

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КРОСС-ПРОТЕКТИВНОЙ РЕКОМБИНАНТНОЙ ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ, ВКЛЮЧАЮЩЕЙ КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЭПИТОПЫ ВИРУСНЫХ БЕЛКОВ M2 И ГЕМАГГЛЮТИНИНА

Л.А. Степанова¹, М.А. Шуклина¹, Е.А. Блохина², Р.Ю. Котляров², А.А. Ковалева¹,
Н.В. Равин², Л.М. Цыбалова¹

¹ Научно-исследовательский институт гриппа, Санкт-Петербург, Россия

² Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии», Москва, Россия

Effectiveness of cross-protective recombinant influenza vaccine based on conserved epitopes of viral proteins M2 and hemagglutinin

L.A. Stepanova¹, M.A. Shuklina¹, E.A. Blokhina², R.Y. Kotlyarov², A.A. Kovaleva¹, N.V. Ravin², L.M. Tsybalova¹

¹ Science Research Institute of Influenza, Saint-Petersburg, Russia

² Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology», Moscow, Russia

Резюме

Вирус гриппа является наиболее уникальным по уровню изменчивости антигенных и биологических свойств. Из-за постоянных мутаций в генах, кодирующих поверхностные белки вируса, в существующих «сезонных» вакцинах приходится ежегодно заменять 1–2 вирусных компонента. Кроме того, традиционные вакцины являются штамм-специфическими и обладают ограниченной эффективностью в предотвращении заболеваний, вызванных новыми штаммами вирусов гриппа. В связи с этим создание противогриппозных вакцин на основе консервативных детерминант вирусных белков с широким спектром защиты и коротким периодом производства является одной из приоритетных задач, решение которой приведет к реальному контролю гриппозной инфекции. Перспективной тенденцией в создании универсальных гриппозных вакцин является конструирование рекомбинантных белков на основе комбинации консервативных вирусных белков или пептидов.

Цель: разработка кандидатной рекомбинантной гриппозной вакцины на основе двух консервативных белков вируса гриппа А (M2 и HA) и оценка ее иммуногенности и защитного эффекта на животной модели.

Результаты: исследовали гуморальный и T-клеточный ответ у мышей (Balb/c) после интраназальной иммунизации рекомбинантными белками (Flg-4M2ehs и Flg-HA2-2-4M2ehs). Оба белка стимулировали формирование выраженного M2e-специфического гуморального и CD4+ T-клеточного ответа в легких мышей. Рекомбинантный белок с двумя целевыми антигенами (M2e и полипептид 76–130 второй субъединицы гемагглютинаина) стимулирует формирование вирус-специфического T-клеточного ответа и полную защиту (100% выживаемость) мышей от летального заражения вирусами гриппа А человека и птиц (A/H3N2, A/H2N2, A/H5N1). У мышей, иммунизированных рекомбинантным белком с одним целевым антигеном (Flg-4M2ehs), выживаемость после летального заражения составила 60–75%.

Abstract

The influenza virus is the most unique in the level of variability of antigenic and biological properties. Because of constant mutations into genes coding surface viral proteins, in modern vaccines it is necessary to replace 1–2 virus components annually. Traditional influenza vaccines are the strain – specific and have limited efficiency in prevention of new strains of influenza viruses. In this regard, creation of influenza vaccines based on conserved determinants of viral proteins with broad spectrum protection and the short period of production is one of priority tasks which decision will lead to real control of an influenza infection. A current trend in the design of universal flu vaccines is the construction of recombinant proteins based the combination of conserved viral proteins or peptides.

The goals of this study: to develop the candidate recombinant flu vaccine based on the two conserved influenza proteins (M2 and HA); to investigate immune response; and to measure the protection activity in an animal model.

Results: In this study we investigated the humoral and T-cell response in mice after intranasal immunization with recombinant proteins (Flg-4M2ehs and Flg-HA2-2-4M2ehs). Both proteins induce a robust M2e-specific humoral and CD4+ T-cell response in mice lung. The recombinant protein with two target antigens (M2e and HA2) induces virus-specific CD4+ and CD8+ T-cell response and full protection (100% survival) of mice from lethal challenge human and avian influenza viruses A (A/H3N2, A/H2N2, A/H5N1). In mice immunized with Flg-4M2ehs, the survival after lethal challenge was 60–75%.

Conclusion: Our results show an essential role of a conserved fragment of the HA2 in the formation of protective T-cell response and protection of mice from lethal challenge with influenza viruses A of various subtypes. The prospects of the development of vaccine formulation based on two conserved antigenic determinants of influenza virus A are shown.

Заключение: полученные результаты демонстрируют существенную роль консервативного фрагмента второй субъединицы гемагглютинаина в формировании протективного Т-клеточного иммунитета и защите мышей от летального заражения вирусами гриппа А различных субтипов. Показана перспективность разработки вакцинного препарата на основе двух консервативных антигенных детерминант вирусов гриппа А.

Ключевые слова: вирус гриппа, рекомбинантная вакцина, эктодомен белка M2, HA2, иммунитет.

