

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное Государственное Бюджетное Научное Учреждение
«Институт экспериментальной медицины»

На правах рукописи

МЕЖЕНСКАЯ

Дарья Андреевна

**СОЗДАНИЕ ПРОТОТИПА УНИВЕРСАЛЬНОЙ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ
ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО ДОМЕНА M2 БЕЛКА
ВИРУСА ГРИППА А**

1.5.10 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

*на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Научный руководитель:
д.б.н., член-корр. РАН
И.Н. ИСАКОВА-СИВАК

Санкт-Петербург

2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	11
1.1. Вирусы гриппа	11
1.1.1. Строение и классификация вирусов гриппа.....	11
1.1.2. Изменчивость вирусов гриппа А.....	13
1.2. Вакцинопрофилактика гриппа.....	15
1.2.1. Обзор существующих вакцин для профилактики сезонного гриппа	15
1.3. Подходы к усилению иммуногенности и расширению спектра действия сезонных гриппозных вакцин	17
1.3.1. Создание вакцин на основе NA	18
1.3.2. Создание вакцин на основе HA	19
1.3.2.1. Создание искусственных консенсусных последовательностей	19
1.3.2.2. Вакцины на основе стеблевого домена HA	19
1.3.3. Т-клеточные вакцины	21
1.4. Создание универсальных гриппозных вакцин на основе эктодомена белка M2.....	22
1.4.1. Этапы изучения M2	22
1.4.2. Функции M2 белка.....	25
1.4.3. Механизмы защиты вакцин на основе M2e	27
1.4.4. Различные модификации M2e	30
1.4.5. Разработка вакцин на основе M2e антигена.....	32
1.4.6. Клинические испытания вакцин на основе M2e.....	41
1.5. Заключение к обзору литературы.....	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	45
2.1. Материалы	45
2.2. Методы исследования	46
2.2.1. Эволюционный анализ последовательностей M2e.....	46
2.2.2. Методы обратной генетики.....	46
2.2.3. Вирусологические методы	47
2.2.4. Оценка экспрессии M2e рекомбинантными вирусами гриппа.....	49
2.2.5. Методы работы с лабораторными животными	50
2.2.6. Иммунологические методы	52
2.2.7. Оценка безопасности вакцин	54

2.2.8. Методы статистического анализа результатов исследования	55
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ	56
3.1. Поиск консенсусной последовательности M2e для конструирования универсальной гриппозной вакцины	56
3.2. Конструирование вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины, кодирующих дополнительные эпитопы M2e	59
3.2.1. Встраивание дополнительных эпитопов M2e в молекулу HA	59
3.2.2. Оценка экспрессии M2e фрагментов рекомбинантными вирусами гриппа	60
3.2.3. Оценка ростовых характеристик вакцинных прототипов в системе in vitro	61
3.3. Оценка аттенуирующих свойств вакцинных прототипов	64
3.4. Изучение иммуногенности и протективной активности вакцинного прототипа на основе штамма H7N9 на модели мышей	65
3.4.1. Иммуногенность модельного штамма H7N9-HA+4M2e для мышей линии BALB/c	65
3.4.2. Протективная активность модельного штамма H7N9-HA+4M2e в экспериментах на мышцах линии BALB/c.....	69
3.4.2.1. Изучение прямого защитного действия вакцин.....	69
3.4.2.2. Изучение роли M2e-специфических антител в защите при проведении опытов по пассивной иммунизации.....	74
3.5. Иммуногенность и защитная эффективность прототипов универсальной гриппозной вакцины на основе сезонных штаммов H1N1 и H3N2	75
3.5.1. Проведение прайм-буст иммунизации гомологичными вакцинами	75
3.5.1.1. Изучение иммуногенности вакцин на основе штаммов H1N1 и H3N2.....	75
3.5.1.2. Изучение протективной активности вакцин на основе штамма H3N2.....	76
3.5.2. Проведение прайм-буст иммунизации гетерологичными вакцинными вирусами	77
3.5.2.1. Изучение иммуногенности вакцин при использовании различных режимов иммунизации	77
3.5.2.2. Изучение кросс-протективной активности вакцин при использовании различных режимов иммунизации	78
3.5.3. Характеристика В-клеточного ответа у мышей при использовании различных режимов иммунизации	79
3.5.4. Характеристика Т-клеточного ответа у мышей при использовании различных режимов иммунизации	80
3.6. Альтернативные стратегии по конструированию вакцинных штаммов ЖГВ, кодирующих дополнительные эпитопы M2e	82
3.6.1. Сравнение эффективности различных консенсусных последовательностей M2e.....	82
3.6.2. Создание вакцинных прототипов путем кодирования дополнительных эпитопов M2e в гене NS	84

3.6.3. Отбор наиболее перспективных кандидатов для их дальнейшей характеристики в доклинических исследованиях	86
3.6.4. Изучение ростовых характеристик <i>in vitro</i> отобранных прототипов универсальной гриппозной вакцины	87
3.7. Доклиническое изучение вакцинных кандидатов на модели хорьков	89
3.7.1. Оценка репликативных свойств вакцинных прототипов.....	89
3.7.2. Оценка безвредности вакцинных прототипов	91
3.7.3. Оценка иммуногенности вакцинных прототипов	93
3.7.4. Оценка кросс-протективной активности вакцинных прототипов в отношении гетерологичного вируса гриппа А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)	98
3.7.4.1. Оценка вирусной нагрузки в тканях животных	98
3.7.4.2. Оценка клинических симптомов гриппозной инфекции после заражения.....	99
3.7.4.3. Гистопатологическая оценка повреждений тканей респираторного тракта хорьков после заражения	100
3.7.5. Изучение факторов иммунного ответа иммунизированных хорьков после заражения гетерологичным вирусом гриппа.....	103
3.7.6. Оценка защитного потенциала вакцин в отношении патогенных гетерологичных вирусов гриппа А в опытах по пассивной иммунизации мышей	105
3.7.7. Корреляционный анализ зависимости вирусной нагрузки в респираторных органах от количества стимулированных IgG антител после иммунизации	107
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	109
ВЫВОДЫ.....	116
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	117
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	119

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Грипп – инфекционное респираторное заболевание, которое проявляет ярко выраженный сезонный характер и является причиной возникновения эпидемий и пандемий. Ежегодно регистрируется от трёх до пяти миллионов случаев тяжёлого течения заболевания и более чем 650 000 случаев летального исхода [98]. Несмотря на сниженную активность вирусов гриппа в сезоне 2020-2021 в результате принятых мер по сдерживанию нового заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2 [195], вирусы гриппа продолжают циркулировать среди людей и наносить существенный социально-экономический ущерб.

Вакцинация является наиболее эффективной мерой по борьбе с распространением гриппа и снижению числа госпитализаций. Однако, вакцинация сезонными гриппозными вакцинами приводит к формированию преимущественно штамм-специфического гуморального иммунного ответа и является неэффективной против дрейфовых вариантов вирусов гриппа. Кроме того, периодически в человеческую популяцию заносятся совершенно новые, ранее не циркулировавшие антигенные варианты вируса гриппа, и, поскольку население к ним иммунологически наивно, вирусы с легкостью распространяются среди людей, вызывая глобальную пандемию. Особенную опасность представляют также активно циркулирующие среди животных и птиц в последнее десятилетие высокопатогенные вирусы гриппа, с потенциальной угрозой трансмиссии в человеческую популяцию. Именно эти особенности гриппозной инфекции объясняют пристальное внимание мирового научного сообщества к проблеме разработки универсальных гриппозных вакцин, направленных на индукцию перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков. Такие универсальные вакцины призваны обеспечить защиту против любого серотипа вируса гриппа А, в результате чего отпадает необходимость в ежегодной вакцинации, и, как следствие этого, существенно снижаются затраты на профилактику заболеваемости гриппом [125, 175].

Для разработки универсальных гриппозных вакцин чаще всего используют такие консервативные антигены вируса гриппа, как стеблевой домен молекулы гемагглютинина (НА), нейраминидаза (НА), а также внутренние белки вириона (белки полимеразного комплекса, нуклеопротеин (NP) и матриксные белки М1 и М2) [96]. Несмотря на определенные успехи, достигнутые в последние годы в области создания универсальной гриппозной вакцины, до сих пор не представлены конструкции, полностью удовлетворяющие всем требованиям безопасности, иммуногенности, генетической стабильности, возможности крупномасштабного

производства и экономической целесообразности. В этой связи разработка новых подходов к созданию универсальных гриппозных вакцин является своевременной и актуальной.

Степень разработанности темы. Эктодомен белка M2 (M2e) вируса гриппа А является наиболее широко используемой мишенью для создания универсальной гриппозной вакцины ввиду его консервативности среди различных подтипов вируса гриппа А. Однако сам по себе фрагмент M2e является слабым иммуногеном из-за своего размера, малого числа вхождения в вирион, а также из-за экранирующего действия более крупных поверхностных белков вируса гриппа А [189]. Опубликовано большое количество работ, целью которых являлось усиление иммуногенности M2e с помощью различных носителей. Для повышения иммуногенности M2e чаще всего используют присоединение этого маленького пептида к более крупному белковому носителю; также используют увеличение числа повторов M2e с последующим включением получившейся структуры в различные системы доставки. Одним из таких носителей может выступать белок GCN4, который является эукариотическим транскрипционным белковым активатором. Использование такого носителя M2e (M2e-tGCN4) привело к значительной выработке M2e-специфических антител, уровень которых обеспечил защиту вакцинированных мышей от летальной дозы вируса гриппа А, адаптированного для мышей [39]. Другим носителем может выступать коровый фрагмент вируса гепатита В (M2e-HBc), использование которого также привело к выработке M2e-специфических антител и защите вакцинированных мышей [51]. Имеются исследования, в которых M2e присоединялся к N-концу укороченного белка теплового шока (HSP70359-610), выделенного из *Mycobacterium tuberculosis* [49]. Также в качестве носителя может быть использован пептид слияния вируса гриппа [72], различные липосомные носители [7], поверхностный белок вируса табачной мозаики [180], липопротеин Ag473 менингококка *N. Meningitidis* [254], флагеллин [4, 204, 220], и другие [117].

В настоящее время некоторые разработки находятся на различных этапах клинических испытаний. Так, вакцина ACAM-FLU-A, основанная на первоначальной идее Neirynck и др. [167], уже прошла I фазу клинических испытаний (NCT00819013, Sanofi). Внутримышечное введение ACAM-FLU-A способствовало формированию анти-M2e антител в сыворотках крови у 90% испытуемых и не вызывала побочных действий. Однако уровень таких антител быстро снижался со временем, в результате чего дальнейшие клинические испытания ACAM-FLU-A были приостановлены. Аналогичная идея использования вакцины на основе HBc [219] была изучена при проведении клинических испытаний вакцины «Унифлю» (NCT03789539, VA Pharma LLC). Другая гриппозная вакцина, основанная на идее использования флагеллина для увеличения иммуногенности M2e [85], в I фазе клинических испытаний продемонстрировала высокую иммуногенность (NCT00921206, VaxInnate) [221]. Тем не менее, вакцины на основе M2e пока не

были зарегистрированы для профилактики гриппозной инфекции, и разработки в данном направлении продолжаются.

Цели и задачи исследования. Все вышеизложенное определило основную ЦЕЛЬ настоящей работы, состоящую в разработке универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка вируса гриппа А. В соответствии с целью, были поставлены следующие задачи:

1. Проанализировать эволюционную изменчивость эктодомена М2 белка вирусов гриппа А с целью отбора консенсусных последовательностей М2е для дальнейшего конструирования универсальной гриппозной вакцины.
2. Сконструировать вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины, несущие в своем составе увеличенное число эктодоменов М2 белка вируса гриппа А.
3. Оценить иммуногенность и кросс-протективность сконструированных вакцинных прототипов на модели мышей.
4. Определить факторы иммунного ответа, коррелирующие с усиленной кросс-протективностью рекомбинантных вакцинных штаммов.
5. Оценить безвредность, иммуногенность и протективную активность перспективных кандидатов в универсальную живую гриппозную вакцину в доклинических исследованиях на хорьках.

Научная новизна работы:

1. Данная работа явилась первой попыткой создания универсальной живой гриппозной вакцины, индуцирующей усиленный гуморальный иммунный ответ к консервативному участку белка М2 вируса гриппа А.
2. Впервые были сконструированы рекомбинантные штаммы ЖГВ подтипов Н1Н1, Н3Н2 и Н7Н9 на основе отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, кодирующие в своем геноме 4 копии М2е белка. Встроенные фрагменты 4М2е представляют собой консенсусные последовательности М2е всех генетических линий вирусов гриппа А, циркулирующих среди людей, свиней и птиц.
3. Была продемонстрирована возможность встраивания М2е эпитопов между сигнальным пептидом и субъединицей НА1 молекулы гемагглютинаина, при этом не нарушались репликативные свойства вакцинных вирусов как в системе *in vitro*, так и в респираторном тракте лабораторных животных.
4. Впервые был сконструирован рекомбинантный штамм ЖГВ, экспрессирующий фрагмент 4М2е в рамке считывания NS1 белка донора аттенуации А/Ленинград/17, укороченного до 126 а.к.
5. Было показано, что интраназальная иммунизация животных рекомбинантными штаммами ЖГВ+4М2е приводила к выработке достоверно более высоких уровней анти-М2е антител по

сравнению с классическими штаммами ЖГВ. При этом встраивание М2е эпитопов в молекулу гемагглютинаина приводило к выработке достоверно более высоких уровней М2е-специфических антител, по сравнению с внесением 4М2е кассеты в рамку считывания NS1 белка.

6. Впервые проведено детальное изучение различных звеньев вирусспецифического иммунитета при иммунизации новыми вакцинными прототипами, которое показало, что наиболее вероятным механизмом, обеспечивающим перекрестную защиту иммунизированных животных от заражения гетерологичным вирусом гриппа, является секреция М2е-специфических антител В-клетками, расположенными в медиастинальных лимфатических узлах животных.
7. Кроме того, эксперименты по пассивной иммунизации мышей сыворотками иммунизированных животных показали наиболее широкий спектр защиты у образцов из групп ЖГВ+4М2е, что также указывает на вклад М2е-специфических антител в усиление защиты от заражения гетерологичными вирусами гриппа.

Теоретическая и практическая значимость работы. В ходе выполнения диссертационной работы были смоделированы последовательности вставок из целевых М2е-эпитопов для конструирования живой гриппозной вакцины с максимально широким покрытием вирусов гриппа А, циркулирующих как среди людей, так и среди свиней и птиц. Данные последовательности также могут быть использованы для дизайна универсальной гриппозной вакцины на основе других платформ, включая векторные вакцины, рекомбинантные белковые технологии, а также вакцины на основе нуклеиновых кислот.

В ходе реализации диссертационного исследования была сконструирована панель рекомбинантных штаммов – кандидатов в универсальную ЖГВ, в экспериментах на животных продемонстрирована их способность обеспечивать защиту против широкого круга антигенно-удаленных вирусов гриппа, а наиболее перспективные варианты были изучены в расширенных доклинических испытаниях на модели хорьков. В результате был отобран кандидат ЖГВ/НА+4М2е для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах. Успешная апробация прототипа универсальной гриппозной вакцины в клинических исследованиях позволит защитить население от любого вновь возникающего вируса гриппа, в том числе пандемического варианта, и снизить заболеваемость и смертность от гриппа и его осложнений.

Методология и методы исследования. В работе применяли стандартные вирусологические, серологические, иммунологические, биоинформатические и статистические методы. Исследование проводилось на базе ФГБНУ «Институт Экспериментальной Медицины» Минздрава России.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины, кодирующие в своем геноме дополнительные консенсусные последовательности эктодомена M2 белка, являются безвредными, иммуногенными и индуцируют у экспериментальных животных повышенные уровни M2e-специфичных антител, коррелирующие со степенью защиты от заражения гетеросубтипическими вирусами гриппа А.
2. Перекрестная защита животных, иммунизированных экспериментальными прототипами универсальной живой гриппозной вакцины, обеспечивается за счет усиленной секреции M2e-специфических антител В-клетками, расположенными в медиастинальных лимфатических узлах, на ранних стадиях после заражения. При этом наиболее вероятной эффекторной функцией M2e-специфических антител является комплемент-зависимая цитотоксичность.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном проведении важнейших этапов исследования, включая анализ литературных данных по теме исследования, поиск консервативных участков M2e биоинформатическими методами, конструирование рекомбинантных вакцинных штаммов методами обратной генетики, изучение свойств вакцинных кандидатов в системе *in vitro*, изучение иммуногенных и кросс-протективных свойств вакцинных прототипов подтипа H7N9 на модели мышей, а также статистическую обработку данных, интерпретацию и осмысление полученных результатов. Исследование вакцинных прототипов подтипов H1N1 и H3N2 на мышях линии BALB/c проводилось в лаборатории профессора Sang-Moo Kang (Государственный Университет штата Джорджия, Атланта, США) при участии Котоминой Т.С. Доклинические исследования вакцинных прототипов на модели хорьков проводились на базе ООО «Институт доклинических исследований» (пос. Кузьмолово, Ленинградская обл.), при этом вирусологические и иммунологические исследования были выполнены автором лично.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертационного исследования были представлены на различных международных (The 8th ESWI Influenza Conference (Декабрь 4-7, 2021, онлайн), The 7th ESWI Influenza Conference (Декабрь 6-9, 2020, онлайн); 10th edition of Options for the Control of Influenza (Август 28 – Сентябрь 02, 2019, Сингапур); Научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Декабрь 4-6, 2018, Санкт-Петербург); XXI Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Апрель 14, 2018, Санкт-Петербург); 2nd International Meeting on Respiratory Pathogens (Март 7-9, 2018, Сингапур) и российских конференциях (Санкт-Петербургская молодежная школа-конференция «Достижения и перспективы в борьбе с инфекционными заболеваниями (грипп, COVID-19) на

национальном и международном уровне», посвященная 120-летию со дня рождения академика А.А. Смородинцева (Сентябрь 6-7, 2021, Санкт-Петербург); XII Ежегодный всероссийский конгресс по инфекционным заболеваниям (Сентябрь 7-9, 2020, Москва);

Публикации. По материалам диссертационного исследования опубликовано 18 печатных работ, из которых 6 научных статей в журналах, входящих в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus, и 12 тезисов докладов на отечественных и международных конференциях.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Вирусы гриппа

1.1.1. Строение и классификация вирусов гриппа

Грипп – инфекционное респираторное заболевание инфекционное респираторное заболевание. Данное заболевание вызывается вирусами гриппа, которые принадлежат семейству ортомиксовирусов (Orthomyxoviridae) и образуют 4 рода (Род *Alphainfluenzavirus* – вирусы гриппа А, Род *Betainfluenzavirus* – вирусы гриппа В, Род *Gammainfluenzavirus* – вирусы гриппа С и Род *Deltainfluenzavirus* – вирусы гриппа D). Все представители вирусов гриппа являются оболочечными вирусами, генетическая информация которых представлена сегментированной одноцепочечной (-)РНК (Рисунок 1). Разделение вирусов по родам происходит на основе их нуклеокапсидных и матриксных белков, по числу сегментов в геноме, по способности заражать тот или иной организм и по степени тяжести вызываемого заболевания [125, 208].

Вирусы гриппа А и В широко распространены среди людей и животных, и именно они наносят наибольший социально-экономический ущерб. У обоих вирусов гриппа А и В три наибольшие РНК по размеру кодируют сегменты РНК-зависимой РНК полимеразы (PB1, PB2 и PA), ответственные за синтез вирусной РНК и репликацию внутри заражённой клетки. Два сегмента кодируют вирусные гликопротеины – гемагглютинин (НА), способный связываться с сиаловыми кислотами клетки-хозяина и обеспечивающий проникновение вириона в клетку, и нейраминидазу (NA), обеспечивающую высвобождение вирусного потомства путём отщепления остатков сиаловой кислоты от олигосахаридных цепей. Сегмент 5 кодирует вирусный нуклеопротеин (NP), связывающий вирусную РНК сразу же после ее синтеза. Сегменты 7 и 8 кодируют сразу несколько белков. Матриксный (M1) и мембранный (M2 или BM2, в случае вируса гриппа В) формируются с 7-го сегмента РНК, а неструктурный (NS1) и белок ядерного экспорта (NEP) получают с 8-го сегмента. Белок M1 выстилает поверхность вириона изнутри и совместно с NEP координирует перемещение вирусной РНК внутри клетки. M2 работает в качестве протон-селективного канала, необходимого для регуляции цикла репликации вируса гриппа. M2, совместно с НА и NA, частично находится на поверхности мембраны, которую вирус получает от заражённой клетки, а частично находится в заякоренном в мембрану состоянии. NS1 является одним из основных факторов вирулентности вируса гриппа, поскольку выступает в качестве ингибитора клеточного противовирусного ответа. Также вирусы гриппа А способны экспрессировать дополнительные белки – PB1-F2 и PA-x, участвующие в подавлении

антивирусного ответа клетки, а также белки M42, NS3 и другие [223]. Такие белки не представлены в составе вириона или представлены в очень малом количестве, поэтому их функция до сих пор неясна [125]. Альтернативный сплайсинг пре-мРНК осуществляется клеточным аппаратом сплайсинга и возможен благодаря тому, что синтез РНК вирусов гриппа происходит в ядрах заражённых клеток [3]

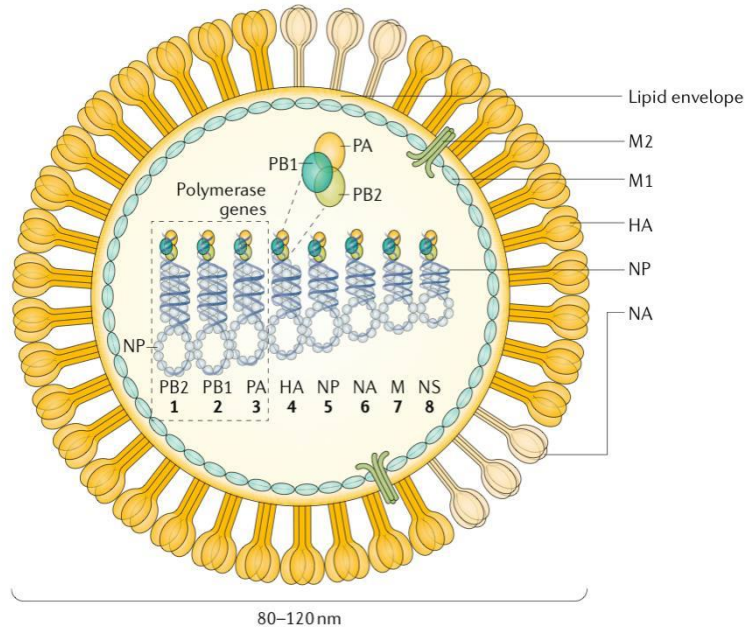


Рисунок 1 – Схематическое изображение вириона вируса гриппа А. Адаптировано из [125].

Вирусы гриппа С и D имеют в своём составе по 7 РНК-сегментов. Вирусы гриппа С циркулируют среди людей и некоторых животных (собаки, свиньи) и способны вызывать локальные вспышки заболевания [153, 154]. Вирусы гриппа D, в свою очередь, циркулируют среди животных, преимущественно крупного рогатого скота [208].

Несмотря на широкую представленность различных вирусов гриппа среди людей и животного мира, только вирусы гриппа А способны вызывать пандемии в дополнение к ежегодному сезонному приросту заболеваемости. Основной отличительной особенностью вирусов гриппа А является их колоссальный природный резервуар, допускающий возникновение новых штаммов данного патогена.

На основании антигенных особенностей поверхностных белков HA и NA, все вирусы гриппа А делятся на различные серотипы. Всего существует 16 различных подтипов HA и 9 подтипов NA. Если учитывать штаммы, циркулирующие среди летучих мышей, то число подтипов HA возрастёт до 18, а NA – до 11. Однако несмотря на филогенетическое родство вирусов летучих мышей и других вирусов гриппа А, возможная реассортация между ними на сегодняшний момент не была зафиксирована. В настоящее время среди людей циркулируют

вирусы гриппа А только подтипов H1N1 и H3N2, а в период с 1957 по 1968 гг. фиксировалась циркуляция штаммов H2N2 среди людей. Однако исследования показали, что у вирусов H5, H6, H7 и H9 также есть потенциал для передачи от животных человеку [232].

Вирусы гриппа В и С не имеют аналогичного деления на подтипы и не так широко представлены среди животных. Постоянные мутации, происходящие в геноме РНК-содержащих вирусов, привели к разделению всех вирусов гриппа В на две линии – В/Виктория/2/1987-подобные и В/Ямагата/16/1988-подобные, которые также со-циркулируют среди людей [178].

1.1.2. Изменчивость вирусов гриппа А

Одним из способов ухода от иммунного ответа человека вирусами гриппа является постоянное накопление мутаций в поверхностных гликопротеинах HA и NA, тогда как накопление мутаций в других белках происходит с гораздо меньшей скоростью [106]. Данный процесс называется антигенным дрейфом, и именно он делает необходимым ежегодное обновление состава вакцин для максимальной схожести циркулирующих и вакцинных штаммов.

Основным механизмом действия сезонных вакцин является создание продолжительного антительного ответа против вирусных гликопротеинов HA и в меньшей степени NA. Так, HA-специфические антитела нейтрализуют вирусную активность и полностью защищают от заражения, если они присутствуют в достаточной концентрации в слизистой оболочке дыхательных путей, тогда как NA-специфические антитела блокируют высвобождение новых вирусных частиц из инфицированных клеток [48].

Всемирная организация здравоохранения ведёт непрерывное наблюдение за изменениями, происходящими в белках HA и NA вирусов гриппа. В специальных референсных центрах анализируются антигенные свойства штаммов, выделенных от заболевших в данный сезон, с помощью реакции ингибирования гемагглютинирующей активности. Данный метод основан на способности вирусов гриппа агглютинировать красные кровяные клетки и на способности иммунных сывороток противостоять такой агглютинации. Также пристальное наблюдение ведётся за изменениями нуклеотидных последовательностей HA. Метод антигенной картографии позволяет численно определить степень произошедших изменений в результате антигенного дрейфа [197]. Данными методами было показано, что даже небольшое число аминокислотных замен, произошедших в функциональных сайтах головной субъединицы HA, могут вызвать существенный антигенный дрейф [116]. Менее пристальное наблюдение ведётся за NA, однако более широкое применение методов подавления нейраминидазной активности поможет в дальнейшем усилить антигенное соответствие вакцинных и циркулирующих штаммов [125].

Другим механизмом изменчивости, приводящим к более значительному изменению вирусов гриппа, является реассортация, которая возможна благодаря сегментированному геному вирусов гриппа. Все известные пандемии, начиная с 1918-го года, были вызваны именно реассортационным изменением антигенного состава вирусов гриппа. Так, например, пандемия 2009-го года была вызвана появлением тройного реассортанта вирусов гриппа А человека, свиньи и птицы (Рисунок 2) [64]. Причины возникновения пандемии 1918-го года до сих пор точно не установлены – одной из возможных причин считается возникшая реассортация вирусов гриппа человека и птиц [185].

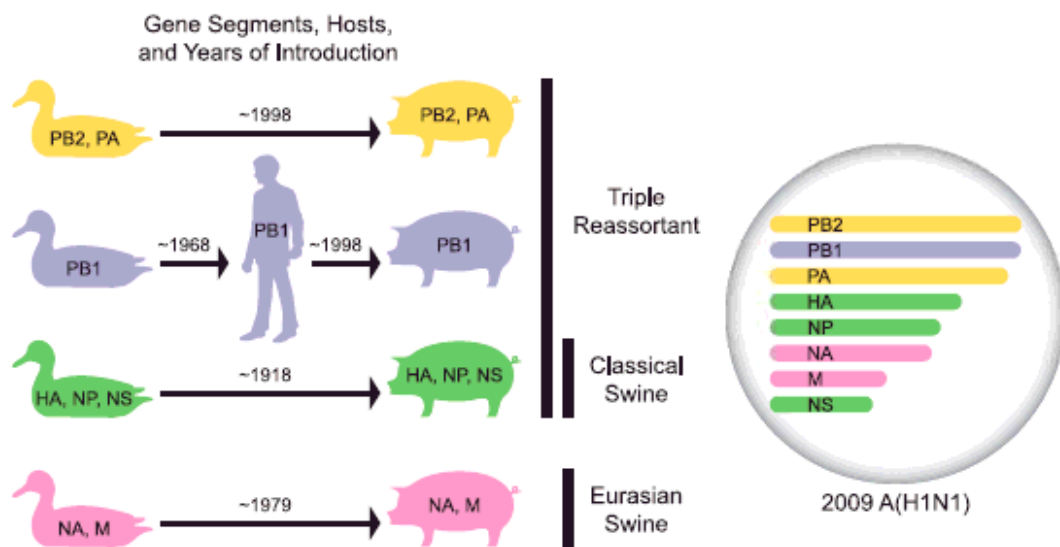


Рисунок 2 – Схема происхождения геномам пандемического штамма 2009-го года, полученного путём реассортации. Адаптировано из [64].

