

УДК 571.27

# Ненейтрализующие антитела к консервативным антигенам вируса гриппа

Е. С. Седова\*, Д. Н. Щербинин, А. А. Лысенко, С. В. Алексеева, Э. А. Артемова, М. М. Шмаров

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

\*E-mail: sedova-es@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.07.2019

Принята к печати 21.09.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-22-32

**РЕФЕРАТ** На сегодняшний день актуальной остается разработка новых противогриппозных вакцин широкого спектра действия, которые позволят избежать ежегодного изменения штаммового состава вакцины. Создание новых вакцин на основе высококонсервативных белков вируса гриппа позволит подготовиться к возможным пандемиям и существенно снизить наносимый ими ущерб. Ключевым моментом в определении эффективности противогриппозных вакцин является оценка уровня гуморального ответа на вакцину. Для создания новых противогриппозных вакцин важно знать механизмы действия различных, в том числе ненейтрализующих, антител, а также иметь методы определения уровня таких антител после иммунизации. В данном обзоре рассмотрены такие механизмы противогриппозного действия, реализуемые ненейтрализующими антителами, как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый фагоцитоз (АЗФ) и опосредованная антителом комплементзависимая цитотоксичность (АОКЗЦ). Запускают эти реакции такие антигены вируса гриппа, как гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (NA), так и высококонсервативные антигены – ионный канал М2, матриксный белок М1 и нуклеопротеин NP. Кроме того, рассмотрены механизмы действия и способы обнаружения антител к стволовой части НА и NA вируса гриппа.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антителозависимая клеточная цитотоксичность, антителозависимый фагоцитоз, вакцины широкого спектра действия, вирус гриппа, опосредованная антителами комплементзависимая цитотоксичность.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность; АЗФ – антителозависимый фагоцитоз; АОКЗЦ – опосредованная антителом комплементзависимая цитотоксичность; НА – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; NP – нуклеопротеин; NK – натуральные киллерные клетки; ITAM – тирозинсодержащий активационный мотив; ИФА – иммуноферментный анализ; IFN $\gamma$  – интерферон-гамма; TNF $\alpha$  – фактор некроза опухоли альфа; ELLA – лектин-ферментный анализ.

## ВВЕДЕНИЕ

Грипп – высококонтагиозная инфекция, вызывающая ежегодные эпидемии и через неравные промежутки времени – пандемии. По данным ВОЗ, ежегодно во всем мире гриппом заболевают 20–30% детей и от 5 до 10% взрослых, а от тяжелых осложнений, вызванных гриппозной инфекцией, умирают от 250 до 500 тыс. человек. При пандемиях масштабы ущерба и смертность значительно возрастают. Например, от пандемии гриппа в 1918–1919 годах умерли, по разным данным, от 50 до 100 млн человек [1].

Важнейшей мерой защиты от гриппозной инфекции и ограничения ее распространения является вакцинопрофилактика. Современные гриппозные вакцины, как правило, индуцируют образование антител к поверхностным антигенам НА и NA вируса гриппа. Поверхностные белки вируса гриппа подвергаются постоянному антигенному дрейфу, поэтому необходимо ежегодное обновление штаммового состава вакцин [2].

На сегодняшний день актуальна разработка новых противогриппозных вакцин широкого спектра дей-

ствия, которые позволят избежать ежегодного изменения штаммового состава вакцины. Кроме того, создание новых вакцин на основе высококонсервативных белков вируса гриппа позволит подготовиться к возможным пандемиям и существенно снизить наносимый ими ущерб.

Ключевым моментом оценки эффективности противогриппозных вакцин является определение уровня гуморального ответа на вакцину. Нейтрализующие антитела к глобулярному домену гемагглютинаина вырабатываются при вирусной инфекции, а также служат основой защитных механизмов всех применяемых на сегодняшний день противогриппозных вакцин [3]. Большинство вируснейтрализующих антител связываются с глобулярной частью HA, блокируют связывание HA с остатком сиаловой кислоты и предотвращают проникновение вируса в клетки (рис. 1, б). Именно эти антитела определяют в классических реакциях торможения гемагглютинации и нейтрализации [4–6]. Кроме того, многие антитела к глобулярной части HA также способны блокировать выход вируса из клетки (рис. 1, г). Этот механизм защиты невозможно оценить в классических реакциях торможения гемагглютинации и нейтрализации, он обнаруживается при добавлении антител к клеткам, предварительно зараженным вирусом гриппа [7].

Антитела к различным консервативным антигенам вируса гриппа (таким, как NP, M1, M2) обычно не являются нейтрализующими и не могут предотвратить развитие вирусной инфекции, однако за счет различных иммунных механизмов они способны выполнять защитную функцию. Таким образом, при создании новых противогриппозных вакцин широкого спектра действия актуальными становятся изучение механизмов действия различных, в том числе ненейтрализующих, антител, а также разработка методов оценки уровня таких антител после иммунизации новыми противогриппозными вакцинами.

### **АНТИТЕЛА К КОНСЕРВАТИВНЫМ АНТИГЕНАМ ВИРУСА ГРИППА, УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕАКЦИЯХ АНТИТЕЛОЗАВИСИМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ, АНТИТЕЛОЗАВИСИМОГО ФАГОЦИТОЗА И КОМПЛЕМЕНТЗАВИСИМОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ, ОПОСРЕДОВАННОЙ АНТИТЕЛАМИ**

Способность антител нейтрализовать вирус гриппа традиционно считалась важнейшим механизмом противогриппозной защиты. Однако исследования последних лет показали важность и других опосредованных антителами эффектов, которые также вносят свой вклад в защиту от вируса [3]. Существуют следующие механизмы противогриппозного дей-

ствия, реализуемые ненейтрализующими антителами: антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый фагоцитоз (АЗФ) и комплементзависимая цитотоксичность, опосредованная антителами (АОКЗЦ) [8]. Антигенами вируса гриппа, запускающими эти реакции, являются как HA и NA, так и такие высококонсервативные антигены, как ионный канал M2, матриксный белок M1 и нуклеопротеин NP.

