

2. Санина Т.В., Кирьянова С.В., Черемушкина И.В., Корнеева О.С. Исследование бифидогенной активности фукозы и ее полимеров. Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. 2011, 1: 141-143.
3. Шендеров Б.А. Медицинская микробная экология и функциональное питание. Микрофлора человека и животных и её функции. М., ГРАНТЬ, 1998.
4. Шендеров Б.А. Роль питания и кишечной микрофлоры в поддержании нутритивного гомеостаза человека. Вестник восстановительной медицины. 2008, 1: 12-13.
5. Inra J., Concetta V., Daniela de C. et al. Drosophila sperm surface alpha-L-fucosidase interacts with the egg coats through its core fucose residues. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 2015, 63: 133-143. doi: 10.1016/j.ibmb.2015.06.011.
6. Listinsky J.J., Siegal G.P., Listinsky C.M. The emerging importance of alpha-L-fucose in human breast cancer: a review. *Am. J. Transl. Res.* 2011, 3 (4): 292-322.
7. Luther K.B. Role of unusual O-glycans in intercellular signaling. *International Journal of Biochemistry Cell Biology.* 2009, 41: 1011-1024.
8. Orczyk-Pawliłowicz M. The role of fucosylation of glycoconjugates in health and disease. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online).* 2007, 61: 240-252.
9. Park D., Ryu K.S., Choi D. et al. Characterization and role of fucosemutarotase in mammalian cells. *Glycobiology.* 2007, 17 (9): 955-962.
10. Romero-Aguirregomezcorta J., Mat6s C., Coy P. α -L-fucosidase enhances capacitation-associated events in porcine spermatozoa. *Vet. J.* 2015, 203 (1): 109-114. doi: 10.1016/j.tvjl.2014.11.006.
11. Venditti J.J., Swann J.M., Bean B.S. Hamster sperm-associated alpha-L-fucosidase functions during fertilization. *Biol. Reprod.* 2010, 82 (3): 572-579. doi: 10.1095/biolreprod.109.076695.

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

А.С.Оксанич, А.А.Никонова, В.В.Зверев

РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА В ПРОТИВОВИРУСНОЙ ТЕРАПИИ: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ

НИИ вакцин и сывороток имени И.И.Мечникова, Москва

За последние 20 лет было разработано более 60 рекомбинантных моноклональных антител (МкАт) для лечения различных заболеваний. Более 30 препаратов антител разрешены к применению в терапии, включая большую группу препаратов против онкологических заболеваний. Также МкАт используют в трансплантологии, для лечения сердечно-сосудистых, аутоиммунных и, в редких случаях, инфекционных заболеваний. Несмотря на то, что от вирусных заболеваний ежегодно гибнут десятки миллионов людей, в настоящее время разрешен всего один препарат на основе рекомбинантных антител для профилактики РСВ у детей. В обзоре основное внимание уделяется подходам к созданию терапевтических МкАт против вирусных инфекций, примерам терапии вирусных инфекций рекомбинантными антителами и проблемам разработки таких методов лечения.

Журн. микробиол., 2018, № 6, С. 114—123

Ключевые слова: рекомбинантные антитела, вирусные инфекции, иммуноглобулин, терапия

А.С.Оксанич, А.А.Никонова, В.В.Зверев

RECOMBINANT ANTIBODIES IN ANTI-VIRAL THERAPY: ACHIEVEMENTS AND PERSPECTIVES

Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russia

More than 60 recombinant monoclonal antibodies (mAbs) have been developed for the treatment of various diseases in the last 20 years. About 30 antibody preparations are approved for use in therapy, including large group of drugs against cancer. In addition, mAbs are used in transplantation, for the treatment of cardiovascular, autoimmune and, in rare cases, infectious diseases. Despite the fact that tens millions of people die every year from viral diseases, only one drug based on recombinant antibodies for the prevention of RSV in children is currently allowed. This review focuses on approaches to generate therapeutic mAbs to fight viral infection, examples of mAb therapies for viral infections, and the challenges of developing such therapies.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 6, P. 114—123

Key words: recombinant antibodies, viral infections, immunoglobulin, therapy

Применение антител (Ат) в терапии вирусных инфекций началось еще в начале XX века, когда для лечения больного использовали сыворотку от выздоровевшего от той же инфекции донора. Постепенно сывороточные препараты стали замещаться на очищенный иммуноглобулин из пулированной донорской сыворотки, так называемый внутривенный иммуноглобулин (ВВИГ).

Несмотря на успехи как от сывороточной терапии, так и от применения ВВИГ, никакого существенного прогресса в использовании антител для терапии инфекций не было достигнуто, до тех пор, пока в 1975 году не была разработана моноклональная технология, позволяющая выделять от иммунизированных мышей моноклональные антитела (МкАт) нужной специфичности. До середины 80 годов XX века были разработаны несколько эффективных методов выделения МкАт, активных в отношении вирусов человеческого и животного происхождения. Одним из таких методов стал фаговый дисплей, принцип действия которого заключается в использовании антигена для так называемого пэннинга библиотек антител, построенных из генов вариабельных областей тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина от неиммунных, вакцинированных или естественно инфицированных людей. В этом методе библиотеки антител представлены антигену через дисплей на фагах, бактериях, дрожжах или клетках млекопитающих [37]. В других методах антитела клонируются из одиночных В-клеток периферической крови или плазматических В-клеток, изолированных от вакцинированных или естественно инфицированных животных или людей. МкАт также получают из иммунных сывороток используя подходы, которые комбинируют методы протеомики и обратной генетики [12]. Недавно пары тяжелой и легкой цепей были собраны на основе метода глубокого секвенирования репертуара генов IgG В-клеток [24]. В настоящем обзоре основное внимание уделяется подходам к созданию терапевтических МкАт против вирусных инфекций, примерам терапии МкАт от вирусных инфекций и проблемам разработки таких методов лечения.