Природным резервуаром вирусов гриппа А считаются водоплавающие птицы, поскольку среди них были найдены штаммы с различными HA (H1-H16) и NA (N1-N9) [243]. Также предполагается, что некоторые вирусы водоплавающих птиц передались другим видам птиц (например, курицам, перепелам или индейкам) и млекопитающих (человек, свинья, лошади, собаки, морские млекопитающие и т.п.). Внутривидовая и межвидовая передача вирусов включает в себя вирусную адаптацию к новому хозяину. Такая особенность свойственна вирусам гриппа, поскольку у их РНК-полимеразной субъединицы отсутствует корректорская активность, которая приводит к появлению большего числа мутаций, по сравнению с клеточной ДНК-полимеразой. Возникающие адаптационные изменения затрагивают как HA – для оптимизации работы при различных рН, свойственных различным хозяевам, так и NA, для оптимизации тонкого баланса функций данных белков (рецептор-специфического связывания и разрушения). Также мутации затрагивают различные субъединицы РНК-полимеразного комплекса, влияющие

на репликационные свойства вирусов гриппа в том или ином хозяине. Изменения в NP влияют на связывание с интерферон-индуцированным ГТФ-связывающим белком хозяина Mx1. Мутации в M1 и M2 в свою очередь влияют на вирусную морфологию и способствуют адаптации к новым вирусным хозяевам [125].

1.2. Вакцинопрофилактика гриппа

1.2.1. Обзор существующих вакцин для профилактики сезонного гриппа

В настоящее время вакцинация является наиболее эффективной мерой по борьбе с распространением гриппа и снижению числа госпитализаций [6, 22]. Первые попытки по созданию вакцины от гриппа были реализованы вскоре после обнаружения вирусов гриппа А.

В настоящее время существует два основных типа вакцин от гриппа – живые гриппозные вакцины (ЖГВ) и инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ) [194]. Поскольку среди людей одновременно циркулируют вирусы гриппа, значительно отличающиеся по антигенному составу, традиционно гриппозные вакцины являлись трехвалентными – содержали по два компонента вирусов гриппа А (штаммы H1N1 и H3N2) и один – вируса гриппа В [60]. Однако, антигенные различия линий В/Виктория и В/Ямагата, а также низкий уровень предсказания штамма, который по мнению специалистов ВОЗ будет циркулировать в следующем сезоне, привели к созданию также и четырехвалентных вакцин [172], которые применяются на практике уже с 2012 года.

Для создания ИГВ инактивация вирусных агентов может быть проведена различными способами, поэтому на рынке препаратов представлены сразу несколько типов ИГВ. Для производства цельновирионных вакцин вирусный материал изначально накапливается с использованием развивающихся куриных эмбрионов (реже – с использованием клеточных систем) и впоследствии инактивируется под воздействием химических реагентов (например, формалином или β-пропиолактоном). В результате такого воздействия нарушается вирусная способность заражать клетки и реплицироваться, но при этом сохраняются необходимые антигены HA и NA для индукции иммунного ответа [28]. Сплит-вакцины производятся на основе цельновирионных вакцин, однако, инактивация таких вакцин включает обработку детергентами для разрушения вирусной оболочки. В результате удаляются нуклеиновые кислоты и большие вирусные белки, тогда как сохраняются наиболее важные антигены – HA, NA, а также M1 и NP [121]. В последнее время сплит-вакцины вытеснили цельновирионные вакцины за счёт снижения наблюдаемых побочных эффектов [28].

Ещё одним подвидом ИГВ являются субъединичные вакцины, которые содержат только очищенные антигены HA и NA. Изначально такие вакцины создавались на основе сплит-вакцин,

однако с развитием генно-инженерных методов стало доступным создание экспрессионных конструкций с необходимыми свойствами [124].

Также существуют вакцины на основе виросом, которые представляют собой подобие оболочки вируса гриппа, в которой имеются НА, NA и вирусные фосфолипиды. Такое строение обеспечивает способность к слиянию мембран, то есть делает возможным проникновение в клетки для усиления иммунной реакции [28]. Была показана способность таких вакцин продуцировать вирусные антиген-специфические антитела, но не CD8 Т-клеточный ответ [162].

Следует отметить, что основным механизмом защитного действия ИГВ является формирование системного гуморального иммунитета. Стимуляция вирус-специфических IgG антител против основных антигенов вирусов гриппа не только защищает организм от развития заболевания, но и снижает его тяжесть. Тем не менее, данный тип антител является узкоспецифическим и не защищает привитых от дрейфовых вариантов вирусов гриппа [194, 250].

Ещё одним основным типом вакцин являются живые гриппозные вакцины, представляющие собой генетически-стабильные, иммуногенные и безопасные аттенуированные вирусные вакцины. Общей чертой патогенных вирусов гриппа является активная репликация при 37-39 °С и слабая репликация при 25-26 °С, тогда как аттенуированные вирусы гриппа, наоборот, демонстрируют способность размножаться при низких температурах с полным отсутствием репликации при повышенных температурах [150]. Такой холодадаптированный (ca) и температурочувствительный (ts) фенотип позволяет вакцинным вирусам реплицироваться именно в верхних дыхательных путях привитых, формируя специфический иммунный ответ именно во входных путях инфекции, и не опускаться в нижние дыхательные пути – не приводя тем самым к клиническим проявлениям заболевания.

Первая ЖГВ была получена в 1930-х годах в СССР [199] в результате многократного пассирования живого вируса в различных системах (изначально это были лёгкие мышей, позже – развивающиеся куриные эмбрионы) вирусы теряли свойство вирулентности, однако, приобретали возможность защищать привитых людей от заражения эпидемическими вирусами гриппа. Дальнейшие работы, в которых было проведено последовательное многократное пассирование дикого штамма при оптимальной температуре 32 °С и пониженной 26 °С, привели к разработке первой в мире холодадаптированной вакцины на основе вируса А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) [2].

После появления сообщений о сегментированной природе генома вирусов гриппа [156, 174, 182], вакцинный штамм А/Ленинград/134/17/57 (H2N2) стал использоваться как донор аттенуации для создания сезонных вакцин методом реассортации [1, 104]. То есть такие живые гриппозные вакцины представляют собой реассортанты между эпидемическим вирусом (гены НА и NA), отвечающим за антигенные свойства, и между донором аттенуации (все гены кроме

НА и NA), отвечающим за безопасность вакцины для людей. ЖГВ успешно применяется в России с 1987 года, тогда как аналогичная вакцина в США на основе вируса А/Энн Арбор/6/60 (H2N2) была зарегистрирована только в 2003 году, а в Европе – в 2012 г. [95]. Западный аналог был разработан методом серийного пассирования дикого вируса в культуре клеток почек куриц при последовательном снижении температур инкубации [151].

Основным механизмом защитного действия ЖГВ является формирование мощного секреторного IgA ответа в верхних дыхательных путях привитых, а также формирование Т-клеточного иммунитета [19, 82]. Ещё одним неоспоримым преимуществом ЖГВ перед ИГВ является простота интраназального введения вакцины, не требующая дополнительного расходного материала в виде шприцев, а также не требует присутствия медицинского персонала для инъекционного введения препарата.

Следует отметить, что вакцинация сезонными гриппозными вакцинами приводит к формированию преимущественно штамм-специфического гуморального иммунного ответа и зачастую является неэффективной в отношении дрейфовых вариантов вирусов гриппа [194]. Кроме того, периодически в человеческую популяцию заносятся совершенно новые, ранее не циркулировавшие антигенные варианты вируса гриппа, и, поскольку население к ним иммунологически наивно, вирусы с легкостью распространяются среди людей, вызывая глобальную пандемию. Особенную опасность представляют также активно циркулирующие среди животных и птиц в последнее десятилетие высокопатогенные вирусы гриппа, с потенциальной угрозой трансмиссии в человеческую популяцию. Именно эти особенности гриппозной инфекции объясняют пристальное внимание мирового научного сообщества к проблеме разработки универсальных гриппозных вакцин, направленных на индукцию перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков. Такие универсальные вакцины призваны обеспечить защиту против любого серотипа вируса гриппа А, в результате чего отпадает необходимость в ежегодной вакцинации, и, как следствие этого, существенно снижаются затраты на профилактику заболеваемости гриппом [125, 175].

1.3. Подходы к усилению иммуногенности и расширению спектра действия сезонных гриппозных вакцин

Основным принципом создания универсальных гриппозных вакцин, которые бы обладали более широким спектром действия по сравнению с сезонными вакцинами, является перенаправление адаптивного иммунитета с иммунодоминантных гипервариабильных участков на менее иммуногенные консервативные фрагменты вирусных белков.

В геноме вирусов гриппа кодируется до 17 белков, большинство из которых входит в состав вириона, а некоторые могут быть обнаружены только в заражённых клетках [223]. Каждый вирусный белок имеет в своём составе В- и Т-клеточные эпитопы, которые сильно различаются по иммуногенным свойствам, а также варьируются по своей скорости изменчивости. Так, например, было показано, что иммуногенные эпитопы, расположенные в глобулярном домене НА, сильно варьируются при сравнении различных подтипов НА, тогда как субъединица НА2 менее подвержена мутационным изменениям [25, 113].

1.3.1. Создание вакцин на основе НА

Нейраминидаза (НА) является одним из поверхностных белков вирусов гриппа. В исследовании Monto и др. [158] было показано, что анти-НА антитела, стимулированные после заражения штаммом H2N2, играют значительную роль в защите даже в отсутствие НА-специфических антител. Также были обнаружены НА-специфические ингибирующие антитела при изучении эффективности ИГВ и ЖГВ при проведении клинических испытаний [159]. Однако, несмотря на важность анти-НА антител, все существующие вакцины стандартизируются по количеству НА-составляющей, но не НА, что приводит к значительной вариации способности вакцин индуцировать специфические к НА антитела [69]. Также было показано, что заражение вирусами гриппа приводит к формированию широкого спектра анти-НА антител, способных защитить переболевшего от повторного заражения, тогда как эффективность антител после иммунизации с использованием ИГВ остаётся ограниченной [30]. Одной из возможных причин такого наблюдения может являться неправильное представление эпитопов НА иммунной системе после вакцинации, поэтому были предложены различные стратегии по увеличению иммуногенности НА. Однако, стоит отметить, что использование ЖГВ приводит к формированию значительного количества анти-НА антител, обладающих кросс-реактивными свойствами [44, 45].

Для усиления иммуногенных свойств были предложены различные стратегии – например, создание рекомбинантных белков НА [146, 207] или создание вирусоподобных частиц [109, 198]. Также была предложена стратегия по созданию консенсусной последовательности НА и получению на её основе искусственного белка. Предполагалось, что такой подход увеличит реактивность специфических антител, однако, полученные данные свидетельствовали о способности сформированных антител распознавать НА только внутри своего подтипа [101], то есть была показана низкая эффективность использования полноразмерной НА в качестве целевого антигена. В результате были предложены стратегии, в которых использовались только основные эпитопы НА, способные усилить спектр защиты вакцин [47, 114, 152, 187, 252].

Однако, несмотря на давнее внимание учёных к данной теме, в литературе представлено недостаточно данных для формирования полной картины о всех консервативных эпитопах вирусов гриппа А и В. Также в настоящее время не было представлено ни одного прототипа универсальной гриппозной вакцины на основе НА, который бы находился на стадии клинических испытаний [122].

1.3.2. Создание вакцин на основе НА

1.3.2.1. Создание искусственных консенсусных последовательностей

Основной иммунодоминантной субъединицей НА является его головная субъединица, однако, из-за высокой степени изменчивости, такая область не может напрямую использоваться для создания универсальной гриппозной вакцины. В качестве решения данной проблемы было предложено создание искусственных консенсусных последовательностей НА, которые бы обладали способностью индуцировать широкий спектр кросс-реактивных нейтрализующих антител [192].

Одним из наиболее известных и успешных алгоритмов является алгоритм по компьютерной оптимизации антигенов широкого спектра действия (Computationally Optimized Broadly Reactive Antigen, COBRA), с помощью которого были получены рекомбинантные белки с широким спектром действия против различных подтипов НА (Н1, Н2, Н3, Н5 или Н7), изученные с использованием различных моделей животных (мыши, хорьки и приматы) [26, 55, 67, 68, 186, 191, 237].

Однако, использование такого подхода приводит к увеличению гуморального иммунного ответа только внутри одного из подтипов вирусов гриппа А. Для демонстрации усиления защиты против действия гетерологичных вирусов гриппа, необходимо использование сразу нескольких консенсусных последовательностей НА [142], что может в значительной мере ограничить применение таких вакцин на практике.

1.3.2.2. Вакцины на основе стеблевого домена НА

Ещё одним направлением по созданию универсальных гриппозных вакцин является использование в том или ином виде стеблевого домена НА, который обладает высокой степенью консервативности внутри одной филогенетической группы [124]. Также было показано, что антитела, специфичные к данному домену, обладают высоким защитным потенциалом [11]. Однако, в составе традиционных вакцин, стеблевой домен НА обладает низкой иммуногенностью, в результате чего был предложен ряд подходов по усилению иммуногенности данного фрагмента.

Гликозилирование глобулярного домена. В работе Lin и др. [140] впервые был предложен метод, в котором вносились дополнительные сайты гликозилирования в основные антигенные сайты HA1 субъединицы. Такой подход позволяет использовать собственные механизмы вирусов гриппа по снижению распознавания антигенов [38].

В ряде работ на модели животных [50, 141] было показано, что использование вакцин с гликозилированным глобулярным доменом имело больший иммуногенный и защитный потенциал по сравнению с традиционными вакцинами. Однако, сложность создания вакцин, а также вопросы о механизмах формирования иммунитета затрудняют использование такого подхода на практике в ближайшем будущем.

Вакцины на основе стеблевого домена. Альтернативным способом по усилению ответа к стеблевому домену HA является создание стабильных белковых структур, в которых бы отсутствовала HA1 субъединица. Несмотря на сложность реализации данной идеи, существует несколько экспериментальных работ, в которых были получены прототипы со стабильной третичной структурой. Одним из наиболее успешных примеров является создание вакцины на основе тримерной субъединицы HA2, полученной в результате экспрессии с использованием клеточной линии млекопитающих для обеспечения правильной пост-трансляционной модификации [90]. Вакцинация с использованием данного прототипа привела к формированию значительного иммунного ответа, который был способен защитить мышей против экспериментального заражения гомологичными вирусами гриппа. Другим примером является создание стабильных тримерных структур HA2, полученных после сшивки с бактериальным ферритином [242]. Исследование такой вакцины на модели мышей и хорьков также показало иммуногенность и защитную эффективность вакцины, изучение которой продолжилось в клинических испытаниях на здоровых волонтерах (NCT03814720). В качестве продолжения развития темы был создан вакцинный прототип на основе наночастиц ферритина против вирусов гриппа А с HA из группы 2, которая также продемонстрировала многообещающие результаты при изучении на модели мышей [36].

Вакцины на основе длинной альфа-спирали HA2. Более простым подходом (с точки зрения получения стабильной структуры) является создание вакцин на основе длинной α -спирали субъединицы HA2 (long alpha helix, LAH) [229]. Были предложены вакцинные прототипы на основе различных белковых носителей (гемоцианина лимфы улитки [229] и корового белка вируса гепатита В [249]) или же стабильные тримерные структуры на основе только LAH [148]. Основным недостатком данного подхода является низкий уровень гомологии между последовательностями LAH для HA из групп 1 и 2. Соответственно, перечисленные вакцины были эффективны только при проведении экспериментального заражения гомологичными патогенными вирусами гриппа А.

В качестве модификации метода была предложена стратегия, в которой бы использовалось сразу несколько подходов – участок LАH сшивался с ещё одним консервативным фрагментом вирусов гриппа А. В статье Kirsteina и др. [115] был предложен подход по совместному использованию LАH и внеклеточного эпитопа М2 белка (М2е), который в значительной мере расширял защитную эффективность вакцин.

Вакцины на основе химерных молекул НА. Ещё одним подходом, направленным на переориентирование основного иммунного ответа с вариабельного глобулярного домена НА1 на более консервативный домен НА2, является использование вакцин с химерными НА (chimeric НА, сНА). сНА имеют одинаковые субъединицы НА2, тогда как в значительной мере отличаются по своим НА1 составляющим, принадлежащим различным подтипам [73, 124]. Вакцины на основе предложенного подхода прошли многочисленные испытания на моделях мышей и хорьков [92, 93, 123, 166, 188], в которых было показано, что использование данного подхода приводит к формированию более кросс-реактивных защитных антител, чем при использовании классических ИГВ и ЖГВ. Изучение наиболее успешных прототипов вакцин на основе сНА с использованием ЖГВ и ИГВ платформ было продолжено в клинических испытаниях [17, 164], в которых также была показана высокая реактивность антител, циркулирующих в крови привитых даже через 420 дней после вакцинации. Однако, как и в предыдущих подходах, для формирования полноценного иммунного ответа необходима комбинация нескольких вакцин, которые бы обеспечивали защиту против вирусов гриппа из различных групп.

Также стоит отметить аналогичный подход к созданию химерных вакцины против вирусов гриппа В [54, 203]. Однако, при создании таких вакцин заменяется не весь глобулярный домен, а лишь основные антигенные фрагменты. Чаще всего замена происходит с использованием последовательностей вирусов гриппа А редких штаммов Н5, Н8, Н11 или Н13.

1.3.3. Т-клеточные вакцины

Поскольку традиционные ИГВ являются слабыми индукторами Т-клеточного иммунного ответа [169], разрабатываются также подходы для усиленной индукции вирусспецифических Т-клеток, поскольку известно, что данный тип иммунитета является не только более кросс-реактивным по сравнению с гуморальным иммунитетом, но также и более долгоживущим за счет формирования Т-клеток памяти [246]. Вирусные белки NP и М1 являются самыми перспективными мишенями для формирования Т-клеточного иммунитета при гриппозной инфекции и вакцинации [29, 71]. Наиболее изученным прототипом универсальной гриппозной вакцины на основе данных антигенов является вариант на основе модифицированного вируса осповакцины Анкара (МВА), который был изучен в фазе I клинических испытаний. Было показано, что такая вакцина индуцирует NP- и М1-специфические CD8⁺ IFN γ ⁺ Т-клетки и

снижает длительность заболевания у людей [18, 139]. Использование других носителей или комбинаций подходов также показали перспективность в индукции Т-клеточного ответа при проведении клинических испытаний [37].

Использование вакцины на основе NP вируса гриппа В при изучении на животных показало защитную эффективность против обеих линий Виктория и Ямагата за счёт существенной роли сформированных NP-специфических CD8⁺ Т клеток [41, 132].

За последние годы была проведена большая работа по разработке различных биоинформатических методов, позволяющих предсказывать потенциальные эпитопы и оценивать их свойства [201]. Однако, одной из основных сложностей разработки Т-клеточных вакцин для людей является разнообразие популяции по ГКГ, что приводит к необходимости использования различных аллельных вариантов в конечном продукте, тогда как компьютерный анализ позволяет определить лишь наиболее встречаемые варианты. Также сложность заключается в проведении доклинических испытаний – необходимо использование нелинейных или трансгенных животных, которые бы моделировали разнообразие популяции и позволяли бы изучать механизмы формирования иммунитета *in vivo* [211]. При создании вакцин, имеющих в своём составе несколько Т-клеточных эпитопов, дополнительно необходимо учитывать возможную конкуренцию эпитопов за связывание с одними и теми же молекулами ГКГ и наличие возможных эпитопов в вспомогательных структурах (например, во фланкирующих линкерах) [105]. Ещё одним ограничением является возможное присутствие эпитоп-специфических, способных к активации аутореактивных Т клеток [239].

Несмотря на перечисленные сложности, представлены несколько успешных прототипов, которые находятся на различных стадиях испытаний. Одним из таких прототипов универсальной гриппозной вакцины является вакцина M001, имеющая в своём составе линейные эпитопы белков NP, M1 и HA вирусов гриппа А. I и II фазы клинических испытаний показали иммуногенность и безопасность такой вакцины [10]. Однако, при изучении защитных свойств такого прототипа не было выявлено никакого статистически достоверного защитного эффекта (NCT03450915).

Помимо перечисленных вакцинных кандидатов, многие прототипы универсальных гриппозных вакцин находятся на стадии доклинических испытаний [5], а также ведутся работы по созданию Т-клеточных вакцин против вирусов гриппа В [20].

1.4. Создание универсальных гриппозных вакцин на основе эктодомена белка M2

1.4.1. Этапы изучения M2

Первое сообщение о наличии M2 белка в составе вируса гриппа А было опубликовано в 1981-м году [128]. К тому моменту несколькими научными группами уже было показано, что

вирус гриппа А имеет сегментированный геном, состоящий из восьми элементов [156, 174, 182]. Также было известно, что 8-й сегмент мРНК кодирует 2 белка - NS1 и NS2 [127], что нуклеотидная последовательность 7-го сегмента мРНК содержит две открытые рамки считывания [234], кодирующие открытый ранее белок М1 и некий неизвестный белок, состоящий из 97 аминокислотных остатков [129].

Мечение различных вирусных лизатов с помощью ^{35}S -метионина и ^{35}S -цистеина с последующим разделением в полиакриламидном геле позволило обнаружить новый белок, который обладал большей электрофоретической подвижностью, чем уже известные белки вируса гриппа А. Выделение различных сегментов мРНК с последующим синтезом пептидов *in vitro* позволило получить пептид схожей молекулярной массы и сделать вывод о генетическом родстве 7-го сегмента мРНК генома вирусов гриппа А и нового белка М2, а метод РНК-РНК-гибридизации позволил установить, что 7-й сегмент одновременно кодирует белки М1 и М2 [128].

Изначально белок М2 был обнаружен только в клетках, зараженных вирусом гриппа А, но не в самих вирионах [128], что позволило выдвинуть предположение о специфическом расположении белка. На основе аминокислотной последовательности М2 [129] был построен график гидропатии, указывающий на присутствие внутри белка гидрофобного домена. Дальнейшее изучение белка позволило сделать вывод о его топологии - С-конец расположен в цитоплазматическом пространстве, тогда как N-концевой участок М2 направлен во внешнее пространство [130].

Весь белок М2 можно разделить на 3 части – N-концевой или внеклеточный домен (23 а.о., без учёта 1-го метионина), гидрофобный трансмембранный домен (19 а.о.) и С-концевой домен (54 а.о.). Внеклеточный домен М2 (М2е) обладает высокой консервативностью среди всех вирусов гриппа А. Одной из причин низкой вариабильности М2е является его неспособность вызывать иммунный ответ у инфицированного организма, то есть не наблюдается давление отбора на данный участок. Однако считается, что более важной причиной является генетическое родство между М2е и М1: а.о. 1-9 М2е и М1 кодируются одними и теми же нуклеотидами в одной и той же рамке считывания. А.о. 10-23 М2е и 239-252 М1 также кодируются одной и той же последовательностью РНК, но транслируются в разных рамках считывания [97]. М1 в свою очередь является высоко консервативным матриксным белком со счётным числом известных мутаций [59].

Первое моноклональное антитело к М2 белку (14С2) было получено в 1988-м году после иммунизации мышей линии BALB/с очищенным М2 белком, введённым совместно с адьювантом Фрейнда. Последующее изучение 14С2 показало, что антитело связывается с внеклеточным N-концевым участком М2 – М2е [244]. В настоящий момент имеются данные, что

в связывании 14C2 участвует фрагмент M2e с 6-го по 15-й аминокислотный остаток (M2e₆₋₁₅) [228]. В 1998-м году было показано, что антитело 14C2 не способно препятствовать адсорбции и проникновению вирусов гриппа в клетки, однако способно ограничивать рост вирусов гриппа А в системе *in vitro* [244].

Ещё одно M2e-специфическое моноклональное антитело было получено в 1996-м году. Мыши линии BALB/c были иммунизированы с помощью гемоцианина лимфы улитки сшитого с M2 пептидом SLLTEVETPIRNEWGCRCND. Далее выделенные после иммунизации спленоциты мышей были соединены с гибридомой F23.1 – клетками, продуцирующими моноклональные антитела к иммуноглобулину подтипа G2a (IgG2a). Авторами статьи было отобрано моноклональное антитело (3F12), обладающее не только кросс-реактивностью к различным штаммам вируса гриппа А, но и обладающее способностью связываться с Т-клеточным рецептором. Было показано, что такое биспецифичное антитело способно ограничивать репликацию вируса гриппа А в системе *in vitro* (но с меньшей эффективностью чем 14C2) и перенаправлять активированные Т-клетки для утилизации заражённых клеток [58].

В 2003-м году было опубликовано исследование, в котором кролики были иммунизированы четырьмя различными пептидами, соответствующими перекрывающимся областям N-концевого участка M2e – M2e₂₋₂₄, M2e₂₋₁₂, M2e₈₋₁₈ и M2e₁₃₋₂₄. Было показано, что каждый из используемых пептидов приводил к формированию антител, распознающих все четыре упомянутые ранее пептида. Также было показано, что антитела, способные узнавать фрагмент N-концевого участка M2 со 2-го по 12-й аминокислотный остаток, обладают вирус-нейтрализующей активностью как против вируса гриппа подтипа А, так и подтипа В [143]. Авторы исследования предположили, что такой фрагмент M2 может содержать эпитоп, обладающий ингибиторной активностью против обоих вирусов. Однако, на сегодняшний момент нет никаких дополнительных сведений, подтверждающих способность антител к M2e фрагменту вируса гриппа А подавлять репликацию вируса гриппа В. В 2004-м году той же группой учёных было показано, что участок M2 EVETPIRN (а.о. 6–13) приводит к формированию антител 8C6 и 1B12, защитная роль которых не была ещё достаточно изучена [144].

Одним из потенциальных терапевтических антител, которое прошло I и II фазы клинических испытаний является антитело TCN-032, распознающее фрагмент M2e₂₋₆ [70] [183], а антитело Z3G1, продемонстрировавшее защиту мышей в опытах по экспериментальному заражению животных вирусами [228].

Методы мутационного и кристаллографического анализа совместно с методом ядерного магнитного резонанса позволили установить, что трансмембранный белок M2 сформирован четырьмя идентичными α -спиралями. Каждая из α -спиралей имеет высоко консервативные

положения His37 и Trp41, которые играют важную роль в жизненном цикле вириона [206], тогда как позиции Cys17 и Cys19 отвечают за стабилизацию всей структуры [83].

Структура свободного M2e неизвестна, однако получены кристаллографические данные по структуре M2e в комплексе с различными моноклональными антителами. Так на примере антител MAb65, MAb148, Fab148 and Fab65 было показано, что M2e может принимать как минимум 2 различных конформационных положения с целью увеличения аффинности связывания. В формировании комплекса с антителами Fab148 и MAb148 участвует фрагмент M2e со 2-го по 5-й аминокислотный остаток (M2e₂₋₅). Такое связывание происходит с формированием N-концевого β -поворота вблизи антигенсвязывающего участка и значительно отличается от того, в котором M2e связывается с антителом MAb65 своей центральной частью с образованием седлообразной структуры с выпяченным Trp15 [33]. Для формирования стабильного комплекса с Fab65 также была показана важность остатков 10-11 M2e, тогда как для связывания MAb65 остатки 6, 8, 14 имеют более значимую роль [34].

Изучение структурных особенностей трансмембранного домена M2 (а.о. 18-60) и областей вокруг при pH 7.5 позволило обнаружить присутствие следующих фрагментов: 1) неструктурного N-концевого участка (а.о. 18-23), 2) трансмембранной α -спирали (а.о. 25-46), которая формирует ионный канал, 3) короткой гибкой петли (а.о. 47-50) и 4) C-концевой алифатической спирали (а.о. 51-59) [193].

1.4.2. Функции M2 белка

В настоящее время известно несколько основных функций белка M2. Первой и наиболее важной является его работа в качестве протон-селективного канала или так называемого виropорина [181], который формируется четырьмя фрагментами His37xxxTrp41 [12, 214, 225]. Вскоре после попадания вируса гриппа в клетку в составе эндосомы [79, 137, 233], M2 переходит в активированное состояние из-за кислотного окружения внутри эндосом. С помощью белка M2 происходит перекачка ионов H^+ через вирусную мембрану внутрь вириона (трансфер протонов происходит с образованием протонированного состояния His37 [65, 225] и с последующим вращением индольной группы Trp41 [214]). Приток протонов приводит к последующему притоку ионов K^+ и Na^+ , которые в свою очередь способствуют изменению конформации белка M1, после которого вирусная РНК переходит в релаксированное состояние [137, 202]. Низкий эндосомальный pH приводит к конформационным изменениям молекулы NA, которая, в свою очередь, запускает слияние мембраны вириона с эндосомальной мембраной. Далее ослабляется взаимодействие между M1 и рибонуклеопротеиновым комплексом, что в дальнейшем приводит к высвобождению vРНК в цитозоль [32]. Также было показано, что ионный дисбаланс в клетке,

вызванный работой белка M2, является провоспалительным сигналом для миелоидных клеток (макрофагов и дендритных клеток) [88].

Также M2 опосредованно участвует в формировании и почковании новых вирионов вируса гриппа А. Изначально было показано, что вирусная репликация ингибируется антителами, распознающими внеклеточный домен M2, несмотря на его малое количество на поверхности вируса гриппа А [155]. Методами обратной генетики и мутационного анализа было показано, что присутствие укороченной формы M2 или вариантов с мутациями в области цитоплазматического конца снижает количество свободного M1 в клеточном пространстве, который необходим для сборки и почкования новых вирионов [27]. Было показано, что именно алифатический участок M2 (M2₄₅₋₆₂) играет главную роль во взаимодействии в том числе с клеточными белками.

