

УДК 578

Введение rAAV, кодирующих широко нейтрализующие антитела, обеспечивает защиту мышей при заражении летальной дозой вируса гриппа H3N2 и нейтрализацию штаммов подтипов H1 и H3

Р. Р. Минтаев*, Ф. А. Урусов, А. В. Соловьев, Б. В. Белугин, Д. В. Глазкова, Г. А. Шипулин, Е. В. Богословская

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119121 Россия

*E-mail: ramil.mintaev@fbb.msu.ru

Поступила в редакцию 09.08.2025

Принята к печати 18.09.2025

DOI: 10.32607/actanaturae.27774

РЕФЕРАТ Вирус гриппа вызывает сезонные эпидемии во всем мире. Вместе с тем, быстрая эволюция вируса делает применение сезонных вакцин недостаточно эффективным. Одним из подходов к решению проблемы профилактики гриппа может быть использование моноклональных антител, активных в отношении широкого спектра штаммов вируса гриппа. В представленной работе определяли вируснейтрализующую активность моноклональных антител CR9114, MHAА4549A, MEDI8852, C585 и 1G01 против вируса гриппа. С этой целью использовали рекомбинантные векторы на основе аденоассоциированного вируса (rAAV), кодирующие эти антитела. rAAV-векторы экспрессировали в мышах *in vivo* и определяли вируснейтрализующую активность сывороток по отношению к штаммам H1N1 и H3N2 вируса гриппа. Введение rAAV-C585, rAAV-MHAА4549A и rAAV-1G01 обеспечивало 100% защиту мышей, зараженных летальной дозой вируса гриппа H3N2. Эффективность rAAV-CR9114 и rAAV-MEDI8852 против данного штамма вируса гриппа оказалась ниже – 80 и 75% соответственно.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА rAAV, моноклональные антитела, CR9114, MHAА4549A, MEDI8852, C585, 1G01, грипп.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп остается серьезной проблемой глобального здравоохранения. Ежегодно в мире фиксируется 3–5 млн тяжелых и до 650 000 смертельных случаев этого заболевания, из которых до 100 000 это дети младше 5 лет [1]. Вирус гриппа характеризуется быстрой эволюцией, что снижает эффективность применения сезонных вакцин [2], поэтому сохраняется острая потребность в разработке новых подходов к профилактике и лечению гриппа.

Одним из таких подходов является использование моноклональных антител, которые обладают активностью в отношении широкого спектра штаммов вируса гриппа. Противовирусное действие антител обусловлено их способностью нейтрализовать вирусные частицы, а также такими эффекторными

функциями, как антителозависимая цитотоксичность и антителозависимая активация комплемента (ADCC – antibody-dependent cellular cytotoxicity, CDC – complement-dependent cytotoxicity) [3, 4]. Пассивная иммунизация моноклональными антителами рассматривается как перспективный способ лечения инфекционных заболеваний [5–7]. Использование моноклональных антител особенно актуально в тех случаях, когда необходимо максимально быстро подавить развитие инфекционного процесса и предотвратить развитие осложнений. Пассивная иммунизация моноклональными антителами хорошо зарекомендовала себя при тяжелом COVID-19 [8, 9]. В то же время результаты клинических исследований по оценке широко нейтрализующих антител против вируса гриппа либо

не продемонстрировали различий между экспериментальными и контрольными группами пациентов, либо такие различия имели минорный характер [10–12].

Вместе с тем моноклональные антитела против вируса гриппа могут оказаться эффективными при профилактическом использовании, если поддерживать их присутствие в организме длительное время. Долговременную персистенцию желаемых антител может обеспечить их доставка с помощью векторов на основе рекомбинантного аденоассоциированного вируса (rAAV), которые несут гены, кодирующие антитела. На сегодняшний день разработаны rAAV, кодирующие моноклональные антитела против вируса Эбола [13, 14], ВИЧ-1 [15, 16], а также против вируса гриппа [17, 18].

Описано большое количество антител против вируса гриппа (см. обзор [5]). Это позволяет создавать rAAV, кодирующие антитела, и отбирать наиболее перспективные варианты. Основываясь на данных о широте действия и эффективности, мы выбрали четыре антитела – CR9114, МНAA4549А, MEDI8852 и С585, направленные на гемагглютинин (НА), и одно антитело – 1G01 – на нейраминидазу (НА) [19–23].

Антитела CR9114, МНAA4549А и MEDI8852 нацелены на консервативную стволовую часть НА. Согласно [19], CR9114 связывается с НА вирусов гриппа групп 1 и 2, однако нейтрализует вирусы группы 2 существенно слабее. В отличие от CR9114, антитела МНAA4549А и MEDI8852 имеют более широкую активность в пределах обеих групп вирусов [20, 24].