Моноклональные антитела против вирусных инфекций

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ). В 1998 году FDA одобрил препарат Паливизумаб (Synagis) для профилактики РСВ-инфекции у детей. Паливизумаб представляет собой гуманизированное МкАт, которое связывается с F-гликопротеином РСВ. Другой препарат — Мотавизумаб — производное Паливизумаба, в десять раз более активно связывается с F-гликопротеином, чем Паливизумаб [25]. В клинических испытаниях у реципиентов Мотавизумаба наблюдали 26% снижение случаев госпитализации от РСВ-инфекции по сравнению с получателями Паливизумаба. У амбулаторных пациентов, получающих в качестве терапии Мотавизумаб, РСВ в нижних дыхательных путях детектировали на 50 % реже, чем у реципиентов Паливизумаба [11]. В испытаниях фазы 1 препарата антител против РСВ пролонгированного действия, известного как Мотавизумаб-УТЕ (Мотавизумаб с аминокислотными заменами в Fc-фрагменте МкАт M252Y/S254T/T256E [УТЕ]) на здоровых добровольцах, было показано, что клиренс Мотавизумаба-УТЕ был значительно ниже (71-86 %), а период полувыведения увеличивался в 2-4 раза, по сравнению с немодифицированным препаратом Мотавизумаба. Эффективная концентрация Мотавизумаба-УТЕ сохранялась в сыворотке в течение 240 дней, что подтверждалось нейтрализующей активностью РСВ, в сравнении с 90-дневным периодом для Мотавизумаба [33]. Несмотря на положительные характеристики Мотавизумаба и Мотавизумаба-УТЕ эти препараты не были одобрены для клинического применения.

MEDI8897, рекомбинантный человеческий IgG1, выделенный из В-клеток донора и нацеленный на функциональный тример F-белка в оболочке РСВ (prefusion). Препарат нейтрализует как А, так и В штаммы РСВ и более чем в 50 раз эффективен, чем Паливизумаб. MEDI8897 был разработан с введением замены УТЕ в области Fc-фрагмента Ат для удлинения периода полувыведения. В исследовании фазы 1 средний период полувыведения MEDI8897 составлял от 85 до 117 дней в группах исследования дозировки, а профиль безопасности MEDI8897 был аналогичен плацебо. MEDI8897 в настоящее время находится в фазе 2b и исследуется на недоношенных новорожденных

детях [17]. Антитело ALX-0171 представляет собой однодоменное верблюжье антитело или наноантитело, нацеленное на F-белок РСВ. Из-за небольшого размера наноантитела, ALX-0171 тестируется в фазе 2 как терапевтическое Ат для ингаляций у младенцев (в возрасте от 1 до 24 месяцев), которые были госпитализированы с инфекцией РСВ [10].

Цитомегаловирусная инфекция. Классическая терапия взрослых от ЦМВ-инфекции осуществляется противовирусными препаратами, такими как ганцикловир, фоскарнет и цидофовир. Первичная инфекция у женщин во время беременности является фактором риска для врожденной ЦМВ-инфекции. Для ее лечения возможно применение иммуноглобулинов, но препараты поликлональных противовирусных иммуноглобулинов имеют серьезные ограничения. Их трудно стандартизировать, и они не достаточно эффективны. Напротив, МкАт, направленные на ключевые эпитопы вирусов, должны обеспечивать преимущество в эффективности. Многочисленные МкАт против ЦМВ, которые были разработаны ранее, сейчас находятся на разных стадиях доклинических и клинических испытаний [16].

Подавляющее большинство антител, вырабатываемых против ЦМВ, нацелены против антигена gB. Антитела, направленные только против gB, часто не обладают достаточной нейтрализующей способностью, чтобы контролировать ЦМВ-инфекцию и его реактивацию. Недавние исследования показали, что пентамерный gH-комплекс является основной мишенью для нейтрализующих антивирусных Ат [27]. Использование комбинации МкАт имеет несколько преимуществ, включая повышенную эффективность и снижение развития вирусной резистентности. По меньшей мере два препарата антител против ЦМВ, проходящие клинические испытания, представляют собой комбинации двух МкАт.

Разрабатываемый препарат CSJ148 (Novartis) представляет собой смесь Ат LJP538, которое связывается с вирусным протеином gB, и LJP539, которое связывается с вирусным пентамерным комплексом gH. Оба антитела были изолированы из В-клеток, иммортализованных вирусом Эпштейна-Барр, от доноров, иммунных к ЦМВ. Результаты клинических испытаний показывают, что CSJ148 и его компоненты безопасны, хорошо переносятся и имеют фармакокинетику свойственную для иммуноглобулина человека [29].

Препарат RG7667 (Genentech) — это комбинация двух рекомбинантных МкАт: MCMV5322A и MCMV3068A. MCMV5322A представляет собой высокоаффинный вариант МкАт MSL-109, которое связывается с нейтрализующим вирус эпитопом gH/gL ЦМВ. MSL-109 — это человеческое МкАт, изолированное из клеток селезенки серопозитивного к ЦМВ пациента. Другой компонент RG7667, МкАт MCMV3068A, связывает пентамерный комплекс gH. MCMV3068A выделили из гибридомы мыши и затем гуманизировали [20].

