанных ранее антител, распознающих рецепторсвязывающий карман, C05 связывают HA исключительно при помощи тяжелой цепи. Основное взаимодействие опосредуется только длинной HCDR3-петлей, которая проникает в рецепторсвязывающий карман. Эпитоп к этим антителам на поверхности HA является очень компактным.

Еще одни антитела с широким гетеросубтипическим распознаванием – F045-092, также получены с помощью фаговой библиотеки на основе клеток, выделенных от доноров. Они способны распознавать и нейтрализовать различные штаммы вируса гриппа подтипов H1, H2, H3 и H5 [35]. Анализ кристаллической структуры антител F045-092 в комплексе с HA показал, что они встраивают HCDR3-петлю в рецеп-

**Таблица 2.** Взаимодействие моноклональных антител, специфичных к стержневой части НА, с различными подтипами вирусов гриппа А

Групповая классификация вирусов гриппа	Моноклональное антитело									
	C179	F10	CR6261	MAb 3.1	CR8020	CR8043	Fab 39.29	FI6v3*	CR9114**	
	H9	+	+	+	-	-	-	н.т.	н.т.	+
	H8	н.т.	+	+	-	-	-	н.т.	н.т.	+
	H12	-	н.т.	-	-	-	-	н.т.	н.т.	+
	H6	+	+	+	+	-	-	н.т.	н.т.	+
	H1	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	H2	+	+	+	+	-	-	+	н.т.	+
	H5	+	+	+	+	-	-	+	+	+
	H11	н.т.	+	-	-	-	-	н.т.	н.т.	н.т.
	H13	-	-	-	-	-	-	н.т.	н.т.	н.т.
	H16	-	-	-	-	-	-	н.т.	н.т.	н.т.
	H3	-	-	-	-	+	н.т.	+	+	+
	H4	-	-	-	-	+	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.
	H14	-	-	-	-	н.т.	+	н.т.	н.т.	н.т.
	H10	-	-	-	-	+	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.
	H7	-	-	-	-	+	н.т.	+	+	+
H15	-	-	-	-	н.т.	+	н.т.	н.т.	н.т.	

*Примечания.* «+» – нейтрализация вируса гриппа, «-» – не выявлено взаимодействие с НА, «н.т.» – не тестировали. Красным показана группа H1 вирусов гриппа, зеленым – группа H3.

\* Антитела FI6v3 взаимодействуют с другими подтипами НА, но нейтрализация вируса не исследована.

\*\* CR9114 взаимодействуют с вирусом гриппа В, но не нейтрализуют его.

торсвязывающий карман, причем карбоксильная группа аспартата на верхушке распознающей петли мимикрирует карбоксильную группу сиаловых кислот [32]. Вероятно, благодаря рецепторной мимикрии достигается большая широта распознавания различных подтипов вируса гриппа А.

### АНТИТЕЛА К СТЕРЖНЕВОЙ ЧАСТИ МОЛЕКУЛЫ НА

Первоначально описанные антигенные сайты располагались только на глобулярном домене НА, и какое-то время была распространена точка зрения, согласно которой стержневой регион считался недоступным для гуморального иммунного ответа. Однако уже в 1993 году были описаны антитела C179, полученные в мышах, иммунизированных вирусом гриппа H2N2, и способные нейтрализовать НА подтипов H1, H2 и H5 [11, 14]. В отличие от антител к глобулярной части, эти антитела блокировали конформационные перестройки НА при низком значении pH, подавляя таким образом его функции. Спустя 20 лет после открытия антител C179 установили их кристаллическую структуру в комплексе с НА подтипа H5. Анализ этого комплекса показал, что антитела взаимодействуют с НА при помощи как тяжелых, так и легких цепей [36].

Спустя 15 лет после открытия антител C179 были описаны еще несколько антител к стержневой части НА. Изучение структуры двух таких антител человека – CR6261 [37] и F10 [38] – в комплексе с НА показало, что они взаимодействуют с высококонсервативным эпитопом в стержневой части, общим среди НА первой группы (табл. 2). Оба антитела взаимодействуют с НА только с помощью тяжелых цепей, вставляя петлю HCDR2 в гидрофобный карман.

Другие моноклональные гетеросубтипические антитела (MAb 3.1) были получены от доноров с использованием фаговой библиотеки. Антитела MAb 3.1 способны нейтрализовать вирусы гриппа подгруппы H1a (H1, H2, H5 и H6), но имеют слабую нейтрализующую активность против подгруппы H1b (H13, H16 и H11) [39]. Подобно другим гетеросубтипическим антигриппозным антителам CR6261 и F10, MAb 3.1 контактируют со стержневой частью НА, используя только тяжелую цепь, однако у MAb 3.1 в отличие от них во взаимодействии участвуют петли HCDR1 и HCDR3.