Обычно антитела против головной части НА хорошо нейтрализуют вирус, но при этом широта их действия ограничена вследствие высокой изменчивости указанной области. Тем не менее, Qi и соавт. [22] обнаружили антитело С585, нацеленное на головную часть НА, нейтрализующее широкий спектр вирусов, относящихся к серологической группе Н3. Несмотря на то что активность С585 ограничена пределами подтипа Н3, это антитело представляет интерес, поскольку с высокой эффективностью связывается с НА и нейтрализует большое число штаммов Н3N2, циркулировавших в период 1968–2016 гг. [22].

Последнее из выбранных нами антител – 1G01, направлено на нейраминидазу вируса гриппа. В работе Stadlbauer и соавт. [23] показано, что это антитело защищает от чрезвычайно широкого спектра штаммов вируса гриппа А и В, действуя против всех подтипов вируса (N1–N9, NB).

Целью настоящей работы было изучение принципиальной возможности использования векторных

препаратов на основе rAAV серотипа 9, кодирующих моноклональные антитела CR9114, МНAA4549А, MEDI8852, С585 и 1G01, для защиты от гриппа на модели летальной гриппозной инфекции у мышей.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клонирование плазмидных векторов для получения rAAV

Аминокислотные последовательности антител CR9114, МНAA4549А, MEDI8852, С585, 1G01 и COV2-2196 (в качестве отрицательного контроля) были конвертированы в нуклеотидные последовательности с оптимизацией кодонов для экспрессии в клетках человека (табл. S1) в программе SnapGene (GSL Biotech LLC, <http://www.snapgene.com/products/snapgene/>). Затем для снижения потенциальной иммуногенности трансгенов, вызываемой взаимодействием Toll-подобного рецептора 9 с CpG-динуклеотидами чужеродной ДНК, была проведена замена кодонов, пересекающихся с CpG, на синонимичные. Полученные нуклеотидные последовательности клонировали в плазмидный вектор, структура которого описана в работе Shipulin и соавт. [25]

Получение rAAV

rAAV серотипа 9 получали в клетках HEK293FT (Invitrogen, США). Клетки HEK293FT трансфицировали векторной плазмидой совместно с плазмидами rAAV-Helper и rAAV-RC-9 (Cell Biolabs, США). Векторные частицы очищали методом ультрацентрифугирования в градиенте иодиксанола. Титр rAAV9 определяли методом капельной цифровой ПЦР. Детально процедура получения, очистки и определения количества rAAV описана в работе Shipulin и соавт. [25].

Иммуноферментный анализ (ИФА)

Концентрации IgG человека в сыворотках определяли с помощью ИФА-набора Human IgG ELISA Antibody Pair Kit (STEMCELL, Канада) по протоколу производителя. Все анализируемые сыворотки были предварительно инактивированы при 56°C в течение 30 мин.

Вирусы гриппа

Для оценки противовирусной активности векторов, кодирующих антитела, использовали штаммы вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) и А/Аичи/2/1968 (H3N2), полученные из ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины».

Для наработки, определения титра вирусов и оценки нейтрализующей активности антител использовали клеточную культуру MDCK.STAT1 KO (CCL-34-VHG, ATCC, США). Клетки культивировали в полной среде DMEM (Gibco, США) с 10% FBS (Gibco). Инкубацию проводили при 37°C и 5% атм. CO₂. Для наработки вирусов клетки культивировали до достижения монослоем 90% конfluence, проводили замену полной среды на DMEM с 0.0002% трипсином («ПанЭко», Россия), после чего добавляли суспензию вируса (100 × TCID₅₀). Клетки инкубировали в течение 4 сут до полного разрушения монослоя, после чего культуральную среду фильтровали через 0.45-мкм фильтр (TPP, Швейцария) и концентрировали в 100 раз с помощью центрифужного концентратора Amicon Ultra-15, 100 кДа (Millipore, Германия). Аликвоты вирусного концентрата хранили при температуре -80°C.

ТЦД₅₀ вирусов гриппа определяли стандартным методом, описанным ранее (вспомогательный протокол 4) [26]. Титр вирусов оценивали по визуальное фиксируемому разрушению монослоя клеток (ЦПД). Значения титра вируса рассчитывали по методике Рида и Мюнча [27].

Экспериментальные животные

В работе использовали самок мышей C57BL/6 (возраст 6 недель, масса тела от 16 до 18 г), полученных из питомника «Столбовая», филиал ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА».

Адаптация вируса гриппа А/Аичи/2/1968 и определение МЛД₅₀

Адаптацию вируса А/Аичи/2/1968 к заражению мышью C57BL/6 проводили по описанной ранее методике (базовый протокол 2) [26]. Для определения МЛД₅₀ вируса были сформированы пять групп животных по шесть особей в каждой, которых подвергли интраназальному заражению вирусом в разведениях 10⁰, 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ и 10⁻⁵ (вспомогательный протокол 5) [26]. Через 17 дней оценивали количество выживших животных в каждой группе и проводили расчет МЛД₅₀ по методике Рида и Мюнча [27].