RG7667 разработан компанией Genentech для профилактики ЦМВ-инфекции во внутриутробном периоде, а также у реципиентов трансплантата органов и гемопоэтических стволовых клеток. Исследования RG7667 в фазе I показали, что они безопасны, хорошо переносятся и имеют удовлетворительный профиль фармакокинетики и иммуногенности. Результаты исследований поддерживают дальнейшую разработку RG7667 в качестве средства для профилактики и лечения ЦМВ-инфекции. В исследовании фазы 2 у реципиентов почки с высоким риском заболевания ЦМВ RG7667 хорошо переносился, снижал частоту ЦМВ-инфекции в пределах 12 и 24 недель после трансплантации. Было выявлено лишь несколько случаев заболевания ЦМВ по сравнению с плацебо [21].

Инфекция, вызванная вирусами гриппа. В результате быстрого развития подходов для выделения антител и инженерных технологий, пассивная иммунизация нейтрализующими антителами становится все более перспективным подходом к решению проблемы угрозы здоровью населения при пандемии гриппа.

Так, МкАт МНАА4549А, было клонировано из одиночного плазмобласта, выделенного от донора, привитого от гриппа. МкАт связывает высококонсервативный эпитоп на стебле гемагглютинина (ГА) вируса гриппа А и блокирует ГА-зависимое мембранное слияние в эндосоме и способно нейтрализовать все известные штаммы вируса гриппа А человека. В двух клинических испытаниях фазы I МНАА4549А бы-

ла продемонстрирована безопасность и хорошая переносимость при однократной внутривенной дозе препарата в количестве 10800 мг. МкАт демонстрировал линейную фармакокинетику в сыворотке, сопоставимую с фармакокинетикой человеческого IgG1 и не взаимодействовал с известными эндогенными мишенями у людей. МНАА4549А в настоящее время находится в фазе 2 клинических испытаний, в котором оценивается эффективность препарата при лечении пациентов, госпитализированных с тяжелой формой вируса гриппа А [15].

Другое Ат — VIS410 — представляет собой рекомбинантное человеческое МкАт класса IgG1, которое нацелено на область стебля ГА вируса гриппа А. МкАт связывается с 1 и 2 подтипом ГА вирусов гриппа А. Профилактическое введение VIS410 приводило к полной защите мышей от развития острого респираторного дистресс-синдрома и летального заболевания вирусом гриппа А (H7N9) [6]. В фазе 1 клинического испытания VIS410 была продемонстрирована его безопасность. Препарат оказывал влияние на вирус как в сыворотке крови, так и в верхних дыхательных путях. Эти результаты подтверждают перспективу его применения в качестве терапевтического или профилактического средства против гриппа А. VIS410 в настоящее время находится в исследовании фазы 2а, предназначенном для оценки безопасности и переносимости антител у пациентов с неосложненным гриппом.

МкАт CR6261 было изолировано из комбинаторных библиотек, которые были созданы из IgM(+) В-клеток человека в период сезонной вакцинации против гриппа. МкАт CR6261 нейтрализует вирус, блокируя конформационные перегруппировки, связанные с мембранным слиянием, распознает высококонсервативную спиральную область на стебле ГА1 и ГА2 [18]. Антитело защищает мышей при использовании до и после заражения летальной дозой H5N1 или H1N1. CR6261 в настоящее время находится в фазе 2 клинических испытаний.

МкАт CR8020, человеческое МкАт, обладает широкой нейтрализующей активностью против большинства вирусов гриппа А, включая H3N2 и H7N7, которые вызывают тяжелые заболевания у человека. CR8020 было выделено из В-клетки донора, вакцинированного против вируса гриппа. Структурные анализы показывают, что МкАт CR8020 нацелено на фрагменты ГА, которые склонны к антигенному дрейфу. Важно отметить, что CR8020 взаимодействовало даже с мутантными формами ГА вируса H7N9 в период недавних вспышек [36].

МкАт TCN-032 было выделено из IgG(+) В-клетки здорового человека, распознает ранее неизвестный конформационный эпитоп в эктодомене матричного белка M2e, эта область связывания высококонсервативна в вирусах гриппа А и присутствует почти во всех выявленных до сих пор штаммах, включая высокопатогенные вирусы, которые заражают в основном птиц и свиней. TCN-032 защищало мышей от летальных доз вирусов гриппа H5N1 или H1N1. Фаза 1 клинических исследований показала, что TCN-032 является безопасным, без каких-либо проявлений иммунного обострения на основе экспрессии цитокинов сыворотки. Данное МкАт может обеспечить немедленный иммунитет и терапевтическое преимущество при инфекции гриппа А без проявления устойчивости вируса [32].

ВИЧ. Несмотря на многолетние интенсивные усилия, эффективная вакцина против ВИЧ до настоящего времени не разработана. Благодаря достижениям в выявлении широконейтрализующих антител из одиночных В-клеток от инфицированных ВИЧ, антитела против этого вируса становятся одним из подходов как для профилактического, так и терапевтического лечения ВИЧ-инфекции и СПИД. Ряд широконейтрализующих антител к ВИЧ-1 в настоящее время находятся на разных стадиях клинических исследований. Большинство МкАт против ВИЧ, например VRC01, 3BNC117, 10-1074 и 4E10, в клинических испытаниях нейтрализуют вирус в основном за счет взаимодействия с консервативными вирусными эпитопами. Но существуют и другие подходы, например, МкАт Pro140 тестируется для лечения ВИЧ-инфекции за счет блокирования рецептора CCR5, который часто используется вирусом как ко-рецептор при заражении CD4-клеток [23].