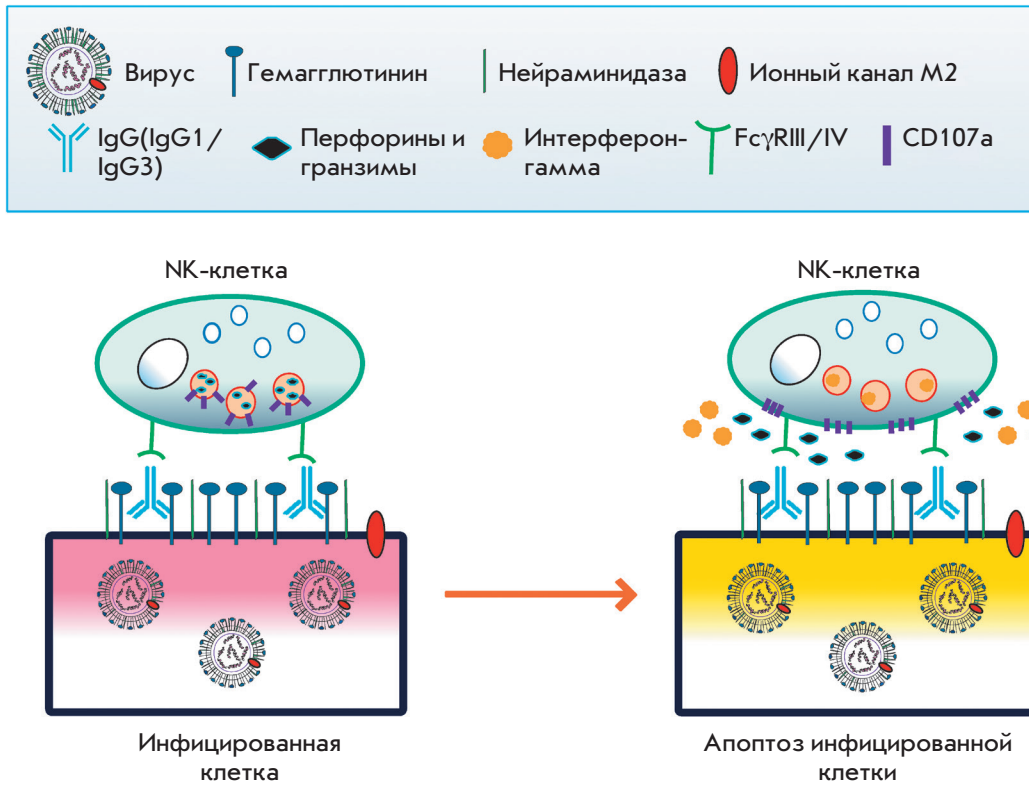
В отличие от нейтрализующих антител, функции которых осуществляются с помощью переменных участков, эффект ненейтрализующих антител зависит от консервативного Fc-региона. Fc-регион способен взаимодействовать с различными компонентами иммунной системы, в то время как переменная часть антитела связана с антигеном. Для осуществления эффекторных функций ненейтрализующих антител наиболее значимы изотипы антител IgG и IgM, при этом наиболее высоким функциональным потенциалом обладает IgG3 [9].

Ненейтрализующие антитела могут связываться своим Fc-регионом со специфическими Fc-рецепторами, экспонированными на поверхности большинства типов иммунных клеток, включая NK-клетки, макрофаги и нейтрофилы (рис. 1, е). После связывания с антителами эти иммунные клетки активируются и включаются в борьбу с патогеном. Описаны шесть различных рецепторов, вовлеченных в активацию (FcγRI, IIA, IIC, IIIA и IIIV) или ингибирование (FcγRIIB1/B2) иммунных клеток человека. Нейтрализующие антитела могут также активировать систему комплемента (рис. 1, ж) [9].

### **Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)**

Клетки, инфицированные вирусом гриппа, несут на своей поверхности вирусные белки, в основном HA и NA, так как новые вирионы образуются путем отпочковывания от клеточной мембраны. Противогриппозные IgG могут связывать вирусные белки на поверхности клеток, опсонизируя таким образом инфицированные клетки. Рецептор IIIa Fc-гамма (FcγRIIIa), экспонированный на поверхности многих клеток врожденного иммунного ответа, таких, как NK-клетки, моноциты и макрофаги, связывается с Fc-регионом IgG. В результате взаимодействия FcγRIIIa с IgG, связанным с инфицированной клеткой, происходят фосфорилирование тирозинсодержащего активационного мотива (ITAM) и активация Ca<sup>2+</sup>-зависимого сигнального пути. В результате NK-клетки начинают вырабатывать цитотоксические факторы (перфорины и гранзимы), приводящие к смерти инфицированной клетки, и противовирусные цитокины (IFNγ, TNFα) и хемокины (рис. 2) [10].





**Рис. 2.** Механизм АЗКЦ в клетке, зараженной вирусом гриппа. IgG взаимодействует с вирусными антигенами на поверхности инфицированной клетки. NK-клетки связываются с инфицированными клетками за счет Fc-FcR-взаимодействия, высвобождают цитотоксические гранулы и экспрессируют противовирусные цитокины

Одной из основных мишеней для антител, участвующих в АЗКЦ, является консервативный стебель НА, одного из наиболее представленных поверхностных белков вируса гриппа. Так, показано, что антитела широкого спектра действия к консервативному стеблю НА защищают мышей от летальной гриппозной инфекции через механизм, который включает взаимодействие Fc-FcγR. Напротив, протективность антител к вариабельному глобулярному домену НА проявлялась как в присутствии, так и в отсутствие взаимодействия с FcγR [11].

Так, повторное заражение макаков вирусом гриппа приводило к быстрому появлению АЗКЦ-реакций. В бронхоальвеолярных лаважах животных были найдены антитела, способные индуцировать активацию NK-клеток, что коррелировало со сниженным выделением вируса и уменьшением длительности заболевания [12]. У людей высокие титры антител, способных участвовать в АЗКЦ, также коррелировали со снижением заболеваемости при экспериментальном инфицировании [13]. Кроме того, пожилые люди, перенесшие ранее грипп, вызванный вирусами, близкими к штамму, вызвавшему в 2009 году пандемию «свиного гриппа», и сохранившие значимые титры антител, способных участвовать в АЗКЦ, но не имеющие вируснейтрализующих антител, были защищены от пандемического вируса гриппа. Таким образом,

ненейтрализующие антитела к стеблю НА, способные индуцировать АЗКЦ, напрямую связаны с уровнем защиты от вируса гриппа [14]. При этом, согласно опубликованным данным, вакцины от сезонных вирусов гриппа слабо индуцируют появление антител, способных участвовать в АЗКЦ. А присутствие активирующих NK-клетки антител широкого спектра действия у пожилых людей позволяет предположить, что эти антитела накапливаются в течение жизни в результате многократного заражения различными вирусами гриппа [15].

С использованием панели из 13 антител к НА вируса гриппа (как нейтрализующих, так и ненейтрализующих как к стволу, так и к глобулярной части НА) DiLillo и соавт. [16] показали, что для обеспечения защиты *in vivo* всем антителам широкого спектра действия требуются Fc-FcγR-взаимодействия. Аналогичный результат был получен при сравнении двух антител к НА, одно из которых обладало широким спектром действия, а другое было штаммоспецифичным. Это позволило предположить, что от Fc-FcγR-взаимодействия зависит широта спектра действия не только некоторых антител, специфичных к НА, но также антител к другим антигенам вируса гриппа, представленным на поверхности инфицированной клетки. Кроме того, зависимость от Fc-FcγR-взаимодействия некоторых



антител можно обойти путем значительного (в 8–10 раз) повышения количества антитела, участвующего во взаимодействии с вирусом гриппа. Стоит отметить, что при вирусной инфекции антитела широкого спектра действия генерируются в гораздо меньших количествах, чем штаммоспецифические. Таким образом, Fc-FcγR-взаимодействие, по-видимому, может увеличивать эффективность малочисленных антител широкого спектра, компенсируя тем самым их маленькое количество [16].