Более того, белок M2 вируса гриппа А является медиатором подавления макроаутофагии на стадии слияния аутофагосом и лизосом, что в дальнейшем усиливает гибель клеток, приводя к увеличению выхода вирусного потомства и усилению распространения вирусной инфекции [14, 63].

Функциональным ортологом белка M2 вируса гриппа А является аналогичный белок M2 вируса гриппа В (BM2), который также участвует в переносе ионов через мембрану [163], участвует во взаимодействии с матриксным белком 1 вируса гриппа В [227], необходим для сборки новых вирионов [89] и имеет участок Гис19xxxТри23 в трансмембранном домене [177]. Однако, аминокислотные последовательности M2 и BM2 имеют значительные отличия между собой. Так, например, внеклеточная часть BM2 состоит всего из семи аминокислотных остатков (в результате анализа 9 011 последовательностей из базы данных Influenza Research Database была получена консенсусная последовательность BM2 – MLEPFQI). Считается, что из-за своего малого размера фрагмент BM2e не способен привести к формированию защитного иммунного ответа [189].

Функциональным аналогом M2 является белок M42, который также может быть получен в результате сплайсинга 7-го сегмента генома некоторых штаммов вируса гриппа А [235].

Несмотря на важность всех функций выполняемых M2, данный белок не является необходимым для вируса гриппа А. В лабораторных условиях в результате внесения различных стоп-кодонов были получены так называемые «M2 null» вирусы [31, 87, 231]. Все полученные вирусы были жизнеспособны, однако, как отмечалось, обладали сниженным уровнем репликации [31, 87, 212, 231, 235, 236]. Более того, были получены вирусы с модификацией M2, способные только к единичному раунду репликации (M2-deficient single replication (M2SR)), которые могут быть использованы для разработки потенциальных кандидатов для живой гриппозной вакцины. Такая M2SR вакцина обладает способностью заражать клетки с

последующим накоплением всех вирусных белков за исключением M2. То есть заражение происходит без формирования вирусного потомства [190]. Новая вакцинная платформа показала эффективность против заражения гомологичным или гетерологичным вирусом гриппа при исследовании на животных (мыши и хорьки) [76, 77] и была в I фазе клинических испытаний (NCT03553940; NCT02822105).

1.4.3. Механизмы защиты вакцин на основе M2e

Несмотря на малый размер M2e, множество вопросов, касающихся этого фрагмента, требуют дальнейшего изучения. Так, например, не до конца прояснён механизм защиты вакцинами на основе M2e [133]. С момента обнаружения анти-M2e антител [244] считалось, что именно они обеспечивают основную защиту, которая была многократно показана в экспериментах на животных [42, 49, 117]. В исследовании Hughey P. и др. [84] было показано снижение экспрессии белка M2 в присутствии антитела 14C2, что в свою очередь влияло на снижение количества новых вирусных частиц. Однако, если у вируса гриппа А имелся ряд мутаций в С-концевом домене белка M2 и N-концевом домене белка M1 (влияние могла оказывать даже одна аминокислотная замена, как в случае Pro10His, Val31Ile или Ala41Val), то такой мутированный штамм приобретал устойчивость к действию 14C2 [245, 248].

Несмотря на то, что анти-M2e антитела не являются нейтрализующими [56, 61, 171], значимая роль в обеспечении защиты при проведении опытов по пассивной иммунизации была показана различными научными группами как для сывороток после иммунизации, так и для моноклональных анти-M2e антител [56, 118, 167, 217]. В работе Eliasson D. и др. [53] было показано, что мыши, дефицитные по В-клеткам, были недостаточно защищены с помощью мукозальной вакцины на основе M2e, даже при высоком уровне сформированного CD4 T-клеточного ответа к M2e. В 2011-м году, El Vakkooui и др. [51] продемонстрировали в своей работе важность рецепторов Fc гамма (Fc γ R) для обеспечения защиты различными M2e-специфическими IgG подтипами в модели *in vivo*. В работе проводилась пассивная иммунизация мышей линии BALB/c дикого типа и FcR $\gamma^{-/-}$ с последующим действием летального гриппозного вируса, адаптированного для мышей. Несмотря на введение равного количества анти-M2e IgG мышам обоих подтипов, мыши FcR $\gamma^{-/-}$ были статистически-значимо менее защищены по сравнению с мышами дикого типа. Дальнейшие эксперименты показали, что активация рецептора Fc γ RIII, необходима для защиты *in vivo*, опосредованной анти-M2e IgG1 изотипом [51]. Аналогичные результаты были получены и в работе Lee и соавторов [134]: несмотря на то, что у мышей с генотипом FcR $\gamma^{-/-}$ после иммунизации вирусоподобной частицей (ВПЧ) M2e5x индуцировался схожий уровень антител (IgG1 and IgG2a) по сравнению с мышами дикого типа, в результате мыши без γ -цепи FcR были менее защищены. Van den Hoefke и др. [222] показали,

что для защиты мышей против вируса гриппа различными подклассами IgG антител требуются различные подтипы FcR. Так для защиты антителами IgG1 требуется FcγRIII, тогда как для защиты с помощью IgG2a требуются все три подтипа активирующих FcγR (FcγRI, FcγRIII и FcγRIV).

Известно, что M2 представлен в большом количестве на поверхности инфицированной клетки, тогда как его количество в самом вирусе ограничивается несколькими десятками копий [244]. То есть анти-M2e IgG антитела обеспечивают защиту, взаимодействуя с уже заражёнными вирусом гриппа клетками и запуская эффекторные клетки иммунитета в результате активации через Fc участок, что в результате приводит к гибели и/или фагоцитозу заражённых клеток [51]. Во многих исследованиях были предприняты попытки точно установить, какие именно эффекторные клетки участвуют в элиминации заражённых клеток с экспрессирующимся белком M2 в присутствии анти-M2e IgG. Противоречивые результаты были получены относительно формирования антителозависимой клеточной цитотоксичности (АКЦ) натуральными киллерами (НК) в ответ на иммунизацию M2e-содержащими вакцинами. В нескольких исследованиях было показано, что АКЦ механизм защиты играет необходимую роль [100, 196, 228], тогда как в экспериментах с пептид-специфическими моноклональными антителами или ВПЧ такой механизм не был подтверждён [61, 115]. В исследованиях [61, 100, 228] механизм НК-опосредованной АКЦ рассматривался в результате проведения опытов по пассивной иммунизации, что вносит дополнительные трудности в определении истинного механизма защиты. В другом исследовании, проведённом El Bakkouri и др. [51] в результате клеточной деплеции была показана решающая роль альвеолярных макрофагов (АМ) в обеспечении защиты с помощью анти-M2e IgG антител. Полученные результаты представляют собой особый интерес, поскольку АМ являются резидентными клетками лёгких и считается, что они одними из первых среди клеток иммунной системы сталкиваются с респираторными патогенами в дыхательных путях. Одиночный вклад данных клеток не является значимым для обеспечения полной защиты организма от патогена, однако он может влиять на различные звенья врождённого и адаптивного иммунного ответа [200]. Также возникает ряд вопросов при оценке влияния системы комплемента после иммунизации вакцинами на основе M2e эпитопов [133]. Система комплемента способна связываться с вирионами вируса гриппа в присутствии вирус-специфических антител [15, 80].

Исследование Wang и др. [228] продемонстрировало важность системы комплемента C3 в снижении вирусной нагрузки в лёгких мышей после челленджа, однако в работе Jegerlehner и др. [100] не был показан существенный вклад данной системы в защиту.

Различные исследования также продемонстрировали важность M2e-специфического CD4⁺ и CD8⁺ ответов [52, 53, 111, 134, 215, 238]. Т клетки подтипа CD8 известны своей

способностью уничтожать заражённые клетки, встраивая в них перфорин, а также через FasL-опосредованный цитотоксический путь, обеспечивая тем самым вирусный клиренс [216]. CD4 в свою очередь влияют на продукцию IFN- γ , который также участвует в снижении вирусной нагрузки [13]. Эксперименты по Т-клеточной деплеции показали, что важность подтипов CD4⁺ and CD8⁺ в обеспечении защиты против гетерологичных челлендж вирусов связана между собой [111, 215]. Однако, существуют и другие работы по изучению M2e-специфического Т-клеточного ответа, в которых из-за различий в используемых вакцинных платформах, в протоколах иммунизаций, в используемых адъювантах и в способах иммунизаций были получены противоположные результаты [133]. В работе Eliasson и др. [53] после иммунизации мукозальной СТА1-3M2e-DD вакциной была показана значимая роль M2e-специфических резидентных CD4 клеток памяти в лёгких, но не CD8, в обеспечении защиты мышей против летальной дозы гриппозной инфекции. Стоит отметить, что такой CD4 Т-клеточный ответ имел продолжительный эффект, способный защитить мышей даже через 12 месяцев после вакцинации [53]. В исследовании Lee и др., мыши FcR $\gamma^{-/-}$, вакцинированные ВПЧ M2e5x, быстрее восстанавливались после действия гриппозного патогена, чем наивные FcR $\gamma^{-/-}$. Такой эффект, как считают исследователи, скорее всего наблюдался благодаря наличию в лёгких у иммунизированных FcR $\gamma^{-/-}$ продуцирующих IFN- γ CD4 и CD8 Т-клеток [134].

Таким образом, до сих пор не существует полного описания механизма защиты справедливого для всех M2e-содержащих вакцин. Все возникающие противоречия в описанных данных могут объясняться как неучтёнными звеньями защитного механизма, так и дополнительным влиянием вектора-носителя M2e (поскольку в работах с противоречащими результатами были использованы различные носители). Также свой вклад в несоответствие результатов может вносить различие в используемых методах оценки различных механизмы и отсутствие стандартизации применяемых протоколов исследования. В статье 2022-го года показано, что использование различных адъювантов при иммунизации вакцинами на основе вирусоподобных частиц, содержащих на поверхности эпитопы M2e, может направить путь формирования Т-клеточного ответа. То есть лишь вариация адъюванта может привести к смене профиля с Th1 на Th2 [24].

Несмотря на это, учёные сходятся во мнении, что ответ на иммунизацию M2e-содержащими вакцинами включает множество различных звеньев, которые суммарно могут иметь значимый защитный эффект.

Так, например, было показано, что после интраназальной иммунизации с использованием СТА1-3M2e-DD, формируются резидентные Th17 клетки, влияющие не только на снижение воспалительных процессов, но и на ускорение заживления лёгочных тканей [173].

1.4.4. Различные модификации M2e

Многие исследования, направленные на разработку универсальной гриппозной вакцины на основе M2e, используют весь эктодомен белка M2 (а.о. 2-24). Однако, укороченные формы M2e (Таблица 1) также могут быть применены для формирования ответа к важным областям M2e. Такие укороченные формы могут потенциально снизить стоимость производства вакцины, а также позволяют использовать новые вектора-носители, обладающие небольшой вместимостью для чужеродного антигена. Так, например, существует ряд антител (14C2, 3F12, 8C6, 1B12, Z3G1) [58, 144, 244], которые распознают лишь небольшую часть от всего M2e, и которые уже нашли широкое применение на практике.

Может показаться, что для наилучшей защиты вакцинами на основе M2e требуется индукция всевозможных анти-M2e антител. Однако, было показано, что такие антитела имеют различные защитные характеристики. Таким образом, оптимальная эффективность универсальных вакцин на основе M2e может достигаться при индукции только наиболее значимых антител, нацеленных на лишь некоторые области эктодомена (Таблица 1).

Fu и др. [61] сравнили различные M2e-специфические IgG антитела и показали, что защитная эффективность антитела L18, распознающего а.о. 4-13 M2e, значительно превосходила эффективность антитела O19 (распознает а.о. 2-9), тогда как антитело S1 (распознаёт а.о. M2e 7–13) в свою очередь не защитило мышей против летального действия вируса гриппа А. По результатам других исследователей, регион M2e 4–13 содержит В-клеточный эпитоп, последовательность, распознаваемую антителом 14C2 (а.о. 6-13) [145], а также дополнительный потенциальный эпитоп (M2e 8–12) [179].

Стоит отметить, что при использовании различных укороченных форм M2, вектора-носители также имеют важную роль для обеспечения иммуногенности вакцин. Так, например, иммунизация укороченной формой M2e (а.о. 2-16) совместно с адъювантом Фрейнда не привела к формированию высокого уровня анти-M2e антител [179], в отличие от случая использования фага f88 в качестве носителя M2e-антигена [43]. Считается, что укороченные формы M2e приводят к формированию высокого уровня анти-M2e антител только в случае использования вспомогательной системы, способной индуцировать Т-клеточный ответ.

1.4.5. Разработка вакцин на основе M2e антигена

Обнаружение ингибирования репликации вируса гриппа А с помощью антитела 14С2 [244] дало начало целому направлению по созданию универсальных гриппозных вакцин. Известно, что внеклеточный домен белка M2 обладает высокой степенью консервативности по сравнению с белками HA и NA, и кросс-протективный эффект может быть направлен прицельно на M2e. Изучение защитного потенциала антитела 14С2 на мышах линии BALB/c показало его существенную роль в снижении уровня репликации вируса гриппа А (но не В) в лёгких мышей. В результате обнаружения такого эффекта была предложена идея, что более низкая восприимчивость взрослых людей, ранее переболевших гриппозной инфекцией, по сравнению с детьми как раз обеспечивается наличием M2e-специфических антител [217]. Однако, последующие исследования показали, что M2e сам по себе является слабым иммуногеном и только у половины людей, заразившихся вирусом гриппа А, формируются анти-M2e антитела [251]. И также нет каких-либо доказательств, что такая низкая концентрация антител у людей может играть какую-либо защитную роль [21, 251]. Но в последствии было предложено, что внесение дополнительных M2e эпитопов в состав вакцины сможет играть праймирующую роль для формирования антител перед дальнейшим заражением циркулирующим вирусом гриппа А [251].

Несмотря на большое количество данных, указывающих на низкую иммуногенность природного M2e в силу его малого размера, низкого числа копий в вирионе и вероятного экранирующего действия более крупных поверхностных молекул вируса гриппа А [57, 86, 244], было показано, что иммунизация мышей синтетическим пептидом M2e совместно с адьювантом приводит к формированию высокого уровня анти-M2e антител, способных защитить животных в опытах по экспериментальному заражению летальными вирусами гриппа (челлендж) [238]. Однако, большинство стратегий по созданию универсальной гриппозной вакцины на основе M2e реализуются с использованием каких-либо дополнительных носителей.

В одной из первых работ был получен рекомбинантный бакуловирус, содержащий M2 вируса гриппа А/Энн-Арбор/6/60 (Вас-AM2), для последующего заражения клеток *Spodoptera frugipedra* (Sf9). Антитело 14С2 детектировало присутствие M2 на поверхности заражённых клеток. Такой анализ позволил использовать лизат клеток Sf9, заражённых Вас-AM2 в качестве антигена для изучения антительного ответа к M2 среди людей в ответ на заражение вирусом гриппа А [21]. Также одним из первых прототипов универсальной гриппозной вакцины стало использование в качестве носителя корового фрагмента вируса гепатита В, соединённого с пептидом M2e (M2NBc). В таком прототипе было воссоздано природное расположение N-концевого участка M2 во внеклеточном пространстве. Иммунизация мышей линии BALB/c с

помощью M2HВс показала высокий уровень защиты против действия летальной дозы вируса гриппа А, а также привела к формированию высокого уровня анти-M2е антител, эффективность которых была также продемонстрирована в эксперименте по пассивной иммунизации [167].

В дальнейшем различные липосомные носители [7], поверхностный белок вируса табачной мозаики [180] и ротавирус NSP4 [9] также были использованы в качестве носителей для стимуляции анти-M2е антител. Также в качестве носителя может выступать белок GCN4, который является эукариотическим транскрипционным белковым активатором. Использование такого носителя M2е (M2е-tGCN4) привело к значительной выработке M2е-специфических антител, уровень которых обеспечил защиту вакцинированных мышей от летальной дозы вируса гриппа А, адаптированного для мышей [39].

Наиболее эффективным и экономически выгодным способом является создание рекомбинантных вирусоподобных частиц (ВПЧ), на поверхности которых был бы представлен M2е [42]. Поскольку M2 является гомотетрамером, состоящим из 2-х субъединиц, соединенных дисульфидной связью, удерживаемых вместе ковалентными взаимодействиями [167], было выдвинуто предположение о необходимости использовать M2е также в качестве тетрамера при создании рекомбинантных вирусов, так как при таком подходе M2е будет образовывать компактно свёрнутый белок, обеспечивая тем самым правильную геометрию вирусных частиц. Несмотря на данную гипотезу, имеются подтверждения создания ВПЧ, состоящих из 5-ти тандемных повторов M2е (M2е5х), внутримышечное введение которых защищало мышей от вирусов гриппа А различных серотипов [110, 112, 136].

Существуют данные, указывающие на высокую консервативность остатков Cys17 и Cys19, однако во многих исследованиях их заменяют на Ser17 и Ser19, соответственно, чтобы избежать агрегацию белков из-за формирования дисульфидных связей между участками M2е. Такая замена нашла широкое применение, поскольку было показано, что замена остатков Cys17 и Cys19 не влияет на экспрессию M2е [83], и что такая двойная замена не сказывается на иммуногенных свойствах M2е эпитопов [7].

Стоит отметить, что большинство успешных гриппозных вакцин на основе M2е были исследованы на модели мышей, тогда как существует лишь небольшое число исследований, проведённых на более крупных животных (свиньи, хорьки, обезьяны, собаки). Возможным объяснением такого различия может являться как линейность используемых мышей, так и их общая доступность по сравнительно низкой цене, тогда как более крупные животные уже являются не столь генетически схожими, что сказывается на различиях в формируемом иммунном ответе. Даже хорьки внутри коммерческой популяции имеют различные паттерны активации Т-клеток из-за гетерогенности по их локусу главного комплекса гистосовместимости [46]. Также и среди других млекопитающих имеются существенные различия в структуре,

клеточной специфичности и свойствах Fc рецепторов [102]. Так, например, было показано, что Fc-рецепторы свиней не способны связываться с человеческими IgG1, что ограничивает возможность использовать таких животных при изучении моноклональных антител с широким спектром защиты [160].

Таким образом, существует множество способов по увеличению иммуногенности M2e. Наиболее значимые результаты имеющихся доклинических испытаний приведены в Таблице 2. Однако, их дальнейшее использование в широкой практике ограничивается недостаточным объемом знаний о безопасности используемых векторов в клинической практике. В настоящее время продолжают работы по поиску новых векторов-носителей M2e, а также поиски новых стратегий иммунизаций. Например, было предложено использовать различные типы вакцин – первая иммунизация с помощью живой гриппозной вакцины, а повторная – с помощью ВПЧ, содержащих M2e [135].

Таблица 2 – Создание вакцин на основе M2e и M2 с использованием различных носителей.

Платформа	Тип животных	Способ иммунизации*	Основные результаты	Ссылка
1	2	3	4	5
Коровий фрагмент вируса гепатита В	Мыши	ВВ ⁺ или ИН	3 иммунизации с трёхнедельными интервалами дозами 5, 10, или 50 мкг привели к формированию анти-M2e антител у мышей. Группа животных, последовательно иммунизированная 10 мкг ВВ и ИН, была защищена от действия 5 ЛД ₅₀ of А/ПР/8/34 (H1N1) и А/Виктория/3/75 (H3N2). Также была показана значимая роль анти-M2e антител в опытах по пассивной иммунизации.	[167]
	Мыши	ВМ ⁺	3 иммунизации с двухнедельными интервалами дозой в 50 мкг привели к формированию высокого уровня анти-M2e антител у мышей. Челлендж с помощью 5 ЛД ₅₀ различных гетерологичных вирусов выявил высокий уровень защиты животных.	[219]
Модифицированная форма лейциновой застёжки дрожжевого транскрипционного фактора GCN4	Мыши	ВВ ⁺ или ИН	3 иммунизации (по 10 мкг) привели к формированию специфических анти-M2e IgG1 и IgG2a антител. Тетрамерная вакцина M2e-tGCN4 индуцировала привела к формированию анти-M2e антител, способных распознавать природный этодомен M2. Иммунизированные мыши были полностью защищены от действия 4 LD ₅₀ X47.	[39]
Праймирование M2-ДНК и буст рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим M2	Мыши	ВМ	2 иммунизации (по 50 мкг) привели к усиленному антительному ответу. Челлендж LD ₅₀ А/ПР/8/34 (H1N1), 10 LD ₅₀ of А/ФМ/1/47-МА (H1N1) и LD ₅₀ А/Тайланд/СП-83/2004 (H5N1) показали значительную кросс-протективность вакцины. Также была показана значимая защитная роль клеток CD4 ⁺ и CD8 ⁺ .	[215]
Бактериофаг T7	Мыши	ПК ⁺	Трёхкратная иммунизация (по 10 ⁹ БОЕ) привела к образованию IgG1 и IgG2a M2e-антител, а также к формированию Т-клеточного ответа. Челлендж с помощью 4 ЛД ₅₀ А/ПР/8/34 (H1N1) и X47 показал высокую степень защиты у иммунизированных мышей.	[75]

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Фрагмент ротавируса NSP4 ₉₈₋₁₃₅	Мыши	ПК ⁺	Трёхкратная иммунизация (по 10 мкг) химерным белком привела к образованию повышенного уровня антител по сравнению с иммунизацией пептидами M2e. В основном индуцировалось образование IgG1 M2e-антител и в меньшей степени IgG2a. Челлендж с помощью 3 ЛД ₅₀ А/ПР/8/34 (H1N1) или А/лошадь/Лондон/72 (H7N7) не выявил существенных различий между химерной и пептидной вакциной. Однако, вирусная нагрузка в лёгких мышей на 3-й день после заражения была значительно ниже у группы, иммунизированной M2e-NSP4 вакциной.	[9]
Конъюгаты: гемоцианин лимфы улитки (KHL) и внешний мембранный белковый комплекс <i>N. Meningitidis</i> (OMPC)	Мыши	ПК or BM ⁺	Трёхкратная иммунизация (по 20 мкг) с интервалами в 4 недели привела к образованию высокого уровня антител, обладающих кросс-реактивностью. Челлендж с помощью ЛД ₉₀ реассортанта А/Гонконг/68хПР8 показал полную выживаемость и меньшую потерю веса вакцинированных мышей по сравнению с контрольной группой.	[56]
	Хорьки	BM ⁺	3 иммунизации (по 100 мкг) с интервалами в 4 недели показали, что наиболее иммуногенной является вакцина на основе OMPC по сравнению с вакциной на основе KHL. Челлендж с помощью 100 ТЦИД ₅₀ А/ПР/8/34 (H1N1) выявил существенное снижение репликации челлендж-вируса в носовых ходах и лёгких.	
	Макаки-резусы	BM ⁺	3 иммунизации (по 10 мкг) в течение 25 недель (на 0-й, 8-й и 25-й неделях) вакциной на основе OMPC привели к образованию повышенного уровня M2e-антител. Далее сыворотки были исследованы с помощью эксперимента по пассивной иммунизации мышей челлендж-вирусом А/Гонконг/68хПР8 (H3N1), в котором была показана их защитная эффективность.	
Рибофлавин синтаза из <i>Brucella abortus</i>	Мыши	ПК, ПК ⁺ , BM, BM ⁺ , ИН, ИН ⁺	Трёхкратная иммунизация (по 10 мкг) различными способами с интервалом в 3 недели привела к образованию IgG1 и IgG2a M2e-антител в различных соотношениях, ПК ⁺ метод иммунизации привел к образованию большего количества антител и был выбран для дальнейшего изучения. Челлендж с помощью 5 ЛД ₅₀ А/ПР/8/34 (H1N1) показал защитную эффективность вакцины.	[8]

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Мозаичный вирус мальвы	Мыши	ПК ⁺	Двукратная иммунизация химерным вирусом (по 20 мкг) с 2-х недельным интервалом привела к образованию IgG1 и IgG2a M2e-антител, тогда как иммунизация с помощью M2e-пептидов не являлась иммуногенной. Челлендж с помощью A/WSN/1933 (H1N1) существенное снижение репликации челлендж-вируса в носовых ходах и лёгких.	[131]
	Собаки	BM ⁺	Трёхкратная иммунизация химерным вирусом (по 80 мкг) с 3-х недельным интервалом привела к образованию кросс-реактивных M2e-антител и выявила необходимость использования адьюванта. Челлендж не проводился.	
ДНК-вакцина на основе HA H1N1	Мыши	BM ⁺	Двукратная иммунизация (по 0.2 мкг) с 3-х недельным интервалом образованию кросс-реактивных M2e-антител. Челлендж с помощью 5 ЛД ₅₀ A/AB/Корея/MA81/07 (H5N2) показал высокую степень защиты у иммунизированных мышей.	[176]
Флагеллин и консенсусная последовательность HA подтипов H3-N7	Мыши	ИН	3х-кратная иммунизация (по 6мкг) с интервалами в 3 недели привела к образованию высокого уровня M2e-антител. Челлендж с помощью 10 ЛД ₅₀ A/Аичи/2/68 (H3N2) показал полную выживаемость вакцинированной группы.	[218]
Флагеллин <i>Salmonella typhimurium</i>	Мыши	ПК	3 иммунизации (по 6 мкг) с трехнедельными интервалами привели к формированию высокого уровня анти-M2e антител. Также была показана полная защита иммунизированных мышей против действия 10 ЛД ₅₀ of A/Аичи/2/68 (H3N2).	[204]
Флагеллин <i>Salmonella typhimurium</i>	Мыши	ПК или ИН	Двукратная иммунизация химерным вирусом (по 3 мкг) с 2-х недельным интервалом привела к образованию повышенного уровня антител по сравнению с иммунизацией пептидами M2e, который не снижался последующие 10 месяцев исследования. Челлендж мышей, иммунизированных дозой 3 мкг, с помощью ЛД ₉₀ A/ПР/8/34 (H1N1) показал высокую степень защиты.	[85]
	Кролики	BM	Двукратная иммунизация химерным вирусом (по 15 мкг) с 3-х недельным интервалом образованию M2e-антител.	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Множественные антигенные пептиды	Мыши	ПК ⁺	Однократная иммунизация привела к образованию высокого уровня M2e антител, количество которых незначительно снизилось за последующие шесть месяцев. Двукратная иммунизация привела к существенному снижению вирусного патогена в лёгких животных после челленджа 10 ЛД ₅₀ А/Пекин/501/09 и защитила от существенной потери веса.	[247]
ДНК-вектор со вставкой M2e-NP	Свиньи	ПК ⁺	3 иммунизации (по 200 мкг) с трехнедельными интервалами не только не защитили животных против действия 10 ⁸ ТЦИД ₅₀ вируса А/Sw/Best/96 (H1N1), но также привели к более тяжёлому протеканию болезни по сравнению с контрольной группой.	[78]
Липопептиды	Мыши	ПК	2 иммунизации (по 20 нмоль) с двухнедельным интервалом укороченной формой M2e (а.о. 2–16) привели к формированию аналогичного уровня антител, что и иммунизация полноразмерным M2e (а.о. 2–24) и привели к снижению вирусной нагрузки в лёгких мышей после челленджа 10 ^{4.5} БОЕ вирусом of А/Мемфис/1/71 х А/Беллами/42 (H3N1).	[179]
Гемоцианин лимфы улитки (KHL) с полноразмерным M2e (M2e-KLH) и укороченной формой M2e ₂₋₁₀ (SP1-KHL)	Мыши	ВВ ⁺	3 иммунизации с трехнедельными интервалами привели к формированию анти-M2e антител в случае применения обеих вакцин. Иммунизированные мыши были более защищены по сравнению с контрольной группой против действия 4 ЛД ₅₀ of А/ПР/8/34 (H1N1). Сравнение обеих вакцин выявило большую иммуногенность M2e-KLH по сравнению с SP1-KHL.	[40]
	Кролики	н/у	3 иммунизации с трехнедельными интервалами выявили более высокую иммуногенность SP1-KHL. Сыворотки иммунизированных хорьков защитили мышей в опыте по пассивной иммунизации против действия 4 ЛД ₅₀ of А/ПР/8/34 (H1N1). Также кандидат SP1-KHL показал большую иммуногенность в беспородные белых новозеландских кроликах по сравнению с линейные мышами линии BALB/c.	