Найдены также антитела, которые взаимодействуют исключительно со второй группой НА. Так, например, антитела CR8020, выделенные от здорового донора, связывают высококонсервативный эпитоп стержневой части НА и проявляют нейтрализующую

ющую активность против вирусов H3, H7 и H10 [39]. Позднее были получены другие антитела, CR8043, которые, в отличие от CR8020, кодируются другими генными сегментами [40]. В опытах *in vitro* CR8043 проявляли нейтрализующую активность против подтипов H3 и H10 вируса гриппа и защищали мышь от летальной дозы вирусов H3N2 и H7N7 [41]. Антитела CR8020 и CR8043 связывают схожие эпитопы, но с HA взаимодействуют по-разному. Оба антитела взаимодействуют как с легкими, так и с тяжелыми цепями HA. Подобно антителам, связывающим первую группу HA, антитела CR8020 и CR8043 также взаимодействуют со стержневой частью молекулы HA и предотвращают его конформационные изменения при низких значениях pH. Эти антитела также ингибируют процесс созревания HA, блокируя протеолитическое расщепление незрелого предшественника HA0 на субъединицы HA1 и HA2. Таким образом, обнаруженные и структурно охарактеризованные эпитопы к этим антителам представляют собой второе уязвимое место на стержневой части молекулы HA.

Описаны моноклональные антитела, обладающие гетеросубтипической активностью как против первой (H1), так и против второй (H3) группы вирусов гриппа А. В 2011 году впервые охарактеризовали подобные пангетеросубтипические антитела FI6v3, выделенные из библиотеки, состоящей из 104 000 плазматических клеток, полученных от восьми доноров, при помощи метода культивирования единичных клеток [42]. Антитела FI6v3 обладали вируснейтрализующей активностью против вирусов обеих групп и ингибировали формирование синцития в культуре клеток. Подобные им Fab-фрагменты моноклональных антител Fab 39.29 получены с помощью метода «*in vitro* активирования и обогащения антигенспецифическим способом» 840 плазмобластов вакцинированных индивидов [43].

Еще одни пангетеросубтипические антитела CR9114 связывают консервативный эпитоп на стержневой части HA и в тестах нейтрализации проявляют активность против всех проверяемых штаммов вируса гриппа А [44]. Более того, эти антитела способны взаимодействовать с вирусом гриппа В, однако в опытах *in vitro* нейтрализация вируса гриппа В не была выявлена, по крайней мере в тестируемых концентрациях. Таким образом, в настоящее время антитела CR9114 являются антителами с самой широкой специфичностью из всех изученных моноклональных антител к HA вирусов гриппа А.

Найдены также гетеросубтипические антитела к вирусам гриппа В. В частности, антитела CR8059 и CR8071 способны нейтрализовать вирусы гриппа В обеих линий [44].

Возможность получения однодоменных антител с перекрестной нейтрализующей активностью впервые показана в отношении подтипов H1, H2, H5, H9 вируса гриппа. Четыре перекрестно нейтрализующих антитела (R2b-E8, R2b-D9, R1a-A5 и R1a-B6) связывались с HA полной длины, но не с доменом HA1, а также утрачивали связь с HA при низком pH. Эти антитела связываются с эпитопами в мембранной проксимальной области стержня HA вдали от сайта связывания рецептора. Подобный механизм перекрестной нейтрализации описан для моноклональных антител F10 человека и CR6261. Одно из антител (R2a-G8) связывается с частью домена HA1, который находится в области стержня HA [18].

На основании сказанного по широте распознавания все антитела можно классифицировать на четыре группы.

1) Антитела к глобулярной части, распознающие один или небольшое количество штаммов в пределах одного подтипа HA (2D1).

2) Антитела к глобулярной части, распознающие большое количество штаммов или все штаммы в пределах одного подтипа HA (H5M9, HC45, VH151, 8F8, 8M2, 2G1 и др.).

3) Антитела к глобулярной части, способные распознавать несколько штаммов различных подтипов HA (C05 и S139/1).

4) Антитела к стержневой части, достигающие выраженной гетеросубтипической активности (C179, F10, CR6261, CR8020, FI6v3, MA b 3.1, CR8043, Fab 39.29, CR9114).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возникающие время от времени эпидемические вспышки гриппа в вакцинированных популяциях безусловно свидетельствуют о необходимости продолжения поиска средств экстренной профилактики, а также лечения этого заболевания. Особую важность при этом приобретают средства защиты от пандемических штаммов вируса гриппа.

Для экстренной профилактики гриппа, вызываемого вирусом, изменчивым в отношении главного антигена – гемагглютинина, наиболее интересной представляется идея разработки препаратов широкого спектра действия, способных нейтрализовать вирусы гриппа разных подтипов.

В данной работе рассмотрена возможность распознавания различных В-клеточных эпитопов HA нейтрализующими антителами широкого спектра действия, что весьма актуально в связи с эволюцией вирусов гриппа.