Антитела к консервативным вирусным белкам, например к нуклеопротеину NP, также вносят свой вклад в реакции АЗКЦ. Так, гриппозная инфекция и вакцинация индуцируют образование антител к NP, белкам M1 и M2, участвующим в АЗКЦ [17, 18]. Показано, что NP вируса гриппа некоторое время экспрессируется на поверхности инфицированных клеток и, следовательно, может служить целью для АЗКЦ [19–21]. Carragher и соавт. показали, что вакцинация лабораторных мышей рекомбинантным растворимым NP вируса гриппа А индуцирует высокие титры антител к NP и крайне слабый Т-клеточный ответ. При этом вакцинация снижала проявление симптомов заболевания и уменьшала титры вируса гриппа в легких животных после заражения гриппозной инфекцией. Пассивный перенос сывороток иммунизированных мышей наивным животным также обеспечивал защиту от заражения вирусом гриппа [22]. Последующие исследования показали, что протективные свойства сыворотки мышей, иммунизированных рекомбинантным NP вируса гриппа А, при пассивном переносе как животным с дефицитом В-клеток, так и мышам с нормальным количеством В-клеток проявляются через механизм, включающий FcγR [23]. Исследования на макаках показали, что анти-NP-антитела обладают способностью активировать NK-клетки *in vitro* [18, 24].

Сыворотки крови здоровых детей и взрослых (но не младенцев) содержат антитела к различным белкам вируса гриппа А H7N9, участвующие в реакциях АЗКЦ, причем уровень антител к NP был значительно выше, чем к HA и NA. Уровни участвующих в АЗКЦ антител к NP сезонных вирусов гриппа А коррелировали с уровнем антител к NP вируса гриппа А H7N9, поэтому предполагается, что образование этих перекрестно реагирующих с H7N9 антител происходило в результате вакцинации и заболевания сезонными вирусами гриппа А [25]. Антитела к NP вируса гриппа А, участвующие в АЗКЦ, обнаружены у детей, вакцинированных сезонной инактивированной противогриппозной вакциной. У здоровых и инфицированных гриппом добровольцев выявлены антитела к NP, которые могут взаимодействовать с FcγRIIIa и активировать NK-клетки.

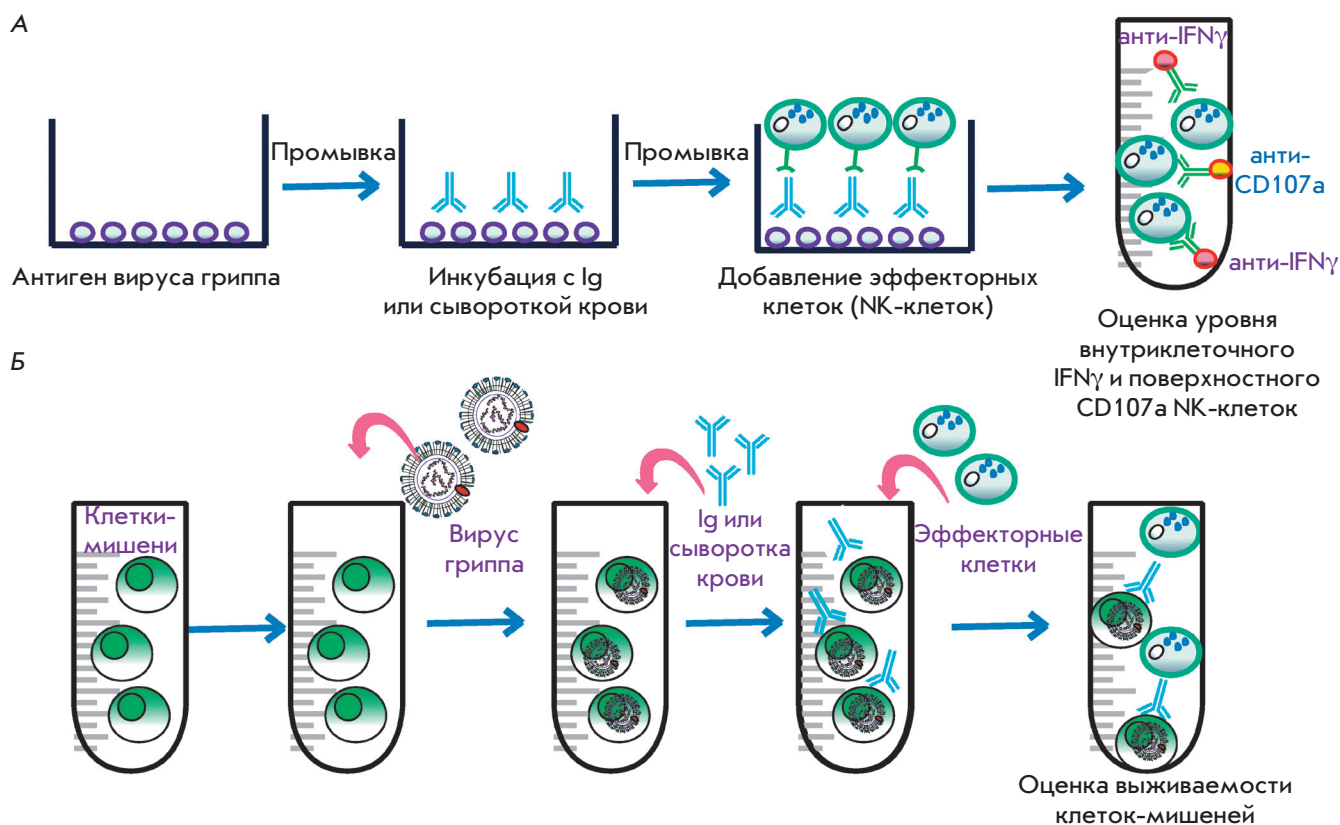
Сыворотки здоровых доноров, содержащие антитела против NP, индуцировали активацию NK-клеток, направленную против экспрессирующих NP вирус-инфицированных клеток [13, 26].