Введение

Среди всех возбудителей респираторных инфекционных заболеваний вирус гриппа является наиболее уникальным по уровню изменчивости. Мутации, возникающие в процессе репликации вируса, из-за отсутствия механизма редактирования сохраняются и передаются новому поколению. При этом мутации в генах поверхностных белков вируса (антигенный дрейф) существенно меняют антигенные свойства возбудителя, и это приводит к практически ежегодным эпидемиям. Второй механизм изменчивости обусловлен сегментарностью генома вируса и легко реализуется путем реассортации при коинфекции одного хозяина разными субтипами вируса. Образовавшиеся реассортанты нередко являются причиной пандемии. Из-за постоянных мутаций в генах, кодирующих поверхностные белки вируса, в современных вакцинах приходится ежегодно заменять 1–2 вирусных компонента. Кроме того, цикл производства вакцины, начиная от изоляции актуального вируса, требует значительного времени – 6 и более месяцев. При появлении вирусов с пандемическими потенциями скорость производства традиционных вакцин катастрофически отстает от скорости распространения пандемии. Как правило, только на второй волне пандемии мы имеем достаточное количество доз вакцины. В связи с этим создание противогриппозных вакцин с широким спектром защиты и коротким периодом производства является одной из приоритетных задач, решение которой приведет к реальному контролю гриппозной инфекции.

Исследования последних лет показали, что консервативные белки вируса гриппа, такие как M1, M2, NP, второй субъединицы гемагглютинаина (HA2), могут обеспечить протективный иммунный ответ против различных субтипов вирусов гриппа. Сконструирован ряд кандидатных вакцин на основе эктодомена белка M2 (M2e) и показана их способность индуцировать выраженный M2e-специфический гуморальный ответ (не-нейтрализующие антитела, обеспечивающие лизис инфицированных клеток через механизм антитело-зависимой клеточной цитотоксичности)

Key words: influenza virus, recombinant vaccine, M2e ectodomain, HA2, immune response.

и обеспечивать полную защиту экспериментальных животных от заражения вирусами гриппа А [1–5]. Показана также безопасность и иммуногенность таких вакцин у человека [2, 6, 7]. Другими перспективными вакцинными антигенами являются консервативные участки HA2. В последнее время был выделен ряд моноклональных антител (от мышей, человека), которые реагируют с эпитопами, локализованными в стеблевой части гемагглютинаина (HA2). Такие антитела являются перекрестно реагирующими и нейтрализуют субтипы вируса гриппа в пределах филогенетической группы, обеспечивая широкий спектр защиты [8–10]. Кандидатные вакцины на основе HA2 индуцируют гуморальный и Т-клеточный ответ у мышей и обеспечивают защиту от гомологичных и гетерологичных вирусов одной филогенетической группы [11–15]. Иммунизация традиционными вакцинами и естественная гриппозная инфекция не стимулируют продукцию значительного количества анти-M2e и анти-HA2 антител. Это обусловлено низкой иммуногенностью консервативных участков вирусных белков в присутствии иммунодоминантного рецептор-связывающего региона первой субъединицы гемагглютинаина [16–18]. Присоединение слабоиммуногенных антигенов к высокоиммуногенному белку-носителю позволяет существенно повысить их иммуногенность.

Подходящей платформой для создания рекомбинантных вакцин на основе слабоиммуногенных антигенов является бактериальный флагеллин – естественный лиганд толл-подобного рецептора 5 (TLR 5). Флагеллин обладает сильной адъювантной активностью при различных способах введения (парентеральный, подкожный, мукозальный) [19, 20]. Способность флагеллина служить одновременно платформой и адъювантом при разработке вакцин показана на различных моделях инфекционных заболеваний, включая грипп [1, 21].

Цель исследования – разработка кандидатной рекомбинантной гриппозной вакцины на основе двух консервативных белков вируса гриппа А (M2 и HA) и оценка ее иммуногенности и защитного эффекта на животной модели.

Материалы и методы

Конструирование и экспрессия рекомбинантных белков

В качестве консервативных антигенов белков вируса гриппа были выбраны: консенсусная последовательность эктодомена белка М2 (М2е) штаммов вируса гриппа А человека (М2еh), М2е пандемического вируса гриппа А/Калифорния/075/09 Н1N1рдм09 (М2еs), консенсусная аминокислотная последовательность (76–130) второй субъединицы НА вирусов гриппа А субтипов Н3 и Н7, относящихся ко второй филогенетической группе.

Аминокислотные последовательности М2е и НА2(76-130) разных вирусов были взяты из баз данных GISAID и GenBank. Последовательности выравнивали с использованием сервера MAFFT и алгоритмов FFTNS-i, FFT-NS-2 [22] и анализировали в программном пакете Unipro UGENE v.1.14.0. [23]. На основе флагеллина (Flg) были сконструированы два белка: Flg-4М2еhс и Flg-НА2-2-4М2еhс. Искусственно созданные гены, кодирующие химерные белки, вводили в плазмиду рQE30 (Qiagen) с помощью стандартных генно-инженерных методов. Ген флагеллина был ранее нами получен с помощью ПЦР на геномной ДНК *Salmonella typhimurium* и клонирован. Были получены экспрессионные векторы: рQE30-Flg-4М2еhс, рQE30-Flg-НА2-2-4М2еhс, рQE30-Flg. Для создания штаммов-продуцентов рекомбинантных белков соответствующими экспрессионными векторами трансформировали штамм *E. coli* DLT1270 – производный от штамма DH10В, в хромосому которого интегрирован ген репрессора лактозного оперона *lacI*. Культуры штаммов-продуцентов выращивали в среде LB с добавлением ампициллина, экспрессию индуцировали IPTG (до 0,1 мМ). От клеточного лизата белки очищали с помощью металло-аффинной хроматографии на Ni сорбенте.