Пассивная иммунизация и определение протективной активности AAV-конструкций

Для исследования протективной активности AAV-конструкций *in vivo* были сформированы шесть экспериментальных групп по 10 мышей в каждой. Животные во всех группах получали внутримышечные инъекции соответствующих rAAV

в дозе 2×10¹¹ векторных геномов (в.г.) на мышью в объеме 100 мкл. Пять групп получили rAAV, кодирующие антитела против вируса гриппа (группы 1–5). Шестая группа получила rAAV, кодирующий антитело COV2-2196 против SARS-CoV-2, и служила отрицательным контролем. Контрольная группа, численностью 22 особи, инъекций rAAV не получала. Через 90 дней после введения rAAV животных заражали адаптированным вирусом А/Аичи/2/68 (H3N2) путем интраназального введения 30 мкл вирусной суспензии в количестве 5 МЛД₅₀. Далее ежедневно в течение 14 дней подсчитывали число выживших животных в каждой группе и определяли массу их тела.

Реакция нейтрализации вируса гриппа

Реакцию нейтрализации проводили в соответствии с протоколом, описанным ранее (вспомогательный протокол 11) [26]. Делали последовательные двукратные разведения сывороток (от 1/10 до 1/160) в полной среде DMEM в 96-луночной планшете. Полученные разведения смешивали с вирусами гриппа в дозах 25 или 8 TCID₅₀ в конечном объеме 100 мкл. Спустя 1 ч в каждую лунку добавляли 2.5×10⁴ клеток MDCK.STAT1 KO в объеме 100 мкл. Через 24 ч полную среду заменяли средой DMEM с 0.0002% трипсина. Спустя 72 ч оценивали присутствие ЦПД вируса гриппа в каждой экспериментальной точке. Расчет IC₅₀ проводили по методике Рида и Мюнча [27].

Статистический анализ данных

Различия в выживаемости между экспериментальными группами оценивали по критерию Мантела–Кокса (*p*-value < 0.05). Различия в титре антител IgG в крови мышью оценивали с использованием теста Краскела–Уоллиса с последующими множественными сравнениями между группами с помощью теста Данна и поправкой на множественное сравнение по методу Бонферрони. *P*-value < 0.01 считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Оценка экспрессии антител *in vivo*

В исследовании использовали плазмидные векторы rAAV-CR9114, rAAV-MHAA4549A, rAAV-MEDI8852, rAAV-C585 и rAAV-1G01, обеспечивающие экспрессию антител в формате IgG1 под контролем гибридного промотора CMV/EF1a. С помощью указанных плазмид в клетках HEK293FT были наработаны rAAV, которые затем вводили мышам линии C57BL/6 в количестве 2×10¹¹ в.г./мышью. На первом этапе изучали способность вновь полу-

ченных AAV-векторов продуцировать антитела *in vivo*. Концентрацию антител человека в сыворотке мышей определяли через 2, 4, 6 и 8 недель после введения rAAV (рис. 1). Концентрации антител увеличивались с течением времени и достигали максимальных значений на 6 неделю эксперимента. Медианы концентраций антител CR9114, MEDI8852, МНАА4549А и 1G01 через 8 недель составили 82, 27, 60 и 61 мкг/мл соответственно. Медиана концентрации антитела С585 составила 12 мкг/мл, что существенно ниже по сравнению с остальными антителами.

Определение противовирусной активности сывороток иммунизированных мышей в реакции нейтрализации

После первичной оценки уровня экспрессии антител, которую обеспечивают AAV-векторы *in vivo*, был поставлен второй эксперимент, в котором количество мышей C57BL/6 в группе увеличили до 8–10. Каждое животное получило однократную инъекцию соответствующего AAV-вектора в количестве 2×10^{11} в.г./мышь. Животные контрольной группы rAAV не получали. В качестве дополнительного отрицательного контроля использовали мышей, которые получили rAAV, кодирующий антитело COV2-2196, специфичное к SARS-CoV-2 [28].

Через 4 недели после введения rAAV сыворотки животных каждой экспериментальной группы смешивали в равных объемах. Значения концентраций антител в полученных пулах оказались сходными с данными из первого эксперимента (табл. 1). Пулы сывороток исследовали в реакции нейтрализации вирусов А/Аичи/2/1968 (H3N2) и А/Калифорния/04/2009 (H1N1). Нейтрализующие разведения для пулов и вычисленные значения IC50 представлены в табл. 1.

