

ИНТРАНАЗАЛЬНАЯ ИММУНИЗАЦИЯ РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ НА ОСНОВЕ M2e-ПЕПТИДА И ФРАГМЕНТА ВТОРОЙ СУБЪЕДИНИЦЫ ГЕМАГГЛЮТИНИНА ВИРУСОВ ГРИППА А ИНДУЦИРУЕТ КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫЙ ГУМОРАЛЬНЫЙ И Т-КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ У МЫШЕЙ

Шуклина М.А., Степанова Л.А., Ковалева А.А., Коротков А.В., Шалджян А.А., Зайцева М.В., Елецкая Е.И., Цыбалова Л.М.

ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородиной» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Создание вакцин с широким спектром защиты является одной из приоритетных задач в области профилактики гриппа. В последнее время интерес исследователей вызывают консервативные фрагменты белков вируса гриппа (M1, M2, NP, вторая субъединица гемагглютинина HA2) как объект разработки рекомбинантных вакцин широкого спектра действия. Сложность в разработке вакцин на основе таких фрагментов заключается в их низкой иммуногенности. Однако присоединение слабоиммуногенных антигенов к белку-носителю позволяет значительно усилить их иммуногенность. Был разработан кандидатный вакцинный белок Flg-HA2-2-4M2e, содержащий два высококонсервативных вирусных антигена (эктодомен белка M2 – M2e и участок 76-130 второй субъединицы HA2), слитых с белком-носителем флагеллином. Флагеллин – белок жгутиков бактерий, является естественным лигандом Toll-подобного рецептора 5 (TLR-5) и обладает сильной адъювантной активностью при различных способах введения. Цель настоящего исследования состояла в оценке формирования гуморального и Т-клеточного иммунного ответа и широты протективного действия кандидатного вакцинного белка Flg-HA2-2-4M2e при введении мышам. Мышей иммунизировали трехкратно интраназально с двухнедельными интервалами. Через две недели после последней иммунизации животных заражали летальной дозой (5 LD₅₀) вирусов, относящихся к обеим филогенетическим группам (A/California/07/09 (H1N1)pdm09 или A/Shanghai/2/2013 (H7N9)). Полученные результаты показали формирование выраженного M2e-специфического гуморального ответа (сывороточных IgG и IgA) у иммунизированных мышей. Иммунизация приводила также к формированию M2e- и вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток в легких, которые продуцировали TNFα и IFNγ. Выявлено формирование антиген-специфических эффекторных и центральных Т-клеток памяти в легких мышей опытной группы. Формирование кросс-протективного защитного иммунитета у иммунизированных

Адрес для переписки:

Шуклина Марина Александровна
ФГБУ «Научно-исследовательский институт
гриппа имени А.А. Смородиной» Министерства
здравоохранения РФ
195030, Россия, Санкт-Петербург, пр. Энтузиастов,
46, корп. 1, кв. 313.
Тел.: 8 (812) 526-72-25.
E-mail: ma.shuklina@yandex.ru

Address for correspondence:

Shuklina Marina A.
Smorodintsev Research Institute of Influenza,
Ministry of Health of the Russian Federation
195030, Russian Federation, St. Petersburg, Enthusiasts ave.,
46, bldg 1, apt 313.
Phone: 7 (812) 526-72-25.
E-mail: ma.shuklina@yandex.ru

Образец цитирования:

М.А. Шуклина, Л.А. Степанова, А.А. Ковалева, А.В. Коротков, А.А. Шалджян, М.В. Зайцева, Е.И. Елецкая, Л.М. Цыбалова «Интраназальная иммунизация рекомбинантным белком на основе M2e-пептида и фрагмента второй субъединицы гемагглютинина вирусов гриппа А индуцирует кросс-протективный гуморальный и Т-клеточный ответ у мышей» // Медицинская иммунология, 2020. Т. 22, № 2. С. 357-370. doi: 10.15789/1563-0625-IIW-1584
© Шуклина М.А. и соавт., 2020

For citation:

M.A. Shuklina, L.A. Stepanova, A.A. Kovaleva, A.V. Korotkov, A.A. Shaldzhyan, M.V. Zaitseva, E.I. Eletsckaya, L.M. Tsybalova "Intranasal immunization with a recombinant protein based on the M2e peptide and second subunit of influenza A viral hemagglutinin fragment induces a cross-protective humoral and T cell response in mice", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2020, Vol. 22, no. 2, pp. 357-370. doi: 10.15789/1563-0625-IIW-1584
DOI: 10.15789/1563-0625-IIW-1584

мышей было продемонстрировано на модели летальной гриппозной инфекции. Опытные животные были практически полностью защищены (90-100% выживаемость) от высокой дозы пандемического вируса A/H1N1pdm09 и высокопатогенного вируса гриппа птиц A/H7N9. Второй задачей была оценка иммунного ответа на сублетальную инфекцию вирусом гриппа у иммунизированных животных. Мыши контрольной и опытной групп были инфицированы дозой MID₁₀₀ вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Было показано, что у иммунизированных мышей, по сравнению с контрольными, в ответ на сублетальное инфицирование изменился профиль иммунного ответа иммуноглобулинами – в 10 раз увеличилась доля IgG2a, более оптимальных в защите от инфекции. Полученные результаты показали, что рекомбинантный белок Flg-HA2-2-4M2e является перспективным кандидатом для разработки универсальной вакцины нового поколения, формирующий протективный гуморальный и Т-клеточный ответ на консервативные вирусные эпитопы и защищающий от вирусов гриппа А обеих филогенетических групп.

Ключевые слова: вирус гриппа, рекомбинантная вакцина, эктодомен белка M2, HA2, иммунный ответ, гемагглютинин

INTRANASAL IMMUNIZATION WITH A RECOMBINANT PROTEIN BASED ON THE M2e PEPTIDE AND SECOND SUBUNIT OF INFLUENZA A VIRAL HEMAGGLUTININ FRAGMENT INDUCES A CROSS-PROTECTIVE HUMORAL AND T CELL RESPONSE IN MICE

Shuklina M.A., Stepanova L.A., Kovaleva A.A., Korotkov A.V., Shaldzhyan A.A., Zaitseva M.V., Eletskaia E.I., Tsybalova L.M.

Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Development of vaccines with a broad-spectrum of protection is one of the priorities in the programs of influenza prevention. Recently, the conserved fragments of influenza virus proteins (M1, M2, NP, the second subunit of the hemagglutinin HA2) provoke interest of investigators as the object of the development a broad-spectrum vaccines. Low immunogenicity present a problem when developing vaccines based on such conserved fragments. However, fusion of low immunogenic antigens into the high immunogenic carrier protein may significantly enhance their immunogenicity. The candidate vaccine protein Flg-HA2-2-4M2e was developed which contains two highly conserved viral antigens (the ectodomain of the M2 protein (M2e), 76-130 region of the second subunit of HA2), fused with flagellin as a carrier protein. Flagellin (bacterial flagella protein) is a natural ligand of TLR-5, and has a strong adjuvant activity at different ways of its administration. The purpose of this study was to assess development of humoral and T cell immune response, along with broad-spectrum protection after mice immunization with the candidate Flg-HA2-2-4M2e vaccine protein. Mice were immunized intranasally three times with two-week intervals. Two weeks after the final immunization, the mice were challenged at the 5 LD₅₀ dose with influenza viruses A/California/07/09 (H1N1) pdm09 (phylogenetic group I), or A/Shanghai/2/2013 (H7N9) (phylogenetic group II). The results obtained in this study showed induction of strong M2e-specific humoral response (serum IgG and A) in the immunized mice. Immunization with recombinant protein stimulated formation of M2e-specific and virus-specific CD4⁺ and CD8⁺T cells in lung which produced TNF α or IFN γ . Production of antigen-specific effector and central memory T cells was also detected in lungs of immunized mice. The formation of cross-protective immunity in immunized mice was demonstrated in a model of lethal influenza infection. The experimental animals were almost completely protected from the high dose of the pandemic virus A/H1N1pdm09, and highly pathogenic avian influenza A/H7N9 (90-100% survival). We also evaluated the changes of antigen-specific immune response in immunized mice after sublethal infection with A/H3N2 influenza virus. Mice of control and experimental groups were infected with MID₁₀₀ of influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2). It was shown that the M2e-specific response (IgG, IgA) was significantly increased in immunized mice after sublethal infection with influenza virus A/H3N2, and we detected the changes in profile of M2e-specific IgG subclasses. Following sublethal infection

in immunized mice, the proportion of M2e-specific IgG2a was increased 10-fold. The results showed that the recombinant protein Flg-NA2-2-4M2e is a promising candidate for development of universal vaccines, which induces a protective humoral and T-cell response to conserved viral epitopes and protects against influenza A viruses of both phylogenetic groups.