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
ВПЧ	Мыши	ВМ	2 иммунизации с четырёхнедельным интервалом привели к формированию анти-M2e антител и защитили мышей от действия 4 ЛД ₅₀ А/Филиппины/2/1982(Н3N2) через 4 и 8 недель после повторной иммунизации.	[112]
ВПЧ на основе M2e и LAN	Мыши	ВБ ⁺	3 иммунизации (по 25 мкг) с двухнедельными интервалами привели к формированию высокого уровня анти-M2e антител, защитивших мышей против действия 30 ЛД ₅₀ А/Калифорния/7/2009 (Н1N1), 3 ЛД ₅₀ of А/ПР/8/34 (Н1N1) и А/Филиппины/2/82(Н3N2). Также была показана высокая защитная эффективность сывороток после иммунизации в опытах по пассивной иммунизации. Значимая роль ADCC в обеспечении защиты не была показана.	[115]
Фаг M13	SPF курицы	ВМ	2 иммунизации химерным фагом, экспрессирующим укороченную форму M2e (а.о. 2–9) дозой 1×10^{10} фаг/200 μ л привели к формированию специфических антител к участку M2e ₂₋₉ .	[147]
Синтетический β -лист	Мыши	ПК ⁺ и ИН ⁺	3 иммунизации с двухнедельными интервалами привели к формированию высокого анти-M2e IgG ответа, представленного в основном подтипом IgG1 и в меньшей степени IgG2a и IgG2b. Также иммунизация полностью защитила мышей от действия 4 ЛД ₅₀ А/ПР/8/34 (Н1N1).	[253]
Вирус мозаики папайи	Мыши	ВМ	Двукратная иммунизация мышей (по 10мкг) с трёхнедельным интервалом привела к формированию высокого титра анти-M2e антител. Также было показано, что кандидат, в котором присоединение антигена M2e происходило по N-концу вектора, обладает большей иммуногенностью, чем в случае присоединения M2e по C-концу.	[126]
Адьювант СТА1-DD	Мыши	ИН	2 иммунизации с трёхнедельным интервалом привели к усиленному M2e-специфическому антительному ответу, в том числе к формированию высокого уровня анти-M2e IgA в лёгочных смывах. Вакцинация обеспечила защиту против действия 4 ЛД ₅₀ X47.	[52]

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4	5
Антитела 8С6 и 1В12 (распознают М2е ₆₋₁₃)	Мыши	ВБ (пассивная иммунизация)	Пассивная иммунизация антителами 8С6 и 1В12 привела к формированию высокого уровня анти-М2е антител и обеспечила 75% защиту иммунизированных животных против действия 5 ЛД ₅₀ of А/ПР/8/34 (Н1N1), тогда как в контрольной группе защита составила 0%.	[144]
М2е-специфическое IgG2а антитело МАb65	Мыши	ВБ (пассивная иммунизация)	Пассивная иммунизация снизила уровень трансмиссивности челлендж-вирусов А/Удорн/72 (Н3N2) и А/Гонконг/68 (Н3N2) и также привела к снижению вирусных титров в лёгких и носовых ходах животных.	[118]

* ВБ, внутрибрюшинно; ИН, интраназально; ПК, подкожно; ВМ, внутримышечно; ⁺, с адьювантом.

1.4.6. Клинические испытания вакцин на основе M2e

В настоящее время несколько M2e-содержащих вакцин находятся на различных стадиях испытаний. Основной целью испытаний является исследование безопасности и эффективности новых вакцин. Так как M2e сам по себе является слабым иммуногеном, то очень важно продемонстрировать способность вакцин на основе M2e вызывать сильный M2e-специфичный иммунный ответ, в том числе и T-клеточный иммунитет. Для этих целей зачастую используются лабораторные мыши, исследование на которых сопряжено со многими трудностями. Так, например, мыши не являются природными переносчиками вирусов гриппа, также зачастую в исследованиях используются летальные дозы вирусов, на основе которых делаются выводы об эффективности новой вакцины, однако человеческие вирусы гриппа не всегда приводят к летальным последствиям. Также исследования проводятся на специальных линиях мышей, которые не отражают всё разнообразие человеческой популяции и существующие клетки иммунологической памяти против вирусов гриппа у многих людей. Таким образом, исследование на лабораторных мышах является важным этапом исследования любой новой вакцины, но не всегда отражает реальную картину для других популяций [49].

Учитывая все ограничения моделей животных, для проверки безопасности и эффективности вакцин также должны быть проведены различные испытания на людях, прежде чем вакцина может быть выпущена на рынок. Все клинические испытания новых препаратов делятся на несколько фаз, которые имеют различные функции. Главная задача I фазы заключается в исследовании безопасности вакцины на людях. II фаза клинических испытаний направлена на исследование защитных свойств вакцины, и для получения статистически достоверных результатов требуется большое количество волонтеров [118].

В настоящее время вакцины на основе M2e не представлены на рынке препаратов, однако некоторые разработки находятся на различных этапах клинических испытаний (Таблица 3). Так, например, вакцина ACAM-FLU-A, основанная на первоначальной идее Neirynck и др. [167], уже прошла I фазу клинических испытаний (NCT00819013, Sanofi). Важно отметить, что носителем M2e-эпитопов в ACAM-FLU-A является HBc, и для наработки такой вакцины требовалась только клеточная культура *Escherichia coli*, то есть были полностью исключены различные аллергены животного происхождения. Исследование было проведено методом произвольного выбора в условиях двойной анонимности с использованием в качестве контроля группу, получавшую плацебо. Внутримышечное введение ACAM-FLU-A способствовало формированию анти-M2e антител в сыворотках крови у 90% испытуемых и не вызывала побочных действий. Однако уровень таких антител быстро снижался со временем, в результате чего дальнейшие клинические испытания ACAM-FLU-A были приостановлены (NCT00819013). Аналогичный прототип универсальной гриппозной вакцины на основе HBc – “Унифлю”, также был исследован в

условиях двойной анонимности с использованием в качестве контроля группу, получавшую плацебо. Исследование проводилось в Санкт-Петербурге, Россия (NCT03789539). Вакцина содержала 4 копии человеческого M2e, встроенных в иммунодоминантную петлю HВс [219]. В исследовании приняли участие 54 здоровых добровольца от 18 до 60 лет, которым дважды с трёхнедельным интервалом внутримышечно вводилась вакцина в одной из доз (20 или 40 мкг). Результаты испытаний ожидаются в ближайшем будущем.

Другая гриппозная вакцина, основанная на идее использования флагеллина для увеличения иммуногенности M2e [85], в I фазе клинических испытаний продемонстрировала безопасность при внутримышечном введении в дозах 0,3 и 1,0 мкг, тогда как введение вакцины в дозах 3,0 мкг или 10,0 мкг сопровождалось нежелательными симптомами (повышение температуры, диарея, усталость, головная и мышечная боли), а также данная вакцина продемонстрировала высокую иммуногенность (NCT00921206, VaxInnate) [221]. В 2011-м году закончилась II фаза данной вакцины (NCT00921947, VaxInnate), результаты испытаний на данный момент не доступны.

Вакцина, имеющая в своем составе различные консервативные CTL-эпитопы [205], также успешно прошла I фазу клинических испытаний (NCT01181336, Imutex Limited). Однако такая вакцина направлена на стимуляцию клеточного иммунитета и специфична только определенной аллели HLA, что может послужить одной из причин ее узконаправленного действия. Также клеточный иммунный ответ обладает более низким быстродействием чем гуморальный, и в случае возникновения пандемий не сможет эффективно предотвратить заражение [117].

Клинические испытания по изучению влияния присутствия дополнительных эпитопов M2e продемонстрировали, что в случае слабого ответа на основную вакцину, M2e компонент может значительно усилить иммунный ответ [213]. То есть эпитопы M2e могут выполнять некую “страхующую” роль, в случае широкого применения на практике.

Вакцина на основе антитела TCN-032 также прошла I фазу клинических испытаний. У волонтеров, получивших внутривенную вакцину (1, 3, 10, 20 или 40 мг/кг массы тела), не наблюдалось никаких побочных действий, связанных с вакцинацией. II фаза клинических испытаний показала, что не нейтрализующее антитело TCN-032 имеет терапевтический потенциал, поскольку его введение приводит к мгновенному иммунному ответу на вирус гриппа А [183].

Таблица 3 – Клинические испытания вакцин на основе М2е.

Производитель	Фаза клинических испытаний	Год проведения испытаний	Идентификатор на clinicaltrials.gov	Наличие доступных результатов
VaxInnate (США)	I	2007–2008	NCT00603811	Нет
Sanofi (France)	I	2007–2009	NCT00819013	Да
VaxInnate (США)	I	2009	NCT00921206	Да [221]
VaxInnate (США)	II	2009–2011	NCT00921947	Да
VaxInnate (США)	I/ II	2009–2010	NCT00921973	Да [213]
Imutex Limited (Великобритания)	I	2010	NCT01181336	Нет
GeneOne Life Science (Южная Корея)	I	2010–2012	NCT01184976	Нет
Theraclone Sciences (США)	I	2012	NCT01390025	Да [183]
	II	2012	NCT01719874	
VA Pharma LLC (Российская Федерация)	I	2018	NCT03789539	Нет

1.5. Заключение к обзору литературы

Ввиду чрезвычайно высокой изменчивости антигенных свойств возбудителя гриппа, обусловленной структурой его генома, зачастую иммунитет, сформированный к предыдущим циркулирующим вариантам вируса, уже не способен противостоять вновь появляющимся дрейфовым вариантам. Кроме того, периодически в человеческую популяцию заносятся совершенно новые, ранее не циркулировавшие антигенные варианты вируса гриппа, и, поскольку население к ним иммунологически наивно, вирусы с легкостью распространяются среди людей, вызывая глобальную пандемию. Особенную опасность представляют также активно циркулирующие среди животных и птиц в последнее десятилетие высокопатогенные вирусы гриппа, с потенциальной угрозой трансмиссии в человеческую популяцию. Именно эти особенности гриппозной инфекции объясняют пристальное внимание мирового научного сообщества к проблеме разработки универсальных гриппозных вакцин, направленных на индукцию перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков.

Зачастую при разработке универсальных гриппозных вакцин, которые бы обладали более широким и продолжительным действием, особое внимание уделяется консервативным участкам вирусов гриппа с целью увеличения их иммуногенности. Одним из таких фрагментов является внеклеточный эпитоп белка М2, предыдущий опыт использования которого показал перспективность создания универсальных гриппозных вакцин на его основе. Однако, несмотря

на определенные успехи, достигнутые в последние годы в области создания универсальной гриппозной вакцины на основе M2e, соответствующие вакцины до сих пор не представлены на коммерческом рынке препаратов, поскольку в настоящее время ни один из разрабатываемых прототипов не удовлетворяет всем условиям безопасности, иммуногенности и экономической целесообразности производства.

Таким образом, создание универсальной гриппозной вакцины на основе M2e с использованием новых носителей является актуальной задачей практического здравоохранения.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Клеточные линии. Для проведения исследования были использованы клетки эпителия почки зелёной мартышки (Vero), полученные из Европейской коллекции клеточных культур (линия WHO кат. № CB884), и клетки эпителия почки собаки (Madin-Darby Canine Kidney, MDCK), которые были получены из Американской Коллекции Культур Клеток (American Type Culture Collection).

Для культивирования клеток Vero использовалась среда OptiPRO SFM с добавлением коммерческого антибиотика-антимикотика (смесь пенициллина, стрептомицина и амфотерицина В) и GlutaMax (Gibco, США). Для культивирования клеток MDCK использовалась среда DMEM (Gibco, США) с добавлением 10% сыворотки эмбриона коров (FBS) и антибиотика-антимикотика (Gibco, США). Обе клеточные линии инкубировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Плазмидные ДНК. Для создания прототипа универсальной гриппозной вакцины были использованы плазмиды на основе вектора pCIPolISapIT, содержащие полноразмерные копии генов вируса гриппа А, имеющиеся в музее отдела вирусологии им. А.А.Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» [91].

Плазида, кодирующая участок 4M2e (консенсусные последовательности человеческого (2 эпитопа), свиного и птичьего эпитопов) была синтезирована в ГенСкрипт (США). Синтез конструкции 4M2e, соответствующей консенсусным последовательностям линий птица/свинья, человек/свинья, свинья и человек был осуществлён компанией ООО «Евроген».

Вирусы гриппа. В работе были использованы различные штаммы вирусов гриппа, полученных из Музея штаммов ФГБНУ «ИЭМ»:

- А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2);
- А/Ануи/1/2013 (H7N9);
- А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1).
- А/Гонконг/1073/99 (H9N2);
- А/Миссисипи/10/13 (H1N1);
- А/Нанчанг/993/95 (H3N2);
- А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1);
- А/Филиппины/2/82 (H3N2);
- А/Нью Йорк/61/2015 (H1N1)
- реассортант А/Вьетнам/1203/04-PR8 (rgH5N1) на основе вируса А/Пуэрто Рико/8/34;

- Адаптированный для мышей А/Калифорния/7/2009 (Cal MA H1N1) предоставлен к.б.н. А.А. Штро (ФГБУ НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева);

Пептид 3M2e. Для исследования иммуногенных свойств рекомбинантных вакцинных штаммов методом иммуноферментного анализа использовался пептид 3M2e, предоставленный А. Казаксом (Латвийский центр биомедицинских исследований, Рига, Латвия) [115].

Лабораторные животные. Мышей (самок) линии BALB/c получали из питомника «Столбовая» (Московская обл). В опытах были использованы мыши в возрасте 4-6 недель, весом 18-20 г. Также часть исследования проводилась на модели хорьков (самцы) на базе ООО «Институт доклинических исследований».

2.2. Методы исследования

2.2.1. Эволюционный анализ последовательностей M2e

Для поиска консенсусных последовательностей M2e, из базы данных Influenza Research Database (fludb.org) были получены все последовательности М генов вирусов гриппа А, выделенных от основных переносчиков вирусов гриппа – человека (27 253 последовательности), свиней (5 379 последовательностей) и птиц (15 367 последовательностей). Выравнивание всех последовательностей и построение филогенетического дерева осуществлялось с помощью сервиса MAFFT [103], а визуализация дерева выполнялась с использованием сервера Interactive Tree Of Life (iTOL) [138]. Поиск превалирующих аминокислот был выполнен с использованием Unipro UGENE [170], а визуализация полученных данных – с использованием RStudio.

2.2.2. Методы обратной генетики

Конструирование химерных генов вируса гриппа. Внесение 4M2e-эпитопов в гены молекулы гемагглютиниона вирусов гриппа подтипов Н1, Н3 и Н7 (между сигнальным пептидом и субъединицей НА1), а также в ген NS донора аттенуации А/Ленинград/17 (за 124-м аминокислотным остатком белка NS1) осуществлялось с использованием стандартных методов генной инженерии.

Изначально, во все используемые для встраивания плазмиды был встроены сайт посадки рестриктазы BsmBI для дальнейшего клонирования участка 4M2e в заданное положение. Далее такие модифицированные гены были встроены в вектор для обратной генетики pCIPolISapIT, обладающий двойной промоторной активностью [81].

В результате проведения полимеразной цепной реакции с использованием набора Platinum™ Pfx DNA Polymerase» (Thermo Fisher Scientific) необходимый для клонирования

участок 4M2e был скопирован с коммерчески синтезированного участка с использованием специфически подобранных праймеров, часть которых была комплементарна краевым последовательностям 4M2e-фрагмента, а другая часть вносила участки посадки рестриктазы BsmBI. Далее в результате обработки векторов со встроенными вирусными генами и полученной вставки 4M2e рестриктазой BsmBI (Thermo Fisher Scientific) и последующего лигирования с использованием лигазы T4 (Thermo Fisher Scientific) были получены вирусные гены, имеющие дополнительную вставку 4M2e-эпитопов в заданном положении, встроенные в вектор pCIPollSapIT.

Получение жизнеспособных рекомбинантных штаммов ЖГВ. Сборка химерного вируса гриппа осуществлялась при помощи трансфекции клеток Vero методом электропорации. Для получения вакцинных прототипов с модифицированным HA были взяты по 6 плазмид, несущих полноразмерные копии генов PB2, PB1, PA, NP, M и NS донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 и по 2 плазмиды, несущие копии генов HA и NA соответствующих штаммов. Для получения вакцинных прототипов с модифицированным NS была использована аналогичная схема за исключением гена NS – в данном случае была использована плаزمиды вируса А/Ленинград/134/17/57, имеющая вставку 4M2e.

Электропорация клеток Vero с использованием заданного набора плазмид осуществлялась с использованием коммерческой системы трансфекции Neon Transfection System (Invitrogen) согласно инструкциям производителя. После электропорации клетки Vero инкубировали в течение 6 часов при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, после чего среду заменяли на среду с содержанием 4 мкг/мл трипсина и 1× антибиотика-антимикотика, после чего клетки инкубировали при 33°C в атмосфере CO₂ ещё 3 суток [81]. Далее клеточную суспензию вводили в 10-дневные развивающиеся куриные эмбрионы (РКЭ) и инкубировали при 33°C в течение 2-3-х суток, после чего наличие жизнеспособного вируса оценивали в реакции гемагглютинации.

Для проверки правильности сборки было проведено полногеномное секвенирование каждого вакцинного прототипа. Секвенирование осуществлялось по методу Сэнгера с использованием автоматического капиллярного секвенатора ABIPrism 3130xl (Applied Biosystems) и коммерческого набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1, согласно инструкциям производителя.

2.2.3. Вирусологические методы

Накопление вирусов гриппа. Культивирование используемых вирусов гриппа проводилось на 10-12 дневных развивающихся куриных эмбрионах птицефабрики «Синявинская» при температуре 33°C для вакцинных штаммов, либо при 37°C для диких

штаммов в течение 48-72 часов, в зависимости от подтипа вируса. После указанного периода времени наличие вируса фиксировали по наличию специфической агглютинации с 0,5%-ными куриными эритроцитами. Далее аллантоисную жидкость, содержащую вирусный материал, собирали и очищали от различных примесей путём центрифугирования (2400g, 15 мин) и хранили при -70°C в аликвотах.

Характеристика рекомбинантных вирусов гриппа в системе *in vitro*. Активность репродукции вирусов гриппа при разных температурах (*ts/ca* фенотип) оценивали по результатам титрования в РКЭ, инкубированных при перmissive (33°C) и повышенной (38°C) температурах в течение 48-72 часов, а при пониженной (26°C) – в течение 6 суток. Вирусы считали температурочувствительными, т.е. имеющими *ts* фенотип, если разница в титрах вируса при оптимальной и повышенной температурой составляла не менее 5,0 lgЭИД₅₀, и холодоадаптированными, т.е. обладающими *ca* фенотипом, если разница в титрах вируса при оптимальной и пониженной температурой не превышала 3,0 lgЭИД₅₀. Инфекционную активность вирусов гриппа определяли методом предельных разведений в РКЭ, а титры выражали в log₁₀ от 50%-ой инфекционной активности вирусов по методу Рида и Менча [184].

Также репликативные свойства вирусов оценивали с использованием перевиваемой линии клеток MDCK, как определением 50%-ной тканевой цитопатической инфекционной дозы (ТЦИД₅₀), так и измерением скорости накопления вирусного материала на клетках. Культивирование клеток MDCK проводили в 175 см² матрасах фирмы Sarstedt (Германия) в ростовой среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10% сыворотки телят и коммерческий антибиотик-антимикотик (Gibco, США). Для проведения исследования ростовых характеристик вирусов гриппа использовали 6- и 96-луночные планшеты для культур клеток, засеянные клеточной суспензией в расчете 10⁵ кл/см². Формирование клеточного монослоя проходило в течение 1-2 дней в CO₂ инкубаторе при 37°C.

Для заражения клеток MDCK вирусами гриппа клеточный монослой дважды отмывали стерильным раствором PBS. Затем вносили в лунки требуемые разведения исследуемого вируса, после чего планшеты оставляли на 1 час при необходимой температуре инкубации для адсорбции вирусных частиц клетками. По истечении этого времени инокулят удаляли, инфицированные клетки промывали раствором фосфатно-солевого буфера для удаления неадсорбированных вирусных частиц. Далее в каждую лунку вносили поддерживающую среду DMEM, содержащую антибиотик-антимикотик и 1 мкг/мл трипсина ТРСК (по 150 мкл – в 96-луночные планшеты, по 3 мл – в 6-луночные планшеты). Клетки инкубировали при различных температурах в атмосфере 5% CO₂. В зависимости от задач исследования пробы отбирали ежедневно (для определения кинетики каждые 12 часов), либо на 3-и или 4-е сутки. Наличие вируса в лунках

определяли в реакции гемагглютинации, а значение ТЦИД₅₀ рассчитывали по методу Рида и Менча [184].

2.2.4. Оценка экспрессии M2e рекомбинантными вирусами гриппа

Все рекомбинантные вакцинные прототипы ЖГВ+4M2e совместно со своими контролями, не имеющими вставку 4M2e – ЖГВ, после накопления на РКЭ были очищены с использованием ультрацентрифуги Optima L-100 XP Ultracentrifuge (Beckman Coulter, США). Первый цикл центрифугирования проводили с ускорением 34000g в течение 2-х часов, после чего ресуспендированный в PBS осадок очищали от куриных белков и клеточных примесей на градиенте сахарозы (30% и 60%) с ускорением 67000g в течение 1 часа. Собранную и ресуспендированную в PBS вирусосодержащую фракцию очищали в финальном центрифугировании с ускорением 67000g в течение 1 часа.

Концентрацию очищенного вируса оценивали с использованием набора Micro BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific).

Для проведения вестерн-блот анализа все очищенные вирусы были предварительно денатурированы в присутствии β-меркаптоэтанола и буфера Леммли. Разделение белков по массе проводилось методом электрофореза в полиакриламидном геле (готовые 12-15% Mini-PROTEAN TGX гели, BioRad). Для выявления специфических зон в полиакриламидном геле после электрофореза применяли метод полусухого электрофоретического переноса на нитроцеллюлозную мембрану. После блокирования мембраны в 3% молоке (сухое молоко, разведённое на PBS), мембрану окрашивали первичным антителом 14C2 (1 мкг/мл), способным распознать участок M2e. После отмывки в растворе PBS следовала инкубация мембраны с конъюгатом – анти-мышинными IgG антителами в разведении 1:2000 (Abcam). Визуализация сигнала проводилась с использованием 3,3'-диаминобензидиновым (DAB) субстратом пероксидазы хрена.

Также для оценки экспрессии M2e-фрагмента на поверхности заражённых клеток была использована клеточная линия MDCK, и для визуализации сигнала был использован метод клеточного ИФА. Клетки MDCK, посеянные в 96-луночных планшетах, заражали 10-кратными разведениями вирусов, начиная с дозы, соответствующей множественности заражения 3 (т.е. 3 инфекционных единицы вируса на каждую клетку). После инкубации клеток при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂, в течение 24-х часов, клетки были зафиксированы 80% ацетоном с последующей инкубацией на льду в течение 20 минут. После отмывки планшетов PBS с добавлением 3% Tween 20 (PBST) и блокирования 3% раствором сухого молока на PBS при 33°C в течение 1 часа и последующей отмывки PBST, планшеты были обработаны 0.08M

H₂O₂ в течение 15 минут при комнатной температуре. После дополнительной отмывки и окрашивания с использованием антитела 14C2 (1 мкг/мл), планшеты промывали PBST с последующим добавлением вторичных анти-мышинных IgG антител в разведении 1:3000. После финальной трёхкратной промывки PBST планшеты проявляли с помощью коммерческого субстрата 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific). После 15 минут инкубации в темноте реакцию останавливали с помощью добавления 1M H₂SO₄. Результаты учитывали на спектрофотометре xMark Microplate Absorbance (BioRad) при длине волны 450 нм.

2.2.5. Методы работы с лабораторными животными

Определение 50%-ной мышинной инфицирующей дозы. Для определения 50%-ной мышинной инфицирующей дозы (МИД₅₀) группы по 5 мышей линии BALB/c заражали различными дозами вируса гриппа, титры которых были предварительно определены в системе РКЭ: 3 – 7 lgЭИД₅₀. Вирусосодержащую жидкость вводили мышам в объеме 50 мкл интраназально без адьюванта. На 3-й день после заражения у всех мышей осуществлялся забор легочной ткани и носовых ходов, которые затем гомогенизировали в 1 мл PBS с использованием автоматического гомогенизатора TissueLyser LT (Qiagen, Германия). Гомогенаты тканей затем центрифугировали в течение двух минут при 1000g и далее титровали в системе РКЭ по описанной выше схеме. После титрования осуществлялся подсчет зараженных мышей в каждом разведении и значение МИД₅₀ рассчитывали по методу Рида и Менча [184].

Иммунизация животных. Изучение иммуногенных свойств вакцинных штаммов проводилось с использованием двух типов модельных животных – мышей линии BALB/c и хорьков. Иммунизация животных рекомбинантными вакцинными штаммами ЖГВ+4М2е проводилась параллельно с контрольными штаммами – немодифицированной ЖГВ, а также PBS. Необходимое количество животных в каждой группе иммунизировали интраназально дважды с трёхнедельным интервалом. Для иммунизации мышей использовалась доза в 300 МИД₅₀ (в 50 мкл), для иммунизации хорьков – 7 lgЭИД₅₀ (в 500 мкл).

Для проведения пассивной иммунизации цельную сыворотку иммунизированных животных вводили внутривенно интактным мышам линии BALB/c через ретро-орбитальный синус в объёме 100 мкл [241]. Через 6 часов после иммунизации животных подвергали действию 3 lgЭИД₅₀ Cal MA H1N1 и 5 lgЭИД₅₀ А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1). Защитная эффективность определялась по снижению массы тела животных и по их выживаемости, регистрируемой ежедневно в течение 14 дней после проведения челленджа.

Однако, метод пассивной иммунизации сыворотками иммунизированных хорьков неприменим из-за высокого риска возникновения токсического шока у мышей. Поэтому был

выбран метод оценки защиты *in vivo* [134]. Для этого пул сыворотки из каждой группы прогревался при 56°C в течение 1 часа. Затем такие обработанные образцы смешивали с равным объемом патогенного вируса в дозе 3 ЛД₅₀ с последующим инкубированием 30 минут при комнатной температуре. Далее такую вирус содержащую смесь вводили интактным мышам интраназально в объёме 50 мкл.

Проведение экспериментального заражения. Для оценки прямого защитного действия вакцинных штаммов на модели мышей был использован широкий набор патогенных вирусов гриппа А, имеющихся в музее отдела вирусологии им. А.А.Сморозина ФГБНУ «ИЭМ».

В случае нелетальных вирусов изучали только титры патогенных вирусов в лёгких иммунизированных мышей на 3-й и 6-й дни после заражения. А в случае летальных вирусов велось ежедневное наблюдение за изменением массы тела животных и выживаемостью в течение 14 дней после проведения экспериментального заражения.

Для оценки прямого защитного действия вакцинных штаммов на модели хорьков, в течение 5 дней после проведения экспериментального заражения оценивали изменения массы тела и температуры животных, а также вирусная нагрузка в респираторных органах на 5-й день после челленджа.

Защитная эффективность сывороток хорьков, введённых мышам при проведении оценки защиты *in vivo* также определялась по снижению массы тела животных и по их выживаемости, регистрируемой ежедневно в течение 14 дней после проведения челленджа.

Во всех экспериментах по определению снижения массы тела, мышши, потерявшие более 30% от исходного веса, подвергались эвтаназии и отмечались как погибшие от действия вируса.

Оценка вирусной нагрузки в респираторных органах хорьков. Через 3 недели после повторной иммунизации животных (по 4 хорька в группе) заражали высокой дозой (6,0 lgЭИД₅₀) гетерологичного пандемического челлендж-вируса А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1). В течение 4-х дней после заражения проводился забор назальных смывов хорьков. Уровни репликации вируса в носовых ходах определяли путем титрования назальных смывов на развивающихся куриных эмбрионах.

На 5-й день после проведения челленджа был осуществлён забор органов дыхательной системы (лёгкие, трахея и носовые ходы) с целью определения уровня репликации патогена.

Всего у хорьков выделяют 5 различных долей лёгких (Рисунок 3), вирусная нагрузка в которых может значимо варьироваться. Поэтому для последующего анализа нами единообразно собирались и взвешивались небольшие образцы (< 1г) каждой из долей легкого. Аналогично взвешивались и другие собранные органы. После титрования гомогенатов органов с

использованием РКЭ, полученные значения в IgЭИД₅₀/мл нормировались на соответствующую массу органа для получения значения IgЭИД₅₀/г.

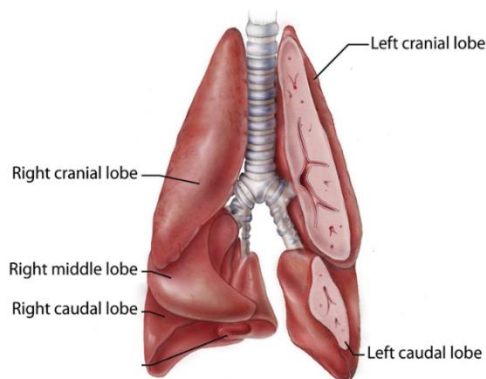


Рисунок 3 - Схематическое изображение лёгких хорьков.

Биотическая комиссия. Исследования вакцинных кандидатов на мышинной модели были одобрены этическим комитетом ФГБНУ «Институт Экспериментальной медицины» (№ 1/20 от 27.02.2020) и Институциональным комитетом по уходу и использованию животных (IACUC) Университета штата Джорджия (протокол A21004). Проведение исследований на модели хорьков было одобрено биоэтической комиссией ООО «Институт доклинических исследований», Санкт-Петербург (№ 4.51/20 от 11.09.2020).

2.2.6. Иммунологические методы

Иммуноферментный анализ. Изучение иммуногенности вакцинных штаммов после иммунизаций на модели мышей выполнялось методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Для этого 96-луночные планшеты с высокой сорбцией (Costar) покрывали необходимым антигеном в количестве 50 нг/лунка и инкубировали 16 часов при +4°C. В качестве антигенов были использованы очищенные на ультрацентрифуге цельные ЖГВ, а также рекомбинантный белок 3M2e.