Таблица 1. Нейтрализация вирусов А/Аичи/2/1968 (H3N2) и А/Калифорния/04/2009 (H1N1) пулами сывороток мышей (доза вирусов 25 TCID50)

Пул сывороток/ группа животных	Вектор	Концентрация IgG, мкг/мл	А/Калифорния/04/2009 (H1N1)		А/Аичи/2/1968 (H3N2)	
			Разведение	IC50, мкг/мл	Разведение	IC50, мкг/мл
1	rAAV-CR9114	83.7	1:10	3.090	-	-
2	rAAV-MEDI8852	39	1:20	1.379	1:10	1.379
3	rAAV-МНАА4549А	57.8	1:20	1.445	1:20	1.022
4	rAAV-C585	12.5	-	-	1:40	0.110
5	rAAV-1G01	55.5	1:20	1.189	1:20	1.025
6	rAAV-2196	24.5	-	-	-	-

Примечание. Указано максимальное разведение сыворотки, при котором обеспечивается защита, и значения IC50. Знаком «-» обозначено отсутствие нейтрализации.

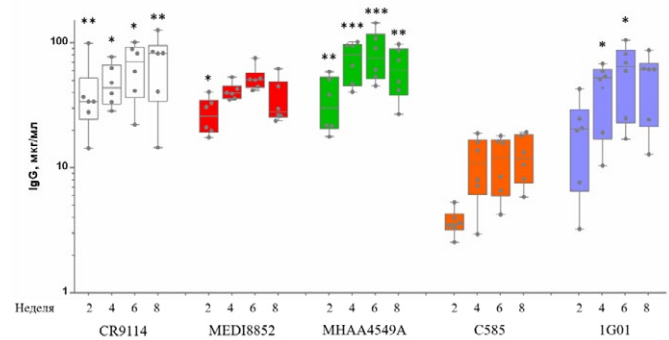


Рис. 1. Определение концентрации IgG человека в сыворотках мышей. Показаны индивидуальные значения для каждого животного ($n = 6$). Горизонтальной линией в боксе показана медиана, границами бокса показаны квантили Q1 (25%) и Q3 (75%), концы усов – минимальные и максимальные значения. Различия титра антител IgG в крови мышей оценивали с использованием теста Краскела–Уоллиса с последующими множественными сравнениями между группами с помощью теста Данна и поправкой на множественное сравнение по методу Бонферрони. Статистически значимые различия между титром антител С585 и титрами остальных антител в тех же временных точках показаны звездочками: * p -value < 0.01, ** p -value < 0.001, *** p -value < 0.0001

Антитела, специфичные к стеблевому домену HA, нейтрализовали вирус А/Калифорния/04/2009 (H1N1) с IC50 = 3.090; 1.379; 1.445 для антител CR9114, MEDI8852 и МНАА4549А соответственно. Антитело 1G01 против нейраминидазы в отношении А/Калифорния/04/2009 показало наибольшую нейтрализующую активность среди исследованных антител (IC50 = 1.189). Антитело С585, специфичное к HA вирусов гриппа подтипа H3, ожидаемо не обладало нейтрализующей активностью в отношении вируса подтипа H1.

Таблица 2. Нейтрализация вирусов А/Аичи/2/1968 (H3N2) и А/Калифорния/04/2009 (H1N1) пулами сывороток мышей (доза вирусов 8 TCID50)

Пул сывороток/ группа животных	Вектор	Концентрация IgG, мкг/мл	А/Калифорния/04/2009 (H1N1)		А/Аичи/2/1968 (H3N2)	
			Разведение	IC50, мкг/мл	Разведение	IC50, мкг/мл
1	rAAV-CR9114	83.7	1:40	0.892	1:10	3.566
4	rAAV-C585	12.5	-	-	1:160	0.029
6	rAAV-2196	24.5	-	-	-	-

Примечание. Доза вирусов 8 TCID50. Указано максимальное разведение сыворотки, при котором обеспечивается защита, и значения IC50. Знаком «-» обозначено отсутствие нейтрализации.

Это антитело оказалось наиболее эффективным против штамма А/Аичи/2/1968 (H3N2) (IC50 = 0.110 для С585). Антитела MEDI8852, МНАА4549А и 1G01 имели сходную, но на порядок меньшую, чем у С585, нейтрализующую активность против вируса Н3. Сыворотки животных, получивших CR9114, не нейтрализовали штамм А/Аичи/2/1968. Мы предположили, что концентрация CR9114 в сыворотках мышей недостаточна для нейтрализации вируса в использованной дозе, равной 25 TCID50. Поэтому в случае CR9114, С585 и контрольного антитела 2196 реакцию нейтрализации проводили с использованием вируса в дозе 8 TCID50. В новых условиях CR9114 не обладало способностью нейтрализовать А/Аичи/2/1968 при низком разведении сыворотки (табл. 2).

Таким образом, введение мышам rAAV обеспечивает продукцию антител *in vivo*, которые обладают характерным для выбранных антител профилем нейтрализации вирусов. Далее мы определяли протективность каждого из AAV-векторов против вируса гриппа А/Аичи/2/1968 подтипа H3N2 в модели летальной инфекции мышей.