Keywords: influenza virus, recombinant vaccine, M2e ectodomain, NA2, immune response, hemagglutinin

Введение

Наиболее эффективным способом предупреждения гриппозной инфекции является вакцинопрофилактика. Эффективность применяемых в настоящее время гриппозных вакцин определяется способностью к формированию нейтрализующих антител к поверхностным гликопротеинам вируса гриппа: гемагглютинину (НА) и нейраминидазе (НА), которые обеспечивают полную защиту против инфекции штаммом вируса гриппа, аналогичным вакцинному. Однако варианты вирусов гриппа с мутациями в антигенных сайтах легко избегают нейтрализации существующими антителами хозяина, приводя к ежегодным вспышкам и эпидемиям гриппа. Несмотря на глобальный мониторинг антигенной изменчивости вирусов гриппа, проводимый Национальными центрами ВОЗ, нацеленный на выбор вакцинных штаммов, последние нередко не совпадают с циркулирующими штаммами, что снижает эпидемиологическую эффективность вакцинации традиционными живыми или инактивированными вакцинами. Двумя главными факторами, которые снижают ценность традиционных вакцин, являются необходимость ежегодного обновления вакцинных штаммов и длительный период, который требуется для наработки вакцин к эпидемическому сезону. В связи с этим создание вакцин с широким спектром защиты и коротким периодом производства является одной из приоритетных задач в области профилактики гриппа.

Консервативные белки вируса гриппа (M1, M2, NP, вторая субъединица гемагглютиниона НА2) вызывают интерес исследователей как объект разработки рекомбинантных вакцин, которые могут обеспечить иммунитет против широкого спектра вирусов гриппа типа А, в том числе пандемических.

На сегодняшний день разработан ряд кандидатных вакцин на основе эктодомена белка M2 (M2e) и показана их способность индуцировать выраженный M2e-специфический гуморальный ответ и обеспечивать защиту экспериментальных животных от заражения вирусами гриппа А [21, 26, 34, 37, 40]. Показана безопасность и иммуногенность таких вакцин у человека [34, 39, 41]. Другой перспективный целевой антиген для разработки вакцины – консервативные

участки второй субъединицы гемагглютиниона НА2. Был выделен ряд моноклональных антител (от мышей, человека), которые реагируют с эпитопами, локализованными в стеблевой части гемагглютиниона (НА2). Такие антитела являются кросс-реактивными и обладают нейтрализующим эффектом в пределах филогенетической группы [11, 42, 45]. Показано, что кандидатные вакцины на основе НА2 способны индуцировать гуморальный и Т-клеточный ответ у мышей и обеспечивать защиту от гомологичных и гетерологичных вирусов одной филогенетической группы [2, 5, 15, 36, 43]. Однако сами по себе консервативные участки вирусных белков являются слабоиммуногенными пептидами [14, 24, 25], что преодолевается использованием адъювантов [35, 46], высокоиммуногенных носителей [4, 10, 22, 23, 29, 31], увеличением числа копий пептида, слитого с носителем.

Одним из таких белков-носителей для слабоиммуногенных антигенов является белок жгутиков бактерий – флагеллин. Он является естественным лигандом Toll-подобного рецептора 5 (TLR-5). Флагеллин обладает сильной адъювантной активностью при различных способах введения (парентеральный, подкожный, мукозальный) [3, 20]. Способность флагеллина служить одновременно белком-носителем и адъювантом при разработке вакцин показана на различных моделях инфекционных заболеваний, включая грипп [21, 28].

Цель настоящего исследования состояла в оценке формирования гуморального и Т-клеточного иммунного ответа и широты протективного действия кандидатного вакцинного белка Flg-NA2-2-4M2e, содержащего два высококонсервативных вирусных антигена (M2e и НА2) при интраназальном введении мышам.

Материалы и методы

Рекомбинантный белок

Конструирование, экспрессия и очистка рекомбинантного белка Flg-NA2-2-4M2e были описаны нами ранее [38]. Был создан химерный ген, кодирующий гибридный белок Flg-NA2-2-4M2e. Схема рекомбинантного белка Flg-NA2-2-4M2e представлена на рисунке 1. Белок Flg-NA2-2-4M2e содержит последовательность флагеллина, к которой на С-конце присоединен фрагмент

второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа второй филогенетической группы, за которым следуют 4 копии M2e (M2h-M2s-M2h-M2s). Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. Нуклеотидная последовательность, кодирующая гибридный белок Flg-HA2-2-4M2e, была клонирована в вектор pQE30 и экспрессирована в штамме *E. coli* DLT1270.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ)

SDS-ПААГ электрофорез в восстанавливающих условиях проводили по стандартной методике [27]. Электрофорез проводили при 12 мА до достижения фронта красителя (бромфенолового синего) нижнего края геля. Гель окрашивали в растворе Кумасси G-250 в течение ночи при качении. После окрашивания гель отмывали в бидистиллированной воде. Гель документировали при помощи системы ChemiDoc MP System (Bio-Rad, США).

Вестерн-блот

Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). Затем мембрану блокировали в 3% растворе БСА (бычий сывороточный альбумин) в течение ночи при комнатной температуре. Белки определяли окрашиванием мембраны мышинными моноклональными антителами к белку M2 вируса гриппа А (14C2, ab5416: Abscam, Великобритания) в разведении 1:16000 и кроличьими поликлональными антителами к флагеллину (ab93713, Abscam, Великобритания) в разведении 1:8000. Мембрану инкубировали 1 ч при комнатной температуре с антителами, разведенными в PBS с 0,1% твин 20 (PBS-T) и 3% БСА, затем отмывали в PBS-T. Белок определяли окрашиванием мембраны в течение 1 ч при комнатной температуре козьими антимышиными или антикроличьими IgG, меченными пероксидазой хрена (Abscam, Великобритания) в разведении 1:2000 и последующей инкубацией 5 мин в ТМВ (тетраметилбензидин) Immublot solution (Invitrogen, США).

Лабораторные животные

В исследовании были использованы линейные мыши (самки) Balb/c массой 16-18 г (возраст 6-8 недель), полученные из сертифицированного питомника Столбовая ГУ «Научный центр биоме-

дицинских технологий РАН». Животных содержали в виварии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России в соответствии с действующими правилами. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, изложенным в ГОСТ 33215-2014 Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Протокол опыта был утвержден Комиссией по биоэтике ФГБУ «НИИ гриппа».

Иммунизация

Мышей иммунизировали интраназально (и/н) рекомбинантным белком в дозе 10 мкг/0,02 мл трехкратно с интервалом 2 недели. Иммунизацию проводили после ингаляционной анестезии смесью 2-3% изофлюран, 30% O₂, 70% N₂O. Контрольным мышам вводили и/н 0,02 мл PBS.

Получение сывороток крови

Образцы крови получали от пяти мышей каждой группы через 2 недели после третьей иммунизации, после эвтаназии в CO₂-камере (VetTech Solutions, Великобритания). Для получения сыворотки кровь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С. После образования сгустков крови образцы помещали на поверхность льда и охлаждали в течение 1 ч с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 400 g. Аликвоты сыворотки крови (по 30 мкл) замораживали при температуре -20 °С.