Лабораторные животные. Иммунизация

В исследовании были использованы линейные мыши (самки) Balb/c массой 18–20 г (возраст 6–8 недель), полученные из сертифицированного питомника «Столбовая» ГУ «Научный центр биомедицинских технологий РАН». Животных содержали в виварии Научно-исследовательского института гриппа 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 Научно-исследовательского института гриппа. Мышей иммунизировали интраназально (и/н) рекомбинантными белками в дозе 10 мкг/0,02 мл трехкратно с интервалом 2 недели. Иммунизацию про-

водили после ингаляционной анестезии смесью 2–3% изофлюран, 30% O₂, 70% N₂O. Контрольным мышам вводили и/н 0,02мл ФБР или 10 мкг/0,02 мл рекомбинантного белка Flg.

Получение сывороток крови и бронхоальвеолярных лаважей

Образцы крови и бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) получали от пяти мышей каждой группы через 2 недели после третьей иммунизации, после эвтаназии в CO₂-камере (Vet Tech Solutions, Великобритания). Для получения сыворотки кровь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C. 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. Для получения БАЛ труп животного фиксировали на операционном столике. Производили разрез кожи по средней линии от нижней челюсти. В нижнюю часть трахеи в направлении легких вводили катетер на глубину 3–5 мм. Дважды промывали бронхи и легкие 1 мл ФБР. БАЛ центрифугировали в течение 15 мин при 400 g, отбирали аликвоты надосадка и замораживали их 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 μ/мл ДНКазы (Sigma, D4263). Легкие гомогенизировали с использованием TissuLyserII, помещали в термошейкер (45 мин, 37°C) и избавлялись от дебриса путем фильтрации (syringe filcons с диаметром пор 70 мкм, BD Biosciences, USA). Эритроциты лизировали АСК буфером (0,15M NH₄Cl, 1,0M KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2–7,4), клетки отмывали полной средой RPMI-1640 с 10% ЭТС, 2 mM L-глутамин, 100 IU/ml пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина. Концентрацию клеток доводили до 5×10⁶ кл/мл.

Иммуноферментный анализ

Сыворотки и БАЛ исследовали в ИФА с использованием 96-луночных планшет (Greiner, Германия). Титры антител определяли индивидуально у 5 мышей каждой группы. В качестве твердой фазы использовали синтетические пептиды М2еh, М2еs (5 мкг/мл), синтезированные в «НПО Верта» (Санкт-Петербург). Использовали поликлональные овечьи антимышечные IgG, IgA (Abscam, Великобритания) меченные 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 или БАЛ, которое дает оптическую плотность, по крайней мере в 2 раза больше, чем бланк.

Проточная цитометрия

Мультипараметрическую проточную цитометрию выполняли в соответствии с Протоколом BD Pharmingen™. Определяли способность рекомбинантных белков индуцировать в легких образование специфических CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих интерлейкины. Клетки легких стимулировали (в течение 6 ч при 37°C) 10 мкг пептида M2e (G-37) или 1 мкг вируса гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) в присутствии брэфелдина А (1 мкг/мл) (BD Bioscience, USA). Клетки отмывали, Fc рецепторы блокировали антителами CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, BD Pharmingen, USA), затем инкубировали с Zombie Aqua (Zombie Aqua™ Fixable Viability Kit, Biolegend, USA) для выявления живых клеток и окрашивали CD3a-FITC, CD4 PerCP, CD8-APC-Cy™7, CD62L-PE-Cy™7, CD44-APC (BD Pharmingen, USA) при +2–8°C в течение 30 мин. Затем клетки пермеабелизовали в соответствии с Протоколом тест-системы Cytotfix/Cytoperm Plus (BD Bioscience, США) и окрашивали флюоресцирующими антителами TNF-α-BV421, IFN-γ-PE (BD Pharmingen, USA). Сбор данных (собирали 50,000 живых CD3+ клеток) выполняли на проточном цитометре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Данные анализировали с помощью программы Kaluza версия 1.5 (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 А/Аичи/2/68(H3N2) в дозе 10LD50, А/Калифорния/1/66(H2N2) в дозе 10LD50 и А/Курган/05/05RG(H5N1) в дозе 5LD50. Вирусы получены из Коллекции вирусов гриппа и ОРЗ Научно-исследовательского института гриппа. Вирус гриппа А/Курган/05/05 RG (H5N1) является авирулентным штаммом, полученным в Научно-исследовательском институте гриппа методами обратной генетики [4]. Вирусы были адаптированы к мышам путем серии пассажей (мышь/куриный эмбрион). Аминокислотные последовательности поверхностных белков этих штаммов (M2, HA, NA) идентичны исходным вирусам. Вирусы вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии. В качестве отрицательного контроля в эксперименте использовали мышей, которым вводили ФБР и белок-носитель флагеллин. После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными. Протективное действие рекомбинантных белков оценивали по динамике

падения массы тела и 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. На основании полученных показателей гибели в каждой группе рассчитывали процент смертности M и индекс защиты IP по следующим формулам:

$$M = (N1:N2) \times 100\%,$$

где N1 – число павших за 14 дней животных, N2 – общее число зараженных животных в группе.

$$IP = (M1-M2):M1 \times 100\%,$$

где M1 и M2 – смертность в процентах в контрольной и опытной группах соответственно.

