

Ochrana před chřipkou je vyřešena?

1. Damian C. Ekiert, Robert H. E. Nielsen, Gira Bhabha a ost. : **A Highly Conserved Neutralizing Epitope on Group 2 Influenza A Viruses.** SCIENCE, Vol. 333, 12 August 2011, s. 843 – 850.
2. Davide Corti, Jarrod Voss, Steven J. Gamblin a ost. : **A Neutralizing Antipody Selected from Plasma Cells That Binds to Group 1 and Group 2 Influenza A Hemagglutinins.** SCIENCE, Vol. 333, 12 August 2011, s. 850 – 855.

Zpracoval a silně zkrátil MUDr. Vladimír Plesník

Souhrn:

Současné chřipkové vakcíny poskytují jen omezenou ochranu proti sezónním kmenům chřipkových virů. Identifikace protilátek V_H1-69, které neutralizují téměř všechny viry skupiny 1 chřipky A představuje převrat v problematice chřipky. V první práci je zpráva o izolaci a charakteristice lidské monoklonální protilátky CR8020, mající širokou neutralizační aktivitu proti většině virů skupiny 2, včetně H3N2 a H7N7, která působí závažná onemocnění lidí. Krystalická struktura Fab CR8020 hemagglutininu pandemického (1968) kmene vykazuje vysoce konzervativní epitop tyčinky hemagglutininu, který rozpoznává skupina 1 protilátek V_H1-69. Takže směs dvou protilátek by mohla stačit k neutralizaci většiny subtypů chřipky A a umožnit vývoj univerzální chřipkové vakcíny i léčby širokospektrými protilátkami. Autoři druhé práce metodou jednobuněčné kultivace vyšetřili velký počet plasmocytů a izolovali neutralizační monoklonální protilátky, které rozpoznávaly glykoprotein hemagglutininu všech 16 subtypů a neutralizovaly viry chřipky A skupiny 1 i 2.. Aplikace těchto protilátek laboratorním myším a fretkám vedla k jejich ochraně. Pro široký specifický účinek a schopnost neutralizace mohou být užívány k pasivní imunizaci a jako cíl pro vývoj nových vakcín.

Chřipkové viry vyvolávají každý rok miliony závažných onemocnění, tisíce úmrtí a velké ekonomické ztráty. Dnes se proti chřipce využívají dvě hlavní opatření. Jednak jsou to antivirotika, mezi něž patří inhibitory virového enzymu neuraminidázy, glykoproteinu v obalu viru chřipky (zanamivir, oseltamivir) a inhibitory průniku iontů kanálem v proteinu M2 (amantadin, rimantadin). Tyto široce užívané preparáty jsou poměrně účinné vůči na ně citlivým kmenům viru. Bohužel účinek antivirotik klesá následkem vzniku resistance u mutovaných kmenů chřipkového viru. Druhé hlavní opatření je preventivní vakcinace. Současné vakcíny jsou založeny na tom, že inaktivované viry navozují účinnou imunitní odpověď proti virům blízce příbuzným vakcinálnímu kmenu. Je však těžké každý rok předvídat které kmény budou převážně cirkulovat. Očkování vakcínou s neaktuálním kmenem viru má jen malý, nebo žádný ochranný efekt. Velký pokrok proto představuje vakcína, která by stimulovala mohutnou tvorbu širokého spektra neutralizačních protilátek.

Hemaglutinin (**HA**) je hlavní glykoprotein v obalu virů chřipky, na který jsou zaměřeny téměř všechny neutralizační protilátky. HA se neustále následkem selekčního tlaku protilátek pozměňuje. Geneticky rozlišujeme u chřipky A 16 subtypů HA, zařazených do dvou skupin. Protilátky vzniklé po očkování, nebo po infekci, primárně neutralizují homologní kmeny ze stejné skupiny, proto je třeba každý rok mít nové vakcíny proti očekávaným kmenům chřipky A.

Od očkováných myší, ze sbírky fágů a z plasmocytů a paměťových B buněk imunních osob se podařilo izolovat protilátky schopné neutralizace mnoha subtypů HA skupiny 1 a/nebo 2. Navíc byly od očkováných myší izolovány specifické protilátky proti hlavičce HA, které zkříženě reagují s některými subtypy virů skupiny 1 i skupiny 2. Dosud však nebyly nalezeny neutralizační protilátky zaměřené na neměnicí se („konzervativní“) epitopy všech 16 subtypů chřipkových virů obou uvedených skupin. Jejich izolace je nadále hlavním cílem pro využití při terapii a pro vývoj vakcín.