Получение суспензии клеток легких

Мышечные легкие удаляли асептически и помещали в эппендорф со средой RPMI-1640, содержащей 0,5 мг/мл коллагеназы (Sigma, C2674) и 25 мкг/мл ДНКазы (Sigma, D4263). Легкие гомогенизировали с использованием TissueLyser II, помещали в термощейкер (45 мин, 37 °С) и избавлялись от дебриса путем фильтрации (syringe filters с диаметром пор 70 мкм, BD Biosciences, США). Эритроциты лизировали АСК буфером (0,15M NH₄Cl, 1,0M KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2-7,4) и отмывали спленоциты полной средой RPMI-1640 с 10% ЭТС, 2 mM L-глутамина, 100 IU/ml пенициллина, 100 mg/ml стрептомицина. Концентрацию клеток доводили до 5 × 10⁶ кл/мл.

Иммуноферментный анализ

Сыворотки исследовали в ИФА с использованием 96-луночных планшетов (Greiner, Германия). Титры антител определяли индивиду-

Flg-HA2-2-4M2ehs:

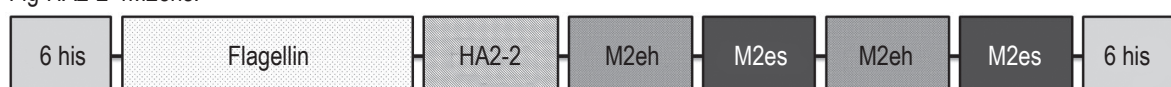


Рисунок 1. Схема рекомбинантного белка Flg-HA2-2-4M2e

Figure 1. Scheme of Flg-HA2-2-4M2e recombinant protein

ально у 5 мышей каждой группы. В качестве твердой фазы использовали синтетический пептид M2e (5 мкг/мл), синтезированный в «НПО Верта» (Санкт-Петербург), а также вирусы A/Shanghai/2/2013 (H7N9) и A/California/07/09 (H1N1) (2 мкг/мл). Использовали поликлональные овечьи антимышинные IgG, IgA (Abcam, Великобритания) меченые пероксидазой хрена. В качестве субстрата использовали ТМБ (тетраметилбензидин) (BD Bioscience) – инкубация 15 мин. Учет реакции проводили при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность, по крайней мере в 2 раза больше, чем бланк.

Мультипараметрическая проточная цитометрия

Мультипараметрическую проточную цитометрию выполняли в соответствии с протоколом BD Pharmingen™. Определяли способность исследуемого рекомбинантного белка индуцировать в легких образование специфических CD4⁺ и CD8⁺T-лимфоцитов, продуцирующих цитокины. Клетки легких стимулировали (в течение 6 ч при 37 °С) 10 мкг пептида M2e (G-37) или 1 мкг вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в присутствии брэфелдина А (1 мкг/мл) (BD Bioscience, США). Клетки отмывали полной средой RPMI, Fc-рецепторы блокировали антителами CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, BD Pharmingen, США), затем инкубировали с Zombie Aqua (Zombie Aqua Fixable Viability Kit, Biolegend, США) для выявления живых клеток и окрашивали CD3a-FITC, CD4 PerCP, CD8-APC-Cy7, CD62L-PE-Cy7, CD44-APC (BD Pharmingen, США) при +2 – +8 °С в течение 30 мин. Затем клетки пермеабелизировали в соответствии с Протоколом тест-системы Cytotfix/Сytoperm Plus (BD Bioscience, США) и окрашивали TNFα-BV421, IFNγ-PE (BD Pharmingen, США). Сбор данных (собирали 100 000 живых CD3⁺ лимфоцитов) выполняли на проточном цитометре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Данные анализировали в программном пакете Kaluza версия 1.5a (Beckman Coulter, США).

Вирусы и заражение мышей

На 14-й день после последней иммунизации мышей Balb/c (по 10 мышей в опытных и контрольных группах) заражали адаптированными к мышам вирусами гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09 и A/Shanghai/2/2013 (H7N9) в дозе 5LD50, а также сублетальной дозой (MID100) вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2). Вирусы получены из Коллекции вирусов гриппа и ОРЗ ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Вирус вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии. В качестве отрицательного контроля

в эксперименте использовали мышей, которым вводили PBS. После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными. Протективное действие рекомбинантных белков оценивали по динамике падения массы тела, выживаемости мышей после заражения. В течение этого периода времени ежедневно (в одно и то же время) регистрировали гибель животных в опытных и контрольных группах, измеряли массу тела животных.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Для постановки РТГА сыворотку, предварительно обработанную RDE и разведенную PBS, вносили в первый ряд 96-луночного микропланшета для иммунологических реакций с U-образными лунками. Далее готовили ряд последовательных двукратных разведений сыворотки на физиологическом растворе в объеме 50 мкл и добавляли по 50 мкл вируса в стандартной концентрации 4 ГАЕ/50 мкл. Планшет инкубировали 1 час при комнатной температуре, после чего во все лунки вносили по 100 мкл 0,5% взвеси эритроцитов. Через 30 минут проводили учет результатов реакции. Титр антигеммагглютинирующих антител выражали как величину, обратную наибольшему заведению сыворотки, при котором наблюдалось торможение агглютинации.

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism v. 6.0. Статистическую значимость различий титров антител и антиген-специфических Т-клеток оценивали с использованием t-критерия Стьюдента, при сравнении показателей выживаемости применяли критерий Мантеля–Кокса. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

При разработке кандидатной вакцины широкого спектра действия против вирусов гриппа А в качестве целевых антигенов были выбраны консервативные фрагменты M2 белка и NA2 вирусов гриппа А: консенсусная последовательность M2e-вирусов гриппа А человека (M2eh); M2e пандемического штамма A/California/07/09 H1N1pdm09 (M2es); консенсусная последовательность NA2 (76-130) вирусов гриппа А второй филогенетической группы (NA2-2) (табл. 1). Аминокислотная последовательность M2e пандемического вируса гриппа (M2es) A/California/07/09 H1N1pdm09 по сравнению с консенсусной последовательностью M2e-вирусов гриппа А человека (M2eh) отличается в 4 положениях 11, 13, 16 и 20 (табл. 1). Предполагалось, что введение в состав рекомбинантного белка двух различных по аминокислотному составу последовательностей M2e позволит расширить спектр защит-

ного действия кандидатной вакцины, включая высокопатогенные штаммы вирусов гриппа субтипа А/Н5N1, так как аминокислотная последовательность M2es имеет отличие от M2e-вируса гриппа А/Н5N1 лишь в одном положении (N13S). Фрагмент HA2-2 (ак76-130) представляет собой большую α -спираль второй субъединицы HA, частично доступную с поверхности молекулы. Консенсусные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа филогенетической группы II (подтипы H3 и H7) в участке HA2 (76-130) идентичны на 63,6%. С учетом замен аминокислотных остатков на близкие по свойствам гомология составляет 80%. В таблице представлены также аминокислотные последовательности M2e и HA2 (76-130) вирусов гриппа А, использованных в данном исследовании.

Теоретически рассчитанная молекулярная масса белка составляла 73,9 кДа, что совпадало с величиной, определенной по электрофоретической подвижности белка в ПААГ. Очищенный белок Flg-HA2-2-4M2e взаимодействовал в вестерн-блот с моноклональными анти-M2 антителами (14C2) и поликлональными анти-flg антителами (рис. 2), что подтверждает его подлинность.

Иммуноферментный анализ сывороток крови мышей, иммунизированных вакцинным белком Flg-HA2-2-4M2e, показал значительный уровень анти-M2e IgG и IgA в сыворотке мышей после 3-й иммунизации (рис. 3А, Б). Также был показан прирост антивирусных IgG в сыворотках иммунизированных мышей к вирусам пер-

вой (А/Н1N1) и второй филогенетических групп (А/Н7N9) (рис. 3В).

В связи с тем, что таргетные антигены содержат CD4⁺ и CD8⁺T-клеточные эпитопы [38], мы исследовали антиген-специфический CD4⁺ и CD8⁺T-клеточный ответ на 14-й день после иммунизации.