VRC01 представляет собой нейтрализующее МкАт против ВИЧ-1, выделенное из В-клеток ВИЧ-инфицированного пациента. Оно направлено против сайта свя-

звания ВИЧ-1 на поверхности CD4-клеток и способно нейтрализовать различные штаммы ВИЧ-1. Исследование фазы 1 показало, что антитело является безопасным и демонстрирует ожидаемый период полураспада и фармакокинетику человеческого IgG. VRC01 было протестировано в двух открытых тестах на безопасность, побочные эффекты, фармакокинетические свойства и антивирусную активность у лиц с ВИЧ-инфекцией, которые подвергались прерыванию антиретровирусной терапии. МкАт несколько задерживало подъем титра вируса в плазме крови по сравнению со среднестатистическим контролем, но не подавляло репликацию вируса на протяжении длительного периода. Антитело было протестировано в многочисленных тестах 2 фазы клинических испытаний [5].

Человеческое антитело 3BNC117, которое взаимодействует с гликопротеином gp120 ВИЧ, было выделено из одиночных В-клеток пациента с высоким титром широконейтрализующих антител. Антитела 3BNC117 блокировали инфекцию и подавляли вирусную репликацию у макаков, инфицированных вирусом R5-тропного обезьянье-человеческого иммунодефицита (SHIV)-AD8, который эмулирует многие патогенные и иммуногенные свойства ВИЧ-1 при заражении им обезьян. В фазе 1 клинических исследований 3BNC117 была продемонстрирована его безопасность и эффективность в снижении вирусной нагрузки ВИЧ-1. В исследовании фазы 2а 3BNC117 подавляло вирусную репликацию у людей во время прерывания лечения. Антитело оказывает сильное избирательное давление на ВИЧ-1, выходящее из латентных резервуаров во время прерывания терапии у людей. В дополнение к подавлению вирусной репликации у ВИЧ-1 инфицированных 3BNC117 усиливало гуморальный иммунитет к ВИЧ-1. МкАт 3BNC117 также тестируют в сочетании со схожим по функциям широконейтрализующим антителом 10-1074 при лечении ВИЧ-1 инфекции [34,35].

Антитела, которые распознают высококонсервативную проксимальную внешнюю область мембраны в эктодомене стебля gp41 ВИЧ, такие как 4E10, 2F5 и 2G12, были протестированы в исследованиях фазы 1/2 у пациентов с высокоактивной антиретровирусной терапией, где наблюдалось значительное подавление вируса при острой и ранней инфекции ВИЧ-1. В дополнение к антителам, непосредственно нацеленным на вирусные антигены для профилактики и лечения инфекции ВИЧ-1, также разрабатываются антитела, нацеленные на рецепторы хозяина, такие как CCR5 и CD4 рецептор. Например, гуманизированное IgG4 МкАт Pro140, нацеленное на рецептор CCR5, было протестировано в клинических испытаниях. Оно проявляло пролонгированную противовирусную активность и, как правило, хорошо переносилось пациентами [22]. Другой препарат, Ибализумаб (iMab), представляет собой гуманизированное МкАт, которое связывается с конформационным эпитопом на CD4-клетках и блокирует проникновение ВИЧ-1 в клетку, в настоящее время Ат проходит клинические испытания. В другом исследовании были сконструированы биспецифические Ат, которые сочетали ингибирующую активность Ибализумаба с анти-gp120 широконейтрализующим Ат для пассивной иммунизации и профилактики ВИЧ-1 инфекции [28].

Вирус гепатита С. В настоящее время разработаны и тестируются в фазе 1 и 2 клинических испытаний четыре МкАт против вируса гепатита С (ВГС). Они предназначены как для терапии хронической инфекции, так и для профилактики реинфицирования печени после трансплантации. Исследования МкАт MBL-HCV1 (MassBiologics) в фазе 2 были начаты в 2010 году, это единственное антитело из 4, направленное на нейтрализацию ВГС, остальные МкАт нацелены на клеточные белки. Опытная группа получала 11 инфузий по 50 мг/кг MBL-HCV1 или плацебо внутривенно с тремя инфузиями в день трансплантации, однократную инфузию в дни с 1 по 7 и еще одну инфузию на 14 день после трансплантации печени. MBL-HCV1 хорошо переносился пациентами и уменьшал вирусную нагрузку в течение периода от 7 до 28 дней [13].

Эбола и Марбург. Вспышка эпидемии Эбола в Западной Африке в период между 2014 и 2015 годами затронула 28652 человека и привела к более чем 11325 смертельным исходам. Уроки, извлеченные из эпидемии с такой высокой смертностью, способствовали к развитию новых мер борьбы против подобных инфекционных заболеваний, в том числе использование МкАт. Например, экспериментальный коктейль из МкАт — ZMapp — получил специальное одобрение для использования во время быстро разви-

вающейся эпидемии лихорадки. ZMapp представляет собой комбинацию из трех МкАт (с13С6, с2G4, с4G7), оптимизированных из двух предыдущих коктейлей антител (ZMab и MB-0033). ZMapp показал эффективную защиту на модели макак резусов [30].

В России также давно ведутся работы по получению гуманизированных антител против Эболы, в 2006 году был зарегистрирован патент по их получению, но эти антитела так и не дошли до стадии клинических испытаний [3]. В работе Паниной А.А. с соавторами описан метод получения трех химерных антител против EBOV GP (GPE118, GPE325 и GPE534), которые схожи по эпитопной специфичности с препаратом ZMapp и показали высокую нейтрализующую активность [2].