Изучение защитной эффективности антител против вируса гриппа подтипа H3N2 (А/Аичи/2/1968) на модели летальной гриппозной инфекции у мышей

Защитные свойства тестируемых препаратов определяли через 3 месяца после введения rAAV. Гибель животных контрольной группы и мышей, получивших rAAV-COV2-2196, началась на 6 день после заражения вирусом А/Аичи/2/1968 (H3N2). К 11 дню наблюдения в контрольной группе погибло 90.8% животных, в группе COV2-2196 процент гибели мышей составил 75% (рис. 2, табл. S2).

Статистически значимое (*p*-value < 0.05) увеличение выживаемости наблюдалось во всех группах, в которых животные были пассивно иммунизированы rAAV, кодирующими антитела против вируса гриппа. В группах животных, иммунизированных

rAAV-МНАА4549А, rAAV-C585 и rAAV-1G01, гибель мышей не наблюдалась, а потеря массы тела, выявляемая в некоторых временных точках, была незначительной. В то же время в группах мышей с антителами CR9114 или MEDI8852 погибло 20 и 30% животных соответственно. В этих же группах потеря массы тела у выживших мышей составила 15 и 20% соответственно (рис. 3), что свидетельствует о неполной защите.

ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы активно исследуется возможность использования широко нейтрализующих антител для лечения и профилактики гриппа [5, 29]. Поскольку вирус гриппа характеризуется большим

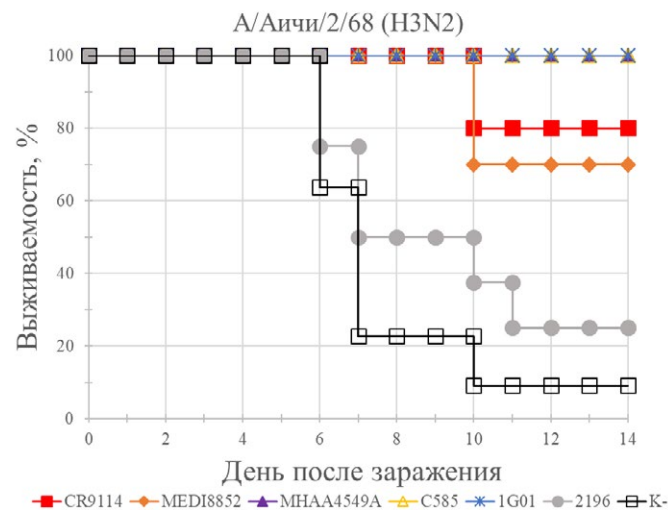


Рис. 2. Выживаемость животных, пассивно иммунизированных препаратами rAAV, на модели гриппозной пневмонии мышей. Инфицирование проводили вирусом гриппа А/Аичи/2/1968 (H3N2). Статистически значимое различие (*p* < 0.05 по критерию Mantel–Cox) было между контролем и каждой из групп, получившими rAAV, кодирующие антитела против вируса гриппа

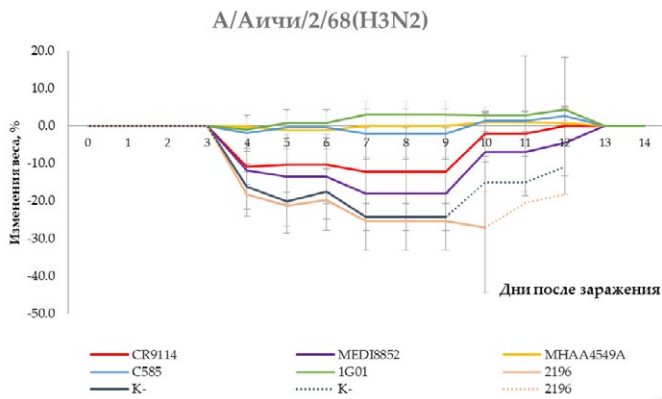


Рис. 3. Изменение веса животных, пассивно иммунизированных rAAV, после инфицирования вирусом гриппа А/Аичи/2/1968 (H3N2). Показаны средние значения \pm S.D. Пунктирными линиями показано изменение веса в соответствующей группе без высчитывания S.D. (количество мышей в группе к этому моменту было меньше 3)

разнообразием, то для профилактического применения следует выбирать антитела, действующие против максимально широкого спектра штаммов вируса гриппа. В настоящей работе нами впервые проведено одновременное сравнение эффективности rAAV-векторов, сконструированных для экспрессии пяти ранее охарактеризованных антител против вируса гриппа. Оценку нейтрализующей активности антител проводили на двух штаммах вируса – А/Калифорния/04/2009 (H1N1) и А/Аичи/2/1968 (H3N2), принадлежащих к наиболее удаленным друг от друга подгруппам серологической группы А – 1 и 2 [30].