Статистическая обработка

Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism v 6.0. Статистическую значимость различий титров антител и антиген-специфических CD4+, CD8+ Т-клеток оценивали с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни, при сравнении показателей выживаемости применяли критерий Мантела – Кокса. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Исследования показали, что защита вакцин на основе пептида M2e обусловлена, главным образом, антителами [24]. Однако формирование M2e-специфического CD4+ Т-клеточного ответа может внести значительный вклад в защиту от гриппозной инфекции, так как CD4+ Т-клетки памяти могут регулировать активность клеток врожденного иммунного ответа, антитело-продуцирующих В-клеток, цитотоксических Т-лимфоцитов [25]. Экспериментальные исследования показали, что наличие вирус-специфических CD8+ и CD4+ клеток-памяти достаточно для обеспечения защиты против гетеросубтипического заражения [26, 27]. Показано также, что пре-существующие вирус-специфические CD8+ Т-клетки у человека коррелируют с защитой против пандемического вируса А/H1N1pdm09 [28]. Предполагается, что комбинация ненейтрализующих антител со специфическими CD4+ и CD8+ Т-клетками может обеспечить полную защиту против гриппозной инфекции. Поэтому кросс-протективные вакцины нового типа должны эффективно стимулировать не только продукцию антител к консервативным вирусным антигенам, но и специфический Т-клеточный ответ (CD4+ и CD8+).

При разработке кандидатной вакцины широкого спектра действия против вирусов гриппа А в качестве таргетных антигенов были выбраны консервативные фрагменты M2-белка и HA2-вирусов гриппа А (табл. 1).

Аминокислотные последовательности консервативных фрагментов поверхностных белков: эктодомен белка M2(2–24) (M2e) и HA2(76–130)

| Таргетный антиген | Аминокислотная последовательность |
|--|---|
| M2eh – консенсусная последовательность вирусов гриппа А человека | LLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD |
| M2es вируса гриппа А/Калифорния/07/09 H1N1pdm09 | LLLTEVETPTRSEWECRCSDSSD |
| HA2-2(76–130) консенсусная последовательность для вирусов гриппа второй филогенетической группы субтипов А/Н3N2 и А/Н7N9 | RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFEKTRRQLRENA |

M2e пандемического вируса гриппа (M2es) А/Калифорния/07/09 H1N1пдм09 по сравнению с консенсусной последовательностью M2e вирусов гриппа А человека (M2eh) отличается на 4 аминокислоты в положениях 11 (Т → I), 13 (S → N), 16 (E → G) и 20 (S → N). Предполагается, что введение в состав рекомбинантного белка двух различающихся по аминокислотному составу последовательностей M2e позволит расширить спектр защитного действия кандидатной вакцины, включая высокопатогенные штаммы вирусов гриппа субтипа А/Н5N1, так как M2es по сравнению с M2e вируса гриппа А/Н5N1 имеет одну лишь одну замену (N12S).

Фрагмент HA2 представляет собой большую α-спираль второй субъединицы HA, частично доступную с поверхности молекулы, эпитопы которой является мишенью для моноклональных антител. Так, T. Wang et al. [11] показали, что моноклональное антитело 12D1 взаимодействует с участком HA2(76–106) и обладает нейтрализующей способностью в отношении вирусов А/Н3N2 1968–2003 годов циркуляции. Выбор консенсусной последовательности второй субъединицы гемагглютини-на субтипов Н3 и Н7 вируса гриппа обусловлен их эпидемической значимостью. Вирусы субтипа А(Н3N2) циркулируют в человеческой популяции с 1968 г., вызывая практически ежегодно эпидемии гриппа. Вирусы субтипа А/Н7N9 рассматриваются специалистами как возможный донор генов для будущего пандемического вируса [29]. Оба целевых антигена (M2e и HA2-2) содержат Т-клеточные и В-клеточные эпитопы.

Были созданы химерные гены, кодирующие два гибридных белка. Схемы рекомбинантных белков представлены на рисунке 1.

Рекомбинантный белок Flg-4M2ehs содержит последовательность флагеллина, к которой на С-конце присоединены 4 копии M2e пептида (M2h-M2s-M2h-M2s). Белок Flg-HA2-2-4M2ehs содержит последовательность флагеллина, к которой на С-конце присоединен фрагмент второй

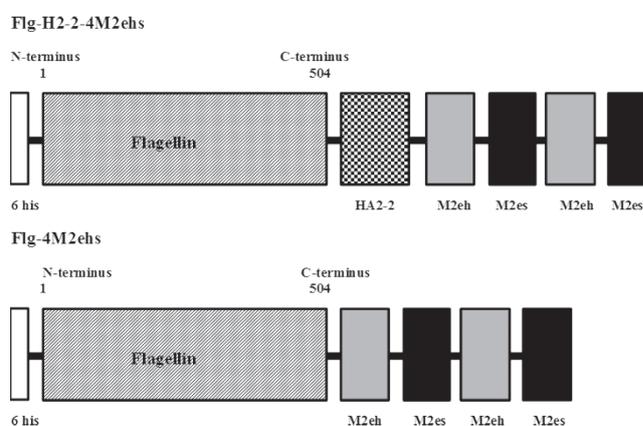


Рис. 1. Схемы рекомбинантных белков Flg-HA2-2-4M2ehs, Flg-4M2ehs

субъединицы HA(76–130) вирусов гриппа второй филогенетической группы, за которым следуют 4 копии пептида M2e (M2h-M2s-M2h-M2s). В этих белках последовательности M2e были разграничены друг от друга и от последовательности HA2-2 глицин-богатыми линкерами.

Ранее нами было показано [4], что M2e вирусов гриппа человека и птиц, слитых с С-концом флагеллина, индуцирует выраженный анти-M2e гуморальный ответ и обеспечивает защиту от вирусов гриппа субтипов А/Н1N1, А/Н3N2, А/Н5N1. Иммуноферментный анализ сывороток крови мышей, иммунизированных вакцинными белками с одним (Flg-4M2ehs) и двумя (Flg-HA2-2-4M2ehs) таргетными антигенами, показал также значительный уровень анти-M2e IgG и IgA в сыворотке и БАЛ мышей (рис. 2А – В) с отсутствием статистически достоверных различий в уровнях анти-M2e IgG и IgA между двумя рекомбинантными белками.