Иммунизация рекомбинантным белком Flg-HA2-2-4M2e индуцировала образование M2e-специфических CD4⁺T-клеток в легких мышей (0,154% по сравнению с контролем 0,03%), большинство из которых являлись монопродуктами TNF α (0,12%) (рис. 4А). Доля M2e-специфических CD4⁺T-клеток, продуцирующих IFN γ , была незначительна, и отмечалось почти полное отсутствие мультифункциональных клеток (TNF α ⁺IFN γ ⁺). Среди M2e-специфических CD8⁺T-клеток (0,11% по сравнению с контролем 0,03%) преобладали IFN γ -продуцирующие клетки (0,062%) над продуцентами TNF α (0,028%) (рис. 4Б).

Интраназальная иммунизация мышей приводила к формированию значительного числа вирус-специфических (А/Aichi/2/68) CD4⁺ в легких: 0,22% в опытной группе против 0,03% в контроле. При этом отмечалось доминирование клеток-продуцентов TNF α (0,15% по сравнению с клетками, продуцирующими IFN γ 0,064%) (рис. 4В). CD4⁺ клетки, продуцирующие оба цитокина, практически не выявлялись. Аналогичные результаты были получены при характеристике вирус-специфических CD8⁺T-клеток легких — 0,27% в опытной группе против 0,04% в контроле

ТАБЛИЦА 1. АМИНОКИСЛОТНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ КОНСЕРВАТИВНЫХ ФРАГМЕНТОВ ПОВЕРХНОСТНЫХ БЕЛКОВ ВИРУСОВ ГРИППА А: ЭКТОДОМЕН БЕЛКА M2 (2-24) (M2e) И HA2 (76-130)

TABLE 1. AMINO ACID SEQUENCES OF CONSERVED FRAGMENTS OF SURFACE PROTEINS OF INFLUENZA A VIRUSES: THE ECTODOMAIN OF THE PROTEIN M2 (2-24) (M2e) AND HA2 (76-130)

Таргетный антиген Target antigen	Аминокислотная последовательность Amino acid sequence
M2eh*	LLTEVETPIRNEWGCRNDSSD
M2es**	LLTEVETPIRSEWE <u>C</u> RCS <u>D</u> SSD
M2e A/H5N1***	LLTEVETPIRNEW <u>E</u> CRC <u>S</u> DSSD
M2e A/H7N9•	LLTEVETPIRTGWEC <u>N</u> C <u>S</u> GSSE
HA2-2••	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLDSEMNKLFETRRLRENA
HA2-1 A/H1N1pdm***	RIENLNKKVDDGFLDIWTYNAELLVLENERLTLDYHDSNVKNLYEKVRSQKNNNA

Примечание. * – консенсусная последовательность M2e вирусов гриппа А человека; ** – последовательность M2e вируса гриппа A/California/07/09 H1N1pdm09; *** – последовательность M2e вируса гриппа птиц подтипа А/Н5N1. • – последовательность M2e вируса гриппа подтипа А/Н7N9; •• – консенсусная последовательность фрагмента 76-130 второй субъединицы HA для вирусов гриппа второй филогенетической группы субтипов А/Н3N2 и А/Н7N9; *** – последовательность фрагмента 76-130 второй субъединицы HA для вируса гриппа A/California/07/09 (H1N1)pdm09.

Note. *, M2e consensus sequence of human influenza A viruses; **, M2e sequence of A/California/07/09 H1N1pdm09; ***, M2e sequence of A/H5N1 subtype. •, M2e sequence of A/H7N9 subtype; ••, HA2 (76-130) consensus fragment from phylogenetic group II influenza viruses subtype A/H3N2 and A/H7N9; •••, HA2 (76-130) fragment from A/California/07/09 (H1N1)pdm09 influenza virus.

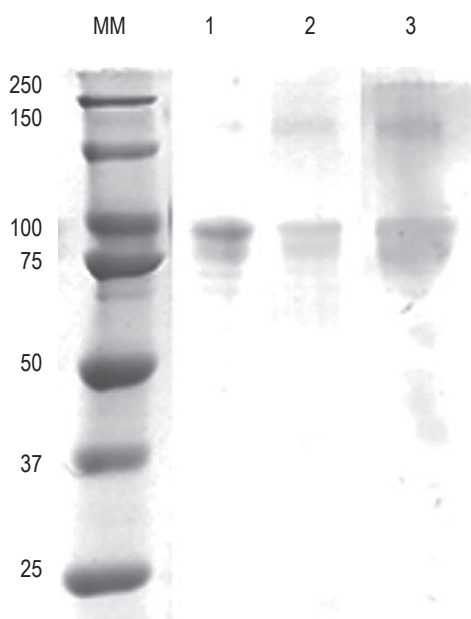


Рисунок 2. Электрофореграмма и вестерн-блот рекомбинантного белка Flg-*HA2-2-4M2e*
Примечание. 1 – электрофорез белка Flg-*HA2-2-4M2e*, окрашивание Кумасси; 2 – вестерн-блот, окрашивание анти-flg антителами; 3 – вестерн-блот, окрашивание анти-M2 антителами.

Figure 2. Electrophoresis and western blot of recombinant protein Flg-*HA2-2-4M2e*

Note. 1, electrophoresis; 2, western blot with anti-flg antibodies; 3, western blot with anti-M2 antibodies.

(рис. 4Г). Показано формирование вирус-специфических продуцентов TNF α (0,142%) и IFN γ (0,11%) при отсутствии двойных продуцентов.

Уровень специфических цитокин-продуцирующих эффекторных (T_{em}, CD44⁺CD62L⁻) и центральных (T_{cm}, CD44⁺CD62L⁺) CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток памяти оценивали после стимуляции клеток легких M2e-пептидом и вирусом A/Aichi/2/68 (H3N2) (рис. 4Д, Е). После иммунизации мышей рекомбинантным белком Flg-*HA2-2-4M2e* выявлено значимое количество M2e-специфических цитокин-продуцирующих CD4⁺T_{em} (0,3%) по сравнению с контрольной группой (0,07%) (рис. 4Д). Число M2e-специфических CD4⁺T_{cm} и CD8⁺T_{em} также возросло среди иммунизированных мышей (0,08 и 0,15% соответственно) по сравнению с контрольной группой (в среднем 0,03%), хотя достоверно значимых различий не было обнаружено. Среди иммунизированных мышей выявлялось статистически значимое количество вирус-специфических CD4⁺T_{em} (0,3%) по сравнению с контрольной группой (0,04%), а также вирус-специфических CD8⁺T_{em} и T_{cm} (0,4 и 0,27%) (рис. 4Е). Уровень CD4⁺T_{cm} также возрос

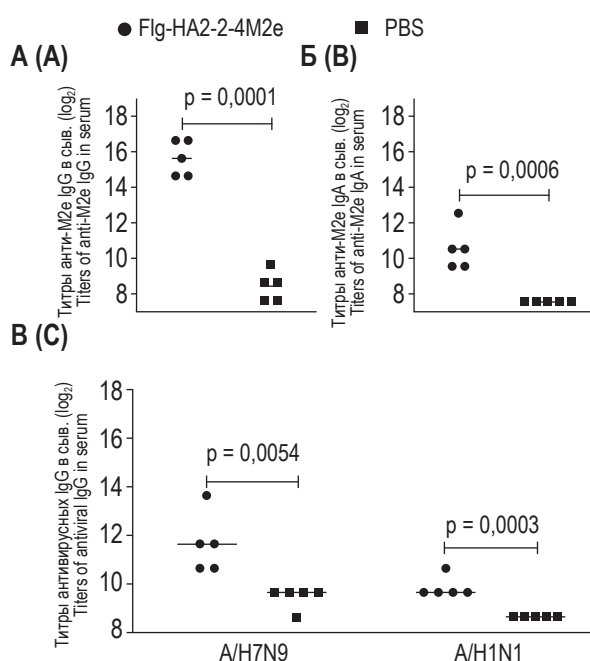


Рисунок 3. Титры (\log_2) специфических антител в сыворотках мышей после интраназальной иммунизации рекомбинантным белком Flg-*H2-2-4M2e*

Примечание. А – титры анти-M2e IgG в сыворотке. Б – титры анти-M2e IgA в сыворотке. В – титры IgG в сыворотке к вирусам A/Shanghai/2/2013 (H7N9) и A/California/07/09 (H1N1) pdm09. Для расчета р-значений использован t-критерий Стьюдента.