После блокирования планшетов БСА, они покрывались двукратными разведениями сывороток начиная с 1:20 (в случае антигена 3M2e) или с 1:100 (в случае использования ЖГВ в качестве антигена). Далее планшеты покрывали соответствующим конъюгатом, а сигнал детектировали с помощью коммерческого проявителя 1-Step Ultra TMB-ELISA Substrate Solution (Thermo Fisher Scientific). После 15 минут инкубации в темноте, проявка останавливалась с помощью добавления 1M H₂SO₄. Учёт результатов проводили на спектрофотометре xMark (BioRad) при длине волны 450 нм. Также для анализа учитывалась площадь под оптическими кривыми, вычисленная как сумма площадей трапеций и выраженная в условных единицах.

Функциональная активность антител. В результате проведения иммунизации мышей также оценивалась функциональная активность индуцируемых антител по уровню дегрануляции НК клеток [161] в присутствии M2e-специфических антител, присутствующих в образцах сывороток крови иммунизированных мышей. Для этого высоко сорбционные 96-луночные планшеты покрывали рекомбинантным 3M2e белком (50 нг/лунка), после чего к ним на следующий день добавлялось по 5 мкл иммунных сывороток, разведённых в 10 раз (объём 50 мкл). После инкубации в течение 1 часа при 37°C (5% CO₂) добавляли спленоциты наивных мышей линии C57BL/6J в качестве источника мышинных НК клеток. Последующая инкубация клеток с сыворотками в течение 24-х часов при 37°C (5% CO₂) и их дальнейшая покраска мечеными антителами для выявления популяции дегранулированных НК клеток (анти-CD3, анти-CD49b, анти-CD45.2, анти-CD107a) и анализ с помощью проточной цитометрии позволили оценить антителозависимую клеточную цитотоксическую (АКЦ) активность антител у экспериментальных животных.

Также функциональная активность антител определялась в результате проведения анализа комплемент-зависимой цитотоксичности. Для этого 24-луночный планшет с монослоем клеток MDCK заражался вирусом гриппа А/Калифорния/7/2009 (H1N1) в дозе 10 MOI (среда DMEM с добавлением антибиотика-антимикотика и 1 мкг/мл ТРСК трипсина), после чего инкубировался при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂. После 18 часов инкубации из каждой лунки отбиралась проба среды для подтверждения вирусной репликации в результате проведения реакции гемагглютинации. После отбора среды и промывки лунок с использованием PBS, в каждую лунку добавлялась соответствующая мышинная сыворотка в разведении 1:10 в среде DMEM. После инкубации в течении 15 минут (37°C, 5% CO₂) в каждую лунку добавлялось по 50 мкл сыворотки наивных морских свинок (разведение 1:10) в качестве источника комплемента с последующей инкубацией в течение 3 часов (37°C, 5% CO₂). Далее содержимое лунок собиралось в индивидуальные пробирки (объём – 2 мл), а клеточный монослой дважды промывали раствором PBS. Затем для диссоциации клеток от подложки добавлялась аккутаза, действие которой останавливалось через 10 минут в результате добавления 1 мл среды DMEM+10% сыворотки телят. После содержимое лунок собиралось и добавлялось к соответствующим, собранным ранее, мышинным сывороткам. То есть в результате для каждого образца были собраны клетки, находящиеся на разных стадиях апоптоза.

Далее собранные клетки центрифугировали в течение минут (300g), дважды промывали PBS и в итоге ресуспендировали в 300 мкл PBS. Пропидиум иодид и YO-PRO иодид (Thermo Fisher Scientific) добавляли к клеточной суспензии, после чего процентное количество клеток в стадии позднего апоптоза анализировали методом проточной цитометрии.

Оценка CD4- и CD8- Т-клеточного ответа. Через три недели после второй иммунизации, а также через 5 дней после проведения экспериментального заражения мышей, у животных осуществлялся сбор бронхо-альвеолярных смывов. Необходимую фракцию клеток отбирали в результате центрифугирования с использованием градиентного раствора перколла (44/67%) с ускорением 1000g в течение 15 минут, как было ранее описано в работе Kim и др. [109]. Собранную фракцию (между 44% и 67%) далее изучали методом проточной цитометрии [108]. Внутриклеточное окрашивание цитокинов проводили с использованием IFN- (eBioscience) и TNF- (BioLegend) специфических антител.

Оценка секреции антител В-клетками в лимфоузлах. На 5-й день после проведения челленджа на модели хорьков у животных также был осуществлён сбор медиастинальных лимфатических узлов (МЛУ). Для получения суспензии клеток, органы протирали через 70 мкм клеточный фильтр (BD) и затем ресуспендировали в 2-х мл среды CR-10 (среда RPMI с добавлением коммерческого антибиотика-антимикотика и 10% сыворотки телёнка). После центрифугирования суспензии при 300g в течение 7 минут при температуре 22°C, клетки были ресуспендированы в 1 мл среды CR-10 для последующего подсчёта. После выделения соответствующих клеток изучалась их способность продуцировать IgG антитела в системе *in vitro* с антигенной стимуляцией и без стимуляции.

Для определения общего уровня IgG антител, стимулированного клетками МЛУ, по 2 миллиона клеток, ресуспендированных в среде CR-0 (среда RPMI с добавлением антибиотика-антимикотика, HEPES и меркаптоэтанол) инкубировали в круглодонных планшетах в трипликатах в стандартных условиях при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Образцы надосадков отбирались на 2-й, 4-й и 6-й дни исследования. Затем общая концентрация IgG антител в образцах определялась в ИФА с нормализацией на IgG стандарт хорьков с известной концентрацией.

Кроме того, клетки, выделенные из МЛУ, инкубировали в присутствии различных антигенов (очищенный вирус или рекомбинантный белок 3M2e), сорбированных на 96-луночных планшетах. После 24-часовой инкубации определяли уровни связавшихся антител с помощью стандартного иммуноферментного анализа. Полученные в результате реакции оптические плотности образцов служили оценкой секреции антиген-специфических антител В-лимфоцитами МЛУ.

2.2.7. Оценка безопасности вакцин

Оценка безвредности вакцинных кандидатов включала в себя несколько параметров, таких как анализ изменения массы или температуры тела иммунизированных животных, данные по клиническому проявлению симптомов (общее поведение, игривость, чихание или присутствие

серозных выделений из носа), а также по патологическому исследованию респираторных органов животных. Учёт перечисленных параметров проводился в течение 28 дней, то есть затрагивал период в 7 дней после повторной вакцинации.

Для проведения гистологического исследования респираторных тканей, по 3 животных из каждой группы были подвергнуты эвтаназии с последующей аутопсией. Различные органы (сердце, трахея, легкие, печень, почки, надпочечники, селезёнка, тимус) были собраны для дальнейшего исследования. Возможное патогенное действие вакцинных штаммов также оценивалось по анализу мукозальных мембран носовых ходов, которые находятся в местах введения вакцины. Ткани были зафиксированы в 10 % забуференном растворе формалина и подвергнуты стандартной проводке на автоматическом гистопроцессоре Histo-Tek VP1 (Sakura) с последующим заключением в среду Гистомикс (БиоВитрум, Россия). Из парафиновых блоков были сделаны срезы и стандартно окрашены гематоксилином и эозином, а также с докраской альциановым синим на мукополисахариды (для назальной полости). Гистологические препараты были исследованы в световом микроскопе DM1000 (Leica, Германия).

Для сравнения показателей изменения температуры тела между группами, высчитывался показатель AUC ΔT , определяемый как площадь под кривой разницы температуры хорька в каждой точке измерения и его базовой температуры (определяется как среднее значение температуры тела в течение 2 суток до начала эксперимента).

При каждом проведении оценки клинических симптомов животных, за любое отклонение от нормального состояния начислялись баллы, которые затем суммировались в конце проведения эксперимента.

2.2.8. Методы статистического анализа результатов исследования

Результаты исследования обрабатывались с помощью статистического пакета программы Graph Pad Prism 6. Для представления полученных данных использовали такие показатели как среднее значение и стандартное отклонение.

Для сравнения двух независимых выборок (например, при анализе вирусных титров в моделях *in vitro* и *in vivo*) использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. При сравнении трёх и более групп (например, при обработке данных ИФА) применялся дисперсионный анализ ANOVA с поправкой Тьюки на множественное сравнение. Статистическое сравнение уровня выживаемости проводилось с использованием критерия Мантела-Кокса.

Во всех применяемых критериях при $p < 0,05$ различия между выборками считались достоверными.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Поиск консенсусной последовательности M2e для конструирования универсальной гриппозной вакцины

Изучение консервативности фрагмента M2e было проведено с использованием всех имеющихся последовательностей M гена в базе данных Influenza Research Database (fludb.org). По состоянию на 2019 год было найдено 27 253 человеческих, 15 367 птичьих и 5 379 свиных последовательностей, которые были изучены на предмет возникновения различных мутаций. Анализ проводился с использованием двух различных подходов:

1) Анализ видовой принадлежности.

Все полученные последовательности M гена были проанализированы на предмет возникновения различных мутаций в каждом из организмов (Рисунок 4). Аналогичный подход был реализован в работе [42]. В результате было показано, что помимо первых девяти аминокислотных остатков, также и остатки Arg12, Trp15, Cys17, Cys19, Ser22 и Asp24 являются высоко консервативными, а в положении 19 только для свиного эпитопа наблюдается повышенный уровень изменчивости.

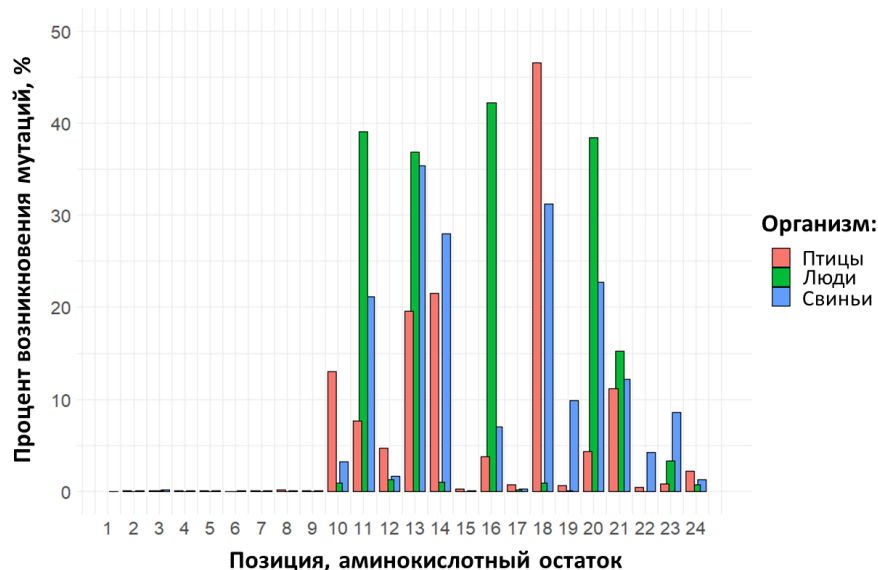


Рисунок 4 - Частота встречаемости мутаций в консенсусах эпитопов M2e вирусов гриппа А человека, свиней и птиц.

В ходе реализации такого подхода были выбраны наиболее преобладающие аминокислоты для каждого положения каждого из организмов, которые представлены в таблице 4. Однако, такой подход не учитывает возникающих сайленс-мутаций в самом гене M2, а также не учитывает возможность переноса гена M2 от одного хозяина к другому, как это произошло при пандемии 2009-го года.

2) Филогенетический анализ последовательностей M2.

В результате единовременного выравнивания всех имеющихся последовательностей M гена с использованием сервиса MAFFT [103] было построено филогенетическое дерево для данного гена. Визуализация дерева проводилась с использованием сервиса the Interactive Tree Of Life (iTOL) [138] (Рисунок 5).

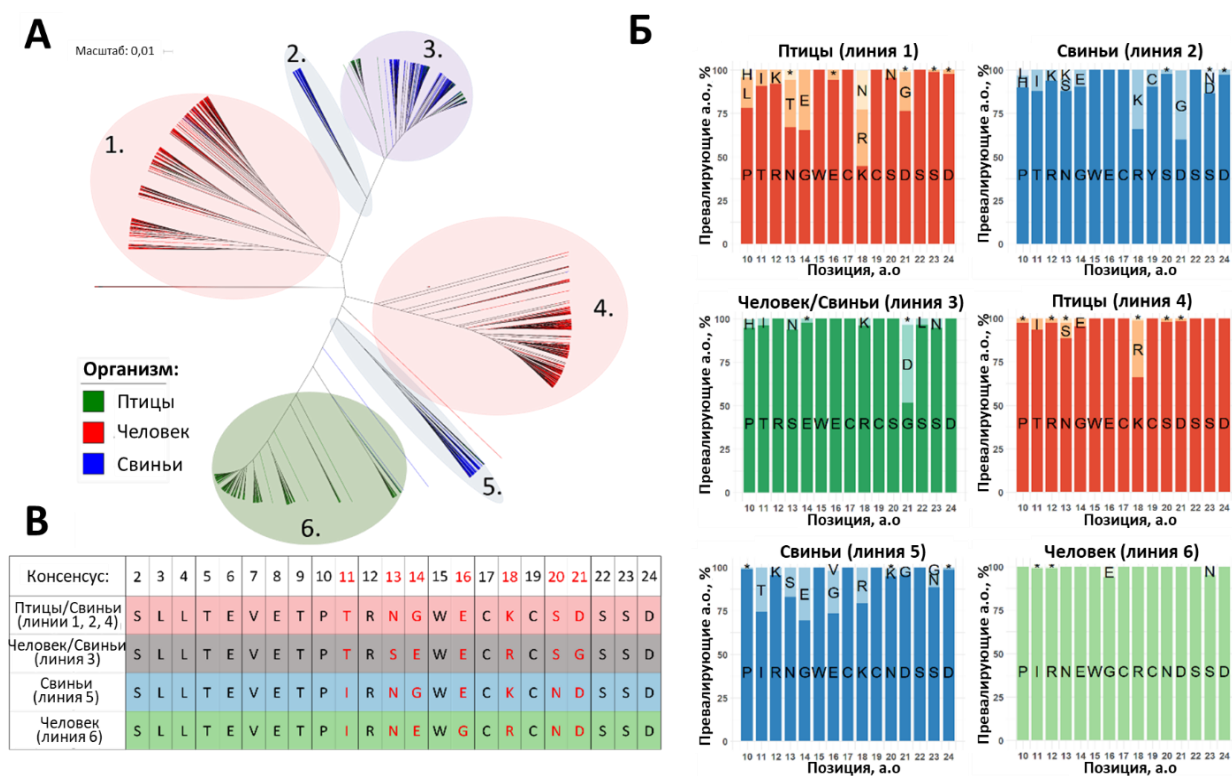


Рисунок 5 - Анализ последовательностей M гена вирусов гриппа А человека, свиньи и птицы. **А.** Филогенетическое дерево, отображающее родственность M генов различных хозяев.

Б. Преобладающие аминокислотные остатки в каждой из полученной линии. А.о. с общим процентным показателем ниже 3% обозначены как «*». **В.** Консенсусные последовательности, рекомендованные для разработки универсальной гриппозной вакцины.

Анализ выявил, что последовательности M гена вирусов гриппа А эволюционно разделяются на несколько линий, которые в основном соответствуют различным организмам. Аналогичный анализ уже был реализован в работе [62], однако, он не учитывал изменения,

произошедшие в М гене после эпидемии 2009-го года, когда в человеческую популяцию был внесен М ген птичьей природы.

В результате проведенного анализа было сконструировано филогенетическое дерево, в котором были выделены 6 основных линий (Рисунок 5А). Для каждой из этих линий была получена своя консенсусная последовательность с использованием программы UGENE Multiple Alignment (Рисунок 5Б).

Как и при реализации предыдущего подхода, для первых 9 а.о. из каждой линии был показан высокий консервативности, а также было продемонстрировано отсутствие мутационной изменчивости остатков Arg12, Trp15, Cys17, Cys19, Ser22 и Asp24. Для остальных а.о. процент их изменчивости варьировался в зависимости от организма хозяина.

Между консенсусами, полученными отдельно для каждой линии, наблюдаются отличия по 7 положениям (Рисунок 5В), которые могут играть существенное значение при подборе последовательности антигена для создания универсальной гриппозной вакцины. Так, например, в литературных данных описано, что иммунизация свиней человеческим М2е с использованием различных носителей не защитила животных от летальной дозы вируса гриппа А свиной природы [78]. Также было показано, что моноклональное антитело 8С6, которое способно защитить мышей против летального челлендж-вируса [144], способно распознавать консенсусный фрагмент человеческого М2е “EVETPIRN” (а.о. 6-13), но не способно распознать консенсус птичьего М2е “EVETPTRN” (а.о. 6-13). Таким образом, считается, что именно замена в 11м положении птичьего М2е позволяет птичьему вирусу гриппа А ускользать от иммунного ответа на человеческий эпитоп М2е [145].

Наш анализ всех доступных последовательностей М2е для последующей разработки универсальной гриппозной вакцины показал, что оптимальным решением для создания такой вакцины будет использование четырёх различных консенсусов М2е, которые смогут покрыть всё разнообразие М2е-эпитопов не только в циркулирующих, но и в новых вирусах гриппа А.

Сравнение последовательностей, полученных в ходе реализации различных подходов по поиску консенсусной последовательности М2е (Таблица 4), выявило некоторые несоответствия в различных позициях эпитопа.

Поскольку в вирусах гриппа А М2-белок представлен в виде гомотетрамера, соединённого дисульфидными связями [167], то и в вакцинах зачастую предлагают использование М2е-эпитопов в виде четырёх повторов. Также стоит отметить, что несмотря на то, что в последовательности М2е а.о. Cys17 и Cys19 являются высоко консервативными, во многих исследованиях такие положения заменяют на Ser17 и Ser19, соответственно. Такая замена вводится чтобы избежать агрегации частиц в результате формирования дисульфидных связей

между сайтами M2e, и она нашла широкое применение, поскольку было показано, что она не влияет ни на экспрессию M2e [83], ни на его иммуногенные свойства [7].

Таблица 4 – Сравнение консенсусных последовательностей M2e, полученных различными способами

Человек	MSLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD	Подход 1
Птицы	MSLLTEVETPTRSEWGSRSDDSSD	
Свиньи	MSLLTEVETPTRNEWESRSDDSSD	
Птицы/Свиньи	MSLLTEVETPTRNGWESKSSDSSD	Подход 2
Человек/Свиньи	MSLLTEVETPTRSEWESRSSGSSD	
Свиньи	MSLLTEVETPIRNGWESKSDSSD	
Человек	MSLLTEVETPIRNEWGSRSDSSD	

Таким образом, были найдены консенсусные последовательности консервативных участков M2e-эпитопов вируса гриппа различных носителей (человек, свиньи и птицы), которые предлагается использовать в дальнейшем для разработки универсальной гриппозной вакцины.

3.2. Конструирование вакцинных штаммов живой гриппозной вакцины, кодирующих дополнительные эпитопы M2e

3.2.1. Встраивание дополнительных эпитопов M2e в молекулу HA

Отобранные после проведения эволюционного анализа последовательности M2e были объединены в кассеты из каждого подхода, по 4 эпитопа в каждой, разделенных гибкими аланиновыми линкерами. Поскольку в «подходе 1» было отобрано всего 3 консенсусных последовательности, эпитоп M2e, характерный для вирусов людей, был использован дважды. Соответствующие нуклеотидные последовательности были химически синтезированы *de novo*, и далее использовались для клонирования в геном вакцинных штаммов ЖГВ между сигнальным пептидом (СП) и основной субъединицей молекулы гемагглютинина (Рисунок 6А).

На начальном этапе исследования для создания прототипа универсальной гриппозной вакцины были взяты 3 плазмиды, несущие полноразмерные копии гена HA различных вакцинных штаммов ЖГВ: А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2), А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) и А/Ануи/1/2013 (H7N9). Модифицированные гены HA, содержащие с N-конца субъединицы HA1 кассету из 4-х эпитопов M2e, были клонированы в вектор для обратной генетики вируса гриппа pCIPolISapIT, и с помощью трансфекции клеток Vero необходимым набором плазмид (несущих модифицированный ген HA, соответствующий ему интактный ген

NA, и 6 остальных генов от донора аттенуации Лен/17) были получены рекомбинантные вирусы гриппа – прототипы универсальной ЖГВ на основе вирусов:

- А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2) – *H3N2-НА+4M2e*;
- А/Ануи/1/2013 (H7N9) – *H7N9-НА+4M2e*;
- А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) – *H1N1-НА+4M2e*.

На данный момент нет сведений о структуре свободного M2e, однако теоретическое предсказание структуры эпитопов с использованием сервиса I-TASSER [240] позволяет предположить формирование компактной структуры природного типа, находящейся на некотором удалении от стеблевого домена НА благодаря присутствию гибкого линкера (Рисунок 6Б). Таким образом, предполагается, что внесение четырёх эпитопов M2e, образующих компактную структуру, в молекулу НА не будет нарушать основные биологические свойства вакцинных штаммов ЖГВ.

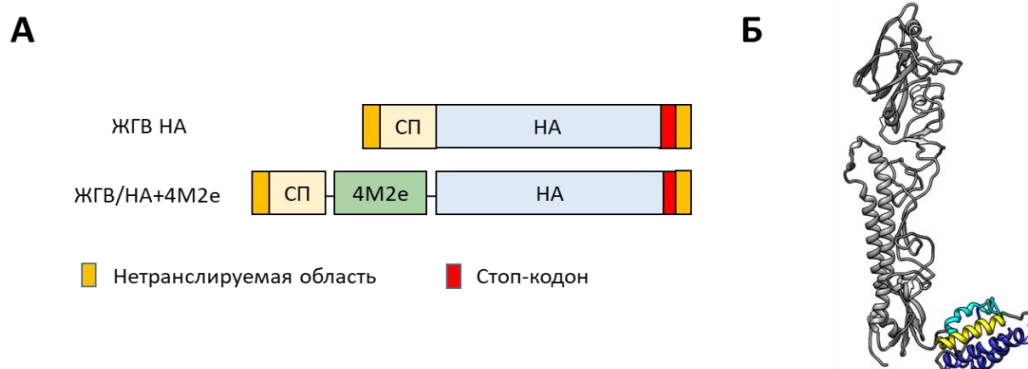


Рисунок 6 – А. Схематическое изображение схемы внесения дополнительных эпитопов M2e в молекулу гемагглютинина (НА) живой гриппозной вакцины между сигнальным пептидом (СП) и основной субъединицей НА. Б. Предсказание структуры мономера НА+4M2e.

3.2.2. Оценка экспрессии M2e фрагментов рекомбинантными вирусами гриппа

Для подтверждения присутствия встроенных дополнительных M2e-эпитопов в молекуле НА различных штаммов ЖГВ был проведён вестерн-блот анализ вирусного материала, накопленного на РКЭ и очищенного ультрацентрифугированием. Для анализа были взяты рекомбинантные вирусы H7N9-НА+4M2e, H3N2-НА+4M2e и H1N1-НА+4M2e совместно со своими контролями - H7N9, H3N2 и H1N1, соответственно. В результате окрашивания моноклональным антителом 14C2 (распознаёт 6-13 а.о. M2e) у всех рекомбинантных вирусов были выявлены специфические полосы с молекулярной массой около 55, 100 и 130 кДа, соответствующие субъединице HA1, белку HA0 и олигомерной форме НА (Рисунок 7) [224], тогда как все вакцинные контроли не имели указанных полос связывания. Тем не менее, у всех исследуемых вирусов был определен собственный M2 белок массой ~15 кДа.

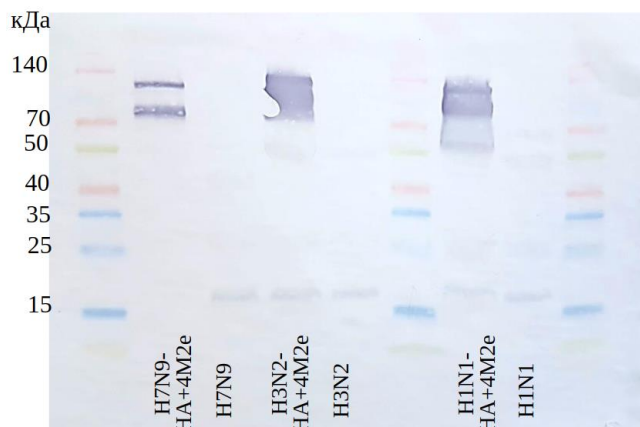


Рисунок 7 – Вестерн-блот анализ исследуемых вирусов с помощью антитела 14С2, детектирующего поверхностный белок М2 ВГ. Окрашенные полосы с молекулярными массами 50, 100 и 130 кДа соответствуют различным формам рекомбинантного НА со вставкой М2е-эпитопов. В качестве положительного контроля был использован вирусный белок М2, имеющийся во всех исследуемых вирусах.

3.2.3. Оценка ростовых характеристик вакцинных прототипов в системе *in vitro*

В результате титрования вакцинных прототипов при различных температурах инкубации с использованием развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ) было показано, что все сконструированные рекомбинантные вирусы гриппа обладают температурочувствительным (*ts*) и холодадаптированным (*ca*) фенотипами, свойственными исходным классическим вакцинным штамма ЖГВ (Рисунок 8).

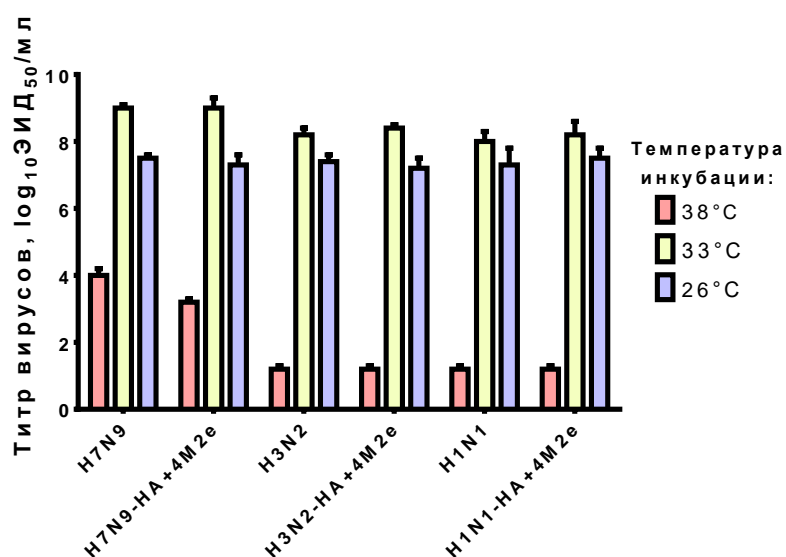


Рисунок 8 – Инфекционная активность исследуемых вирусов гриппа в системе РКЭ при различных температурах инкубации.

Также было показано отсутствие статистически значимого различия в титрах рекомбинантных вирусов и соответствующих контрольных вирусов при оптимальной температуре инкубации (33°C), что указывает на отсутствие влияния вставки 4-х tandemных повторов M2e белка в субъединицу HA1 молекулы гемагглютинина на репликативные свойства вирусов в системе РКЭ.

Для изучения влияния вставки 4M2e в молекулу HA на скорость репликации новых рекомбинантных вирусов, клетки MDCK заражали вирусами с модифицированными HA, а также их соответствующими контролями в дозе, соответствующей множественности заражения 0,01 (т.е. 0,01 инфекционная единица вируса на каждую клетку) с последующей инкубацией при температуре 33°C.

Было отмечено, что вставка 4M2e не влияла на ростовые характеристики как H7N9-HA+4M2e, так и H3N2-HA+4M2e кандидатов по сравнению с контрольными вакцинными штаммами H7N9 (Рисунок 9А) и H3N2 (Рисунок 9Б), соответственно, так как отсутствовало статистически достоверное различие между результатами в каждой временной точке. Для обеих групп вирусов рост титра вируса продолжался в течение первых 60-ти часов, после чего наблюдалась так называемая стадия «плато», не сопровождавшаяся образованием новых вирионов.

Единственным наблюдаемым статистическим различием между контрольным вирусом и новым рекомбинантным вирусом являлось различие для H1N1 и H1N1-HA+4M2e при 12-36-ти часах инкубации (Рисунок 9В), которое может быть объяснено индивидуальными особенностями вируса. Однако такой сниженный уровень репликации H1N1-HA+4M2e в первые 1,5 суток инкубации существенно не сказывался на дальнейших различиях между вирусами – после 1,5 суток инкубации отсутствовало статистически достоверное различие между титрами для химерного вируса и соответствующего контроля. Также из графика репликации следует, что титры вирусов H1N1 и H1N1-HA+4M2e, полученные в клеточной культуре MDCK, не достигли своего максимального значения, так как отсутствует так называемая стадия «плато». Таким образом, сравнение химерного вируса H1N1-HA+4M2e и соответствующего контроля H1N1 выявило влияние вставки 4M2e в молекулу HA на скорость накопления вируса в клеточной культуре MDCK в первые 36 часов исследования. Такое влияние может быть связано со штамм-специфической особенностью, проявляющейся лишь на первых этапах вхождения вирусного материала в клетку и формирования новых вирусных частиц. Также по графику зависимости вирусного титра от времени инкубации для H1N1 и H1N1-HA+4M2e (Рисунок 9В) видно, что титры ни для одного, ни для другого вируса не достигли своего максимального значения, что говорит о необходимости проведения накопления или оценки вирусных титров H1N1 и H1N1-

HA+4M2e на клеточной культуре MDCK в течение максимально возможного времени, которое ограничивается сверху лишь качеством используемых в эксперименте клеток (обычно такие времена составляют 84-96 часов).