Лихорадку Марбург вызывают два схожих типа вируса — Марбург и Равн, принадлежащие к семейству Филовирусов. Они находятся в тесном родстве с вирусом Эбола и вызывают аналогичную с ним тяжелую геморрагическую лихорадку со схожими симптомами и показателями смертности (зачастую выше 50 %). Эффективного лечения лихорадки Марбург в настоящее время не существует. Научный коллектив из Университетов Вандербильта и Техаса с коллегами из других научных центров ранее описал ряд препаратов МкАт к вирусному гликопротеину, выделенных от переболевших инфекцией людей.

На первой стадии исследования ученые вводили антитела MR78-N и MR191-N зараженным летальными дозами вирусов Марбург и Равн морской свинкам на четвертый день после контакта с вирусом (до сих пор ни один экспериментальный препарат на производил эффекта при введении позже, чем на третий день после заражения). Первый препарат предотвратил смерть 60 % животных от вируса Марбург и 100 % — от вируса Равн. Второй препарат обеспечил 100 % выживаемость вне зависимости от типа вируса. Все животные из контрольной группы, получившие плацебо, пали к 10 дню эксперимента.

В следующей серии экспериментов с макаками-резусами использовалось антитело MR191-N. Животным, зараженным летальными дозами вирусов Марбург и Равн, препарат вводили дважды: на пятый и восьмой день после введения вируса. В результате выжили 80 % обезьян, зараженных вирусом Марбург, и 100 % — вирусом Равн. Введение антитела на четвертый день после контакта с вирусом Марбург спасало всех животных. В контрольной группе все макаки пали к 8 (Марбург) и 10 (Равн) дню после заражения. В обоих экспериментах к 7-10 дню от момента введения вируса МкАт MR191-N снижало вирусную нагрузку в крови до неопределяемого уровня [26].

Зика. Вспышка инфекции, вызванной вирусом Зика в 2015-2016 годах и ее связь с врожденными аномалиями, подтолкнули научную общественность к разработке препаратов против новых инфекционных заболеваний. Подобно борьбе с вирусом Эбола и другими вирусными инфекциями, разработка вакцин является главным приоритетом для защиты населения от вируса Зика, но в качестве варианта лечения этого заболевания также предлагаются терапевтические препараты на основе антител. Например, два антитела, выделенные от одного пациента и демонстрирующие высокую нейтрализующую активность *in vitro* против вируса Зика, обеспечивали защиту мышей от заболевания *in vivo* после контакта с вирусом. Структурные исследования показали, что Z23 и Z3L1 связываются с третичными эпитопами оболочки в доменах I, II или III, что указывает на потенциальные мишени для специфической терапии вируса Зика [38].

Клещевой энцефалит. К сентябрю 2017 года в Российской Федерации было зарегистрировано 488 тысяч обращений по поводу присасывания клещей, из которых у 1695 человек был диагностирован клещевой энцефалит (КЭ). В связи с тяжестью возможных последствий заболевания вирусом для данной инфекции, разработана вакцина и препарат человеческого иммуноглобулина. Но ввиду проблем с сырьевой базой для производства иммуноглобулина и различными рисками его введения, российскими учеными из Института химической биологии и фундаментальной медицины (ИХБФМ) СО РАН было разработано химерное антитело против КЭ, получившее название «Энцемаб», которое прошло доклинические испытания и оказалось нетоксичным, не вызвало иммунологических реакций даже в 100-кратной дозировке относительно рекомендуемой. Что важно — при введении антитела мышам не наблюдалось антителозависимого усиления инфекции (АЗУ).

Вирус денге. Денге является самым распространенным в мире инфекционным заболеванием, переносчиком которого являются комары, по разным оценкам, ежегодно вирусом денге заражается около 390 миллионов человек. Тяжелая лихорадка денге, связанная с заражением различными штаммами вируса, характеризуется высокой проницаемостью сосудов, кровотечением из слизистой оболочки и желудочно-кишечного тракта, синдромом денге шока и острой почечной недостаточностью. Тяжелые симптомы денге чаще всего проявляются после вiremии, поэтому антитела, применяемые для пассивной иммунотерапии, должны быть использованы как можно раньше до появления симптомов, чтобы избежать размножения вируса в организме. К сожалению, нет четких прогностических показателей, по которым можно было бы судить о том, как тяжело будет протекать заболевание лихорадкой денге у конкретного индивидуума. В то же время, антитела к денге при суб-нейтрализующих концентрациях могут усилить поглощение вируса денге таким образом, что у пациента резко усугубятся симптомы заболевания, вплоть до летального исхода (АЗУ) [19]. Поэтому разработка вакцин против лихорадки денге находится в центре внимания исследователей. До сих пор всего одна вакцина была одобрена для применения, CYD-TDV (Dengvaxia, Sanofi Pasteur), но она является недостаточно эффективной, так как ее применение было рекомендовано для лиц уже переболевших диким типом вируса. В связи с этим, необходимы более эффективные вакцины против денге. МкАт против лихорадки, полученные ранее, могут быть полезны при определении лучших целевых эпитопов вируса, что важно при разработке новых вакцин.

Как известно Ат против вируса денге в высокой концентрации могут усилить инфекцию (АЗУ). Следовательно, терапевтические антитела должны быть сконструированы таким образом, чтобы взаимодействие антител с FcγR рецепторами на поверхности макрофагов не происходило, таким образом предотвращая АЗУ. Например, мутация N297A в Fc-фрагменте МкАт D23-1G7C2-IgG1 была введена для уменьшения аффинности Fc-области IgG1 для рецептора FcγR, что приводило к заметному снижению АЗУ в исследованиях *in vitro* [31]. В другом исследовании для предотвращения связывания с рецепторами FcγR в область Fc-фрагмента IgG1 МкАт, нейтрализующих денге, и нацеленных на различные эпитопы четырех серотипов вируса денге, была введена мутация LALA (L234A-L235A). Вариант LALA не вызывал АЗУ и нейтрализовал вирус денге *in vitro* и *in vivo* в качестве постконтактной терапии на модели летальной инфекции мышей [8].