Figure 3. Titers (\log_2) of specific antibodies in serum after intranasal immunization

Note. A, titers of anti-M2e IgG in serum. B, titers of anti-M2e IgA in serum. C, titers of antiviral IgG in serum. To calculate the p-values used Student's t-test.

(0,13%) по сравнению с контрольной группой (0,03%).

Для оценки кросс-протективного эффекта рекомбинантного белка Flg-*HA2-2-4M2e*, через две недели после 3-й иммунизации, мышей заражали летальными дозами вирусов гриппа обеих филогенетических групп: A/California/07/09 (H1N1) pdm09 и A/Shanghai/2/2013 (H7N9) в дозе 5LD50. Как показано на рисунке 5А, мыши, иммунизированные рекомбинантным белком Flg-*HA2-2-4M2e*, были практически полностью защищены от заражения вирусами гриппа разных филогенетических групп A/Shanghai/2/2013 (H7N9) (филогенетическая группа II) и A/California/07/09 (H1N1) pdm09 (филогенетическая группа I) (выживаемость составила 90-100%). Максимальная потеря массы тела иммунизированных мышей после заражения гетерологичным по гемагглютиниру вирусом гриппа A/H1N1 pdm09 составила 16%, а вирусом гриппа A/H7N9 – не более 10%,

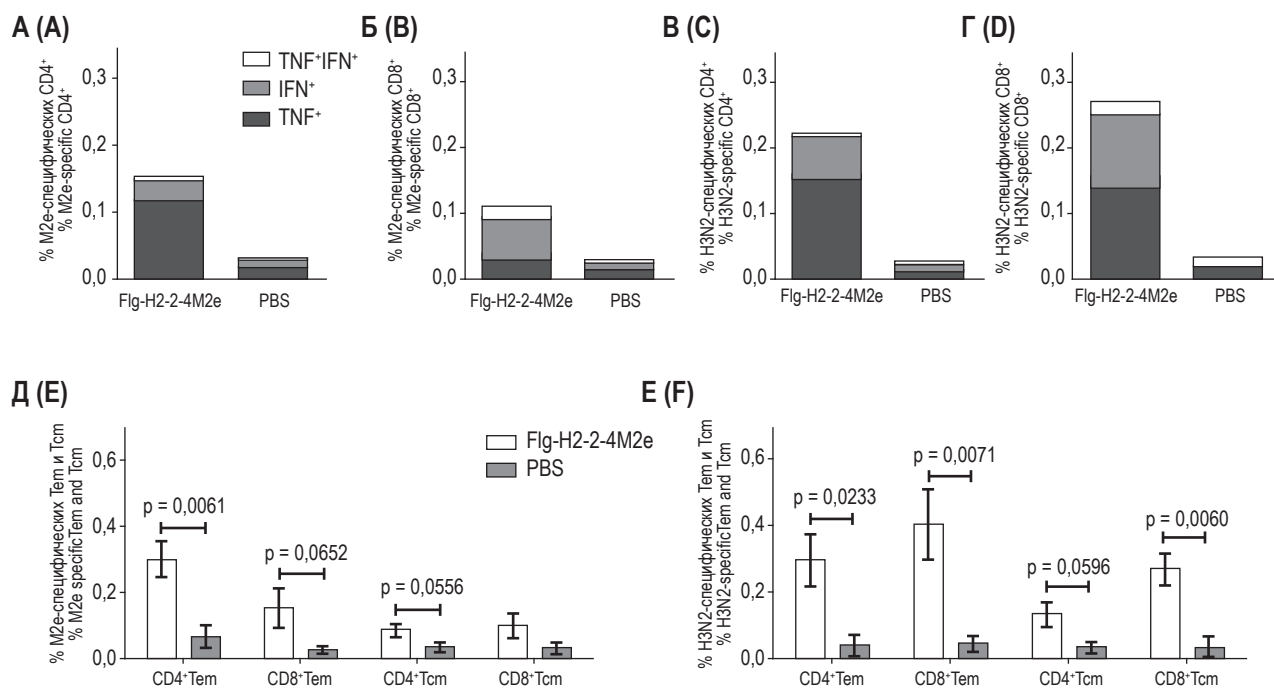


Рисунок 4. Специфический Т-клеточный ответ в легких после интраназальной иммунизации

Примечание. Суммарный % M2e-специфических CD4⁺ (А) и CD8⁺ (Б) Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины IFN γ , TNF α или оба одновременно. Суммарный % H3N2-специфических цитокин-продуцирующих CD4⁺ (В) и CD8⁺ (Г) Т-лимфоцитов. Суммарный % цитокин-продуцирующих (IFN γ ⁺, TNF α ⁺, IFN γ ⁺TNF α ⁺) M2e-специфических (Д) и H3N2-специфических (Е) эффекторных (Tem) и центральных (Tcm) CD4⁺ и CD8⁺ клеток памяти. Для расчета р-значений использован t-критерий Стьюдента.

Figure 4. Specific T-cell response in lung after intranasal immunization. Summary % of M2e-specific cytokine-producing CD4⁺ (A) and CD8⁺ (B)

Note. Summary % of H3N2-specific cytokine-producing CD4⁺ (C) and CD8⁺ (D). Summary % of M2e-specific (E) and H3N2-specific (F) cytokine-producing (IFN γ ⁺, TNF α ⁺, IFN γ ⁺TNF α ⁺) CD4⁺ and CD8⁺ effector (Tem) and central (Tcm) memory T cells. To calculate the p-values used Student's t-test.

тогда как в контрольной группе потеря массы тела животных достигала 30% (рис. 5А, Б). Вместе с тем после заражения иммунизированных животных вирусом гриппа А/Н7N9, гомологичным по фрагменту HA2 (76-130) вакцинному компоненту, инфекция протекала с меньшей потерей массы тела и более ранним и быстрым ее восстановлением, чем при заражении вирусом А/California/07/09 (H1N1)pdm09, гетерологичным по HA2 вакцинному белку.

На 6-й день после заражения у 5 мышей обеих групп были взяты легкие на вирусовыделение. Иммунизация рекомбинантным белком достоверно снижала (в 3,2 раза) вирусные титры в легких при заражении вирусом гриппа А/Н7N9 (p = 0,0041). При заражении вирусом А/Н1N1pdm09 вирусные титры в легких опытных мышей снижались в меньшей степени (в 1,2 раза).

Для того чтобы оценить влияние последующей гриппозной инфекции на характер серологического ответа мышей опытной и контрольной

групп на 14 день после 3-й иммунизации заражали сублетальной дозой (MID100) вируса гриппа А/Aichi/2/68. В течение 14 дней после сублетального заражения потеря массы тела у мышей обеих групп была менее 10%. Кровь у мышей забирали до заражения и на 14-й день после заражения и оценивали динамику изменения уровня M2e-специфических IgG, IgA, подклассов IgG и титры антител в РТГА (рис. 6А, Б, В). Сублетальная инфекция стимулировала значительное увеличение титров M2e-специфических IgG (p = 0,0138) и IgA (p = 0,0006) (рис. 6А, Б). Наличие M2e-специфических антител у животных не влияло на формирование гемагглютинирующих антител. Так, титры антител в РТГА достоверно не отличались у мышей опытной и контрольной групп (рис. 6В). Кроме того, сублетальная инфекция изменяла соотношение IgG1/IgG2a у иммунизированных мышей. Если после иммунизации рекомбинантным белком Flg-H2-2-4M2e доля M2e-специфических IgG2a составляла всего 2,1%, то после сублетальной инфекции произо-