Таким образом, для двух данных пар вирусов показано отсутствие влияния вставки 4M2e-эпитопов на ростовые характеристики вирусов в культуре клеток MDCK. Также показано, что оптимальное время для достижения максимального вирусного титра у H7N9, H7N9-HA+4M2e, H3N2 и H3N2-HA+4M2e в модели MDCK составляет 60-72 часа.

Таким образом, было показано, что по своим фенотипическим характеристикам рекомбинантные вакцинные штаммы соответствуют классическим штаммам ЖГВ - имеют *ts/ca*-фенотипы, то есть вставка 4M2e-эпитопов с N-конца молекулы HA не нарушает фенотипические свойства вакцинного вируса.

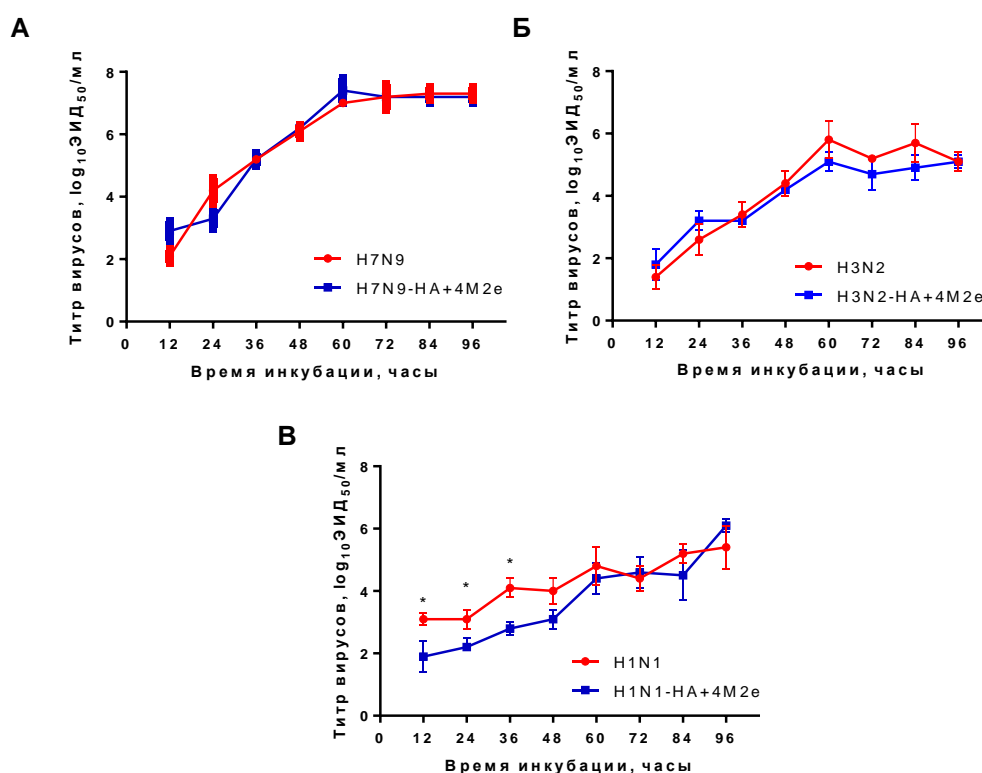


Рисунок 9 – Кинетика накопления исследуемых вирусов гриппа в культуре клеток MDCK: А. H7N9 и H7N9-HA+4M2e; Б. H3N2 и H3N2-HA+4M2e; В. H1N1 и H1N1-HA+4M2e. Символом «*» обозначено статистически достоверное отличие по критерию Манна-Уитни между двумя вирусами в соответствующий временной интервал.

3.3. Оценка аттенуирующих свойств вакцинных прототипов

Для оценки влияния вставки 4М2е на репликативные свойства вакцинных штаммов Н7Н9, Н3Н1 и Н1Н1 в респираторном тракте животных мышей линии BALB/с заражали интраназально различными дозами (от 10^3 до 10^7 ЭИД₅₀) вакцинных прототипов ЖГВ-НА+4М2е, тогда как животные из контрольной группы получали аналогичные дозы немодифицированной ЖГВ. Репликативные свойства вакцинных штаммов оценивались на 3-й день после заражения мышей путём титрования гомогенатов тканей легких и носовых ходов в РКЭ, в результате чего была определена мышьяная инфицирующая доза (МИД₅₀).

Важно отметить, что для всех вакцинных штаммов ЖГВ и ЖГВ-НА+4М2е вирус более активно реплицировался в верхних дыхательных путях (носовых ходах) по сравнению с нижними дыхательными путями (лёгкими), что соответствует аттенуированному фенотипу вируса. Также было показано снижение значения МИД₅₀ для тканей носовых ходов по сравнению со значением МИД₅₀ для лёгочной ткани (Таблица 5).

Однако, стоит отметить сниженный уровень репликации вакцинных прототипов на основе штамма Н3Н2 (Н3Н2 и Н3Н2-НА+4М2е) по сравнению с вакцинами на основе штаммов Н1Н1 и Н7Н9, что может в дальнейшем повлиять на иммуногенные и защитные свойства вакцин.

Таблица 5 – Результаты определения МИД₅₀ и титров вирусов в лёгких и носгах после иммунизации мышей линии BALB/с вирусами ЖГВ-НА+4М2е и ЖГВ на основе штаммов Н7Н9, Н3Н1 и Н1Н1.

Вакцинный штамм	МИД ₅₀ , lgЭИД ₅₀		Титр вирусов при заражающей дозе (n=4)			
			7.0 lgЭИД ₅₀		6.0 lgЭИД ₅₀	
	Носовые ходы	Лёгкие	Носовые ходы	Лёгкие	Носовые ходы	Лёгкие
Н7Н9	4,5	≥6	3,6 ± 1,1	1,6 ± 0,3	2,7 ± 1,8	2,1 ± 0,5
Н7Н9-НА+4М2е	4	≥6	3,7 ± 0,5	1,3 ± 0,2	3,1 ± 0,6	1,4 ± 0,3
Н3Н2	≥6	≥6	1,7 ± 0,4	≤ 1,2	≤ 1,2	≤ 1,2
Н3Н2-НА+4М2е	≥6	≥6	1,6 ± 0,4	≤ 1,2	≤ 1,2	≤ 1,2
Н1Н1	4,5	≥6	3,9 ± 0,6	≤ 1,2	3,1 ± 0,8	≤ 1,2
Н1Н1-НА+4М2е	4	≥6	4,0 ± 0,3	≤ 1,2	2,9 ± 0,6	≤ 1,2

Таким образом, был подтвержден аттенуированный фенотип модифицированного штамма ЖГВ в модели *in vivo* и их перспективность для оценки иммуногенности и защитной эффективности на данной модели животных. Кроме того, было показано, что вставка 4M2e не ухудшает репликативные свойства вакцинных вирусов различных подтипов в системе *in vivo*.

3.4. Изучение иммуногенности и протективной активности вакцинного прототипа на основе штамма H7N9 на модели мышей

3.4.1. Иммуногенность модельного штамма H7N9-НА+4M2e для мышей линии BALB/c

Для сравнения иммуногенности вакцинных штаммов H7N9-НА+4M2e и H7N9 мыши линии BALB/c были дважды иммунизированы (10^6 ЭИД₅₀ в объёме 50 мкл) интраназально с трёхнедельным интервалом, тогда как мыши из контрольной группы получали раствор PBS. Через три недели после повторной иммунизации у всех животных ($n = 5$ в каждой группе) осуществлялся забор крови через ретро-орбитальный синус.

Далее методом ИФА определялся уровень сывороточных антител как к цельному вирусу гриппа H7N9, так и к эпитомам M2e. При использовании в качестве антигена цельного вируса гриппа были обнаружены схожие уровни IgG антител как у химерного, так и у соответствующего контрольного вакцинного штамма H7N9 (Рисунок 10А), что указывает на отсутствие влияния внесенных дополнительных эпитопов M2e на способность такой химерной вакцины индуцировать вирус-специфический гуморальный иммунный ответ.

При использовании в качестве антигена рекомбинантного белка M2 (Рисунок 10Б) было показано, что в группе H7N9-НА+4M2e специфические антитела к данному белку образовывались в статистически достоверно больших количествах, чем в группе мышей, иммунизированных соответствующим штаммом классической ЖГВ. Для выявления достоверных различий между уровнями индуцируемых антител проводилась оценка площадей под кривыми оптической плотности.

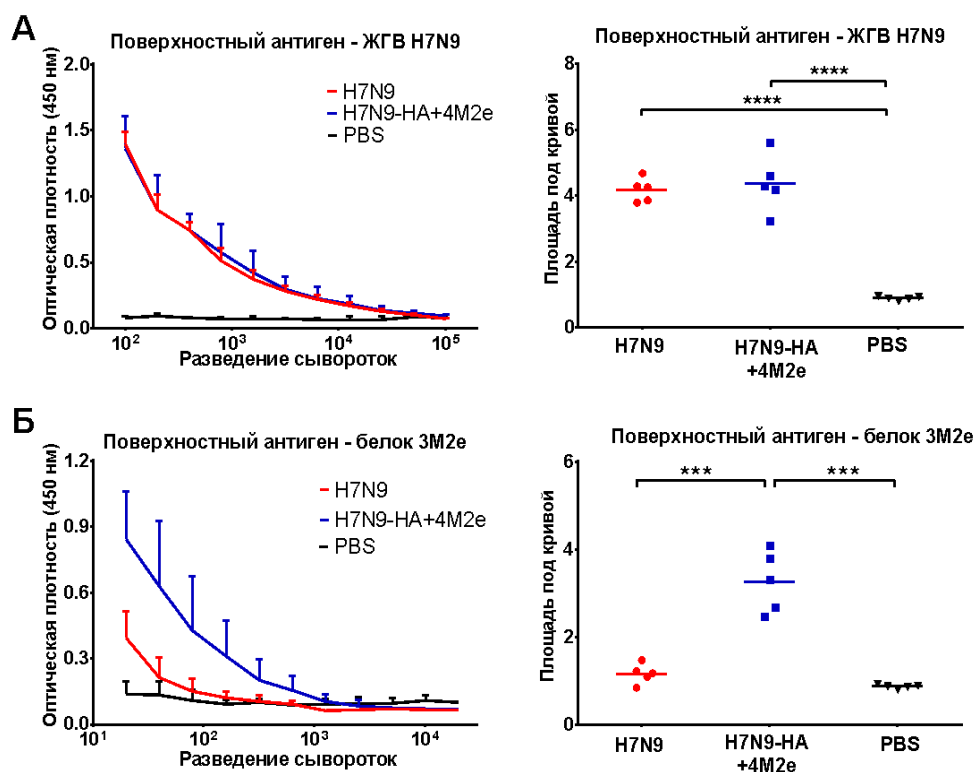


Рисунок 10 – Оценка уровней сывороточных IgG антител у мышей после двукратной иммунизации исследуемыми вакцинными штаммами на основе вируса H7N9.

Иммуноферментный анализ проводили с использованием в качестве подложки очищенного вируса гриппа (А) и рекомбинантного белка 3M2e (Б). Сравнение значений площадей под кривыми (справа) проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

Таким образом, было показано, что включение в состав вирусного белка НА тандемных повторов M2e приводило к усиленному образованию M2-специфических антител, которые, как ожидается, будут обеспечивать защиту привитых животных от дрейфовых вариантов вирусов гриппа.

Далее были изучены изотипы индуцированных анти-M2e антител (IgG1 и IgG2a) в ИФА с использованием соответствующих вторичных антител. Было показано, что большинство M2e-связывающих антител, индуцированных H7N9-НА+4M2e, имеют IgG1 подкласс (Рисунок 11А), но при этом в данной группе также образовывались существенные уровни IgG2a антител, которых не наблюдалось ни в одной из контрольных групп (Рисунок 11Б).

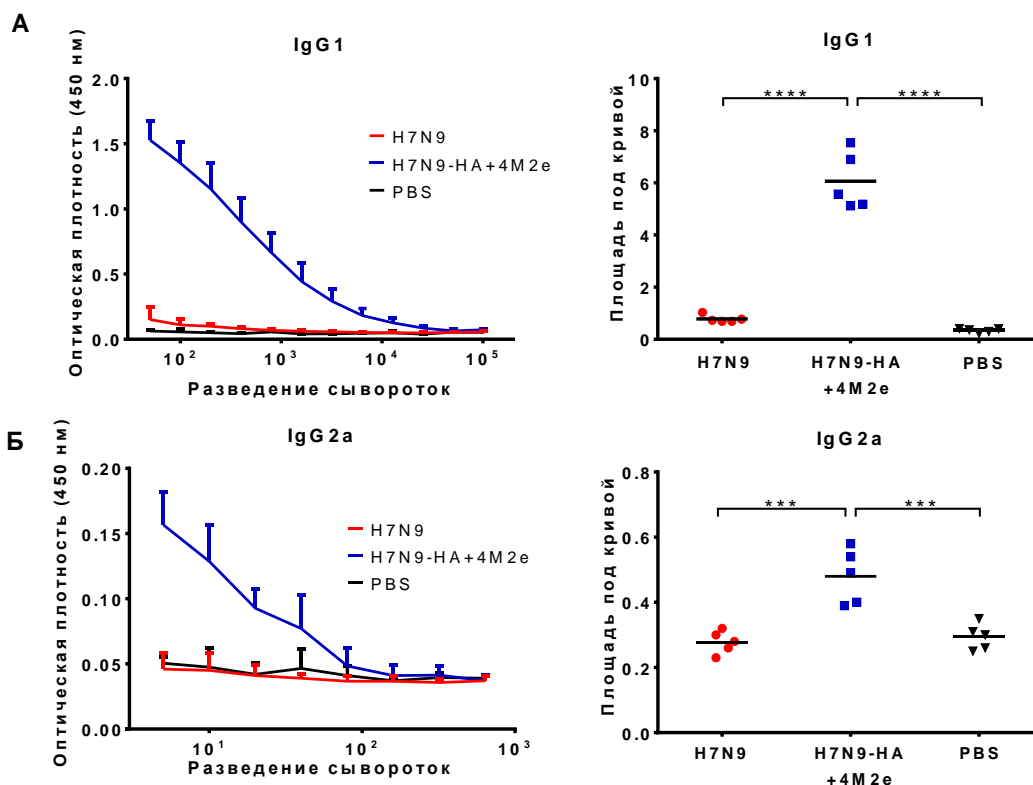


Рисунок 11 – Определение изотипов сывороточных IgG M2e-специфических антител после двукратной иммунизации мышей линии BALB/c вакцинами штаммами H7N9, H7N9-NA+4M2e или PBS. Уровни IgG1 (А) и IgG2a (Б) определялись методом ИФА. Слева представлены значения оптических плотностей для каждого изотипа, справа – индивидуальные значения площадей под кривыми оптической плотности. Сравнение данных проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (***) $p < 0.001$; ****) $p < 0.0001$).

Далее была проведена оценка функциональной активности анти-M2e антител путем определения уровней антителозависимой клеточной цитотоксичности (АКЦ) и комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ), при этом в эксперимент брали как сыворотки крови, собранные на 21 день после повторной иммунизации, так и сыворотки крови животных, собранные на шестой день после экспериментального заражения вакцинированных мышей вирулентным гетерологичным вирусом А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1).

Было показано, что сыворотки мышей, иммунизированных вакцинным штаммом H7N9-NA+4M2e, обладали более выраженной КЗЦ активностью, по сравнению с контрольной группой H7N9 (Рисунок 12А, Б). Интересно, что последующее заражение иммунизированных мышей гетерологичным вирусом гриппа приводило к еще более выраженному усилению КЗЦ активности антител в группе рекомбинантной вакцины, но не в других контрольных группах

(Рисунок 12В). Эти данные указывают на то, что М2е-специфические антитела, индуцируемые химерным вакцинным штаммом, обладают выраженной комплемент-зависимой цитотоксичностью, что может являться одним из защитных механизмов кросс-протективного действия вакцины.

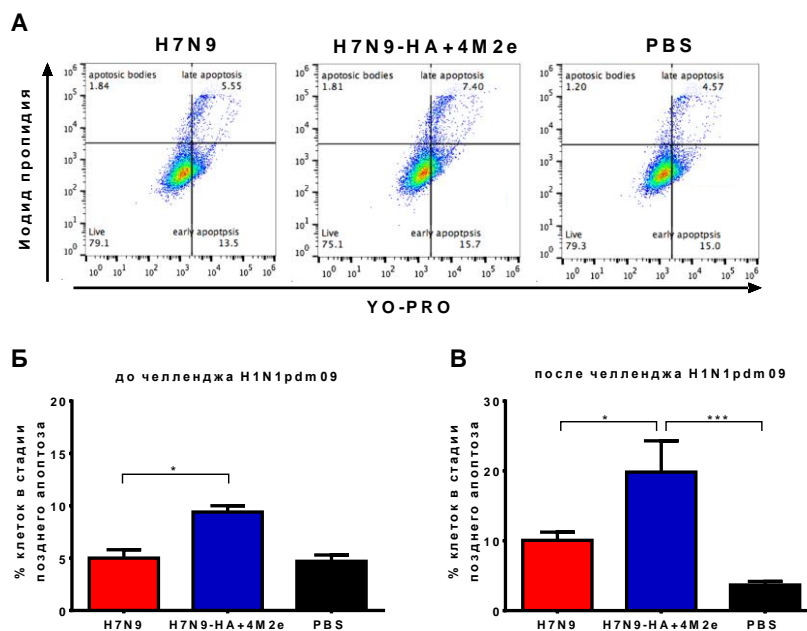


Рисунок 12 – Оценка комплемент-зависимой цитотоксичности антител (КЗЦ). (А) Проточно-цитометрический анализ клеток MDCK, инкубированных с сыворотками мышей и окрашенных с помощью YO-PRO и пропидиум йодида; (Б) Уровень КЗЦ активности сывороток после двукратной иммунизации H7N9, H7N9-HA+4M2e или PBS и (В) после экспериментального заражения мышей гетерологичным вирусом гриппа (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$; **** - $p < 0.0001$).

Двукратная иммунизация мышей исследуемыми вакцинными кандидатами показала, что уровень АКЦ активности антител не отличался между двумя вакцинными штаммами (Рисунок 13А, Б). Несмотря на то, что в группе H7N9-HA+4M2e после челленджа уровень АКЦ статистически достоверно отличался от контрольных групп, его общее значение осталось на довольно низком уровне (Рисунок 13В). Возможным объяснением отсутствия значимого проявления АКЦ активности может являться недостаточный уровень сформированных анти-М2е антител. Например, в работе Kirsteina и др. [115] по созданию прототипа универсальной гриппозной вакцины на основе вирусоподобных частиц уровни М2е-антител значительно превышали уровни, полученные в настоящем исследовании. Также возможным объяснением может являться незначительность АКЦ механизма для М2е-содержащих вакцин на основе ЖГВ,

что согласуется с данными Fu и соавт. [61] по изучению протективного действия анти-M2e антител.

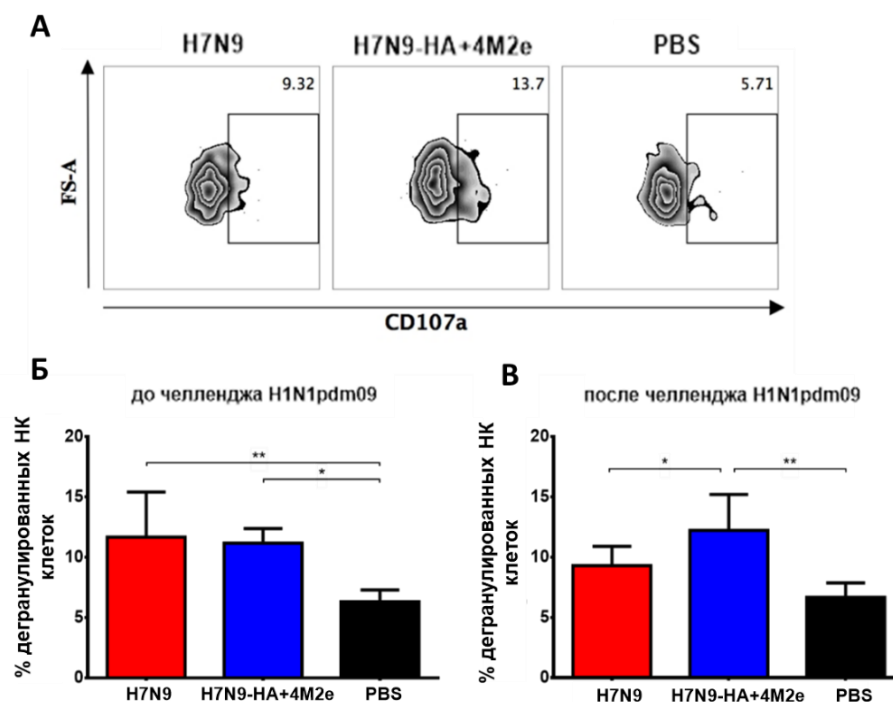


Рисунок 13 – Оценка антитело-зависимой цитотоксичности антител (АКЦ). (А) Проточно-цитометрический анализ НК клеток, инкубированных с сыворотками мышей и окрашенных с помощью специфических меченых антител; (Б) Уровень АКЦ активности сывороток после двукратной иммунизации H7N9, H7N9-HA+4M2e или PBS и (В) после экспериментального заражения соответствующих мышей гетерологичным вирусом гриппа (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$).

3.4.2. Протективная активность модельного штамма H7N9-HA+4M2e в экспериментах на мышах линии BALB/c

3.4.2.1. Изучение прямого защитного действия вакцин

Для изучения влияния индуцированных M2e-антител на усиление защитной эффективности классического штамма живой гриппозной вакцины, мыши линии BALB/c были дважды интраназально иммунизированы рекомбинантным штаммом H7N9-HA+4M2e параллельно с соответствующими контролями – вакцинным штаммом ЖГВ H7N9 и PBS. Через 3 недели после повторной иммунизации мыши были заражены различными челлендж вирусами. В случае с вирусами H3N2 и H9N2, которые не являются летальными для мышей, защитное действие оценивалось по снижению вирусной нагрузки в лёгких животных.

В случае экспериментального заражения с использованием А/Нанчанг/993/95 (H3N2) наблюдалась полная защита мышей, иммунизированных обоими вариантами ЖГВ. Вирус практически полностью отсутствовал в легких животных уже на 3-й день после экспериментального заражения (Рисунок 14), и между вакцинальными группами H7N9-НА+4M2e и H7N9 не наблюдалось никаких статистических различий. Наблюдаемая высокая степень защиты может быть объяснена принадлежностью гемагглютининов H7 и H3 одной филогенетической группе (группа 2).

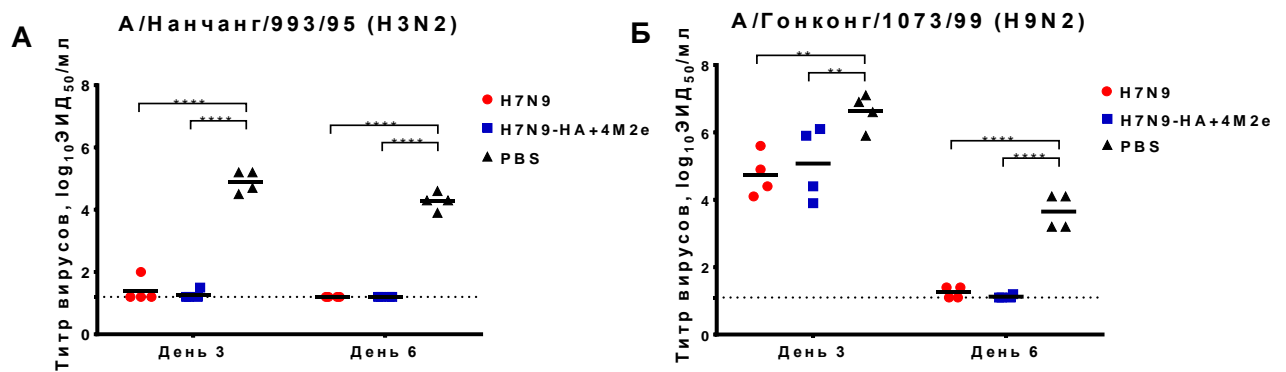


Рисунок 14 – Оценка защитной эффективности вакцинных штаммов против действия нелетальных челлендж-вирусов. После двукратной иммунизации H7N9, H7N9-НА+4M2e или PBS, мыши были заражены вирусами А/Нанчанг/993/95 (H3N2) (А) или А/Гонконг/1073/99 (H9N2) (Б). Вирусная нагрузка в лёгких оценивалась на 3-й и 6-й дни после челленджа путём титрования гомогенатов лёгких на развивающихся куриных эмбрионах. Статистическое сравнение результатов проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$).

Тем не менее, использование при проведении экспериментального заражения вируса А/Гонконг/1073/99 (H9N2), НА которого принадлежит группе 1, также не продемонстрировало различий между вакцинальными штаммами ЖГВ – они эффективно снизили вирусную нагрузку в лёгких мышей на 3-й день после проведения челленджа, а также привели к полному отсутствию патогена в лёгких на 6-й день эксперимента.

Также было проведено экспериментальное заражение иммунизированных мышей патогенными вирусами PR8 (H1N1) и А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) в дозах 3 ЛД₅₀, в котором была показана равная защитная эффективность вакцинных штаммов H7N9 и H7N9-НА+4M2e. Вакцинированные животные не продемонстрировали значительную потерю веса, и

выживаемость в обеих группах составила 100%, тогда как животные из группы плацебо погибли на 7-й день после действия инфекции (Рисунок 15).

Вирусологическая оценка титров патогена в лёгких выявила небольшое преимущество рекомбинантного вакцинного штамма H7N9-НА+4M2e по сравнению с немодифицированным контролем H7N9 – на 6-й день после проведения челленджа у животных из группы H7N9-НА+4M2e вирус практически отсутствовал в лёгких, тогда как у группы мышей H7N9 он присутствовал в достаточном количестве (Рисунок 15С). Для челлендж-вируса PR8 H1N1 демонстрируемое различие не было статистически значимым ($p=0,07$), тогда как разница между вакцинами при использовании А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) свидетельствует об увеличении защитной эффективности ЖГВ с дополнительными эпитопами M2e.

Также для оценки иммунного ответа, сформированного после вакцинации H7N9-НА+4M2e, были использованы вирулентные для мышей вирусы – адаптированный для мышей А/Калифорния/7/2009 (H1N1), А/Филиппины/2/82 (H3N2) и реассортант А/Вьетнам/1203/04-PR8 (rgH5N1) на основе вируса PR8.

Челлендж с использованием 30 ЛД₅₀ А/Калифорния/7/2009 and 16 ЛД₅₀ of rgH5N1 выявил равную защиту в обеих ЖГВ-группах (H7N9-НА+4M2e и H7N9) по сравнению с контрольной группой PBS. Несмотря на приблизительную потерю массы тела в 13% у вакцинных групп, животные продемонстрировали возвращение к исходному весу на 14-й день исследования, тогда как на мышей из групп плацебо данные вирусы оказали летальное действие (Рисунок 16А,В). Интересно, что при увеличении дозы челлендж вируса А/Калифорния/7/2009 до 300 ЛД₅₀, в группе H7N9 также наблюдалась 100% смертность животных, тогда как в группе H7N9-НА+4M2e аналогичный показатель составил всего 40% (Рисунок 16Б). Аналогично, при проведении челленджа с использованием 120 ЛД₅₀ H3N2 мыши из группы H7N9-НА+4M2e показали более высокий уровень защиты по сравнению даже с мышами из группы H7N9, выраженный в достоверно меньшем снижении веса на протяжении всего эксперимента (Рисунок 16Г).