В результате компьютерного анализа известных конформационных В-клеточных эпитопов HA виру-

сов гриппа показано, что мишенью при поиске и создании антител широкого спектра действия к вирусу гриппа является стержневая часть молекулы НА, антитела к которой обладают выраженной гетеросубтипической активностью. Из всех полученных и исследованных к настоящему времени моноклональных антител к НА вирусов гриппа А самую широкую перекрестную нейтрализующую активность проявляют антитела CR9114. Найдены также гетеро-

субтипические антитела CR8059 и CR8071 к вирусам гриппа типа В.

Полученные данные свидетельствуют о возможности получения препаратов широкого спектра действия для экстренной профилактики и лечения гриппа с применением моноклональных или однодоменных антител, нейтрализующих определенные В-клеточные эпитопы в стержневой части НА вируса гриппа.●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Webster R.G., Govorkova E.A. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2014. V. 1323. P. 115–139.
- Murphy B.R., Webster R.G. *Orthomyxoviruses*. Virology. 2nd ed. / Eds Fields B.N., Knipe D.M. N.Y.: Raven Press, 1990. P. 1091–1152.
- Kilbourne E.D. *Influenza*. N.Y.: Plenum Publ. Co., 1987.
- Webster R.G., Bean W.G., Gorman O.T., Chambers T.M., Kawaoka Y. // *Microbiol. Rev.* 1992. V. 56. P. 152–179.
- Kilbourne E.D. // *Nat. Medicine*. 1999. V. 5. P. 1119–1120.
- Wiley D.C., Skehel J.J. // *Ann. Rev. Biochem.* 1987. V. 56. P. 365–394.
- Graves P.N., Schulman J.L., Yong J.F., Palese P. // *Virology*. 1983. V. 126. P. 106–116.
- Laver W.G., Air G.M., Dopheide T.A., Ward C.W. // *Nature*. 1980. V. 283. P. 454–457.
- Raymond E.L., Caton A.J., Cox N.J., Kendal A.P., Brownlee G.G. // *Virology*. 1986. V. 148. P. 275–287.
- Verhoeven M., Fang R., Min Jou W., Devos R., Huylebroeck D., Saman E., Fiers W. // *Nature*. 1980. V. 286. P. 771–776.
- Okuno Y., Isegawa Y., Sasao F., Ueda S. // *J. Virol.* 1993. V. 67. № 5. P. 2552–2558.
- Air G.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1981. V. 78. P. 7639–7643.
- Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., Suzuki Y., Tateno Y., Nakajima K. // *Virology*. 1991. V. 182. P. 475–485.
- Смирнов Ю.А., Липатов А.С., Окуно И., Гительман А.К. // *Вопросы вирусологии*. 1999. Т. 44. С. 111–115.
- Smirnov Y.A., Lipatov A.S., Gitelman A.K., Okuno Y., van Beek R., Osterhaus A.D., Claas E.C. // *Acta Virologica*. 1999. V. 43. P. 237–244.
- Ibañez L.I., De Filette M., Hultberg A., Verrips T., Temperton N., Weiss R.A., Vandevelde W., Schepens B., Vanlandschoot P., Saelens X. // *J. Infect. Dis.* 2011. V. 203. № 8. P. 1063–1072.
- Tutykhina I.L., Sedova E.S., Gribova I.Y., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovskaya M.V., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., et al. // *Antiviral Res.* 2013. V. 97. № 3. P. 318–328.
- Hufton S.E., Risley P., Ball C.R., Major D., Engelhardt O.G., Poole S. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 8. P. e103294.
- Xu R., Ekiert D.C., Krause J.C., Hai R., Crowe J.E.Jr., Wilson I.A. // *Science*. 2010. V. 328. № 5976. P. 357–360.
- Zhu X., Guo Y.H., Jiang T., Wang Y.D., Chan K.H., Li X.F., Yu W., McBride R., Paulson J.C., Yuen K.Y., et al. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 23. P. 12619–12635.
- Fleury D., Barrère B., Bizebard T., Daniels R.S., Skehel J.J., Knossow M. // *Nat. Struct. Biol.* 1999. V. 6. № 6. P. 530–534.
- Fleury D., Daniels R.S., Skehel J.J., Knossow M., Bizebard T. // *Proteins*. 2000. V. 40. № 4. P. 572–578.
- Cho K.J., Hong K.W., Kim S.H., Seok J.H., Kim S., Lee J.H., Saelens X., Kim K.H. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 2. P. e89803.
- Martín J., Wharton S.A., Lin Y.P., Takemoto D.K., Skehel J.J., Wiley D.C., Steinhauer D.A. // *Virology*. 1998. V. 241. № 1. P. 101–111.
- Skehel J.J., Wiley D.C. // *Annu. Rev. Biochem.* 2000. V. 69. P. 531–569.
- Hong M., Lee P.S., Hoffman R.M., Zhu X., Krause J.C., Laursen N.S., Yoon S.I., Song L., Tussey L., Crowe J.E., et al. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 22. P. 12471–12480.
- Whittle J.R., Zhang R., Khurana S., King L.R., Manischewitz J., Golding H., Dormitzer P.R., Haynes B.F., Walter E.B., Moody M.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 34. P. 14216–14221.
- Tsibane T., Ekiert D.C., Krause J.C., Martinez O., Crowe J.E., Wilson I.A., Basler C.F. // *PLoS Pathog.* 2012. V. 8. № 12. P. e1003067.
- Xu R., Krause J.C., McBride R., Paulson J.C., Crowe J.E. Jr., Wilson I.A. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2013. V. 20. № 3. P. 363–370.
- Ekiert D.C., Kashyap A.K., Steel J., Rubrum A., Bhabha G., Khayat R., Lee J.H., Dillon M.A., O’Neil R.E., Faynboym A.M., et al. // *Nature*. 2012. V. 489. № 7417. P. 526–532.
- Lee P.S., Yoshida R., Ekiert D.C., Sakai N., Suzuki Y., Takada A., Wilson I.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 42. P. 17040–17045.
- Lee P.S., Ohshima N., Stanfield R.L., Yu W., Iba Y., Okuno Y., Kurosawa Y., Wilson I.A. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3614.
- Schmidt A.G., Xu H., Khan A.R., O’Donnell T., Khurana S., King L.R., Manischewitz J., Golding H., Suphaphiphat P., Carfi A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 1. P. 264–269.
- Yoshida R., Igarashi M., Ozaki H., Kishida N., Tomabechei D., Kida H., Ito K., Takada A. // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. № 3. P. e1000350.
- Ohshima N., Iba Y., Kubota-Koketsu R., Asano Y., Okuno Y., Kurosawa Y. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 21. P. 11048–11057.
- Dreyfus C., Ekiert D.C., Wilson I.A. // *J. Virol.* 2013. V. 87. № 12. P. 7149–7154.
- Ekiert D.C., Bhabha G., Elsliger M.A., Friesen R.H., Jongeneelen M., Throsby M., Goudsmit J., Wilson I.A. // *Science*. 2009. V. 324. № 5924. P. 246–251.
- Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L.M., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. V. 16. № 3. P. 265–273.
- Wyrzucki A., Dreyfus C., Kohler I., Steck M., Wilson I.A., Hangartner L. // *J. Virol.* 2014. V. 88. № 12. P. 7083–7092.
- Ekiert D.C., Friesen R.H., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H.J., Brandenburg B., et al. // *Science*. 2011. V. 333. № 6044. P. 843–850.
- Friesen R.H., Lee P.S., Stoop E.J., Hoffman R.M., Ekiert D.C., Bhabha G., Yu W., Juraszek J., Koudstaal W., Jongeneelen M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 1. P. 445–450.

42. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., et al. // *Science*. 2011. V. 333. № 6044. P. 850–856.
43. Nakamura G., Chai N., Park S., Chiang N., Lin Z., Chiu H., Fong R., Yan D., Kim J., Zhang J., et al. // *Cell Host Microbe*. 2013. V. 14. № 1. P. 93–103.
44. Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijdgeest D., Khayat R., Ekiert D.C., Lee J.H., Metlagel Z., Bujny M.V., Jongeneelen M., et al. // *Science*. 2012. V. 337. № 6100. P. 1343–1348.
45. Cho K.J., Lee J.H., Hong K.W., Kim S.H., Park Y., Lee J.Y., Kang S., Kim S., Yang J.H., Kim E.K., et al. // *J. Gen. Virol.* 2013. V. 94. P. 1712–1722.
46. Barbey-Martin C., Gigant B., Bizebard T., Calder L.J., Wharton S.A., Skehel J.J., Knossow M. // *Virology*. 2002. V. 294. № 1. P. 70–74.
47. Fleury D., Wharton S.A., Skehel J.J., Knossow M., Bizebard T. // *Nat. Struct. Biol.* 1998. V. 5. № 2. P. 119–123.
48. Kostolanský F., Varecková E., Betáková T., Mucha V., Russ G., Wharton S.A. // *J. Gen. Virol.* 2000. V. 81. P. 1727–1735.
49. Churchill M.E., Stura E.A., Pinilla C., Appel J.R., Houghten R.A., Kono D.H., Balderas R.S., Fieser G.G., Schulze-Gahmen U., Wilson I.A. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 241. № 4. P. 534–556.
50. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. № 12. P. e3942.
51. Caton A.J., Brownlee G.G., Yewdell J.W., Gerhard W. // *Cell*. 1982. V. 31. P. 417–427.