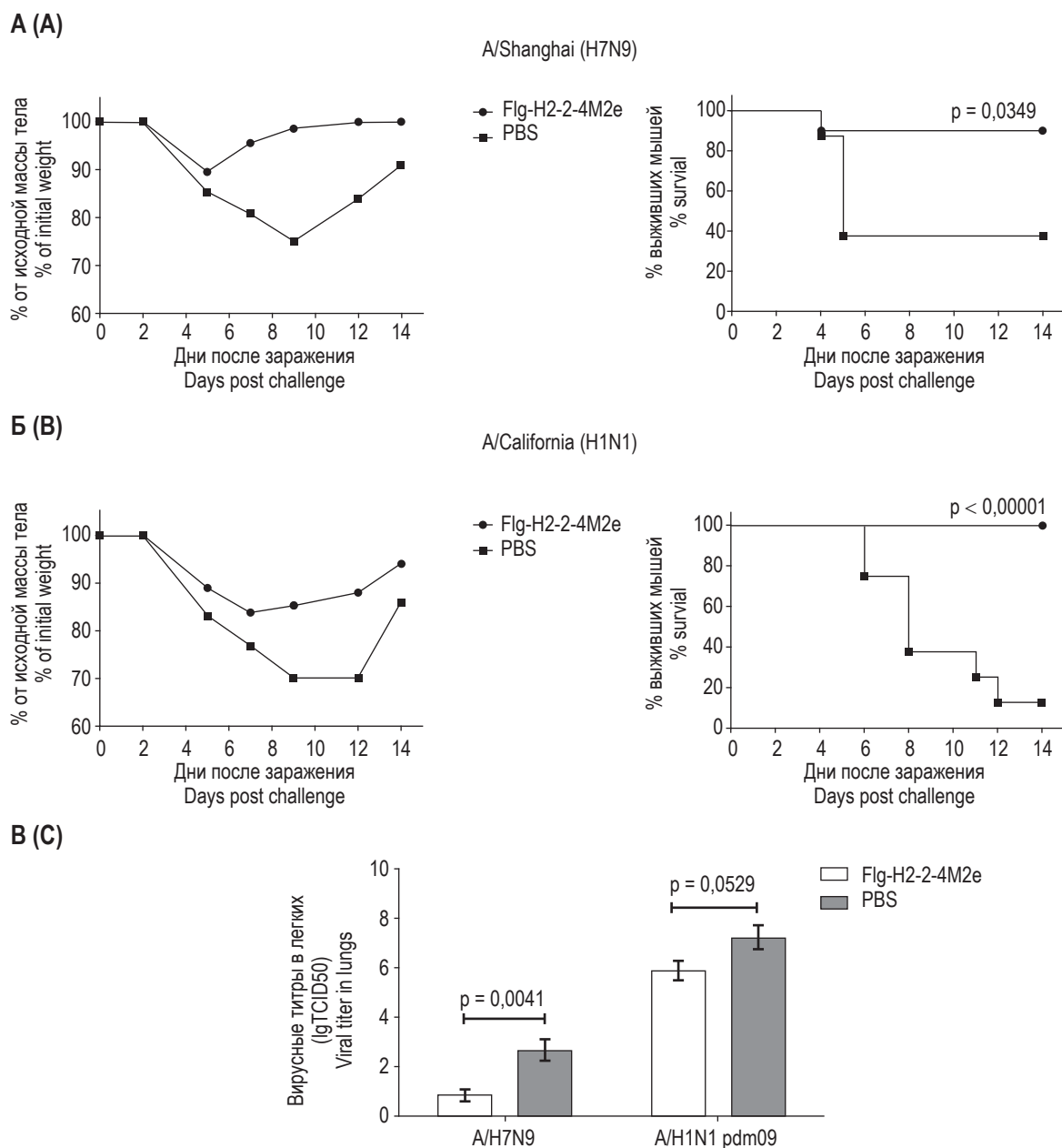


Рисунок 5. Динамика массы тела и выживаемость мышей после заражения вирусами A/Shanghai/2/2013 (H7N9) (А) и A/California/07/09 (H1N1)pdm09 (Б)

Примечание. Для расчета р-значений для данных выживаемости использован критерий Мантеля–Кокса. Вирусные титры в легких (В). Для расчета р-значений использован t-критерий Стьюдента.

Figure 5. Weight loss and survival after lethal challenge with viruses A/Shanghai/2/2013 (H7N9) (A) and A/California/07/09 (H1N1) pdm09 (B)

Note. To calculate the p value for survival rates used Mantel–Cox test. Viral titers in lungs (C). To calculate the p-values used Student's t-test.

шел сдвиг в сторону увеличения доли этого под-класса до 24,8% (рис. 6Г).

Обсуждение

Ряд исследователей показали, что включение нескольких консервативных эпитопов в реком-

бинантный белок ведет к усилению защитных свойств [2, 9, 16, 47].

В данной работе мы изучали формирование гуморального и Т-клеточного ответа к таргетным антигенам (M2e, HA2-2) рекомбинантного белка, а также динамику изменения уровня специфиче-

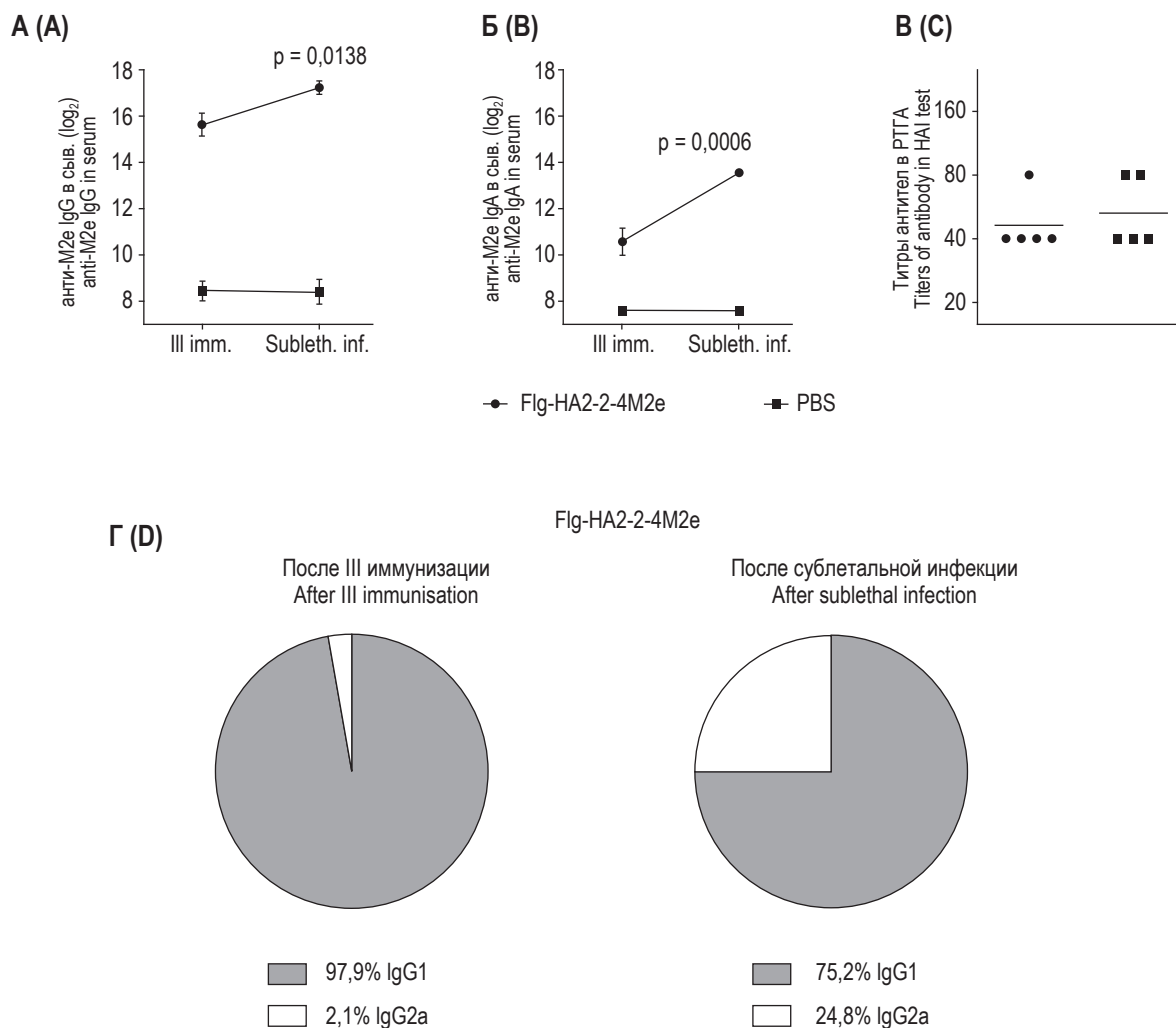


Рисунок 6. Титры антител в сыворотке мышей после 3-й иммунизации и после сублетальной инфекции

Примечание. А – средние значения титров (\log_2) анти-M2e IgG в сыворотке мышей после 3-й иммунизации (III imm.) и после сублетальной инфекции (Subleth. inf.). Б – средние значения титров анти-M2e IgA в сыворотке мышей после 3-й иммунизации (III imm.) и после сублетальной инфекции (Subleth. inf.). В – титры антител к A/Aichi/2/68 в РТГА после сублетальной инфекции. Г – соотношение подклассов IgG после 3-й иммунизации и после сублетальной инфекции. Для расчета р-значений использован t-критерий Стьюдента.