rAAV-опосредованная экспрессия антител MHA4549A и MEDI8852 к стеблевому домену HA обеспечила нейтрализующую активность сывороток мышей в отношении штаммов H1N1 и H3N2, что согласуется с результатами, полученными ранее [20, 21]. Вектор rAAV-CR9114 определял выработку антител в сыворотке, которые в эксперименте с дозой вируса 25 TCID₅₀ нейтрализовали только вирус штамма H1 (табл. 1). При снижении дозы вируса до 8 TCID₅₀ сыворотки мышей, получивших rAAV-CR9114, нейтрализовали как штамм H1, так и H3. Полученные данные согласуются с ранее обнаруженным фактом, что CR9114 значительно лучше работает против вирусов А группы 1, чем группы 2 [31]. Несмотря на слабую нейтрализующую активность сывороток с CR9114 в отношении А/Аичи/2/1968 (H3N2), вектор rAAV-CR9114 обеспечивал защиту 80% летально инфицированных мышей от гибели. Схожая закономерность описана для антитела CR9114 Dreyfus и соавт. [19]. Показано,

что при слабой нейтрализующей активности против вируса H3N2 и даже при полном отсутствии нейтрализации вирусов гриппа В это антитело защищало мышей от гибели после заражения данными вирусами, хотя и наблюдалась потеря 10% массы тела. Показано, что в случае слабой нейтрализации защитное действие антитела CR9114 может осуществляться с использованием Fc-опосредованных механизмов [32].

Не всегда можно четко выделить роль нейтрализующей активности и Fc-эффектов в проявлении защитных свойств антител. Так, сыворотки мышей, получивших rAAV MHA4549A и rAAV MEDI8852, продемонстрировали сходную эффективность в реакции нейтрализации против А/Аичи/2/1968 (H3N2), но только вектор rAAV-MHA4549A обеспечивал 100% защиту мышей без потери массы тела. Это различие может быть связано как с разным уровнем экспрессии этих антител у мышей, так и с возможными различиями в эффективности Fc-зависимых эффекторных функций этих антител (ADCC, ADCP) [21, 33].

Особое место среди всех использованных в работе векторов занимает rAAV-1G01, кодирующий антитело против нейраминидазы, поскольку это антитело активно против всех подтипов вируса гриппа (N1–N9, NB) [23]. Кроме того, антитело 1G01 является нейтрализующим, это его исключительная особенность среди анти-NA-антител, действие которых, как правило, реализуется только через подавление ферментативной активности NA. Нейтрализующие свойства сывороток мышей, пассивно иммунизированных rAAV-1G01, в отношении вирусов гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) и А/Аичи/2/1968 (H3N2), а также их способность защищать мышей от штамма H3N2 *in vivo* подтверждены в наших экспериментах.

Таким образом, все изученные нами векторы показали способность статистически значимо защищать мышей от вируса гриппа подтипа H3N2 и могут использоваться для дальнейшей разработки концепции пассивной иммунизации, основанной на rAAV. Для этого на следующем этапе необходимо исследовать их защитную эффективность на расширенной панели вирусов гриппа. При необходимости для увеличения широты и эффективности действия препарата в дальнейшем можно одновременно использовать комбинацию одиночных векторов. Так, к примеру, антитело CR9114, преимущественно действующее против H1, можно объединить с H3-специфичным антителом C585.

Отдельно следует обозначить проблему существования побочных эффектов, которые часто развиваются в ответ на введение rAAV-частиц, обла-

дающих иммуногенными свойствами [34]. Описаны негативные эффекты, наблюдаемые, как правило, при терапии наследственных патологий, требующих системного введения гAAV [35]. Для профилактики гриппа весьма привлекательной выглядит концепция интраназального введения гAAV [17], которое обеспечит преимущественно локальную экспрессию антител непосредственно в очаге развития инфекции. Такой подход может оказаться более безопасным по сравнению с системным введением вектора

и в перспективе позволит создать эффективный профилактический препарат длительного действия, актуальный для пациентов с ослабленным иммунитетом и других уязвимых групп населения. ●

Работа выполнена в рамках государственного задания ФМБА.