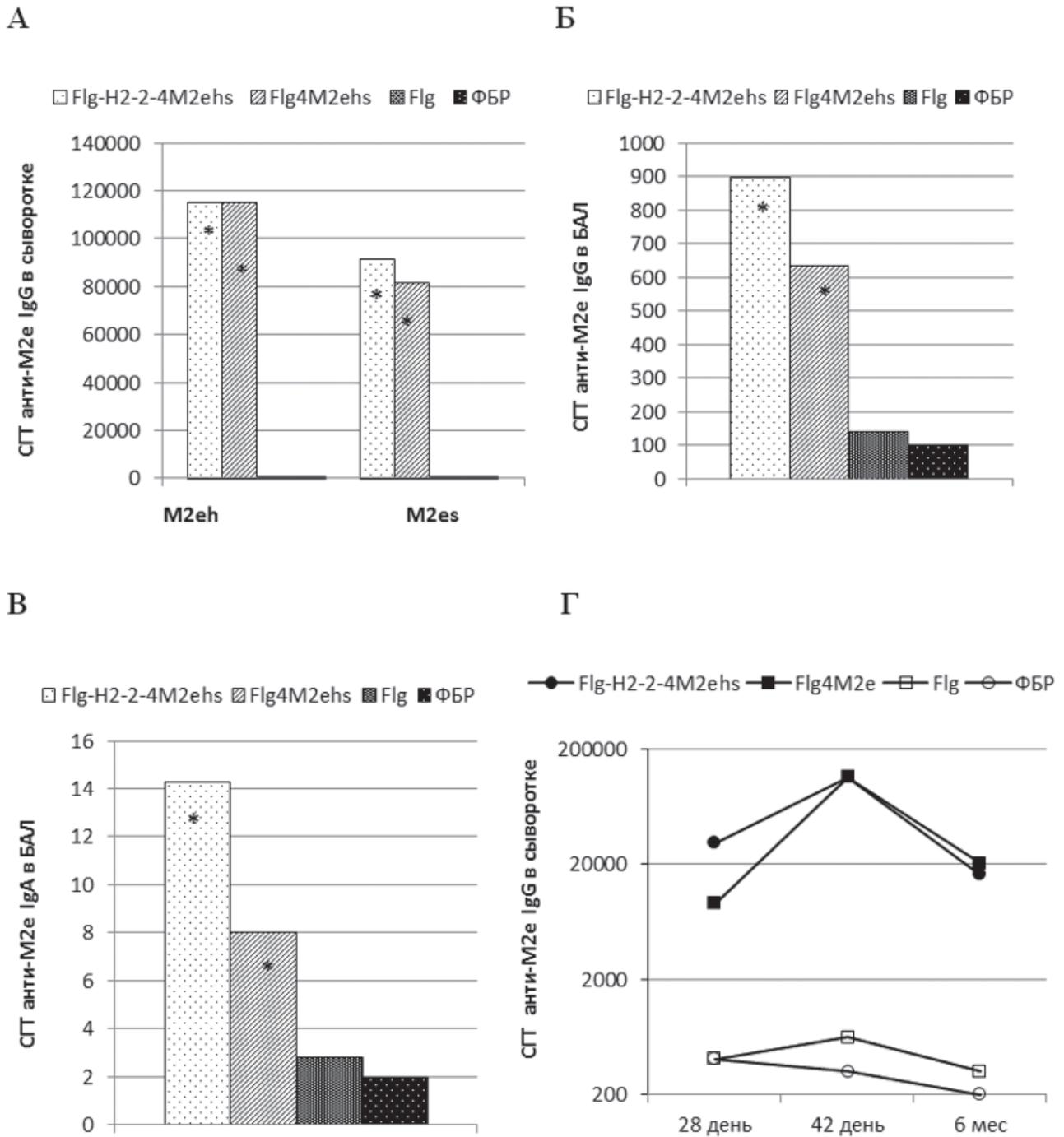


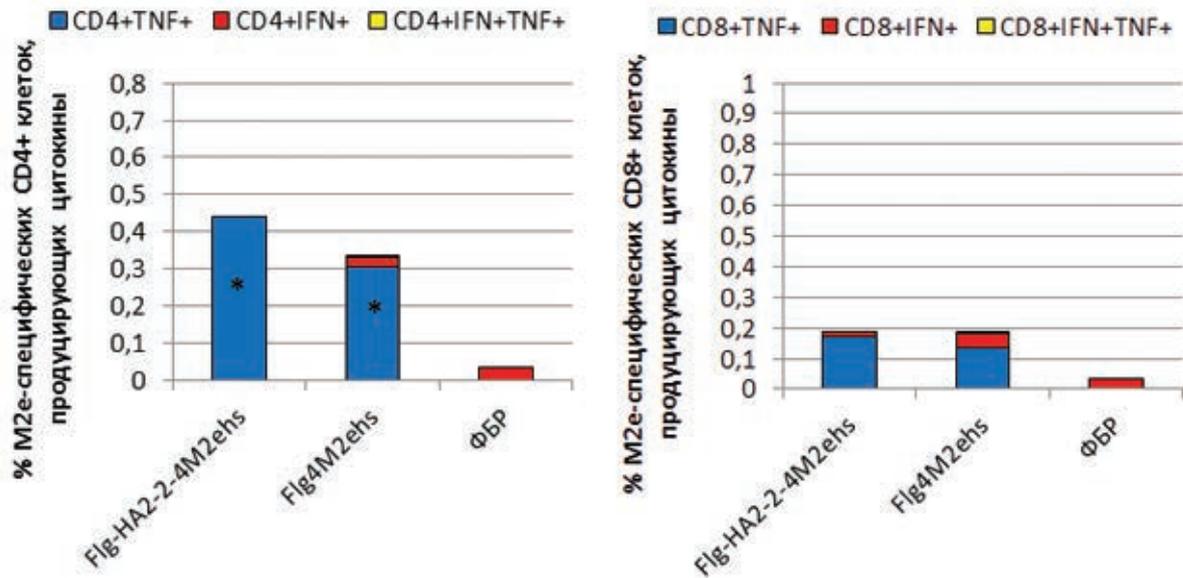
Рис. 2. Средний геометрический титр (СГТ) анти-M2e антител в сыворотке и БАЛ мышей после интраназальной иммунизации рекомбинантными белками Flg-H2-2-4M2ehs, Flg-4M2ehs: А – СГТ анти-M2e IgG в сыворотке; Б – СГТ анти-M2e IgG в БАЛ; В – СГТ анти-M2e IgA в БАЛ; Г – динамика изменения уровня сывороточных анти-M2e IgG на разных сроках после иммунизации мышей рекомбинантными белками. Для расчета р-значения использован критерий Манна – Уитни; * – достоверное отличие от контрольных групп (Flg, PBS) с $p < 0,01$