Figure 6. Titers of antibodies in serum after third immunization and after sublethal infection

Note. A, mean values of anti-M2e IgG titers in serum (\log_2) after third immunization (III imm.) and after sublethal infection (Subleth. inf.). B, mean values of anti-M2e IgA titers in serum (\log_2) after third immunization (III imm.) and after sublethal infection (Subleth. inf.). C, titers of antibodies in serum in HAI test. D, the ratio of IgG subclasses after the third immunization and after sublethal infection. To calculate the p-values used Student's t-test.

ских антител у иммунизированных животных после сублетальной гриппозной инфекции.

Рекомбинантный белок Flg-HA2-2-4M2e включает 4 копии M2e-пептида: 2 копии консенсусной последовательности M2e-вирусов гриппа А человека и 2 копии M2e пандемического вируса гриппа А(H1N1)pdm09. Их последовательности отличаются друг от друга на 4 аминокислоты, включая одну (в положении 11), которая является критической для связывания антител [6]. Пред-

полагается, что введение в состав рекомбинантного белка двух различных по аминокислотному составу последовательностей M2e способствует расширению спектра защитного действия кандидатной вакцины.

Вторым таргетным антигеном рекомбинантного белка Flg-HA2-2-4M2e является консервативный участок HA2 (ак76-130) вирусов гриппа второй филогенетической группы (HA2-2) – консенсусная последовательность вирусов грип-

па А двух субтипов А/Н3N2 и А/Н7N9. Вирусы гриппа субтипа А/Н3N2 циркулируют в человеческой популяции с 1968г. и почти ежегодно вызывают эпидемии. Вирусы субтипа А/Н7N9 вызвали пять эпизоотий в Китае начиная с февраля 2013 года [44, 48] и считаются возможным генетическим донором для будущих пандемических вирусов.

Результаты оценки иммуногенности рекомбинантного белка при интраназальном введении мышам показывают формирование выраженного М2е-специфического гуморального ответа (сывороточных IgG и IgA), который значительно возрастает после сублетальной инфекции. Кроме того, иммунитет к таргетным антигенам (М2е и NA2-2) у мышей не оказывает влияния на выработку антител к гемагглютиниону (по сравнению с контролем) после сублетального заражения.

М2е-иммунитет, как известно, обусловлен элиминацией инфицированных клеток с помощью механизма антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) или комплемент-зависимым фагоцитозом, где ведущую роль играют естественные киллеры, альвеолярные макрофаги и дендритные клетки [12, 24]. Мышиные подклассы IgG2a/c обладают сильными эффекторными функциями и преимущественно участвуют в АЗКЦ благодаря их способности связываться со всеми тремя типами Fc-рецепторов (FcγRI, FcγRIII, FcγRIV) [32]. Сообщалось, что защита мышей, иммунизированных конструкциями на основе М2е коррелирует с высоким уровнем IgG2a [7, 30]. Тем не менее высокий уровень М2е-специфических IgG1 может компенсировать их низкую способность активировать эффекторные клетки [8]. Показано, что макрофаги фагоцитируют инфицированные вирусом гриппа клетки [14, 33], фагоцитоз IgG1-опсонизированных клеток макрофагами зависит от FcγRIII [18] и альвеолярные макрофаги играют ключевую роль в защите от гриппа в случае анти-М2е IgG1 [12].

Полученные нами результаты показывают, что интраназальная иммунизация белком Flg-NA2-2-4M2e приводит к превалированию анти-М2е подкласса IgG1. Однако после сублетального заражения у М2е-иммунных мышей происходит сдвиг в сторону увеличения доли анти-М2е подкласса IgG2a, что мы считаем положительным моментом, так как сбалансированное соотношение антиген-специфических подклассов IgG способствует более полной защите при последующем инфицировании.

Помимо специфического гуморального ответа, важную роль в защите от гриппа играет и Т-клеточный ответ. Известно, что выраженный вирус-специфический CD4⁺Т-клеточный ответ коррелирует с защитой у человека [13].

Исследования Т-клеточного ответа у мышей продемонстрировали, что вирус-специфические CD8⁺ и CD4⁺Т-клетки памяти достаточны для защиты против гетеросубтипического заражения [13, 19]. Важность CD8⁺Т-клеток в контроле за гриппозной инфекцией была показана на различных животных моделях [1, 19]. Комбинация не нейтрализующих антител с CD4⁺ и CD8⁺Т-клетками может обеспечить полную защиту от летальной гриппозной инфекции, и кросс-протективные вакцины нового типа должны быть способны эффективно формировать не только антитела к консервативным антигенам, но и кросс-протективный Т-клеточный ответ.

Иммунизация рекомбинантным белком приводила к формированию М2е- и вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток в легких, которые продуцировали TNFα (преимущественно) и IFNγ (в меньшей степени). Кроме того, показано формирование антиген-специфических эффекторных и центральных Т-клеток памяти в легких иммунизированных мышей.

Таким образом, результаты по оценке иммуногенности рекомбинантного белка Flg-NA2-2-4M2e показывают формирование как антиген-специфического гуморального, так и Т-клеточного иммунного ответа. Для оценки кросс-протективного потенциала рекомбинантного белка мышей заражали высокими дозами вирусов гриппа, относящихся к разным филогенетическим группам (А/Н7N9 и А/Н1N1pdm09). Мыши, иммунизированные рекомбинантным белком Flg-NA2-2-4M2, были практически полностью защищены от заражения вирусами гриппа обеих филогенетических групп. Выраженный защитный эффект белка Flg-NA2-2-4M2е подтверждался также незначительным снижением массы тела, ее быстрым восстановлением и достоверным снижением репродукции вирусов в легких по сравнению с контрольными животными.

Полученные результаты показали, что рекомбинантный белок Flg-NA2-2-4M2е является перспективным кандидатом для разработки универсальной вакцины нового поколения, формирует протективный гуморальный и Т-клеточный ответ на консервативные вирусные эпитопы и защищает от вирусов гриппа А обеих филогенетических групп.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду, при поддержке которого проводились данные исследования (Соглашение № 15-14-00043-П).