Приложения доступны на сайте
<https://doi.org/10.32607/actanaturae.27774>

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Iuliano AD, Roguski KM, Chang HH, et al. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study. *Lancet*. 2018;391:10127(1285-1300). doi: 10.1016/S0140-6736(17)33293-2
- CDC.gov [Internet]. CDC Seasonal Flu Vaccine Effectiveness Studies, Inc; 2009-2025 [updated 2025 May 30]. Available from: <https://www.cdc.gov/flu/vaccines-work/effectiveness-studies.htm>
- Dimmock NJ. Neutralization of animal viruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1993;183:1-149. doi: 10.1007/978-3-642-77849-0
- Pelegri M, Naranjo-Gomez M, Piechaczyk M. Antiviral Monoclonal Antibodies: Can They Be More Than Simple Neutralizing Agents? *Trends Microbiol*. 2015;23(10):653-665. doi: 10.1016/j.tim.2015.07.005
- Sun X, Ling Z, Yang Z, Sun B. Broad neutralizing antibody-based strategies to tackle Influenza. *Curr Opin In Vir*. 2022;53:101207. doi: 10.1016/j.coviro.2022.101207
- Gehring AJ, Salimzadeh L. Current and future use of antibody-based passive immunity to prevent or control HBV/HDV infections. *Antiviral Research*. 2024;226:105893. doi: 10.1016/j.antiviral.2024.105893
- Chavda VP, Prajapati R, Lathigara D, Nagar B, Kukadiya J, Redwan EM, Uversky VN, Kher MN, Patel R. Therapeutic monoclonal antibodies for COVID-19 management: an update. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2022;22(6):763-780. doi: 10.1080/14712598.2022.2078160
- Li L, Zhang W, Hu Y, Tong X, et al. Effect of Convalescent Plasma Therapy on Time to Clinical Improvement in Patients With Severe and Life-threatening COVID-19: A Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2020;324(5):460-470. doi: 10.1001/jama.2020.10044
- Perotti C, Baldanti F, Bruno R, Del Fante C, et al. Covid-19 Plasma Task Force. Mortality reduction in 46 severe Covid-19 patients treated with hyperimmune plasma. A proof of concept single arm multicenter trial. *Haematologica*. 2020;105(12):2834-2840. doi: 10.3324/haematol.2020.261784
- Ali SO, Takas T, Nyborg A, Shoemaker K, Kallewaard NL, et al. Evaluation of MEDI8852, an Anti-Influenza A Monoclonal Antibody, in Treating Acute Uncomplicated Influenza. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(11):e00694-18. doi: 10.1128/aac.00694-18
- McBride JM, Lim JJ, Burgess T, Deng R, et al. Phase 2 Randomized Trial of the Safety and Efficacy of MHAA4549A, a Broadly Neutralizing Monoclonal Antibody, in a Human Influenza A Virus Challenge Model. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(11):e01154-17. doi: 10.1128/AAC.01154-17. PMID: 28807912; PMCID: PMC5655070.
- Lim JJ, Nilsson AC, Silverman M, Assy N, et al. A Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of MHAA4549A, a Monoclonal Antibody, plus Oseltamivir in Patients Hospitalized with Severe Influenza A Virus Infection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020;64(7):e00352-20. doi: 10.1128/AAC.00352-20. PMID: 32393496; PMCID: PMC7318030.
- Qiu X, Audet J, Wong G, Pillet S, Bello A, Cabral T, Strong JE, Plummer F, Corbett CR, Alimonti JB, Kobinger GP. Successful treatment of ebola virus-infected cynomolgus macaques with monoclonal antibodies. *Sci Transl Med*. 2012;4(138):138ra81. doi: 10.1126/scitranslmed.3003876
- Limberis MP, Tretiakova A, Nambiar K, Wong G, Racine T, Crosariol M, Xiangguo Q, Kobinger G, Wilson JM. Adeno-Associated Virus Serotype 9-Expressed ZMapp in Mice Confers Protection Against Systemic and Airway-Acquired Ebola Virus Infection. *J Infect Dis*. 2016;214(12):1975-1979. doi: 10.1093/infdis/jiw460
- Martinez-Navio JM, Fuchs SP, Pantry SN, Lauer WA, Duggan NN, Keele BF, Rakasz EG, Gao G, Lifson JD, Desrosiers RC. Adeno-Associated Virus Delivery of Anti-HIV Monoclonal Antibodies Can Drive Long-Term Virologic Suppression. *Immunity*. 2019;50(3):567-575.e5. doi: 10.1016/j.immuni.2019.02.005
- Леонтьев ДС, Урусов ФА, Глазкова ДВ, Белугин БВ, Орлова ОВ, Минтаев РР, Цыганова ГМ, Богословская ЕВ, Шипулин ГА. Исследование защитной эффективности препарата КомбиМаб-2 против вируса иммунодефицита человека типа 1 на мышах, гуманизированных CD4+ Т-лимфоцитами. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2024;24(3):312-321. doi: 10.30895/2221-996X-2024-24-3-312-321
- Adam VS, Crosariol M, Kumar S, Ge MQ, Czack SE, Roy S, Haczku A, Tretiakova A, Wilson JM, Limberis MP. Adeno-associated virus 9-mediated airway expression of antibody protects old and immunodeficient mice against influenza virus. *Clin Vaccine Immunol*. 2014;21(11):1528-1533.
- Del Rosario JMM, Smith M, Zaki K, Risley P, Temperon N, Engelhardt OG, Collins M, Takeuchi Y, Hufton SE. Protection From Influenza by Intramuscular Gene Vector Delivery of a Broadly Neutralizing Nanobody Does Not Depend on Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity. *Front Immunol*. 2020;11:627. doi: 10.3389/fimmu.2020.00627
- Dreyfus C, Laursen NS, Kwaks T, Zuijdgheest D, et al. Highly conserved protective epitopes on influenza B viruses. *Science*. 2012;337(6100):1343-1348. doi: 10.1126/science.1222908
- Nakamura G, Chai N, Park S, Chiang N, et al. An in vivo