Другой консервативный белок вируса гриппа, обнаруживаемый на поверхности инфицированных клеток, это ионный канал M2. Антитела к этому белку способны в лабораторных экспериментах защищать мышей от вируса гриппа, причем при иммунизации животных эктодоменом ионного канала M2 как в растворимом виде, так и конъюгированных с различными носителями, протективность зависит главным образом от антител. Критически важным для защиты было присутствие NK-клеток [27]. Эксперименты по пассивной иммунизации мышей как дикого типа, так и с фенотипом FcRγ<sup>-/-</sup>, FcγRI<sup>-/-</sup>, FcγRIII<sup>-/-</sup> и (FcγRI, FcγRIII)<sup>-/-</sup> показали, что FcR (а именно FcγRIII) необходим для протективной активности анти-M2e-антител [28, 29]. Моноклональное антитело человека к белку M2 вируса гриппа (Ab1-10) было способно активировать NK-клетки и запускать АЗКЦ *in vitro*, причем АЗКЦ, направленную как на клетки-мишени, экспрессирующие M2, так и на клетки, зараженные вирусом гриппа [30].

Для детального определения уровня противогриппозных антител, участвующих в АЗКЦ, требуется постановка реакции с участием целевого антигена и эффекторных клеток (как правило, NK-клеток). В качестве антигена может выступать как рекомбинантный целевой белок, так и клетки, инфицированные вирусом гриппа, или клетки-мишени, экспрессирующие нужные антигены. Если в качестве антигена был выбран рекомбинантный белок, то его обрабатывают исследуемой сывороткой, а затем к полученному комплексу антиген-антитело добавляют эффекторные клетки. При таком способе постановки реакции судить о АЗКЦ можно по активации эффекторных клеток и экспрессии ими поверхностных и секретлируемых маркерных белков (как правило, это поверхностный маркер активации CD107a и интерферон-гамма) (рис. 3А) [31]. В случае использования в качестве антигенов инфицированных клеток или клеток-мишеней изучать АЗКЦ можно также путем оценки гибели обработанных антителами клеток-мишеней после взаимодействия с эффекторными клетками (рис. 3Б) [32].

### Антителозависимый фагоцитоз (АЗФ)

Фагоцитоз – это важнейший иммунологический процесс, при котором фагоциты поглощают микробные и инфицированные клетки. Первым шагом АЗФ является опсонизация микробной или инфицированной клетки антителами. После опсонизации фагоциты узнают связанные с чужеродными антигенами анти-

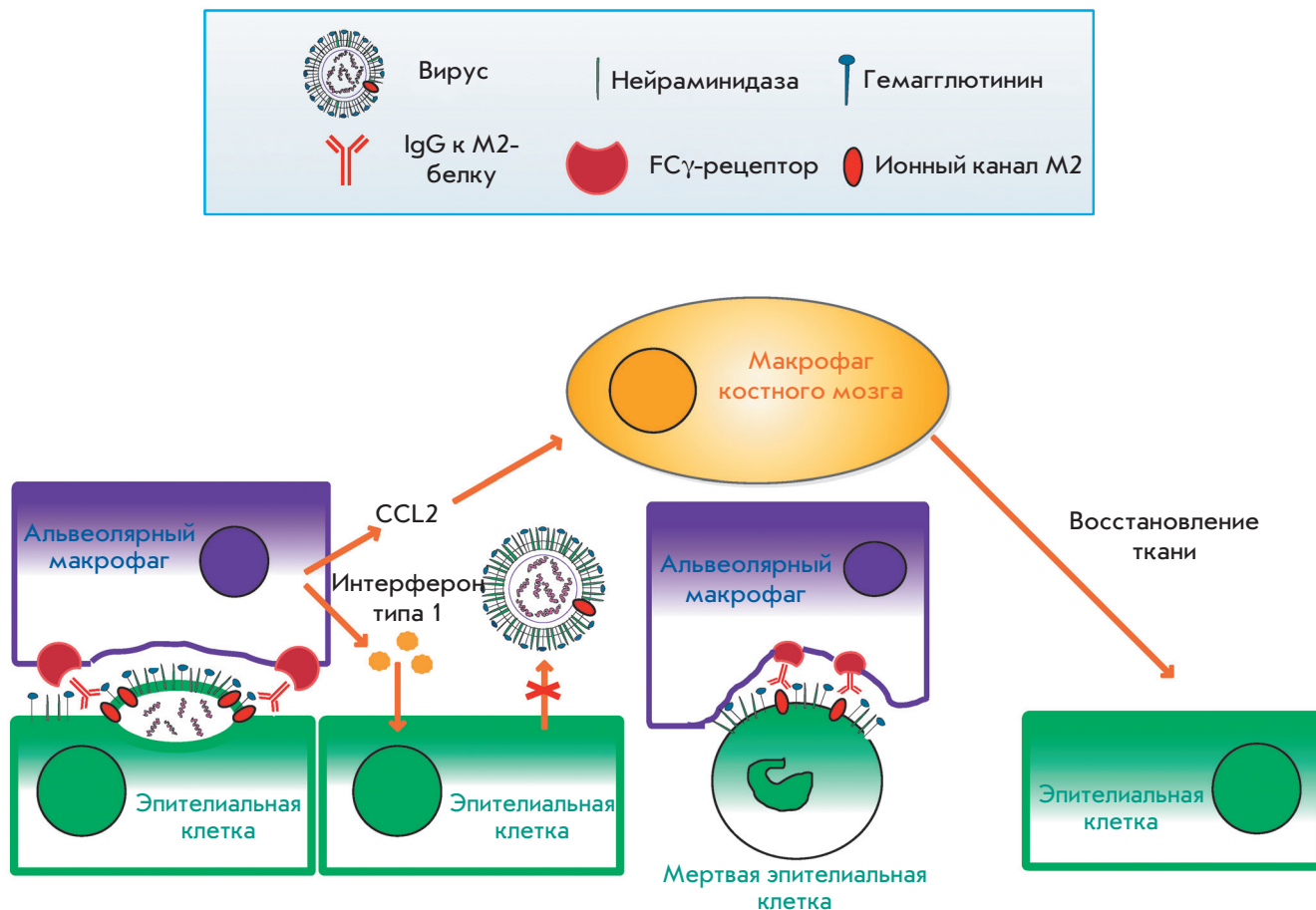


**Рис. 3.** Оценка АЗКЦ в лабораторных условиях. А – оценка АЗКЦ с помощью сорбированных на планшете антигенов вируса гриппа. Антигены сорбируются на планшете и после промывки инкубируются с сывороткой крови или с IgG, очищенными из крови. Несвязавшиеся IgG отмывают и к комплексу антиген–антитело добавляют эффекторные клетки (моноциты периферической крови или очищенные NK-клетки). АЗКЦ оценивают после отмывки по активации эффекторных клеток. Активацию определяют, добавляя меченые антитела к поверхностным и секретируемым маркерным белкам (как правило, это поверхностный маркер активации CD107a и интерферон-гамма). Б – оценка АЗКЦ с помощью инфицированных вирусом гриппа клеток или клеток-мишеней, экспрессирующих целевые антигены вируса. Клетки, экспрессирующие целевые антигены, инкубируют с сывороткой крови или с IgG. Затем к обработанным антителами клеткам добавляют эффекторные клетки и изучают АЗКЦ путем оценки гибели обработанных антителами клеток-мишеней