Список литературы / References

1. Altenburg A.F., Rimmelzwaan G.F., de Vries R.D. Virus-specific T cells as correlate of (cross-) protective immunity against influenza. *Vaccine*, 2015, Vol. 33, pp. 500-506.
2. Ameghi A. Protective immunity against homologous and heterologous influenza virus lethal challenge by immunization with new recombinant chimeric HA2-M2e fusion protein in balb/c mice. *Viral Immunol.*, 2016, Vol. 29, pp. 228-234.
3. Bates J.T. Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice. *Mech. Ageing Dev.*, 2008, Vol. 129, pp. 271-281.
4. Bessa J., Schmitz N., Hinton H.J. Efficient induction of mucosal and systemic immune responses by virus-like particles administered intranasally: implications for vaccine design. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 1, pp. 114-126.
5. Bommakanti G. Design of an HA2-based *Escherichia coli* expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2010, Vol. 107, pp. 13701-13706.
6. Cho K.J., Schepens B., Seok J.H., Kim S., Roose K., Lee J.H. Structure of the extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus in complex with a protective monoclonal antibody. *J. Virol.*, 2015 Vol. 89, pp. 3700-3711.
7. Cunningham A.F., Khan M., Ball J., Toellner K.M., Serre K., Mohr E. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on Salmonella are Th1. *Eur. J. Immunol.*, 2004, Vol. 34, pp. 2986-2995.
8. Delaney K.N., Phipps J.P., Johnson J.B., Mizel S.B. A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice. *Viral Immunol.*, 2010, Vol. 23, pp. 201-210.
9. Deng L., Kim J.R., Chang T.Z., Zhang H., Mohan T., Champion J.A., Wang B-Z. Protein nanoparticle vaccine based on flagellin carrier fused to influenza conserved epitopes confers full protection against influenza A virus challenge. *Virology*, 2017, Vol. 509, pp. 82-89.
10. Denis J., Acosta-Ramirez E., Zhao Y. Development of a universal influenza A vaccine based on the M2e peptide fused to the papaya mosaic virus (PapMV) vaccine platform. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 27-28, pp. 3395-3403.
11. Ekiert D.C. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science*, 2011, Vol. 333, pp. 843-850.
12. el Bakkouri K., Descamps F., de Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 1022-1031.
13. Eliasson D.G., Omokanye A., SchoEn K. M2e tetramer-specific memory CD4 T cells are broadly protective against influenza infection. *Mucosal Immunol.*, 2017, Vol. 11, pp. 273-289.
14. Feng J. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virol. J.*, 2006, Vol. 3, p. 102.
15. Gong X. Conserved stem fragment from H3 influenza hemagglutinin elicits cross-clade neutralizing antibodies through stalk-targeted blocking of conformational change during membrane fusion. *Immunol. Lett.*, 2016, Vol. 172, pp. 11-20.
16. Guo Y., He L., Song N., Li P., Sun S., Zhao G., Tai W., Jiang S., Du L., Zhou Y. Highly conserved M2e and hemagglutinin epitope-based recombinant proteins induce protection against influenza virus infection. *Microbes Infect.*, 2017, Vol. 19, pp. 641-647.
17. Hashimoto Y., Moki T., Takizawa T., Shiratsuchi A., Nakanishi Y. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, pp. 2448-2457.
18. Hazenbos W.L., Gessner J.E., Hofhuis F.M. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity*, 1996, Vol. 5, pp. 181-188.
19. Hillaire M.L., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Induction of virus-specific cytotoxic T lymphocytes as a basis for the development of broadly protective influenza vaccines. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2011, Vol. 2011, 939860. doi: 10.1155/2011/939860.
20. Honko A.N. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect. Immun.*, 2006, Vol. 74, pp. 1113-1120.
21. Huleatt J.W. Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, pp. 201-214.
22. Ingrole R.S., Tao W., Tripathy J.N., Gill H.S. Synthesis and Immunogenicity assessment of elastin-like polypeptide-M2e construct as an influenza antigen. *Nano LIFE*, 2014, Vol. 4, no. 2, 1450004. doi: 10.1142/s1793984414500044.
23. Ionescu R.M., Przysiecki C.T., Liang X. Pharmaceutical and immunological evaluation of human papillomavirus viruslike particle as an antigen carrier. *J. Pharm. Sci.*, 2006, Vol. 95, no. 1, pp. 70-79.
24. Jegerlehner A. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, pp. 5598-5605.

25. Khanna M. Protective immunity based on the conserved hemagglutinin stalk domain and its prospects for universal influenza vaccine development. *BioMed. Res. Int.*, 2014, Vol. 2014, 546274. doi: 10.1155/2014/546274.
26. Kim M.-C. Virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains confer improved cross-protection against various subtypes of influenza virus. *Mol. Ther.*, 2013, Vol. 21, pp. 485-492.
27. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, Vol. 227, pp. 680-685.
28. Liu G. Flagellin-HA vaccines protect ferrets and mice against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) infections. *Vaccine*, 2012, Vol. 30, pp. 6833-6838.
29. Liu W., Peng Z., Liu Z. High epitope density in a single recombinant protein molecule of the extracellular domain of influenza A virus M2 protein significantly enhances protective immunity. *Vaccine*, 2004, Vol. 23, no. 3, pp. 366-371.
30. Mozdzanovska K., Zharikova D., Cudic M., Otvos L., Gerhard W. Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Virology*, 2007, Vol. 4, p. 118.
31. Neiryneck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat. Med.*, 1999, Vol. 5, no. 10, pp. 1157-1163.
32. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Divergent immunoglobulin G subclasses activity through selective Fc receptor binding. *Science*, 2005, Vol. 310, pp. 1510-1512.
33. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fc-gamma receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 2006, Vol. 24, pp. 19-28.
34. Schotsaert M. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert. Rev. Vaccines.*, 2009, Vol. 8, pp. 499-508.
35. Slepishkin V.A., Katz J.M., Black R.A. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine*, 1995, Vol. 13, no. 15, pp. 1399-1402.
36. Stepanova L.A. A fusion protein based on the second subunit of hemagglutinin of influenza A/H2N2 viruses provides cross immunity. *Acta Naturae*, 2016, Vol. 8, pp. 116-126.
37. Stepanova L.A. Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, e0119520. doi: 10.1371/journal.pone.0119520.
38. Stepanova L.A., Mardanova E.S., Shuklina M.A. Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses a subtypes. *J. Biomed. Sci.*, 2018, Vol. 25, no. 1, p. 33.
39. Taylor D.N. Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI). *Vaccine*, 2011, Vol. 29, pp. 4897-4902.
40. Tsybalova L.M. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: Broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2e. *Vaccine*, 2015, Vol. 33, pp. 3398-3406.
41. Turley C.B. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*, 2011, Vol. 29, pp. 5145-5152.
42. Wang T.T. Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, e1000796. doi: 10.1371/journal.ppat.1000796.
43. Wang T.T. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2010, Vol. 107, pp. 18979-18984.
44. World Health Organization [Электронный ресурс]: сайт. Режим доступа: <http://www.who.int/entity/csr/don/26-october-2017-ah7n9-china/en>. [World Health Organization [Electronic resource]. Access mode: www.who.int/entity/csr/don/26-october-2017-ah7n9-china/en.]
45. Wrammert J. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, pp. 181-193.
46. Wu F., Huang J.H., Yuan X.Y. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus. *Vaccine*, 2007, Vol. 25, no. 52, pp. 8868-8873.
47. Zhang H., Wang L., Compans R.W., Wang B.Z. Universal influenza vaccines, a dream to be realized soon. *Viruses*, 2014, Vol. 6, pp. 1974-1991.
48. Zhou L., Ren R., Yang L., Bao C., Wu J., Wang D. Sudden increase in human infection with avian influenza A(H7N9) virus in China, September-December 2016. *Western Pac Surveill Response J.*, 2017, Vol. 8, pp. 6-14.

Авторы:

Шуклина М.А. — младший научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Степанова Л.А. — к.б.н., ведущий научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ковалева А.А. — научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Коротков А.В. — научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Шалдзян А.А. — лаборант-исследователь ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Зайцева М.В. — младший научный сотрудник ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Елецкая Е.И. — лаборант-исследователь ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Цыбалова Л.М. — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе, заведующий отделом вакцинологии, заведующий лабораторией гриппозных вакцин ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Shuklina M.A., Junior Research Associate, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Stepanova L.A., PhD (Biology), Leading Research Associate, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Kovaleva A.A., Research Associate, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Korotkov A.V., Research Associate, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Shaldzhyan A.A., Research Assistant, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Zaitseva M.V., Junior Research Associate, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Eletskaya E.I., Research Technical Assistant, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Tsybalova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, Head, Vaccinology Department, Chief, Influenza Vaccinal Laboratory, Smorodintsev Research Institute of Influenza, Ministry of Health of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 20.07.2018
Принята к печати 19.09.2018

Received 20.07.2018
Accepted 19.09.2018