- human-plasmablast enrichment technique allows rapid identification of therapeutic influenza A antibodies. *Cell Host Microbe*. 2013;14(1):93-103. doi: 10.1016/j.chom.2013.06.004
21. Kallewaard NL, Corti D, Collins PJ, Neu U, et al. Structure and Function Analysis of an Antibody Recognizing All Influenza A Subtypes. *Cell*. 2016;166(3):596-608. doi: 10.1016/j.cell.2016.05.073
22. Qiu Y, Stegalkina S, Zhang J, Boudanova E, et al. Mapping of a novel H3-specific broadly neutralizing monoclonal antibody targeting the hemagglutinin globular head isolated from an elite influenza virus-immunized donor exhibiting serological breadth. *J Virol*. 2020;94:e01035-19.
23. Stadlbauer D, Zhu X, McMahon M, Turner JS, et al. Broadly protective human antibodies that target the active site of influenza virus neuraminidase. *Science*. 2019;366(6464):499-504. doi: 10.1126/science.aay0678
24. Paules CI, Lakdawala S, McAuliffe JM, Paskel M, Vogel L, Kallewaard NL, Zhu Q, Subbarao K. The Hemagglutinin A Stem Antibody MEDI8852 Prevents and Control Disease and Limits Transmission of Pandemic Influenza Viruses. *J Infect Dis*. 2017;216(3):356-365. doi: 10.1093/infdis/jix292
25. Shipulin GA, Glazkova DV, Urusov FA, Belugin BV, Dontsova V, Panova AV, Borisova AA, Tsyganova GM, Bogoslovskaya EV. Triple Combinations of AAV9-Vectors Encoding Anti-HIV bNAbs Provide Long-Term In Vivo Expression of Human IgG Effectively Neutralizing Pseudoviruses from HIV-1 Global Panel. *Viruses*. 2024;16(8):1296. doi: 10.3390/v16081296
26. Cottey R, Rowe CA, Bender BS. Influenza virus. *Current protocols in immunology*. 2001;42(1):19-1. doi: 10.1002/0471142735.im1911s42
27. Reed LJ, Muench H. A simple method of estimation of 50% end points. *American J Hyg*. 1938;27:493-497.
28. Zost SJ, Gilchuk P, Case JB, Binshtein E, et al. Potently neutralizing and protective human antibodies against SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;584(7821):443-449. doi: 10.1038/s41586-020-2548-6
29. Sedeyn K, Saelens X. New antibody-based prevention and treatment options for influenza. *Antiviral Research*. 2019;170:104562. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.104562
30. Jang YH, Seong BL. The Quest for a Truly Universal Influenza Vaccine. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9:344. doi: 10.3389/fcimb.2019.00344
31. Beukenhorst AL, Frallicciardi J, Koch CM, Klap JM, Phillips A, et al. The influenza hemagglutinin stem antibody CR9114: Evidence for a narrow evolutionary path towards universal protection. *Frontiers in Virology*. 2022;2:1049134. doi: 10.3389/fviro.2022.1049134
32. Sutton TC, Lamirande EW, Bock KW, Moore IN, Koudstaal W, Rehman M, Weverling GJ, Goudsmit J, Subbarao K. *In Vitro* Neutralization Is Not Predictive of Prophylactic Efficacy of Broadly Neutralizing Monoclonal Antibodies CR6261 and CR9114 against Lethal H2 Influenza Virus Challenge in Mice. *J Virol*. 2017;91(24):e01603-17. doi: 10.1128/JVI.01603-17. PMID: 29046448; PMCID: PMC5709608.
33. Chai N, Swem LR, Reichelt M, et al. Two escape mechanisms of influenza A virus to a broadly neutralizing stalk-binding antibody. *PLoS Pathog*. 2016;12:e1005702. doi: 10.1371/journal.ppat.1005702
34. Jagadisan B, Dhawan A. Hepatotoxicity in adeno-associated viral vector gene therapy. *Current Hepatology Reports*. 2023;22(4):276-290. doi: 10.1007/s11901-023-00624-5
35. Duan D. Lethal immunotoxicity in high-dose systemic AAV therapy. *Molecular Therapy*. 2023;31(11):3123-3126. doi: 10.1016/j.ymthe.2023.10.015