**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 слабо иммуногенных антигенов к белку-носителю позволяет значительно усилить их иммуногенность. Был разработан кандидатный вакцинный белок Flg-HA2-2-4M2e, содержащий два высоко консервативных вирусных антигена (эктодомен белка M2 - М2е и участок 76-130 второй субъединицы НА2), слитых с белком-носителем флагеллином. Флагеллин – белок жгутиков бактерий, является естественным лигандом толл-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 (5LD50) вирусами, относящимся к обеим филогенетическим группам (A/California/07/09 (H1N1)pdm09 или A/Shanghai/2/2013 (H7N9)),. Полученные результаты показали формирование выраженного М2е-специфического гуморального ответа (сывороточных IgG и IgA) у иммунизированных мышей. Иммунизация приводила также к формированию M2e- и вирус-специфических CD4+ и CD8+ T-клеток в легких, которые продуцировали TNF-α и IFN-γ. Выявлено формирование антиген-специфических эффекторных и центральных Т-клеток памяти в легких мышей опытной группы. Формирование кросс-протективного защитного иммунитета у иммунизированных 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 высоко патогенного 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 А/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

**Abstract**

The development of vaccines with a broad-spectrum of protection is one of the priority tasks in the 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. The difficulty in the development of vaccines based on such conserved fragments consists in their low immunogenicity. However, the fusion of low immunogenic antigens to the high immunogenic carrier protein significantly enhances their immunogenicity. The candidate vaccine protein Flg-HA2-2-4M2e containing two highly conserved viral antigens (the ectodomain of the M2 protein (M2e) and the 76-130 region of the second subunit of HA2), fused with the carrier protein, flagellin, was developed. Flagellin (bacteria flagella protein) is a natural ligand of TLR-5 and has a strong adjuvant activity at different ways of administration. The purpose of this study was to evaluate the formation of humoral and T-cell immune response and broad spectrum protection after mice immunization with candidate vaccine protein Flg-HA2-2-4M2e. Mice were immunized intranasal three times with two week intervals. Two weeks after the final immunization, mice were challenged in dose 5LD50 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 the formation of strong M2e-specific humoral response (serum IgG and A) in immunized mice. Immunization with recombinant protein stimulated the formation of M2e-specific and virus-specific CD4+ and CD8+ T-cells in lung, producing TNF-α or IFN-γ. It was detected the formation of antigen-specific effector and central memory T-cells in the lungs of immunized mice. The formation of cross-protective immunity in immunized mice was demonstrated in the model of lethal influenza infection. The experimental animals were almost completely protected (90-100% survival) from the high dose of the pandemic virus A/H1N1pdm09 and highly pathogenic avian influenza A/H7N9. We also evaluated the changes of antigen-specific immune response in immunized mice after sublethal infection with influenza virus A/H3N2. Mouse 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) 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 a sublethal infection in immunized mice the proportion of M2e-specific IgG2a was increased in 10 times. The results showed that the recombinant protein Flg-HA2-2-4M2e is a promising candidate for development of universal vaccines, which forms a protective humoral and T-cell response to conserved viral epitopes and protects against influenza A viruses of both phylogenetic groups.