тела, главным образом с помощью Fc $\gamma$ -рецепторов CD32 (Fc $\gamma$ RIIA) и CD64 (Fc $\gamma$ RIA), и Fc $\alpha$ -рецептора CD89 [33]. Фагоциты, участвующие в АЗФ, включают в себя моноциты, макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки [17, 34] (рис. 4). АЗФ – один из важнейших индуцированных антителом эффекторных механизмов защиты от вируса гриппа. Показано, что мыши Fc $\gamma$ R $^{-/-}$  высокочувствительны к гриппу даже в присутствии противогриппозных антител, полученных от мышей Fc $\gamma$ R $^{+/+}$ . Причем отсутствие NK-клеток не было критичным для защиты. Показано также, что макрофаги мышей Fc $\gamma$ R $^{+/+}$  активно поглощали опсонизированные вирусные частицы [35]. Dunand и соавт. показали, что некоторые

нейтрализующие моноклональные антитела человека широкого спектра действия защищают мышей от гриппозной инфекции через Fc-опосредованное привлечение эффекторных клеток, при этом защита связана исключительно с АЗФ, а не с АЗКЦ или активацией системы комплемента [36].

Согласно He и соавт., альвеолярные макрофаги критичны для индукции АЗФ моноклональными антителами человека и мыши как *in vitro*, так и в экспериментах по защите животных от заражения гомологичными и гетерологичными вирусами гриппа А [37]. Интересно, что у «пожилых» мышей снижена способность альвеолярных макрофагов защищать легкие от повреждения при гриппозной инфекции [38].



**Рис. 4.** Механизм протективного действия антител к эктодомену ионного канала M2 вируса гриппа. Эпителиальные клетки дыхательных путей, инфицированные вирусом гриппа А, представляют HA, NA и M2-белок вируса гриппа на своей поверхности. От зараженных клеток отпочковываются новые вирусные частицы. M2 на поверхности отпочковывающегося вириона опсонизируется антителами к эктодомену M2, которые активируют альвеолярные макрофаги через Fcγ-рецепторы. Активированные макрофаги способны поглощать отпочковывающиеся вирионы и участки клеточной мембраны, содержащие белок M2. Гибнущие инфицированные клетки могут опсонизироваться антителами к эктодомену белка M2 и фагоцитироваться альвеолярными макрофагами через FcγR-зависимый путь. Активированные макрофаги продуцируют интерфероны типа I, обладающие антивирусной активностью и способные регулировать экспрессию хемокина CCL2, привлекающего макрофаги костного мозга, способствующие восстановлению тканей

В АЗФ-опосредованную защиту против вируса гриппа помимо альвеолярных макрофагов могут включаться другие популяции эффекторных клеток. Так нейтрофилы, которые являются самыми многочисленными лейкоцитами крови, после активации экспрессируют на своей поверхности высокие уровни FcγRIa/b/c, FcγRIIa и FcγRIIIb. Кроме того, нейтрофилы конститутивно экспрессируют FcαRI, который связывает IgA и активирует цитотоксические и фагоцитарные ответы [15]. Анализ Fc-FcγR-взаимодействий между различными IgG, специфичными к стеблю HA, и эффекторными нейтрофилами показал, что моноклональные антитела человека

и мыши к стеблю HA способны индуцировать продукцию нейтрофилами активных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS), которые клетка выбрасывает в фаголизосому. При этом подобный эффект не удалось обнаружить в случае антител к глобулярному домену HA [39]. Истощение нейтрофилов приводило к снижению выживаемости мышей при гриппозной инфекции [40, 41].

Изучение механизма АЗФ во время гриппозной инфекции показало, что как макрофаги, так и нейтрофилы быстро привлекаются в легкие и присутствуют в бронхоальвеолярном лаваже, дыхательных путях и альвеолах, где способствуют быстрой

очистке от инфицированных и мертвых клеток. Хотя супернатант инфицированных вирусом гриппа клеток может стимулировать фагоцитоз моноцитами независимо от вовлечения антител [40], антитела способствуют ускоренному выведению вирусных частиц и инфицированных клеток благодаря взаимодействию с FcγRIa и FcγRIIa на иммунных клетках. Опосредованный антителами вирусный фагоцитоз приводит к уменьшению распространения и тяжести инфекции, уменьшению симптомов и снижению выделения вируса [42]. Предполагается, что каждая последующая гриппозная инфекция, а также противогриппозные вакцинации приводят к индукции небольших уровней перекрестных антител, участвующих в АЗФ, и их уровни возрастают с каждой последующей гриппозной инфекцией [17].

Способностью индуцировать АЗФ обладают различные противогриппозные антитела, в том числе антитела к стеблю гемагглютинаина [36, 37, 39] и антитела к ионному каналу М2 [28, 43].

Для изучения активности антител, отвечающих за АЗФ, обычно оценивают поглощение фагоцитирующими клетками клеток-мишеней, экспрессирующих гриппозные антигены и меченных каким-либо красителем, после обработки последних целевыми антителами [35].

#### **Опосредованная антителом комплементзависимая цитотоксичность (АОКЗЦ)**

Система комплемента состоит из растворимых и мембраносвязанных белков, которые встречаются в крови и тканях млекопитающих. Эти белки взаимодействуют друг с другом и с другими компонентами иммунной системы, в результате чего образуется ряд эффекторных белков, способствующих элиминации различных патогенов [27].

Еще в 1978 году было показано, что система комплемента необходима для защиты мышей от летальной гриппозной инфекции [44]. В 1983 году установлено, что сыворотка крови человека содержит антитела, способные нейтрализовать вирус гриппа путем активации классического пути комплемента [45]. В настоящее время известно, что вирионы вируса гриппа активируют как классический, так и альтернативный пути комплемента, при этом для эффективного лизиса вирионов требуется опсонизация антителами [46].

В 2018 году была проведена работа по изучению эффективности иммунизации мышей с нокаутом С3-компонента комплемента вирусоподобными частицами, несущими белки М2е вирусов гриппа А человека, свиней и птиц, а также вирусоподобными частицами, несущими НА вируса гриппа А подтипа Н5. Оказалось, что иммунизация М2е-вакциной не за-

щищала мышей с нокаутом С3 от вирусов гриппа А, хотя даже низкие уровни антител к белку М2е обеспечивали защиту животных дикого типа от заражения вирусами гриппа А при пассивном переносе. Напротив, мыши с нокаутом С3, иммунизированные НА-вакциной, индуцирующей образование штаммоспецифичных нейтрализующих антител, были защищены от заражения гомологичным вирусом гриппа, несмотря на низкий уровень антительного ответа [47]. Таким образом, можно говорить о способности антител к ионному каналу М2 вируса гриппа защищать от вируса гриппа А путем активации системы комплемента.