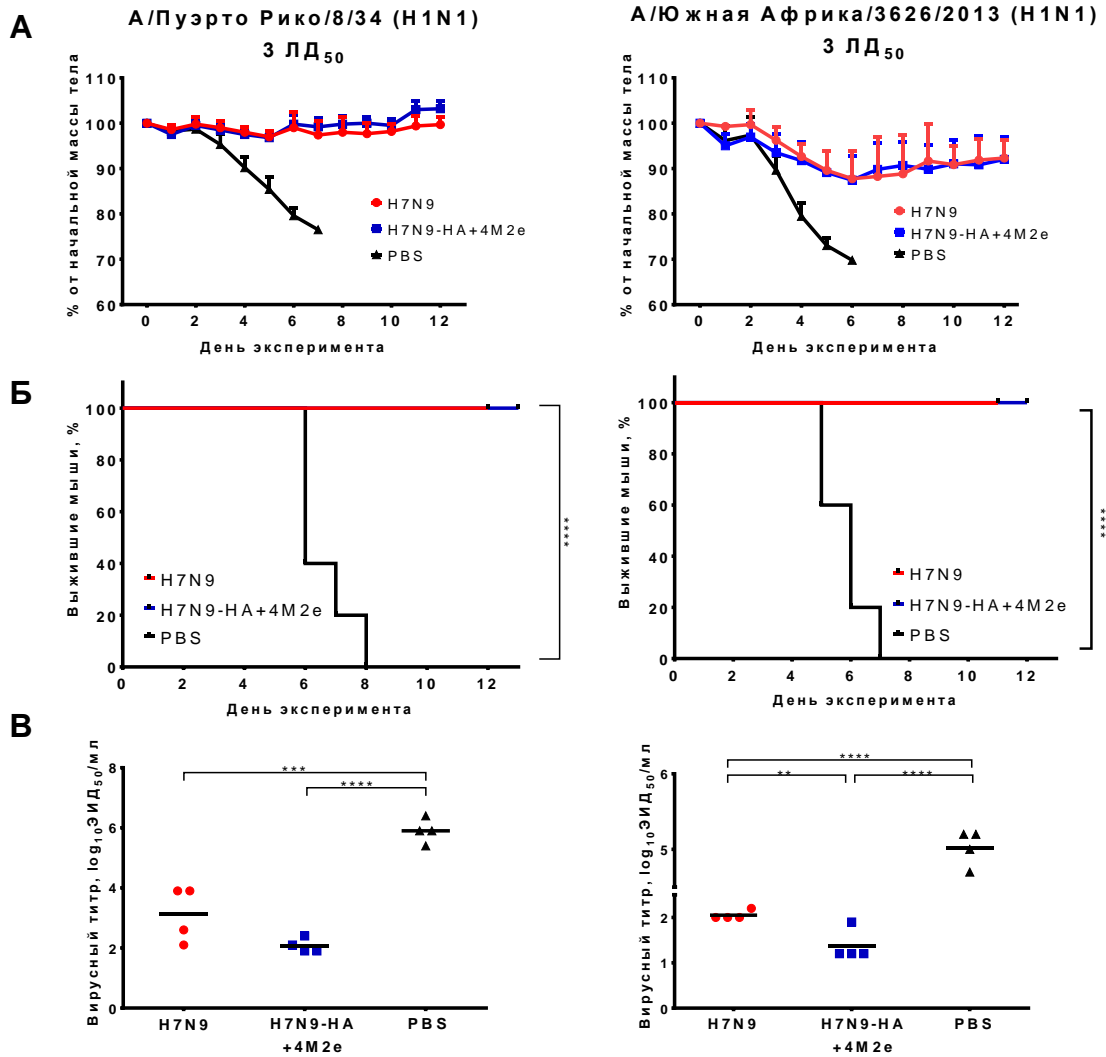


Рисунок 15 – Оценка протективной активности вакцинных штаммов против действия низких доз летальных челлендж-вирусов. После двукратной иммунизации H7N9, H7N9-НА+4M2e или PBS, мыши были заражены 3 ЛД₅₀ вирусов А/Пуэрто Рико/8/34 (H1N1) (слева) от А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) (справа). Защитная эффективность оценивалась по изменению массы тела животных (А) и по уровню выживаемости (Б) в течение 14 дней после заражения. Оценка вирусной нагрузки в лёгких животных (В) была проведена на 6-й день после челленджа. Статистическое сравнение уровня выживаемости проводилось с использованием критерия Мантела-Кокса, а сравнение вирусной нагрузки в лёгких – с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (** - $p < 0.01$; *** - $p < 0.001$; **** - $p < 0.0001$).

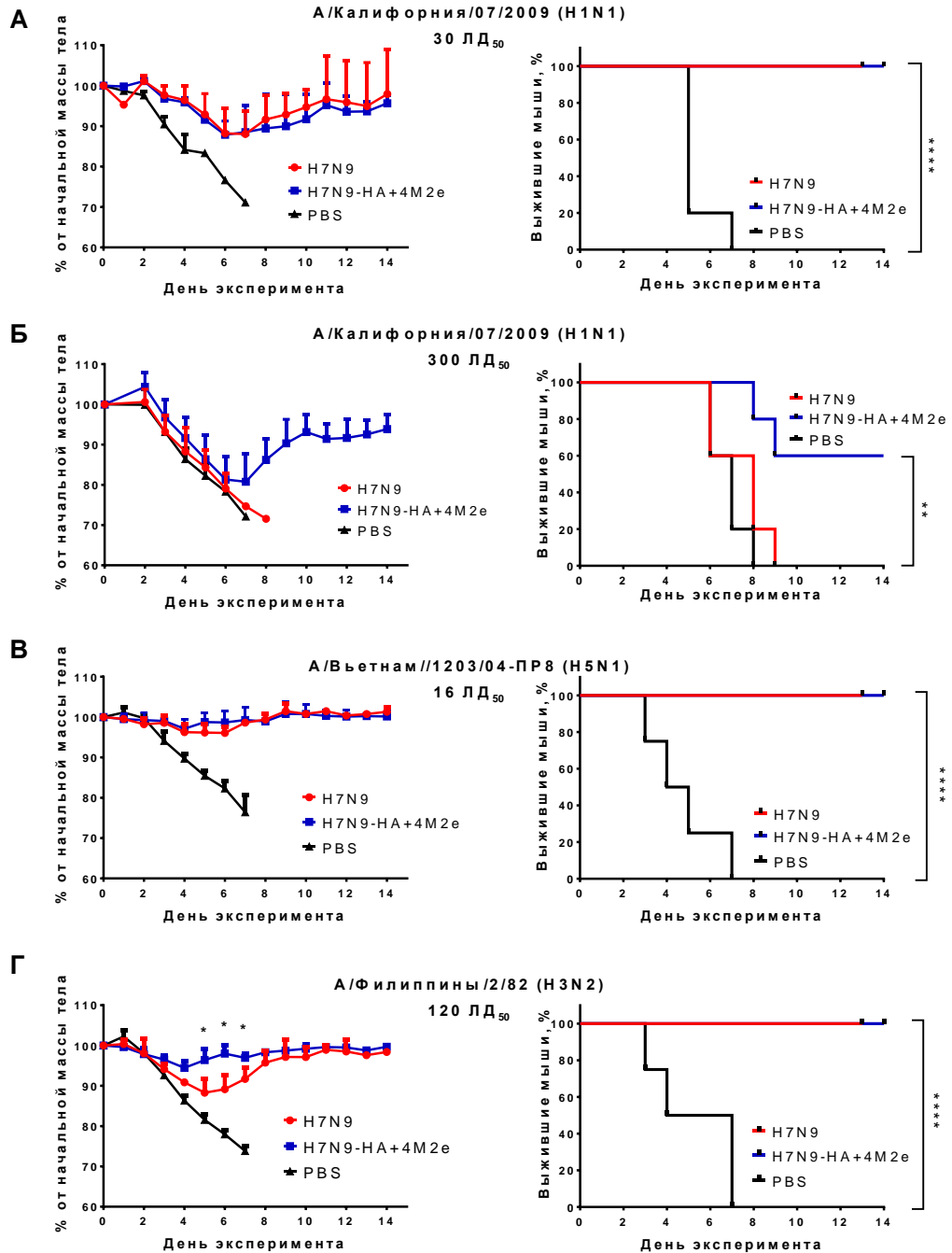


Рисунок 16 – Оценка протективной активности вакцинных штаммов против действия высоких доз смертельных челлендж-вирусов. После двукратной иммунизации H7N9, H7N9-HA+4M2e или PBS, мыши были заражены 30 ЛД₅₀ (А) или 300 ЛД₅₀ (Б) адаптированного для мышей вируса А/Калифорния/7/09 (H1N1); 16 ЛД₅₀ вируса А/Вьетнам/1203/04-PR8 (rgH5N1) (В) и 120 ЛД₅₀ вируса А/Филиппины/2/82 (H3N2) (Г). Снижение массы тела (слева) и выживаемость (справа) фиксировались в течение 14 дней после челленджа. Достоверность разницы в снижении массы тела между двумя группами определялась тестом Манна-Уитни, сравнение кривых выживаемость проводилось с использованием теста Мантела-Кокса. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$; **** - $p < 0.0001$.

3.4.2.2. Изучение роли M2e-специфических антител в защите при проведении опытов по пассивной иммунизации

Для исключения влияния Т-клеточного звена иммунитета и изучения роли именно M2e-специфических антител, был проведён опыт по пассивной иммунизации интактных животных сыворотками мышей после иммунизации H7N9-НА+4M2e, H7N9 и PBS. Для проведения челленджа были использованы 1 ЛД₅₀ вируса А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) и 3 ЛД₅₀ адаптированного для мышей вируса А/Калифорния/7/09 (H1N1). В результате была выявлена статистически значимая разница между группами H7N9 и H7N9-НА+4M2e как при оценке выживаемости, так и при сравнении значений площадей под кривыми потери веса (Рисунок 17), что указывает на положительный эффект индуцированных M2e-специфических IgG антител.

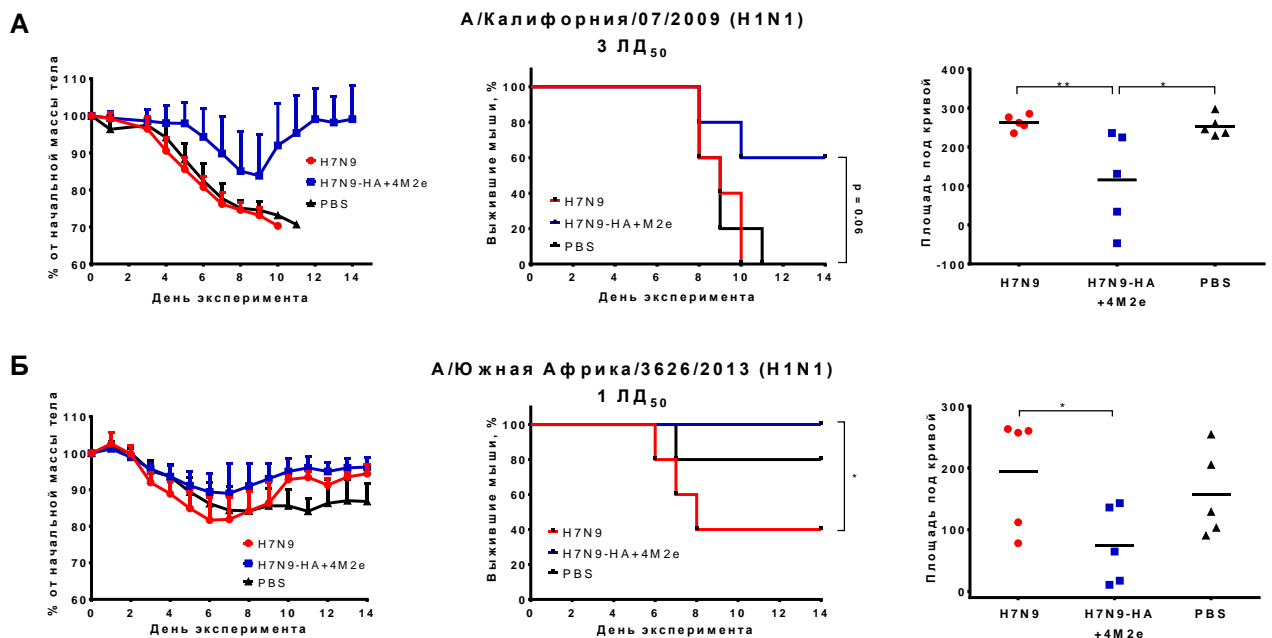


Рисунок 17 – Оценка защитной эффективности вакцинных штаммов в опыте по пассивной иммунизации. Образцы из пула сывороток, полученных после двукратных иммунизаций H7N9, H7N9-НА+4M2e или PBS, были введены мышам через ретро-орбитальный синус за 6 часов до проведения челленджа с использованием 3 ЛД₅₀ адаптированного для мышей А/Калифорния/7/09 (H1N1) (А) или 1 ЛД₅₀ вируса А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) (Б). Снижение массы тела (слева) и выживаемость (в центре) фиксировались в течение 14 дней после челленджа; также оценивалась разница в площадях под кривыми потери веса (справа). Сравнение кривых выживаемости проводилось с использованием критерия Мантела-Кокса, а различия между значениями AUC определялись с помощью дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$).

Таким образом, была показана высокая степень защиты штаммов ЖГВ (H7N9-НА+4M2e и H7N9) против действия гомологичных и гетерологичных вирусов, которая является следствием возможной индукции Т-клеточного звена иммунитета. Однако, вакцинный штамм H7N9-НА+4M2e продемонстрировала усиление защитного потенциала при действии высоких доз челлендж-вирусов, что может свидетельствовать о значимой роль M2e-специфических антител в усилении защиты.

3.5. Иммуногенность и защитная эффективность прототипов универсальной гриппозной вакцины на основе сезонных штаммов H1N1 и H3N2

3.5.1. Проведение прайм-буст иммунизации гомологичными вакцинными штаммами

3.5.1.1. Изучение иммуногенности вакцинных штаммов на основе штаммов H1N1 и H3N2

После проведения двукратной иммунизации новыми рекомбинантными вакцинными штаммами H1N1-НА+4M2e или H3N2-НА+4M2e совместно с соответствующими контролями, была изучена способность данных вакцинных штаммов индуцировать гуморальный ответ. Как и ожидалось, только штаммы ЖГВ-НА+4M2e обладали способностью стимулировать анти-M2e IgG антитела (Рисунок 18Б, Г), а также не наблюдалось снижения иммуногенности таких вакцинных штаммов к самому вектору по сравнению с соответствующими немодифицированными штаммами (Рисунок 18А, В).

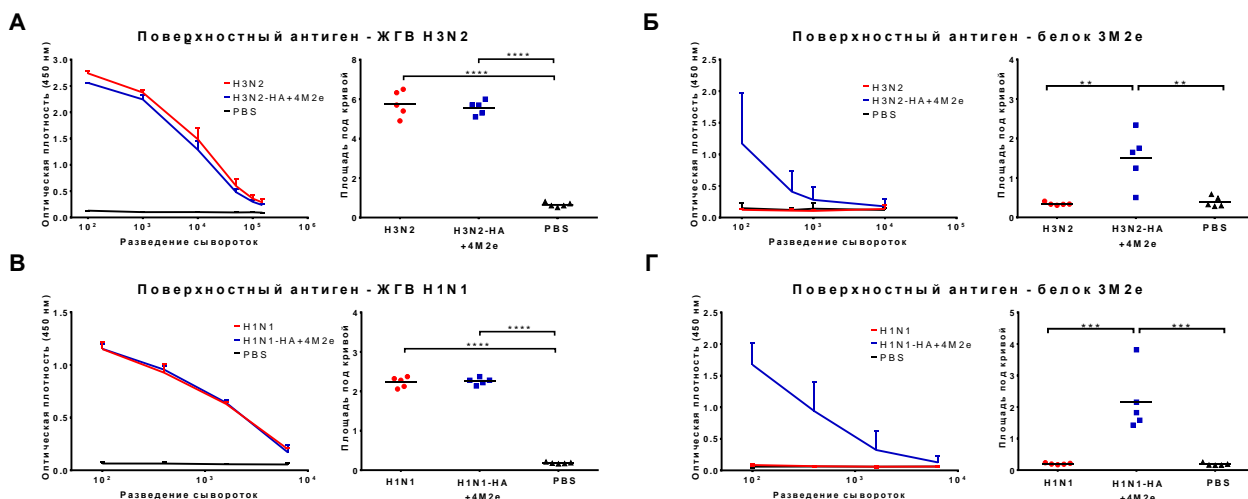


Рисунок 18 – Оценка уровней сывороточных IgG антител у мышей после двукратной иммунизации различными вакцинными прототипами на основе штаммов H1N1 или H3N2. Использованные антигены в ИФА: **А** - очищенный вирус H3N2; **Б, Г** - рекомбинантный белок 3M2e; **В** – очищенный вирус H1N1. Сравнение значений площадей под кривыми оптической плотности проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

3.4.1.2. Изучение протективной активности вакцин на основе штамма H3N2

Изучение влияния стимулированных анти-M2e антител на усиление кросс-протективности вакцинного штамма H3N2- изучалось в опытах по пассивной иммунизации мышей. Наивным мышам BALB/c вводили сыворотки мышей, иммунизированных двукратно H3N2, H3N2-НА+4M2e или получивших препарат плацебо (PBS). Через 6 часов после введения соответствующих иммунных сывороток, мыши были заражены вирусами А/Филиппины/2/82 (H3N2) и А/Вьетнам/1203/04-PR8 (rgH5N1). Как и при исследовании защитных свойств вакцины H7N9-НА+4M2e, мыши из группы H3N2-НА+4M2e продемонстрировали меньшее снижение веса и лучшую выживаемость по сравнению с контрольными группами H3N2 и PBS (Рисунок 19).

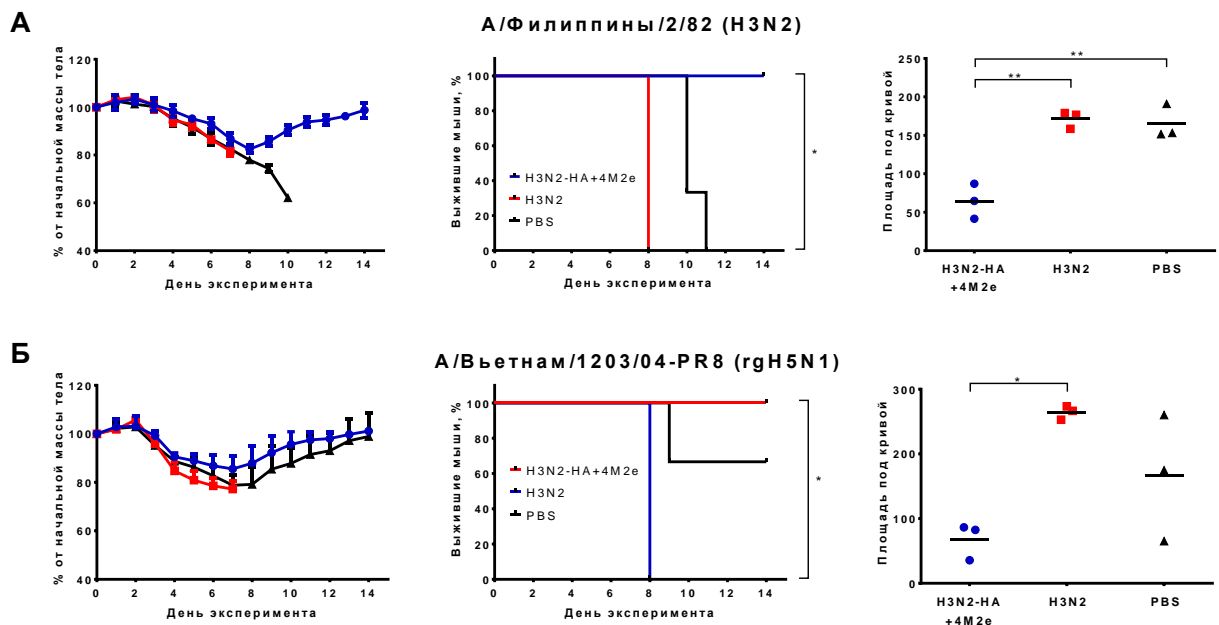


Рисунок 19 – Оценка защитной эффективности вакцинных штаммов в опыте по пассивной иммунизации. Образцы пула сывороток, полученных после двукратной иммунизации, были введены мышам через ретро-орбитальный синус за 6 часов до проведения экспериментального заражения патогенными вирусами гриппа А/Филиппины/2/82 (H3N2) (А) и А/Вьетнам/1203/04-PR8 (rgH5N1) (Б). Снижение массы тела (слева) и выживаемость (в центре) фиксировались в течение 12 дней после челленджа. Также учитывались значения площадей под кривыми снижения массы тела для каждой мыши (справа). Сравнение значений площадей под кривыми проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки, а анализ выживаемости проводился с использованием критерия Мантела-Кокса (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

3.5.2. Проведение прайм-буст иммунизации гетерологичными вакцинными вирусами

3.5.2.1. Изучение иммуногенности вакцин при использовании различных режимов иммунизации

Основными иммуногенными участками вирусов гриппа являются антигены, расположенные в головной субъединице молекулы HA, и для индукции значимого иммунного ответа к другим фрагментам HA зачастую применяется подход, в котором используются гетерологичные вакцинные штаммы для проведения двукратной иммунизации [92, 165]. Иммунизация мышей линии BALB/c проводилась последовательно штаммами H1N1-HA+4M2e и H3N2-HA+4M2e (H1N1-HA+4M2e → H3N2-HA+4M2e), тогда как контрольная группа была иммунизирована соответствующими классическими штаммами ЖГВ (H1N1 → H3N2).

Поскольку рекомбинантные вакцинные штаммы H1N1-HA+4M2e и H3N2-HA+4M2e имеют только небольшой общий фрагмент – 4M2e, и значительно отличаются между собой в остальных антигенных составляющих, предполагалось, что такая стратегия иммунизации приведёт к усиленному формированию анти-M2e антител. Как и ожидалось, только иммунизация с использованием рекомбинантных штаммов ЖГВ-HA+4M2e привела к формированию специфического ответа на фрагмент M2e. Однако, несмотря на ожидания, классическая стратегия вакцинации, где первая и вторая иммунизация были проведены с использованием штамма H1N1-HA+4M2e, привела к формированию статистически достоверно большего количества M2e-специфических IgG антител, чем стратегия гетерологичной прайм-буст иммунизации (Рисунок 20А). Возможным объяснением может являться более высокая иммуногенность вакцинных штаммов на основе H1N1 в мышинной модели по сравнению со штаммами на основе H3N2 ввиду более активной репликации вирусов H1N1 в респираторном тракте мышей (Таблица 5). Тем не менее, анализ гуморального ответа к самому вирусному вектору подтвердил успешность проведения повторной иммунизации вирусами H3N2 в соответствующих группах (Рисунок 20).

Несмотря на наличие статистически достоверной разницы в уровне стимулированных анти-H1N1 IgG антител между группами, получавшими гомологичные и гетерологичные вакцинные штаммы, общий уровень выявленных антител сохранялся на высоком уровне. Аналогичная ситуация наблюдалась и для анти-H3N2 IgG антител – проведение гетерологичной иммунизации способствовало усилению специфического гуморального ответа по сравнению с группами, получавшими гомологичные вакцинные штаммы, несмотря на высокую кросс-реактивность антител при исследовании на модели мышей.

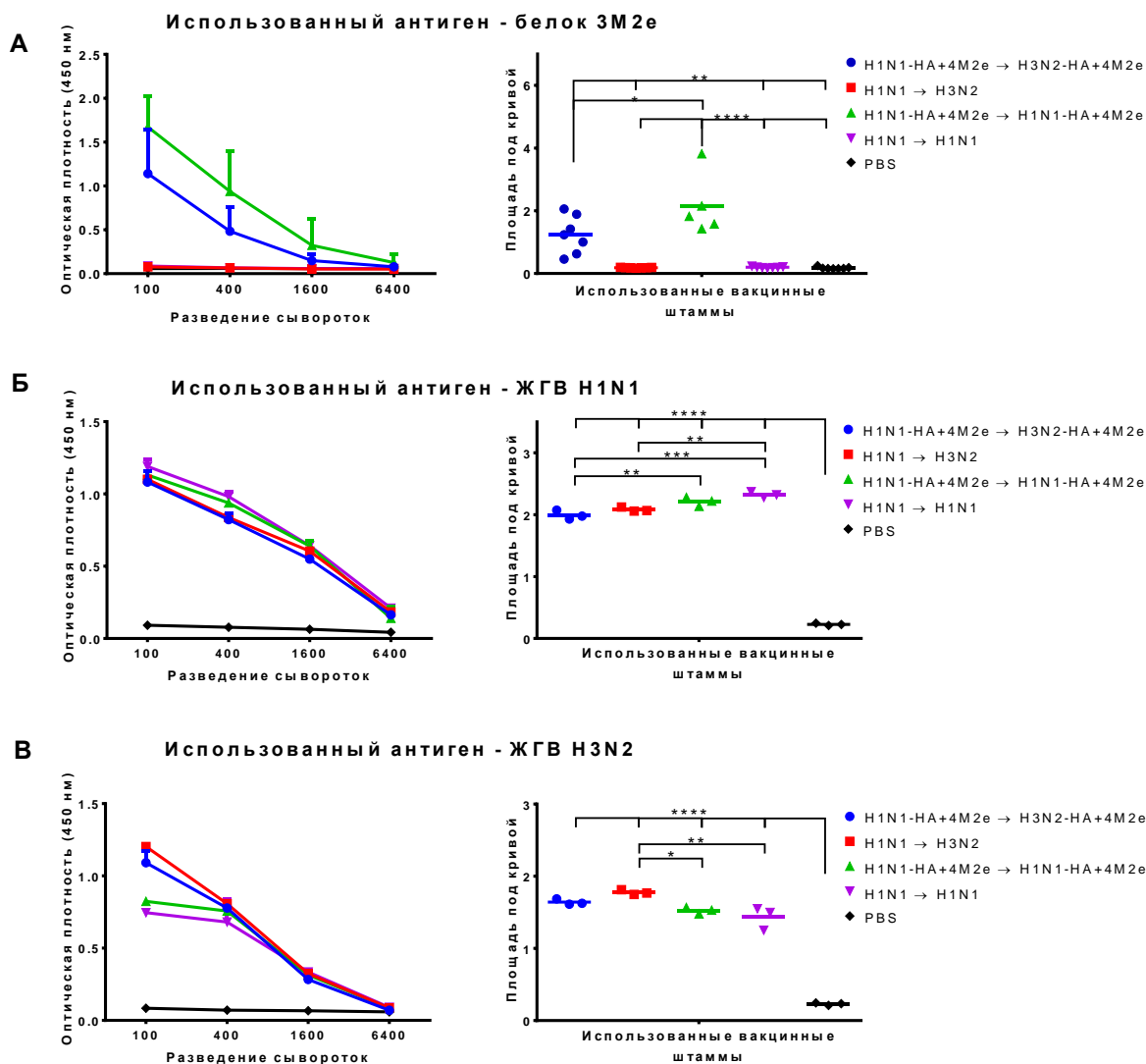


Рисунок 20 – Оценка уровней сывороточных IgG антител у мышей ($n = 3 - 7$ для каждой группы) после двукратной иммунизации различными комбинациями вакцинных штаммов. Анализ проводился методом ИФА путём определения оптической плотности сывороток иммунизированных мышей по отношению к соответствующим вирусным антигенам (А - рекомбинантный белок 3M2e; Б – очищенный вирус H1N1; В - очищенный вирус H3N2). Сравнение значений площадей под кривыми (справа) проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$).

3.5.2.2. Изучение кросс-протективной активности вакцинных штаммов при использовании различных режимов иммунизации

После двукратной иммунизации по описанной выше схеме мыши были заражены 40 ЛД₅₀ гетерологичного вируса гриппа rgH5N1, после чего на 5-й день проведения эксперимента был осуществлён забор органов для последующего вирусологического и иммунологического

исследования. Иммунизация с использованием гомологичных и гетерологичных ЖГВ защитила мышей всех групп от потери веса и привела к статистически достоверному снижению титров вируса в лёгких по сравнению с группой PBS (Рисунок 21А, Б).

Наименьшее снижение веса наблюдалось у мышей из группы, получавшей гомологичные прайм и буст вакцинным штаммом H1N1 по сравнению с остальными группами, однако эти отличия не были статистически значимыми. Несмотря на отсутствие статистической достоверности между группами, среднее значение титра вируса в группе H1N1-НА+4M2e → H3N2-НА +4M2e было наименьшим, тогда как динамика изменения веса была схожей с остальными вакцинными группами. Стоит отметить, что попарное сравнение вирусных титров в группах H1N1-НА+4M2e → H3N2-НА+4M2e и H1N1→ H3N2 с использованием теста Манна-Уитни свидетельствует о тенденции к усилению защитных свойств вакцинами, имеющими вставку 4M2e ($p = 0,026$), но для демонстрации общей защитной эффективности требуется спектр защитных антител помимо специфических только к M2e (Рисунок 21Б).

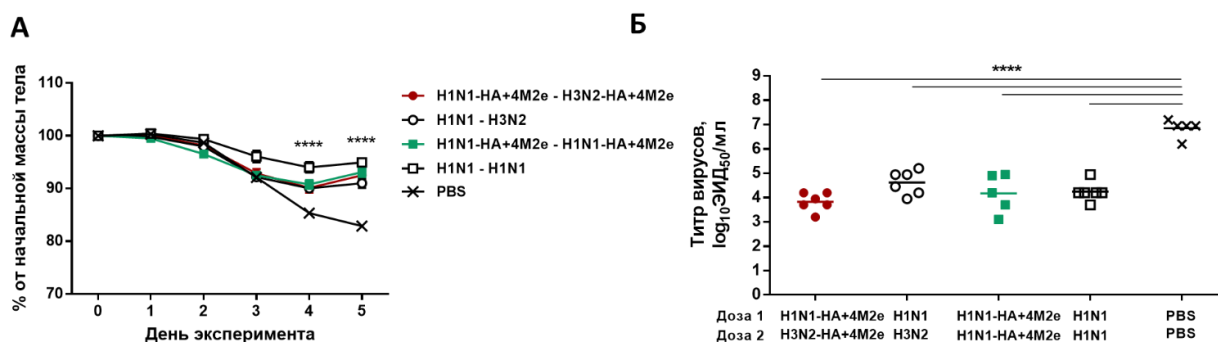


Рисунок 21 – Защитная эффективность вакцин при экспериментальном заражении патогенным вирусом гриппа H5N1. (А) Динамика изменения массы тела и (Б) вирусная нагрузка в лёгких оценивались у групп, получавших различные комбинации вакцин. Сравнение значений проводилось с использованием двухфакторного (А) и однофакторного (Б) дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (**** $p < 0.0001$).