Вирус Западного Нила. Для терапии инфекции, вызванной вирусом Западного Нила (ВЗН), компанией MacroGenics было разработано гуманизированное антитело MGAWN1. Это МкАт нейтрализовало вирус за счет связывания с III доменом поверхностного гликопротеина. MGAWN1 было протестировано в рандомизированном, двойном слепом, плацебо-контролируемом тесте в фазе 2 клинических испытаний на пациентах старше 18 лет с признаками и симптоматикой острой нейроинвазивной формой ВЗН, а также у лиц с лабораторно подтвержденной лихорадкой, вызванной ВЗН [7].

Бешенство. Бешенство встречается во всем мире и в большинстве случаев заканчивается смертельным исходом, когда клинические симптомы заболевания уже развились. Бешенство предотвратимо, если постконтактная профилактика (ПКП) проводится до появления клинических симптомов. ПКП состоит из тщательной очистки раны с последующим немедленным введением иммуноглобулина против бешенства вместе с полным курсом вакцинации от бешенства. Было подсчитано, что из-за неграмотности населения и отсутствия иммуноглобулина против бешенства и вакцин, в мире насчитывается около 59000 смертей ежегодно от собак, зараженных вирусом бешенства, в основном это распространено в Азии и Африке. Поскольку доступ к человеческому антирабическому иммуноглобулину или лошадиной иммунной антисыворотке часто ограничен, целесообразно разрабатывать высокоактивные нейтрализующие МкАт для замены существующих иммуноглобулинов. Препарат CL184 представляет собой смесь двух человеческих МкАт: CR57 и CR4098. МкАт CR57 было выделено из В-клеток, трансформированных вирусом Эпштейна-Барр, от человека, вакцинированного инактивированным вирусом бешенства, и связывается с гликопротеином вируса. МкАт CR4098 распознает эпитоп

гликопротеина, не перекрывающийся с МкАт CR57, оно было выделено из библиотек антител, полученных на основе фагового дисплея, из мононуклеаров периферической крови людей, вакцинированных от бешенства [4]. CL184 был проверен в нескольких клинических исследованиях фазы 1/2 на безопасность и эффективность. Гуманизированное МкАт 17С7, также известное как RAB1, которое было получено от трансгенных мышей, секретирующих человеческий иммуноглобулин, является другим сильным нейтрализующим МкАт против вируса бешенства, который был протестирован в нескольких клинических испытаниях в Индии [39].

Два антитела с высокой активностью и реакцией широкого спектра действия, RVC20 и RVC58, были выделены из иммортализованных В-клеток вакцинированных доноров. RVC20 и RVC58, продемонстрировали нейтрализующую активность в отношении 35 штаммов вируса бешенства *in vitro*. Кроме того, они показали более высокую эффективность и спектр действия по сравнению с антителами, находящимися на клинических испытаниях, включая CR57, CR4098 и RAB1 [14].

В 2012 году ООО «ВНЦМДЛ» был выдан патент на гуманизированное антитело, полученное из мышинового МкАт 1С5, которое взаимодействует с гликопротеином вируса бешенства как минимум 33 штаммов, включая как вакцинный штамм Внуково-32, так и дикие штаммы, встречающиеся на территории России, а также штаммы из Центральной Европы, Украины, США и Африки. МкАт обладает вируснейтрализующей активностью порядка 10^7 LD₅₀ как по отношению к вакцинному штамму Внуково-32, так и по отношению к диким штаммам вируса, тогда как аналогичный показатель для коммерческого лошадиного иммуноглобулина составляет $6,6 \cdot 10^2$ LD₅₀. МкАт также обладает 100 % лечебным действием: мыши, зараженные летальными дозами вируса (8-10 LD₅₀), выживали без развития симптомов бешенства, если в течение 48 часов после заражения им был введен препарат на основе антитела 1С5 [1].

Перспективы

Для профилактического использования против вирусных инфекций на данный момент одобрено только одно МкАт против РСВ — Паливизумаб (Synagis). Несколько главных проблем мешают прогрессу противовирусных МкАт. Одной из ключевых является относительно небольшой рынок препаратов антител против вирусных заболеваний и потенциально более высокая стоимость производства рекомбинантных антител, по сравнению с низкомолекулярными противовирусными препаратами.

Другой важной проблемой является конкуренция МкАт с другими формами лечения и профилактики. Вакцины часто по-прежнему являются наилучшим подходом в борьбе с вирусными инфекциями, часто с выгодами пожизненного иммунитета. Даже после того, как были разработаны и доказаны эффективные методики лечения МкАт, их широкое применение может быть нецелесообразным из-за высоких затрат на производство по сравнению с другими контрамерами против заболевания. Одним из способов решения проблемы высокой стоимости терапии МкАт является снижение себестоимости продукции. Например, производство МкАт в форме одноцепочечных переменных фрагментов Ат (scFv) или Fab, или в форме верблужьих наноантител позволяет относительно недорого получать их в прокариотических системах экспрессии в большом количестве [9]. А например, массовая профилактика бешенства у животных, в частности у собак, позволит значительно снизить издержки на разработку новых препаратов от бешенства и профилактики и лечения этого заболевания у людей [40].