Система комплемента способна не только нейтрализовать вирусные частицы, но также участвует в лизисе инфицированных клеток. Так, вакцинация сезонной трехвалентной инактивированной противогриппозной вакциной приводила к увеличению уровня антител, способных активировать комплементзависимый лизис инфицированных гриппом клеток *in vitro*, хотя эффект и не был ярко выраженным [48]. Индуцирующие АОКЗЦ антитела обнаружены как среди антител к глобулярному домену НА вируса гриппа, так и среди антител к стволочному домену. Но при этом антитела к стволочному домену показали широту спектра действия и были способны индуцировать АОКЗЦ против различных штаммов вируса гриппа А [49].

Показано, что в активации системы комплемента участвуют антитела классов IgG1 и IgM [46]. Уровни антител, участвующих в АОКЗЦ, коррелировали с защитой от сезонного вируса гриппа у детей [32].

Активность антител в АОКЗЦ оценивают на клетках-мишенях, экспрессирующих целевой антиген или зараженных вирусом гриппа с помощью растворов, содержащих комплемент. Гибель клеток оценивают с помощью различных метаболических красителей [50].

#### **АНТИТЕЛА К ГЕМАГГЛЮТИНИНУ И НЕЙРАМИНИДАЗЕ ВИРУСА ГРИППА**

НА и NA вируса гриппа являются высоковариабельными белками. Однако разрабатываемые на сегодняшний момент вакцины широкого спектра действия могут включать также НА и/или NA и их эпитопы. Так стебель НА является достаточно консервативной частью молекулы. Существуют различные стратегии перенаправления иммунного ответа при вакцинации именно на этот антиген [51]. Большинство НА-специфических моноклональных антител, полученных из сывороток людей, перенесших инфекцию, связываются с различными штаммами вирусов гриппа, что позволяет надеяться на создание вакцин широкого спектра действия на основе этого антигена [52].



### Антитела к стеблю HA вируса гриппа

Стебель HA более консервативен, чем глобулярный домен, однако при этом он менее иммуногенен, возможно из-за того, что громоздкая глобулярная часть белка стерически препятствует доступу антител к стеблю HA. Однако, кроме ненейтрализующих антител, участвующих в реакциях АЗКЦ, АЗФ и АОКЗЦ, у людей после гриппозной инфекции или вакцинации выявляется некоторое количество нейтрализующих антител к стеблю HA, причем инфекция более эффективно, чем вакцинация, индуцирует образование антител этого типа.

Антитела против стебля HA могут препятствовать слиянию вируса с эндосомальной мембраной. Для эффективного слияния необходимо присутствие 3–5 соседних HA со связавшимися с эндосомальной мембраной пептидами слияния (рис. 1, в). Нейтрализующие антитела к стеблю HA способны предотвратить рН-индуцированное экспонирование пептида слияния и предотвратить формирование сети HA, взаимодействующих с эндосомальной мембраной. Кроме того, некоторые антитела к стеблю HA способны ингибировать разрезание незрелого предшественника HA0 на субъединицы HA1 и HA2 (рис. 1, д), которые необходимы для успешного инфицирования клеток новой вирусной частицей [4]. Также антитела к стволочному домену HA способны подавлять выход вирусных частиц из клетки (рис. 1, г) [53], в том числе за счет стерического ингибирования активности нейраминидазы [54].

Нейтрализующие антитела к стеблю HA невозможно определить с помощью реакции гемагглютинации. Основными способами оценки подобных антител являются реакции нейтрализации [5], микронейтрализации [6] и нейтрализации на основе псевдотипированных вирусных векторов [55]. Последние представляют собой химерные вирусы, несущие поверхностные антигены вирусов гриппа, которые не содержат генетический материал и не обладают инфекционностью. Такие псевдовirusы, как правило, получают на основе лентивирусных векторов и вируса везикулярного стоматита. Они позволяют при постановке реакции нейтрализации отказать от работы с высокопатогенными вирусами гриппа (что особенно важно при изучении антител широкого спектра действия). По некоторым данным такой способ оценки более чувствителен и больше подходит для выявления нейтрализующих антител к стеблю HA, чем классическая реакция нейтрализации [55].

### Антитела к нейраминидазе вируса гриппа

Нейраминидаза вируса гриппа участвует в различных стадиях инфекционного процесса. Она отреза-

ет вирусную частицу от сиаловых кислот муцинов дыхательных путей, позволяя вирусу проникнуть в клетку. NA позволяет отпочковываться новым вирионам, не давая им оставаться связанными с сиаловыми кислотами на поверхности клетки. Кроме того, NA предотвращает агрегацию вирионов, связанную с взаимодействием HA одного вириона с сиалированными гликанами другого [56]. Антитела к NA вируса гриппа могут препятствовать любому из этих процессов (рис. 1, а,г).

Показано, что в отсутствие антител к NA, антитела к NA способны обеспечить защиту лабораторных животных от заражения вирусом гриппа [57]. Более того, присутствие антител к NA также коррелирует с защитой людей от гриппозной инфекции. Показано, что титры анти-NA-антител увеличиваются в крови человека с возрастом [56].

Появление антител к нейраминидазе индуцируется гриппозной инфекцией, хотя обычно их уровень ниже, чем антител к HA. Важно, что большинство NA-специфических моноклональных антител, полученных из сывороток индивидов, перенесших инфекцию, связываются с широким спектром современных и исторических штаммов вирусов гриппа, ингибируют NA-активность и обеспечивают защиту лабораторных мышей в экспериментах с пассивным переносом [52]. Возможны несколько стратегий создания вакцин широкого спектра действия, индуцирующих образование антител к NA вируса гриппа. Одна из них – создание пандемичной вакцины на основе коктейля из NA нескольких подтипов (N1, N2, N6, N7, N8, N9 и др.), ассоциированных с человеческими и зоонозными штаммами вируса гриппа. Возможно также включение NA как дополнительного антигена в вакцины на основе консервативных антигенов вируса гриппа – M2, NP и др. [58].