Таким образом, присоединение второго антигена (HA2-2) к С-концу флагеллина не снизило уровень индуцируемых M2e-специфических антител. Исследование сывороток крови мышей, взятых через 6 мес. после иммунизации, выявило достаточно высокие титры M2e-специфических антител (рис. 2Г).

В связи с тем, что таргетные антигены содержат Т-клеточные эпитопы, мы исследовали антиген-

специфический CD4+ и CD8+ Т-клеточный ответ в легких мышей на 14-й день после иммунизации методом внутриклеточного окрашивания цитокинов. После активации клеток легких M2e пептидом у мышей, иммунизированных рекомбинантными белками Flg-4M2ehs и Flg-HA2-2-4M2ehs, выявлялось 0,18% и 0,19% CD4+ клеток соответственно, продуцирующих цитокины (рис. 3А).

А



Б

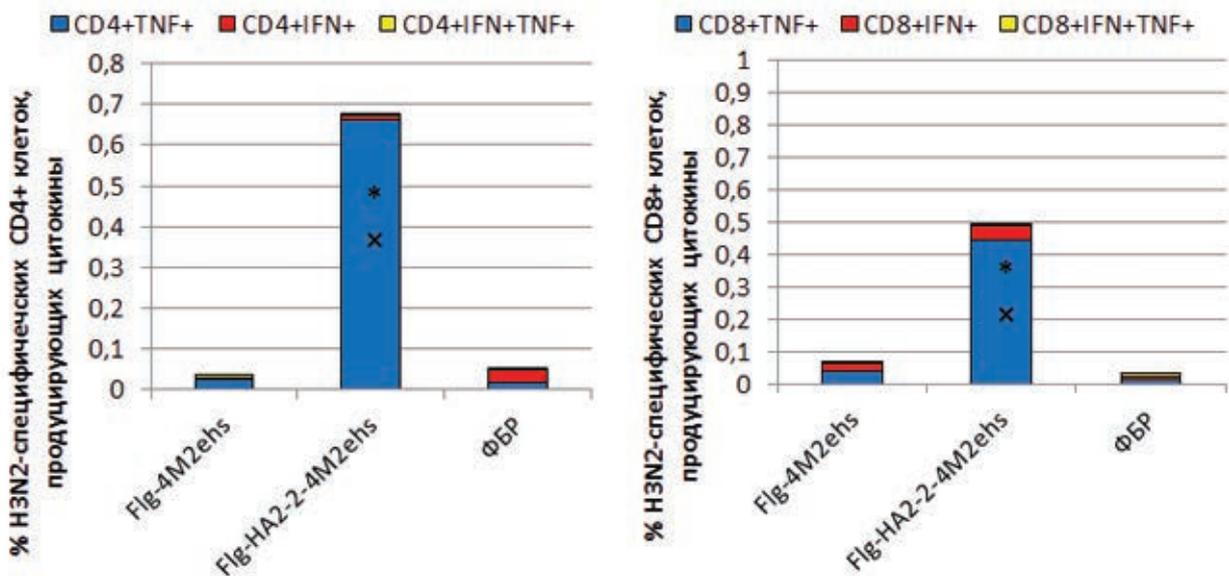


Рис. 3. Антиген-специфические CD4+ и CD8+ Т-клетки в легких мышей после интраназальной иммунизации. Показан % CD4+ и CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих IFN- γ или TNF- α после активации клеток пептидом M2e (А) и вирусом гриппа А/Н3N2 (Б); * – достоверное отличие от контрольной группы с $p < 0,05$; x – достоверное отличие группы Flg-4M2ehs, $p < 0,05$

При этом большинство CD4+ клеток в обеих группах мышей продуцировали TNF- α . Для обоих рекомбинантных белков было характерно отсутствие M2e-специфических CD4+ клеток, продуцирующих IFN- γ +, CD4+ клеток, одновременно продуцирующих два цитокина (TNF- α + IFN- γ +), а также значительного числа M2e-специфических CD8+ Т-клеток. Активация клеток легких вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) показала, что интраназальная иммунизация мышей рекомбинантным белком Flg-NA2-2-4M2ehs приводила к формированию значительного числа вирус-специфических CD4+ и CD8+ Т-клеток, продуцирующих TNF- α (0,66% и 0,44% соответственно) и отсутствию вирус-специфических клеток, продуцирующих IFN- γ + и двойных цитокин-продуцентов (рис. 3Б).