Третья ключевая проблема — особенности патологии, эпидемиологии и иммунологии вирусных инфекций. Зачастую особенности инфекции подсказывают стратегию терапии. Например, понятно, почему в клинических испытаниях не используются МкАт против денге и почему вакцинация является предпочтительным методом борьбы с гриппом. При лихорадке денге и гриппе симптомы часто появляются после пика виремии, поэтому антитело, применяемое для пассивной иммунотерапии, должно быть использовано до появления симптомов как можно раньше, чтобы избежать виремии. Одним из возможных решений является сочетание терапевтических антител и быстрого диагностического теста у постели больного для оказания медицинской помощи. Диагностика может быть использована как для выявления

пациентов с инфекцией, так и больных с восприимчивостью к тяжелым формам заболевания, для которых пассивная иммунотерапия препаратами антител наиболее актуальна. Наконец, вирусы могут иметь особенности, которые препятствуют использованию длительного лечения одним препаратом, например, из-за большого количества штаммов, быстрой эволюции или мутации вируса, неизученных механизмов развития инфекции и ускользания вирусов от иммунного ответа.

Как обсуждалось выше, внесение изменений в Fc-фрагмент Ат приводит к увеличению периода полувыведения терапевтических антител, например, МкАт Мотавизумаб-УТЕ к РСВ, или для предотвращения АЗУ при лечении денге за счет снижения связывания с рецептором FcγR макрофагов. Взаимодействия Fc-домена Ат с различными рецепторами предоставляют дополнительные возможности для дизайна Ат с целью оптимизации их терапевтической эффективности.

Пассивная иммунизация антителами для профилактики и лечения вирусных инфекций проста в управлении, но высокая стоимость терапии МкАт является препятствием для профилактического применения антител для ВИЧ и вируса гриппа внутри большой популяции, особенно в странах с низким уровнем жизни.

Таким образом, целый ряд разработок, а также многочисленные клинические исследования и повышенный интерес фармацевтических компаний демонстрируют широкие перспективы использования препаратов на основе МкАт для терапии и профилактики вирусных инфекций различной природы, в том числе особо опасных.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ 17-15-01525.

ЛИТЕРАТУРА

1. Беневоленский С.В., Зацепин С.С., Клячко Е.В. и др. Гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты (Fab) против вируса бешенства, изолированный фрагмент ДНК, кодирующий Fab против вируса бешенства, клетка дрожжей, трансформированная фрагментом ДНК, и способ получения Fab против вируса бешенства с использованием дрожжей. Патент RU 2440412. Опубликовано 20.01.2012.
2. Панина А.А., Деметьева И.Г., Алиев Т.К. и др. Рекомбинантные антитела к гликопротеину вируса Эбола. Acta Naturae. 2017, 9 (4):87-95.
3. Шингарова Л.Н., Тикунова Н.В., Юн Т.Э. и др. Рекомбинантная плазмидная днк pCL1, кодирующая полипептид со свойствами легкой цепи антитела человека против вируса Эбола, рекомбинантная плазмидная днк pCH1, кодирующая полипептид со свойствами тяжелой цепи указанного антитела, и их применение. Патент RU 2285043. Опубликовано: 10.10.2006.
4. Bakker A.B., Marissen W.E., Kramer R.A. et al. Novel human monoclonal antibody combination effectively neutralizing natural rabies virus variants and individual in vitro escape mutants. J. Virol. 2005, 79(14): 9062-9068.
5. Bar K.J., Sneller M.C., Harrison L.J. et al. Effect of HIV Antibody VRC01 on Viral Rebound after Treatment Interruption. N Engl J Med. 2016; 375(21): 2037-2050.
6. Baranovich T., Jones J.C., Russier M. et al. The Hemagglutinin Stem-Binding Monoclonal Antibody VIS410 Controls Influenza Virus-Induced Acute Respiratory Distress Syndrome. Antimicrob Agents Chemother. 2016, 60(4): 2118-2131.
7. Beigel J.H., Nordstrom J.L., Pillemer S.R. et al. Safety and pharmacokinetics of single intravenous dose of MGAWN1, a novel monoclonal antibody to West Nile virus. Antimicrob Agents Chemother, 2010, 54(6): 2431-2436.
8. Beltramello M., Williams K.L., Simmons C.P. et al. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. Cell Host Microbe. 2010; 8(3): 271-283.
9. Both L., Banyard A.C., van Dolleweerd C. et al. Monoclonal antibodies for prophylactic and therapeutic use against viral infections. Vaccine. 2013, 31(12): 1553-1559.
10. Broadbent L., Groves H., Shields M.D. et al. Respiratory syncytial virus, an ongoing medical dilemma: an expert commentary on respiratory syncytial virus prophylactic and therapeutic pharmaceuticals currently in clinical trials. Influenza Other Respir. Viruses. 2015, 9(4): 169-178.
11. Carbonell-Estrany X., Simxes E.A., Dagan R. et al. Motavizumab for prophylaxis of respiratory syncytial virus in high-risk children: a noninferiority trial. Pediatrics. 2010, 125(1): e35-51.
12. Cheung W.C., Beausoleil S.A., Zhang X. et al. A proteomics approach for the identification and cloning of monoclonal antibodies from serum. Nat Biotechnol. 2012,30(5): 447-452.
13. Chung R.T., Gordon F.D., Curry M.P., et al. Human Monoclonal Antibody MBL-HCV1 Delays HCV Viral Rebound Following Liver Transplantation: A Randomized Controlled Study. Am. J. Transplant. 2013, 13(4): 1047-1054.