Plasmocyty z krve odebrané po týdnu od očkování, nebo od nákazy, jsou převážně antigen-specifické a proto mohou obsahovat širokou škálu protilátek. Protilátky neutralizující všechny viry chřipky A mohou být extrémně vzácné, proto autoři vyvinuli důmyslnou metodu ke kultivaci velkého počtu lidských plasmocytů. Izolovali plasmocyty dárců vybraných na základě předchozího zjištění, že produkují krátce po přirozené infekci chřipkou A, nebo po očkování, velké množství heterosubtypových protilátek. Celkem vyšetřili od osmi dárců 104 000 plasmatických buněk. Od jednoho z nich asi po týdnu od infekce H1N1 virem prasečí chřipky v listopadu 2009 a za 7 dnů po očkování sezónní chřipkovou vakcínou v lednu 2010 izolovali z odebraného vzorku krve plasmocyty. Po infekci virem prasečí chřipky H1N1 velká většina plasmocytů (89,7 %), produkovala specifické protilátky vůči HA tohoto viru (A/California/04/09) a proti HA viru H5 A/Vietnam/1203/04. To svědčilo o tom, že infekce virem prasečí chřipky bústrovala rychlou odpověď zkříženě reagujících paměťových B buněk. Jen málo těchto protilátek také zkříženě reagovalo s H7 hemaglutininem. Odpověď tohoto dárce na aplikaci sezónní chřipkové vakcíny, která obsahovala antigeny H1, H3 a chřipky B, směřovala převážně (98.2 %) na vakcinální antigeny, v souladu se silnou reakcí subtypově specifických paměťových B buněk. Malá část protilátek však reagovala také proti H5 a H7 hemaglutininům. Tyto nálezy ukazují, že jak po přirozené nákaze, tak po očkování, lze ojediněle získat protilátky proti hemaglutininům chřipkových virů skupiny 1 a 2.

Sekvence proměnlivých regionů těžkého polypeptidového řetězce (*heavy chain* – V_h) a lehkého kappa řetězce (*kappa light chain* - V_k) imunoglobulinu, získaného ze čtyř plasmocytů produkujících zkříženě reagující protilátky H1/H5/H7 byly shodné. Kódovaly protilátku pojmenovanou FI6. Její geny pro V_h a V_k klonovali a získali z transgenních buněk rekombinované protilátky. Po purifikaci byla testována jejich vazební a neutralizační aktivita vůči řadě HA a

virů různých subtypů. Protilátky FI6 vážaly všechny rekombinantní nebo purifikované hemaglutininy chřipkových virů skupiny 1 (H1, H2, H5, H6, H8 a H9) i virů skupiny 2 (H3, H4, H7 a H10). Neutralizovaly také pseudoviry a viry skupiny 1 (H1 a H5) a skupiny 2 (H3 a H7), včetně izolátu „Španělské chřipku 1918“. Ze spektra FI6 protilátek vybrali variantu FI6v3, stabilní vůči mutacím a mající in vitro vazební a neutralizační aktivitu srovnatelnou s původní FI6.

Výsledky této výzkumné práce ukázaly užitečnost metody kultivace jednotlivých plasmocytů. Metoda umožnila vyzkoušení tisíců plasmocytů a vedla k izolaci vzácně se vyskytujících neutralizačních protilátek proti všem virům A chřipky. Raritu těchto protilátek dokazuje fakt, že při vyšetření plasmocytů izolovaných od sedmi zbylých dárců, našli několik protilátek, které se sice vážaly na HA virů skupiny 1 a 2, ale nebyly schopné neutralizovat jejich infekciozitu.

Důsledky pro terapii a prevenci chřipky

Viry chřipky A vyvolávající onemocnění lidí pochází jak z 1. skupiny (H1N1 a H2N2), tak ze 2. skupiny (H3N2) virů. Navíc viry chřipky zvířat z obou skupin sporadicky infikují i lidi a mohou vyvolat budoucí pandemie (např. H5N1 a H9N2 ze skupiny 1 a H7N7 ze skupiny 2). To znamená, že ideálně by měla univerzální terapie chránit před oběma skupinami virů chřipky a před chřipkou B. Pokusy o izolaci neutralizačních protilátek působících proti 2. skupině virů chřipky zvířat zpravidla vedly k nálezům protilátek, které měly jen slabý, nebo jen na některé kmeny omezený účinek. Směs nově objevených protilátek, jako jsou CR6261 a CR8020, může chránit prakticky proti všem virům chřipky A, působícím onemocnění lidí. Tato směs protilátek by nepochybně mohla být velmi potřebná pro vysoce ohrožené osoby, např. pro seniory a imunokompromitované osoby, a při závažném, život ohrožujícím průběhu chřipky. Tyto protilátky také představují ideální imunologické řešení chřipkové infekce a mohou být užity jako vzor pro vývoj vakcín, majících vyvolat širokou a dlouhotrvající imunitu. Identifikace a charakterizace CR6261-podobných protilátek představuje mimořádnou příležitost jak jejich průkazu u některých osob, tak vývoje očkovací strategie, která u myší, fretek a opic velmi spolehlivě navozuje vznik protilátek proti vlákně hemaglutininu. Dále identifikace a charakterizace CR8020 by mohla vést ke stejnému pokroku prevence nálezů vyvolávaných viry 2. skupiny. To by byl další krok k získání univerzální vakcíny proti chřipce.

Poznámka:

Hledání ochrany před chřipkou a virovými ARI zabíralo největší část mé profesní snahy. Povedou-li uvedené práce ke kýženému úspěchu boje s chřipkou, mohu skončit. A ještě : obdobný metodický postup je testován také při hledání ochrany před infekcí HIV (viz SCIENCE, srpen 2011).