Чтобы сравнить защитный эффект двух рекомбинантных белков, мышей через две недели после последней интраназальной иммунизации заражали летальными дозами вирусов гриппа раз-

личных субтипов: A/Аичи/2/68 (H3N2), A/Калифорния/1/66 (H2N2) и A/Курган/05/05(H5N1). Как показано в таблице 2, мыши, иммунизированные Flg-NA2-2-4M2ehs, были полностью защищены от заражения летальной дозой вируса гриппа A/Аичи/2/68 (H3N2), тогда как белок Flg-4M2ehs обеспечил только 75% защиту животных. После заражения вирусом гриппа A/Калифорния/1/66 (H2N2) у мышей, иммунизированных Flg-NA2-2-4M2ehs, наблюдалась 100% выживаемость, в отличие от 60% выживаемости после иммунизации мышей Flg-4M2ehs (табл. 3). Иммунизация мышей Flg-NA2-2-4M2ehs также приводила к лучшему защитному эффекту (табл. 4) от вируса гриппа A/Курган/05/05(H5N1) по сравнению с рекомбинантным белком Flg-4M2ehs (90% и 70% выживаемость соответственно). Выраженный защитный эффект белка Flg-NA2-2-4M2ehs подтверждался меньшей потерей массы животных после заражения высокими дозами вирусов.

Таблица 2

Индекс защиты рекомбинантных белков при заражении иммунизированных мышей вирусом гриппа A/Аичи/2/68 (H3N2) в дозе 10LD50

| Препараты | Максимальная потеря веса (%) | Процент смертности, М (%) | Индекс защиты, IP (%) | Значение P (критерий Мантела – Кокса) |
|------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| Flg-NA2-2-4M2ehs | 20,5 | 0 | 100 | P<0,0001* P = 0,0002** |
| Flg-4M2ehs | 29 | 25 | 75 | P = 0,0072* P = 0,0184** |
| Flg | 27 | 100 | 0 | – |
| ФБР | 22 | 100 | – | – |

* – достоверное отличие от группы ФБР;

** – достоверное отличие от группы Flg.

Таблица 3

Индекс защиты рекомбинантных белков при заражении иммунизированных мышей вирусом гриппа A/Калифорния/1/66 (H2N2) дозе 10LD50

| Препараты | Максимальная потеря веса (%) | Процент смертности, М (%) | Индекс защиты, IP (%) | Значение P (критерий Мантела – Кокса) |
|------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------|--|
| Flg-NA2-2-4M2ehs | 15 | 0 | 100 | p<0,0001* p<0,0001** p = 0,0293x |
| Flg-4M2ehs | 20 | 40 | 55,6 | P = 0,0191* P = 0,0532** |
| Flg | 30 | 90 | 0 | – |
| ФБР | 25 | 90 | – | – |

* – достоверное отличие от группы ФБР;

** – достоверное отличие от группы Flg;

x – достоверное отличие от группы Flg-4M2ehs.

Индекс защиты рекомбинантных белков при заражении иммунизированных мышей вирусом гриппа А/Курган/05/05(H5N1) в дозе 5LD50

| Препараты | Максимальная потеря веса (%) | Процент смертности, М (%) | Индекс защиты, IP (%) | Значение P (критерий Мантела – Кокса) |
|------------------|------------------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------------------|
| Flg-NA2-2-4M2ehs | 17 | 10 | 87,5 | P=0,0014* P=0,0234** |
| Flg-4M2ehs | 20 | 30 | 62.5 | P=0,034* |
| Flg | 25 | 60 | 25 | – |
| ФБР | 30 | 80 | – | – |

* – достоверное отличие от группы ФБР;

** – достоверное отличие от группы Flg.

Заключение

Таким образом, включение в состав кандидатной гриппозной рекомбинантной вакцины двух таргетных антигенов (M2e и NA2-2(76-130)) приводило к формированию не только выраженного M2e-специфического гуморального и CD4+ Т-клеточного ответа, но и выраженного вирус-специфического CD4+ и CD8+ Т-клеточного ответа. Сравнение специфической активности двух рекомбинантных белков (Flg-4M2ehs и Flg-NA2-2-4M2ehs) показало существенную роль консервативного фрагмента второй субъединицы гемагглютинаина в формировании вирус-специфических CD4+ и CD8+ Т-клеток в легких и защите от летального заражения вирусами гриппа А человека и птиц. Полученные результаты показали перспективность разработки вакцинного препарата на основе двух консервативных антигенных детерминант вирусов гриппа А.

Благодарности

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

Литература

- 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 / J.W. Huleatt [et al.] / *Vaccine*. – 2008. – Vol. 26. – P. 201–214.
- Schotsaert, M. Universal M2 ectodomain-based influenza A vaccines: preclinical and clinical developments / M. Schotsaert [et al.] / *Expert. Rev. Vaccines*. – 2009. – Vol. 8. – P. 499–508.
- Kim, M-C. Virus-like Particles Containing Multiple M2 Extracellular Domains Confer Improved Cross-protection Against Various Subtypes of Influenza Virus / M-C. Kim [et al.] / *Molecular Therapy*. – 2013. – Vol. 21. – P. 485–492.
- Stepanova, L.A. Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin / L.A. Stepanova [et al.] / *PLoS One*. – 2015. – Vol. 10. – e0119520.

- 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 / L.M. Tsybalova [et al.] / *Vaccine*. – 2015. – Vol. 33. – P. 3398–3406.