14. De Benedictis P., Minola A., Rota Nodari E. et al. Development of broad-spectrum human monoclonal antibodies for rabies post-exposure prophylaxis. *EMBO Mol. Med.* 2016, 8(4): 407-421.
15. Deng R., Lee A.P., Maia M. et al. Pharmacokinetics of MHAA4549A, an Anti-Influenza A Monoclonal Antibody, in Healthy Subjects Challenged with Influenza A Virus in a Phase IIa Randomized Trial. *Clin. Pharmacokinet.* 2018, 57(3): 367-377.
16. Dole K., Segal F.P., Feire A. et al. A First-in-Human Study To Assess the Safety and Pharmacokinetics of Monoclonal Antibodies against Human Cytomegalovirus in Healthy Volunteers. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2016, 60(5): 2881-2887.
17. Domachowske J.B., Khan A.A., Esser M.T. et al. Safety, Tolerability and Pharmacokinetics of MEDI8897, an Extended Half-life Single-dose Respiratory Syncytial Virus Prefusion F-targeting Monoclonal Antibody Administered as a Single Dose to Healthy Preterm Infants. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 2018, 37(9): 886-892.
18. Ekiert D.C., Bhabha G., Elsliger M.A. et al. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science.* 2009, 324(5924): 246-251.
19. Fibriansah G., Lok S.M. The development of therapeutic antibodies against dengue virus. *Antiviral. Res.* 2016, 128: 7-19.
20. Ishida J.H., Burgess T., Derby M.A. et al. Phase 1 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of RG7667, an Anticytomegalovirus Combination Monoclonal Antibody Therapy, in Healthy Adults. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2015, 59(8): 4919-4929.
21. Ishida J.H., Patel A., Mehta A.K. et al. Phase 2 Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial of RG7667, a Combination Monoclonal Antibody, for Prevention of Cytomegalovirus Infection in High-Risk Kidney Transplant Recipients. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2017, 61(2): e01794-16.
22. Jacobson J.M., Lalezari J.P., Thompson M.A. et al. Phase 2a study of the CCR5 monoclonal antibody PRO 140 administered intravenously to HIV-infected adults. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2010, 54(10): 4137-4142.
23. Klein F., Mouquet H., Dosenovic P. et al. Antibodies in HIV-1 vaccine development and therapy. *Science.* 2013, 341(6151): 1199-1204.
24. McDaniel J.R., DeKosky B.J., Tanno H. et al. Ultra-high-throughput sequencing of the immune receptor repertoire from millions of lymphocytes. *Nat Protoc.* 2016;11(3): 429-442.
25. Mejias A., Ramilo O. New options in the treatment of respiratory syncytial virus disease. *J Infect.* 2015; 71 Suppl 1: S80-87.
26. Mire C.E., Geisbert J.B., Borisevich V. et al. Therapeutic treatment of Marburg and Ravn virus infection in nonhuman primates with a human monoclonal antibody. *Sci. Transl. Med.* 2017, 9(384).
27. Ohlin M., Söderberg-Nauclér C. Human antibody technology and the development of antibodies against cytomegalovirus. *Mol. Immunol.* 2015, 67(2 Pt A): 153-170.
28. Pace C.S., Song R., Ochsenauber C. et al. Bispecific antibodies directed to CD4 domain 2 and HIV envelope exhibit exceptional breadth and picomolar potency against HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013, 110(33): 13540-13545.
29. Patel H.D., Nikitin P., Gesner T. et al. In Vitro Characterization of Human Cytomegalovirus-Targeting Therapeutic Monoclonal Antibodies LJP538 and LJP539. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2016, 60(8): 4961-4971.
30. Qiu X., Wong G., Audet J. et al. Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp. *Nature.* 2014, 514(7520): 47-53.
31. Ramadhany R., Hirai I., Sasaki T. et al. Antibody with an engineered Fc region as a therapeutic agent against dengue virus infection. *Antiviral Res.* 2015, 124: 61-68.
32. Ramos E.L., Mitcham J.L., Koller T.D. et al. Efficacy and safety of treatment with an anti-m2e monoclonal antibody in experimental human influenza. *J. Infect. Dis.* 2015, 211(7): 1038-1044.
33. Robbie G.J., Criste R., Dall'acqua W.F. et al. A novel investigational Fc-modified humanized monoclonal antibody, motavizumab-YTE, has an extended half-life in healthy adults. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2013, 57(12): 6147-6153.
34. Schoofs T., Klein F., Braunschweig M. et al. HIV-1 therapy with monoclonal antibody 3BNC117 elicits host immune responses against HIV-1. *Science.* 2016, 352(6288): 997-1001.
35. Shingai M., Nishimura Y., Klein F. et al. Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature.* 2013; 503(7475): 277-280.
36. Tharakaraman K., Subramanian V., Cain D. et al. Broadly neutralizing influenza hemagglutinin stem-specific antibody CR8020 targets residues that are prone to escape due to host selection pressure. *Cell. Host. Microbe.* 2014, 15(5): 644-651.
37. Therapeutic monoclonal antibodies: from the bench to the clinic. [Edited by] Zhiqiang An. 2009 John Wiley & Sons, Inc.: 189-307.
38. Wang Q., Yang H., Liu X. et al. Molecular determinants of human neutralizing antibodies isolated from a patient infected with Zika virus. *Sci. Transl. Med.* 2016, 8(369): 369ra179.
39. Wang Y., Rowley K.J., Booth B.J. et al. G glycoprotein amino acid residues required for human monoclonal antibody RAB1 neutralization are conserved in rabies virus street isolates. *Antiviral. Res.* 2011, 91(2): 187-194.
40. Welburn S.C., Coleman P.G., Zinsstag J. Rabies Control: Could Innovative Financing Break the Deadlock? *Front. Vet. Sci.* 2017, 4: 32.