ИФА – это один из наиболее простых способов оценить иммунный ответ на NA. Для достоверной оценки уровня антител к NA в качестве антигена нужно использовать рекомбинантную, тетрамерную, гликозилированную и ферментативно активную NA. При этом ИФА не дает никакой информации о функциональности измеренного уровня антител. Тесты на ингибирование ферментативной активности NA основаны на разрезании нейраминидазой маленьких молекул, что приводит к появлению измеряемого сигнала. Однако, в отличие от концевых сиаловых кислот, которые прикреплены к гликанам на крупных белках, эти малые молекулы более легко поступают в активный центр NA [59]. Анализ, который позволяет получить наиболее реалистичные оценки анти-NA-активности антител, – ELLA (enzyme-linked lectin assay) – лектин-ферментный анализ, где в качестве субстрата используют высоко-

сиалированный гликопротеин фетуин. Метод основан на измерении количества галактозы, предпоследнего остатка сахара в составе фетуина, связанного с подложкой. NA отщепляет концевые сиаловые кислоты, после чего галактоза становится доступной для анализа с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена лектина арахиса. ELLA был оптимизирован для рутинной серологии, он используется в современных исследованиях для измерения титров антител, ингибирующих нейраминидазу [58].

Ключевым компонентом ELLA является ферментативно активная NA, ингибирование которой и будет оцениваться. NA может находиться в форме очищенного белка или в составе вирусной частицы. При этом при использовании вирусной частицы необходимо помнить, что антитела, связывающиеся с NA, могут снижать активность NA из-за стерических помех. Поэтому в этом анализе обычно используют реассортантные вирусы подтипов H6NX или H7NX. Несмотря на то что использование реассортантных вирусов не может полностью исключить влияния антител к NA на активность NA, такой анализ признан золотым стандартом для измерения ингибирующей NA-активности антител [59].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом обзоре рассмотрены основные механизмы работы противогриппозных антител и способы их обнаружения. Антитела могут обеспечивать защиту от гриппа через Fc-независимый или Fc-зависимый механизмы. Fc-независимые антитела непосредственно нейтрализуют вирус, препятствуя его про-

никновению в клетку, слиянию или отпочковыванию от нее. В прямой нейтрализации вируса гриппа в основном участвуют антитела к глобулярному домену гемагглютинаина [5], которые, как правило, штаммоспецифичны. Fc-зависимые антитела обычно не являются нейтрализующими, но способны активировать антителозависимую клеточную цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз или систему комплемента [18, 34, 49]. Такие антитела могут быть направлены к стволочному домену NA, белкам NA, M2 или NP вируса гриппа, и большинство из них это антитела широкого спектра действия [11, 21, 28, 58].

Разрабатываемые в настоящее время противогриппозные вакцины призваны формировать иммунный ответ не столько на «классические» антигены вируса гриппа NA и NA, сколько на различные консервативные вирусные антигены. При создании вакцин широкого спектра действия необходимо знать, какие критерии эффективности нужно учитывать при проведении доклинических и клинических испытаний. Привычные способы оценки гуморального иммунного ответа на противогриппозные вакцины с помощью реакций гемагглютинации и нейтрализации уже не будут актуальными для многих новых вакцин. Разработка методов оценки ненейтрализующих противогриппозных антител и изучение механизмов их действия необходимы для создания эффективных вакцин широкого спектра действия, способных обеспечить защиту как от сезонных, так и от потенциально пандемических штаммов вируса гриппа. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paules C., Subbarao K. // *Lancet*. 2017. V. 390. P. 697–708.
2. Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Мигунов А.И., Смирнов Ю.А., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Цыбалова Л.М., Народицкий Б.С., Киселев О.И., Гинцбург А.Л. // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 4(15). С. 17–27.
3. Krammer F. // *Nat. Rev. Immunol.* 2019. V. 19. № 6. P. 383–397.
4. Щербинин Д.Н., Алексеева С.В., Шмаров М.М., Смирнов Ю.А., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // *Acta Naturae*. 2016. V. 8. № 1(28). С. 14–22.
5. Truelove S., Zhu H., Lessler J., Riley S., Read J.M., Wang S., Kwok K.O., Guan Y., Jiang C.Q., Cummings D.A. // *Influenza Other Respi. Viruses*. 2016. V. 10. P. 518–524.
6. Kitikoon P., Vincent A.L. // *Meth. Mol. Biol.* 2014. V. 1161. P. 325–335.
7. Brandenburg B., Koudstaal W., Goudsmit J., Klaren V., Tang Ch., Bujny M.V., Korse H.J., Kwaks T., Otterstrom J.J., Juraszek J. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 12. P. e80034.
8. Lu L.L., Suscovich T.J., Fortune S.M., Alter G. // *Nat. Rev. Immunol.* 2018. Т. 18. P. 46–61.
9. Bruhns P., Jönsson F. // *Immunol. Rev.* 2015. V. 268. № 1. P. 25–51.
10. Vandervan H.A., Jegaskanda S., Wheatley A.K., Kent S.J. // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 22. P. 89–96.
11. DiLillo D.J., Tan G.S., Palese P., Ravetch J.V. // *Nat. Med.* 2014. V. 20. P. 143–151.
12. Jegaskanda S., Weinfurter J.T., Friedrich T.C., Kent S.J. // *J. Virol.* 2013. V. 87. P. 5512–5522.
13. Jegaskanda S., Luke C., Hickman H.D., Sangster M.Y., Wieland-Alter W.F., McBride J.M., Yewdell J.W., Wright P.F., Treanor J., Rosenberger C.M., et al. // *J. Infect. Dis.* 2016. V. 214. P. 945–952.
14. Jegaskanda S., Laurie K.L., Amarasena T.H., Winnall W.R., Kramski M., De Rose R., Barr I.G., Brooks A.G., Reading P.C., Kent S.J. // *J. Infect. Dis.* 2013. V. 208. P. 1051–1061.
15. Boudreau C.M., Alter G. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 440.
16. DiLillo D.J., Palese P., Wilson P.C., Ravetch J.V. // *J. Clin. Invest.* 2016. V. 126. P. 605–610.
17. Sicca F., Neppelenbroek S., Huckriede A. // *Expert. Rev. Vaccines*. 2018. V. 17. № 9. P. 785–795.
18. Jegaskanda S., Reading P.C., Kent S.J. // *J. Immunol.* 2014. V. 193. № 2. P. 469–475.
19. Virelizier J.L., Allison A.C., Oxford J.S., Schild G.C. // *Nature*. 1977. V. 266. P. 52–54.
20. Yewdell J.W., Frank E., Gerhard W. // *J. Immunol.* 1981. V. 126. P. 1814–1819.
21. Bodewes R., Geelhoed-Mieras M.M., Wrammert J., Ahmed R., Wilson P.C., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan

- G.F. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. V. 20. P. 1333–1337.
22. Carragher D.M., Kaminski D.A., Moquin A., Hartson L., Randall T.D. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. P. 4168–4176.
23. LaMere M.W., Lam H.T., Moquin A., Haynes L., Lund F.E., Randall T.D., Kaminski D.A. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 7. P. 4331–4339.
24. Jegaskanda S., Amarasena T.H., Laurie K.L., Tan H.X., Butler J., Parsons M.S., Alcantara S., Petravic J., Davenport M.P., Hurt A.C., et al. // *J. Virol.* 2013. V. 87. P. 13706–13718.
25. Jegaskanda S., Co M.D.T., Cruz J., Subbarao K., Ennis F.A., Terajima M. // *J. Infect. Dis.* 2017. V. 215. № 5. P. 818–823.
26. Vanderven H.A., Ana-Sosa-Batiz F., Jegaskanda S., Rockman S., Laurie K., Barr I., Chen W., Wines B., Hogarth P.M., Lambe T., et al. // *EBioMedicine.* 2016. V. 8. P. 277–290.
27. Jegerlehner A., Schmitz N., Storni T., Bachmann M.F. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 9. P. 5598–5605.
28. El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A., van Rooijen N., Verbeek S., Fiers W., Saelens X., et al. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 2. P. 1022–1031.
29. Lee Y.N., Lee Y.T., Kim M.C., Hwang H.S., Lee J.S., Kim K.H., Kang S.M. // *Immunology.* 2014. V. 143. № 2. P. 300–309.
30. Simhadri V.R., Dimitrova M., Mariano J.L., Zenarruzabeitia O., Zhong W., Ozawa T., Muraguchi A., Kishi H., Eichelberger M.C., Borrego F. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. 1–13.
31. Jegaskanda S., Job E.R., Kramski M., Laurie K., Isitman G., de Rose R., Winnall W.R., Stratov I., Brooks A.G., Reading P.C., et al. // *J. Immunol.* 2013. V. 190. № 4. P. 1837–1848.
32. Co M.D., Terajima M., Thomas S.J., Jarman R.G., Rungrojancharoenkit K., Fernandez S., Yoon I.K., Buddhari D., Cruz J., Ennis F.A. // *Viral Immunol.* 2014. V. 8. P. 375–382.
33. García-García E., Rosales C. // *J. Leukoc. Biol.* 2002. V. 72. P. 1092–1108.
34. Freeman S.A., Grinstein S. // *Immunol. Rev.* 2014. V. 262. P. 193–215.
35. Huber V.C., Lynch J.M., Bucher D.J., Le J., Metzger D.W. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 7381–7388.
36. Henry Dunand C.J., Leon P.E., Huang M., Choi A., Chromikova V., Ho I.Y., Tan G.S., Cruz J., Hirsh A., Zheng N.Y., et al. // *Cell Host Microbe.* 2016. V. 19. № 6. P. 800–813.
37. He W., Chen C., Mullarkey C., Hamilton J.R., Wong C.K., Leon P.E., Uccellini M.B., Chromikova V., Henry C., Hoffman K.W., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 846.
38. Wong C.K., Smith C.A., Sakamoto K., Kaminski N., Koff J.L., Goldstein D.R. // *J. Immunol.* 2017. V. 199. № 3. P. 1060–1068.
39. Mullarkey C.E., Bailey M.J., Golubeva D.A., Tan G.S., Nachbagauer R., He W., Novakowski K.E., Bowdish D.M., Miller M.S., Palese P. // *MBio.* 2016. V. 7. № 5. P. e01624–1616.
40. Hashimoto Y., Moki T., Takizawa T., Shiratsuchi A., Nakaniishi Y. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. № 4. P. 2448–2457.
41. Fujisawa H. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 6. P. 2772–2783.
42. Ana-Sosa-Batiz F., Vanderven H., Jegaskanda S., Johnston A., Rockman S., Laurie K., Barr I., Reading P., Lichtfuss M., Kent S.J. // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. 1–18.
43. Saelens X. // *J. Infect. Dis.* 2019. V. 219. (Supplement\_1). P. S68–S74.
44. Hicks J.T., Ennis F.A., Kim E., Verbonitz M. // *J. Immunol.* 1978. V. 121. № 4. P. 1437–1445.
45. Beebe D.P., Schreiber R.D., Cooper N.R. // *J. Immunol.* 1983. V. 130. № 3. P. 1317–1322.
46. Rattan A., Pawar S.D., Nawadkar R., Kulkarni N., Lal G., Mullick J., Sahu A. // *PLoS Pathog.* 2017. V. 13. № 3. P. e1006248.
47. Kim Y.J., Kim K.H., Ko E.J., Kim M.C., Lee Y.N., Jung Y.J., Lee Y.T., Kwon Y.M., Song J.M., Kang S.M. // *J. Virol.* 2018. V. 92. № 20. P. e00969–18.
48. Co M.D., Cruz J., Takeda A., Ennis F.A., Terajima M. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2012. V. 8. № 9. P. 1218–1222.
49. Terajima M., Cruz J., Co M.D., Lee J.H., Kaur K., Wrammert J., Wilson P.C. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 24. P. 13463–13467.
50. Тутер Е.А., Порошин Г.Н., Драницына М.А., Васильев А.Н., Ниязов Р.Р. // *Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской техники.* 2016. Т. 6. С. 37–42.
51. Krammer F. // *Expert Rev. Vaccines.* 2017. V. 16. № 5. P. 503–513.
52. Chen Y.Q., Wohlbold T.J., Zheng N.Y., Huang M., Huang Y., Neu K.E., Lee J., Wan H., Rojas K.T., Kirkpatrick E., et al. // *Cells.* 2018. V. 173. № 2. P. 417–429.
53. Tan G.S., Lee P.S., Hoffman R.M.B., Mazel-Sanchez B., Krammer F., Leon P.E., Ward A.B., Wilson I.A., Palese P. // *J. Virol.* 2014. V. 88. P. 13580–13592.
54. Kosik I., Angeletti D., Gibbs J.S., Angel M., Takeda K., Kosikova M., Nair V., Hickman H.D., Xie H., Brooke C.B., et al. // *J. Exp. Med.* 2019. V. 216. № 2. P. 304–316.
55. Carnell G.W., Ferrara F., Grehan K., Thompson C.P., Temperton N.J. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. № 161.
56. Rajendran M., Nachbagauer R., Ermler M.E., Bunduc P., Amanat F., Izikson R., Cox M., Palese P., Eichelberger M., Krammer F. // *MBio.* 2017. V. 8. P. 1–12.
57. Marcelin G., Sandbulte M.R., Webby R.J. // *Rev. Med. Virol.* 2012. V. 22. № 4. P. 267–279.
58. Eichelberger M.C., Monto A.S. // *J. Infect. Dis.* 2019. V. 219. (Supplement\_1). P. S75–S80.
59. Krammer F., Fouchier R.A.M., Eichelberger M.C., Webby R.J., Shaw-Saliba K., Wan H., Compans R.W., Skountzou I., Monto A.S. // *MBio.* 2018. V. 9. № 2. P. e02332–17.