- 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) / D.N. Taylor [et al.] / *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – P. 4897–4902.

- Turley, C.B. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults / C.B. Turley [et al.] / *Vaccine*. – 2011. – Vol. 29. – P. 5145–5152.

- Wang, T.T. Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins / T.T. Wang [et al.] / *PloS Pathog.* – 2010. – Vol. 6. – P. e1000796.

- Ekiert, D.C. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses / D.C. Ekiert [et al.] / *Science*. – 2011. – Vol. 333. – P. 843–850.

- Wrammert, J. Broadly cross-reactive antibodies dominate the human B cell response against 2009 pandemic H1N1 influenza virus infection. / J. Wrammert [et al.] / *J. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 208. – P. 181–193.

- Wang, T.T. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes / T.T. Wang [et al.] / *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2010. – Vol. 107. – P. 18979–18984.

- Bommakanti, G. Design of an HA2-based Escherichia coli expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge / G. Bommakanti [et al.] / *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. – 2010. – Vol. 107. – P. 13701–1376.

- 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 / A. Ameghi [et al.] / *Viral. Immunol.* – 2016. – Vol. 29. – P. 228–234.

- Stepanova, L.A. A Fusion Protein Based on the Second Subunit of Hemagglutinin of Influenza A/H2N2 Viruses Provides Cross Immunity / L.F. Stepanova [et al.] / *Acta Naturae*. – 2016. – Vol. 8. – P. 116–126.

- Gong, X. Conserved stem fragment from H3 influenza hemagglutinin elicits cross-clade neutralizing antibodies through stalk-targeted blocking of conformational change during membrane fusion / X. Gong [et al.] / *Immunol. Lett.* – 2016. – Vol. 172. – P. 11–20.

16. Jegerlehner, A. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity / A. Jegerlehner [et al.] / J. Immunol. — 2004. — Vol. 172. — P. 5598–5605.
17. Feng, J. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2 / J. Feng [et al.] / Virol. J. — 2006. — Vol. 3. — P.102.
18. Khanna, M. Protective immunity based on the conserved hemagglutinin stalk domain and its prospects for universal influenza vaccine Development / M. Khanna [et al.] / BioMed. Res. Int. — 2014. — 2014:546274.
19. Honko, A.N. Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis* / A.N. Honko [et al.] / Infect. Immun. — 2006. — Vol. 74. — P. 1113–1120.
20. Bates, J.T. Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice / J.T. Bates [et al.] / Mech. Ageing Dev. — 2008. — Vol. 129. — P. 271–281.
21. Liu, G. Flagellin-HA vaccines protect ferrets and mice against H5N1 highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) infections / G. Liu [et al.] / Vaccine. — 2012. — Vol. 30. — P. 6833–6838.
22. Katoh, K. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform / K. Katoh [et al.] / Nucleic Acids Res. — 2002. — Vol. 30. — P. 3059–3066.
23. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov [et al.] / Bioinformatics. — 2012. — Vol. 28. — P. 1166–1167.
24. Lee, Y.N. Mechanisms of cross-protection by influenza virus M2-based vaccines / Y.N. Lee [et al.] / Immune Netw. — 2015. — Vol. 15. — P. 213–221.
25. Swain, S.L. Expanding roles for CD4+ T cells in immunity to viruses / S.L. Swain, K.K. McKinstry, T.M. Strutt / Nat. Rev. Immunol. — 2012. — Vol. 12. — P. 136–148.
26. McKinstry, K.K. Memory CD4+ T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanism / K.K. McKinstry [et al.] / J. Clin. Invest. — 2012. — Vol. 122. — P. 2847–2856.
27. Eliasson, D.G. M2e-tetramer-specific memory CD4 T cells are broadly protective against influenza infection / D.G. Eliasson [et al.] / Mucosal Immunol. — 2017. — doi: 10.1038/mi.2017.14.
28. Sridhar, S. Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza / S. Sridhar [et al.] / Nat. Med. — 2013. — Vol. 19. — P. 1305–1312.
29. Zhou, L. Sudden increase in human infection with avian influenza A(H7N9) virus in China, September-December 2016 / L. Zhou [et al.] / Western Pac. Surveill Response J. — 2017. — Vol. 8. — P. 1–9.

Авторский коллектив:

Степанова Людмила Алексеевна — ведущий научный сотрудник Научно-исследовательского института гриппа, к.б.н.; тел.: 8(812)499-15-34, e-mail: stepanova60@mail.ru

Шуклина Марина Александровна — младший научный сотрудник Научно-исследовательского института гриппа; тел.: 8(812)499-15-34, e-mail: jigokutsushin@mail.ru

Блохина Елена Александровна — научный сотрудник Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии», к.б.н.; тел.: 8(499)783-32-64, e-mail: blohina-lena87@mail.ru

Котляров Роман Юрьевич — научный сотрудник Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии», к.б.н.; тел.: 8(499)783-32-64, e-mail: kotlyarov@biengi.ac.ru

Ковалева Анна Александровна — научный сотрудник Научно-исследовательского института гриппа; тел.: 8(812)499-15-34, e-mail: gifer@rambler.ru

Равин Николай Викторович — заместитель директора по научной работе Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии», д.б.н.; тел.: 8(499)783-32-64, e-mail: nravin@biengi.ac.ru

Цыбалова Людмила Марковна — заместитель директора по научной работе, заведующая отделом вакцинологии Научно-исследовательского института гриппа, д.м.н.; тел.: 8(812)499-15-18, e-mail: sovets@influenza.spb.ru