3.5.3. Характеристика В-клеточного ответа у мышей при использовании различных режимов иммунизации

Кроме сильного иммунного ответа, успешный вакцинный прототип должен приводить к формированию долгосрочного В-клеточного иммунитета, т.к. В клетки смогут быстро начать продуцировать антитела в случае повторного появления антигена [23]. На 5-й день после проведения экспериментального заражения, у мышей из всех групп собирались медиастинальные лимфоузлы (МЛУ) и селезёнки, клетки которых затем инкубировались с

различными антигенами в течение 5 дней. М2е-специфические антитела в МЛУ были обнаружены только при проведении гомологичной и гетерологичной вакцинации с использованием ЖГВ-НА+4М2е, причем гетерологичный способ прайм-буст иммунизации привёл к статистически достоверно большему количеству антител (Рисунок 22А). При этом не было зафиксировано М2е-специфических антител в результате анализа IgG ответа спленоцитов (Рисунок 22Б). То есть можно предположить, что интраназальная вакцинация приводит к формированию местного В-клеточного иммунитета в лёгких.

Как и ожидалось, использование ЖГВ в качестве праймирующей и бустерной вакцин привело к формированию во всех группах вирус-специфического ответа, обнаруженного как в МЛУ, так и в клетках селезёнки (Рисунок 22А, Б). Кроме того, в группах, получавших только вакцинные штаммы на основе ЖГВ Н1N1, наблюдался значительный ответ к Н3N2 антигену за счёт кросс-реактивности некоторых эпитопов.

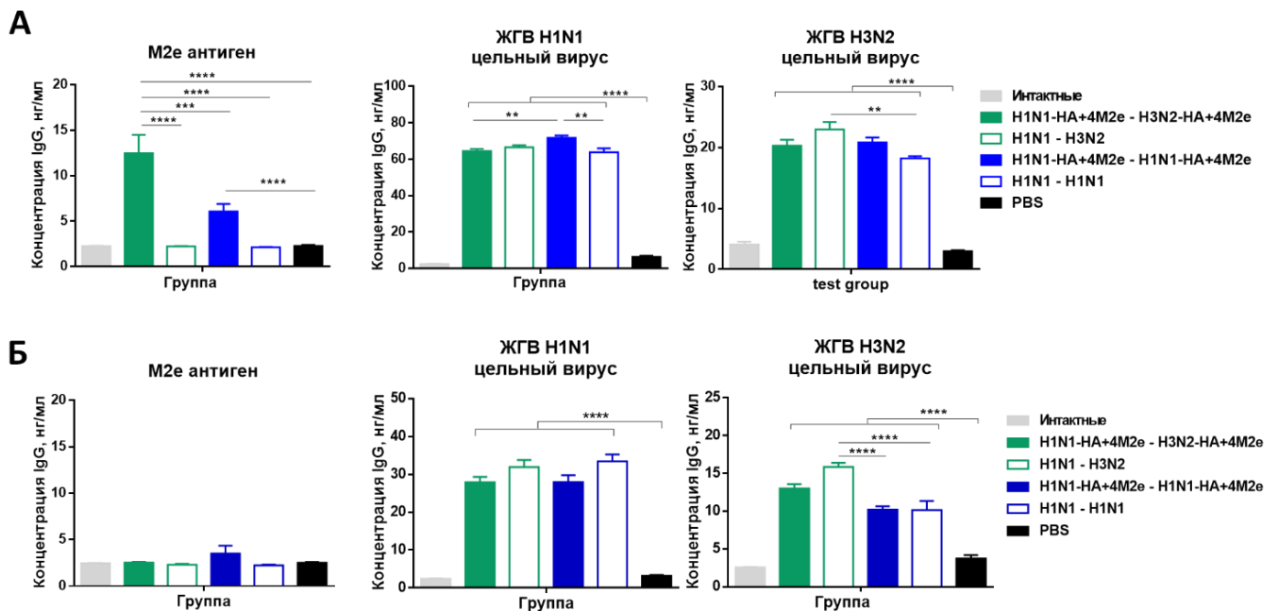


Рисунок 22 – Секретия антител клетками медиальных лимфатических узлов (А) и селезёнок (Б) на 5-й день после проведения экспериментального заражения. Сравнение значений проводилось с использованием однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$).

3.5.4. Характеристика Т-клеточного ответа у мышей при использовании различных режимов иммунизации

Одним из основных защитных механизмов ЖГВ является формирование стойкого Т-клеточного ответа [119]. В результате *in vitro* стимуляции с использованием М2е клеток, выделенных из лёгочных смывов после экспериментального заражения всех групп, получавших

штаммы ЖГВ, были зафиксированы статистически достоверно более высокие уровни CD4 и CD8 Т-клеток, секретирующих цитокины IFN- γ и TNF- α по сравнению с группой PBS.

Стоит отметить, что вакцинация с использованием двух доз ЖГВ H1N1 привела к формированию самого высокого уровня и CD4, и CD8 Т-клеток, которые смогут быстро обеспечить защиту в случае заражения патогенными вирусами гриппа. Однако, не было обнаружено значимых отличий при анализе M2e-специфического Т-клеточного ответа после вакцинации классическими штаммами ЖГВ и рекомбинантными ЖГВ-НА+4M2e (данные не представлены).

После проведения экспериментального заражения иммунизированных мышей вирусом rgH5N1 наиболее выраженный CD4 и CD8 Т-клеточный ответ был зафиксирован у групп, получавших ЖГВ в режиме гетерологичной и гомологичной иммунизации (H1N1 \rightarrow H3N2 и H1N1 \rightarrow H1N1) (Рисунок 23А, Б). Тем не менее, наибольшее количество CD8 Т-клеток, способных отвечать на стимуляцию с использованием M2e, было зафиксировано в группах, получавших гетерологичные вакцины (H1N1 \rightarrow H3N2 и H1N1-НА+4M2e \rightarrow H3N2-НА+4M2e) (Рисунок 23Б). Тогда как наибольшее количество CD4 Т-клеток, продемонстрировавших M2e-специфический ответ, было обнаружено после иммунизации H1N1-НА+4M2e \rightarrow H3N2-НА+4M2e (Рисунок 23А).

Таким образом, было показано, что использование различных стратегий вакцинации с использованием ЖГВ приводит к формированию сильного Т-клеточного ответа. Однако, способность такого ответа быстро реагировать на последующее заражение патогенами варьируется в зависимости от выбранного способа иммунизации. Также было показано, что во всех исследуемых группах, вне зависимости от присутствия дополнительных M2e-эпитопов в составе вакцинного штамма, специфические к M2e Т-клетки внесли значимый вклад в обеспечении защиты при проведении экспериментального заражения.

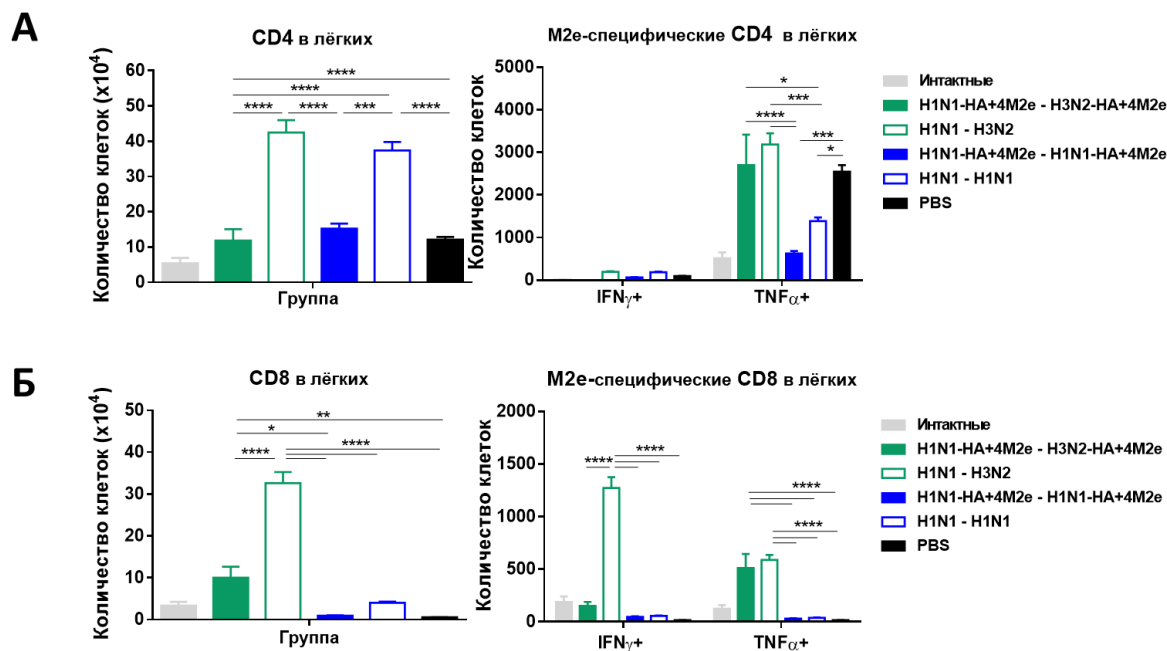


Рисунок 23 – CD4 (А) и CD8 (Б) Т-клеточный ответ, сформированный у вакцинированных различными комбинациями ЖГВ мышей, на 5-й день после проведения экспериментального заражения. Было проанализировано общее количество соответствующих клеток (слева) и цитокин-продуцирующих клеток после стимуляции *in vitro* с использованием M2e-пептида.

Сравнение значений проводилось с использованием как однофакторного (слева), так и двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$).

3.6. Альтернативные стратегии по конструированию вакцинных штаммов ЖГВ, кодирующих дополнительные эпитопы M2e

3.6.1. Сравнение эффективности различных консенсусных последовательностей M2e

На предыдущем этапе исследования рекомбинантные вирусы были сконструированы с использованием кассеты 4M2e, включающей консенсусные фрагменты, характерные для вирусов гриппа А, циркулирующих среди человека, свиней и птиц (Рисунок 24А). На основе теоретических данных, полученных в разделе 3.1, была синтезирована новая кассета, состоящая из консенсусных фрагментов, характерных различным филогенетическим линиям вирусов, циркулирующих среди птиц/свиней, людей/свиней, свиней и людей (Рисунок 5). С использованием новой кассеты был сконструирован химерный ген НА модельного штамма ЖГВ H7N9 (Рисунок 24Б) и получен жизнеспособный вакцинный прототип H7N9-НА+4M2e.

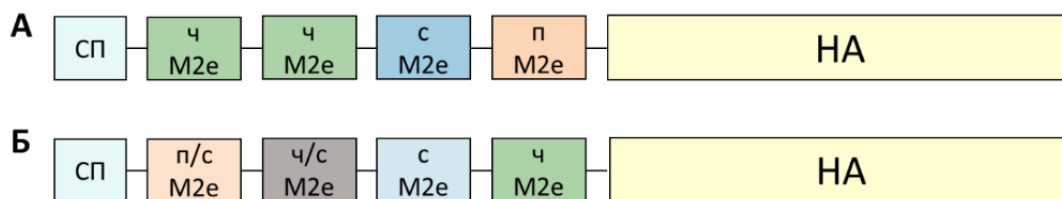


Рисунок 24 – Схема встраивания различных конструкций, состоящих из 4M2e-фрагментов, в молекулу НА между сигнальным пептидом (СП) и его основной субъединицей – А. Консенсусные фрагменты, характерные для вирусов гриппа А, циркулирующих среди человека (ч), свиней (с) и птиц (п). Б. Консенсусные фрагменты, характерные различным филогенетическим линиям вирусов, циркулирующих среди птиц/свиней (п/с), людей/свиней (л/с), свиней (с) и людей (л).

Сравнение двух штаммов ЖГВ H7N9-НА+4M2e, содержащих вставки разных кассет 4M2e, проводили путем двукратной иммунизации мышей BALB/c указанными вирусами в дозе 10^6 с интервалом 21 день. Через три недели после второй иммунизации мышей заражали высокой дозой адаптированного к мышам вируса А/Калифорния/7/09 (H1N1) (300 ЛД₅₀). Контрольные группы животных получали либо две дозы классического варианта ЖГВ H7N9, либо препарат плацебо (PBS). Обе модифицированные вакцины статистически достоверно лучше защищали мышей от заражения гетерологичным вирусом гриппа по сравнению с классической ЖГВ, как в отношении степени потери веса, так и по уровню выживаемости (Рисунок 25). Несмотря на то, что не было выявлено значимых различий в кросс-протективной активности обеих вакцин, имеющих различные вставки 4M2e, наблюдалась тенденция к усилению защитной эффективности у группы со вставкой, основанной на применении филогенетического анализа (H7N9-НА+4M2e (B), Рисунок 25).

Таким образом, для проведения дальнейших исследований по конструированию вакцинных прототипов универсальной живой гриппозной вакцины было предложено использовать модифицированную вставку из 4-х фрагментов M2e, отобранных с использованием филогенетического подхода.

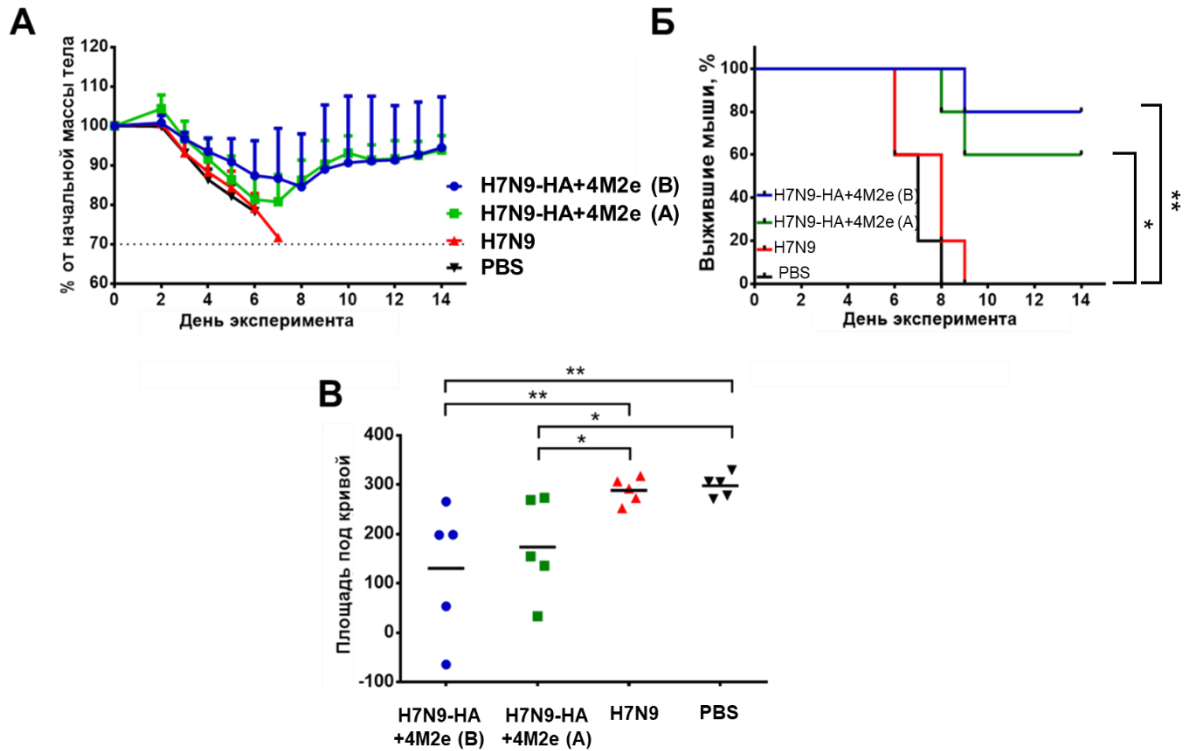


Рисунок 25 – Сравнение защитной эффективности вакцинных штаммов, содержащих дополнительную вставку 4M2e в молекуле HA по сравнению с контрольными группами ЖГВ и PBS. Вставки 4M2e были получены в результате двух различных подходов по поиску консенсусных последовательностей. После экспериментального заражения вирусом Cal MA (300 ЛД₅₀) оценивали снижение массы тела (А), выживаемость (Б), которые фиксировались ежедневно в течение 14 дней. Также оценивалась разница в площадях под кривыми для графиков снижения веса (В). Сравнение значений площадей под кривыми проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки на множественное сравнение (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

3.6.2. Создание вакцинных прототипов путем кодирования дополнительных эпитопов M2e в гене NS

В рамках проведения диссертационного исследования изучалась также возможность создания прототипа универсальной гриппозной вакцины путём внесения дополнительных M2e эпитопов в ген неструктурного белка 1 (NS1) вируса, с уменьшением для этой цели рамки считывания NS1 белка до 126 аминокислот. Поскольку ген NS1 активно экспрессируется в зараженной клетке на ранних стадиях заражения, предполагается, что и накопление внутри клетки большого количества M2e белка будет способствовать усиленной выработке M2e-специфического иммунного ответа.

Для обеспечения максимальной функциональности укороченного NS1 белка, вставка из 4-х M2e повторов вносилась в рамку считывания NS1 белка через сайт саморасщепления P2A, что должно обеспечивать независимый процессинг вирусного белка и встроенного антигена (Рисунок 26).

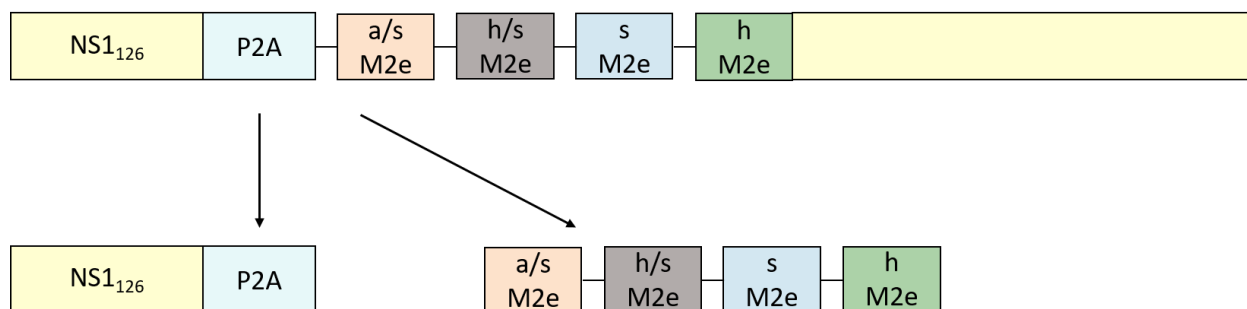


Рисунок 26 – Схематическое изображение конструкций на основе гена NS. P2A: сайт саморасщепления GSGATNFSLKQAGDVEENPG↓P.

Встраивание кассеты P2A+4M2e осуществлялось в ген NS штамма живой гриппозной вакцины А/Ленинград/134/17/57 с использованием стандартных методов генной инженерии. Корректность встраивания оценивалась с помощью секвенирования по Сэнгеру итогового химерного гена NS+4M2e.

Сборку прототипов универсальной гриппозной вакцины осуществляли с использованием обратно-генетической системы, разработанной для донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57 (H2N2), при этом в качестве поверхностных антигенов использовали гены HA, NA следующих сезонных штаммов:

- А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2) – **H3N2-NS+4M2e**;
- А/Нью Йорк/61/2015 (H1N1) – **H1N1-NS+4M2e**.

Соответствующие рекомбинантные вакцинные вирусы были успешно получены путем электропорации культуры клеток Vero необходимым набором плазмид, и вирусы ЖГВ-NS+4M2e далее накапливались в развивающихся куриных эмбрионах. Схема рекомбинантных вирусов, содержащих дополнительные эпитопы M2e представлена на Рисунке 27.

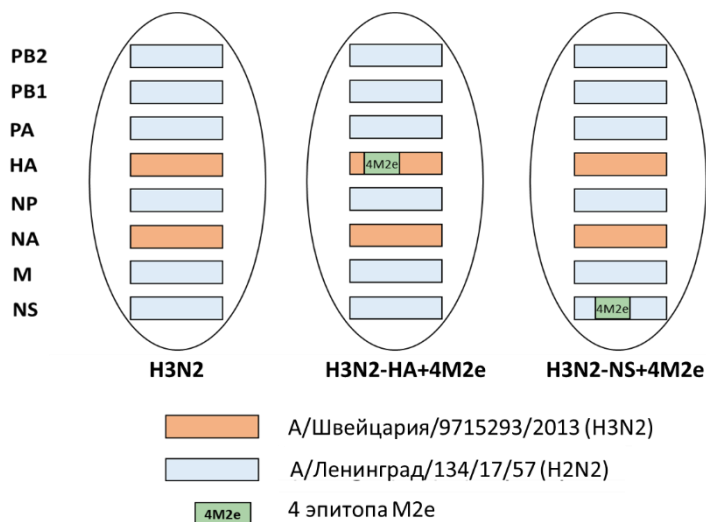


Рисунок 27 – Геномный состав рекомбинантных прототипов универсальной живой гриппозной вакцины на примере штамма H3N2.

3.6.3. Отбор наиболее перспективных кандидатов для их дальнейшей характеристики в доклинических исследованиях

При создании прототипа универсальной живой гриппозной вакцины критически важно сохранить их высокую репликативную активность в основных субстратах для культивирования вирусов гриппа – в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и в культуре клеток MDCK.

На предыдущих этапах исследования было показано, что внесение дополнительных эпитопов M2e в молекулу HA не повлияло на репликативные свойства ни одного из полученных вакцинных кандидатов. Однако, в случае модификации гена NS вакцинного прототипа H1N1-NS+4M2e произошло существенное снижение инфекционной активности вируса в культуре клеток MDCK по сравнению с контрольным штаммом H1N1, не имеющем вставки 4M2e (Рисунок 28). Поскольку аналогичное изменение свойств не было отмечено для вакцинной пары на основе штамма H3N2, можно предположить, что снижение уровня репликации для рекомбинантного вируса H1N1-NS+4M2e является индивидуальной особенностью данного серотипа. В этой связи, наиболее перспективным прототипом универсальной гриппозной вакцины является штамм H3N2-NS+4M2e.

Таким образом, для детального изучения и проведения доклинических исследований были отобраны наиболее перспективные генетически стабильные рекомбинантные штаммы–кандидаты в универсальную вакцину на основе сезонного штамма ЖГВ А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2) – **H3N2-HA+4M2e** и **H3N2-NS+4M2e**.

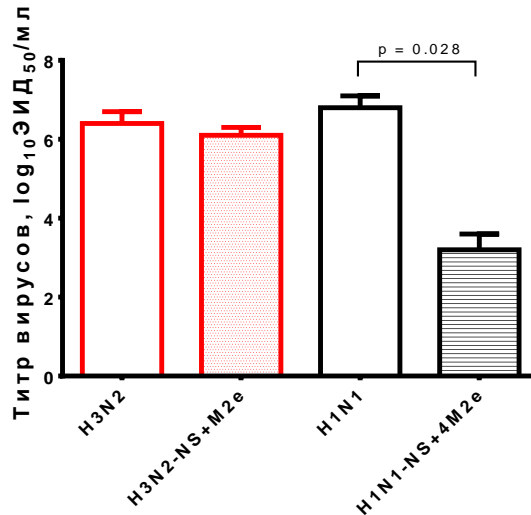


Рисунок 28 – Инфекционная активность вирусов в системе MDCK. Каждый химерный вирус, имеющий вставку дополнительных эпитопов M2e, изучался вместе с соответствующим контрольным вакцинным штаммом, не имеющим аналогичной вставки. Статистическая достоверность различия между титрами определялась с помощью критерия Манна-Уитни.

3.6.4. Изучение ростовых характеристик *in vitro* отобранных прототипов универсальной гриппозной вакцины

Анализ ростовых характеристик рекомбинантных вирусов подтипа H3N2, имеющих вставку 4M2e в генах HA или NS, по сравнению с их соответствующим контролем, в развивающихся куриных эмбрионах выявил отсутствие значимых различий между вирусными титрами при оптимальной температуре инкубации 33°C (Рисунок 29).

Титрование вирусов при повышенной (38°C) и пониженной (26°C) температурах выявило температурочувствительный/холодоадаптированный (*ts/ca*) фенотип у рекомбинантного штамма, имеющего вставку 4M2e в молекуле HA (H3N2-HA+4M2e), характерный для классических штаммов живой гриппозной вакцины (H3N2) (Рисунок 4). Однако, для варианта со вставкой эпитопов M2e в гене NS было выявлено снижение вирусного титра при пониженной температуре 26°C. То есть прототип универсальной гриппозной вакцины H3N2-NS+4M2e имеет *ts/non-ca* фенотип. Нарушение *ca* фенотипа может сказаться на иммуногенных свойствах вакцины из-за возможного пониженного уровня репликации в верхних дыхательных путях. Однако, как было показано ранее [94], вакцинные прототипы без *ca* фенотипа также способны вызывать устойчивый иммунный ответ к вакцинным антигенам.

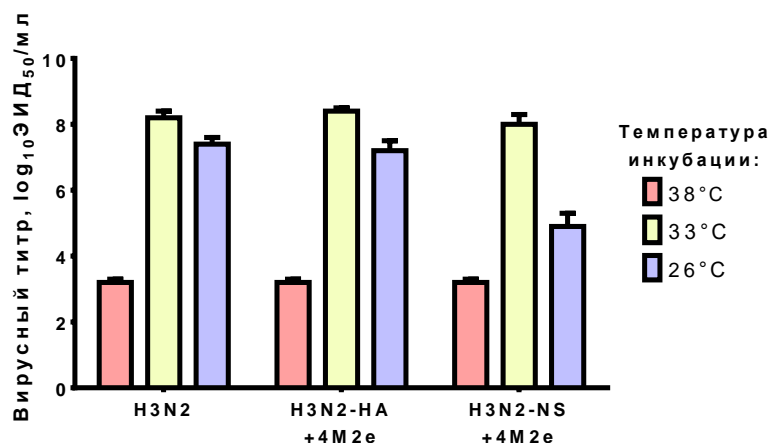


Рисунок 29 – Инфекционная активность исследуемых вирусов гриппа в системе развивающихся куриных эмбрионов при различных температурах инкубации.

Дополнительно была изучена генетическая стабильность всех сконструированных рекомбинантных вирусов гриппа в результате многократного пассирования в системе РКЭ. Секвенирование участков генома вакцинных штаммов после каждого из 10 пассажей показало сохранность вставки 4M2e в генах HA или NS, а также отсутствие мутаций как в самой вставке, так и в самих вакцинных векторах.

Также было важно сравнить влияние модификаций двух различных генов на репликативные свойства вирусов при накоплении на клетках MDCK. Оказалось, что оба рекомбинантных вакцинных штамма на основе H3N2 неотличимы от немодифицированного контрольного вируса в любой из проанализированных временных точек (Рисунок 30)

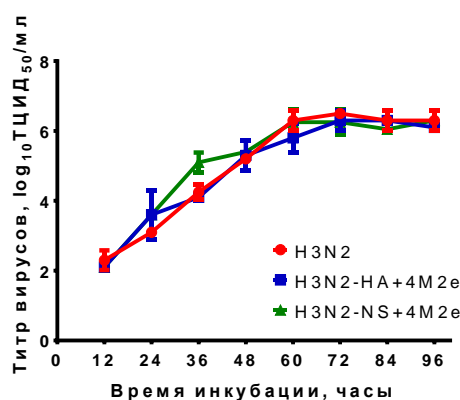


Рисунок 30 – Изучение кинетики накопления вирусного материала рекомбинантных вакцинных штаммов H3N2-HA+4M2e и H3N2-NS+4M2e по сравнению с контролем ЖГВ H3N2.

Также оценивалась способность рекомбинантных вакцинных штаммов экспрессировать M2e эпитопы на поверхности заражённых клеток MDCK при их заражении различными дозами

вирусов. Для детекции фрагментов M2e было использовано антитело 14C2, тогда как в качестве контроля использовалось анти-Н3 моноклональное антитело 4F7.

При больших дозах заражения не было выявлено статистически достоверной разницы в силе детектируемого сигнала между рекомбинантными штаммами и контрольным штаммом Н3N2, поскольку известно, что собственный вирусный белок М2 активно экспрессируется на поверхности заражённых клеток. Тем не менее, при уменьшении дозы заражения вакцинные штаммы Н3N2-НА+4M2e и Н3N2-NS+4M2e выявлялись с помощью анти-M2e антитела статистически достоверно лучше, чем контрольный вирус Н3N2 (Рисунок 31).

Для подтверждения, что продемонстрированное усиление сигнала связано именно с внесением дополнительных эпитопов М2е в геном рекомбинантных вирусов, а не с их усиленной репликацией, было использовано антитело 4F7. В результате, все вакцинные штаммы ЖГВ на основе Н3N2 имели равное количество детектируемых молекул НА при всех дозах заражения (Рисунок 31).

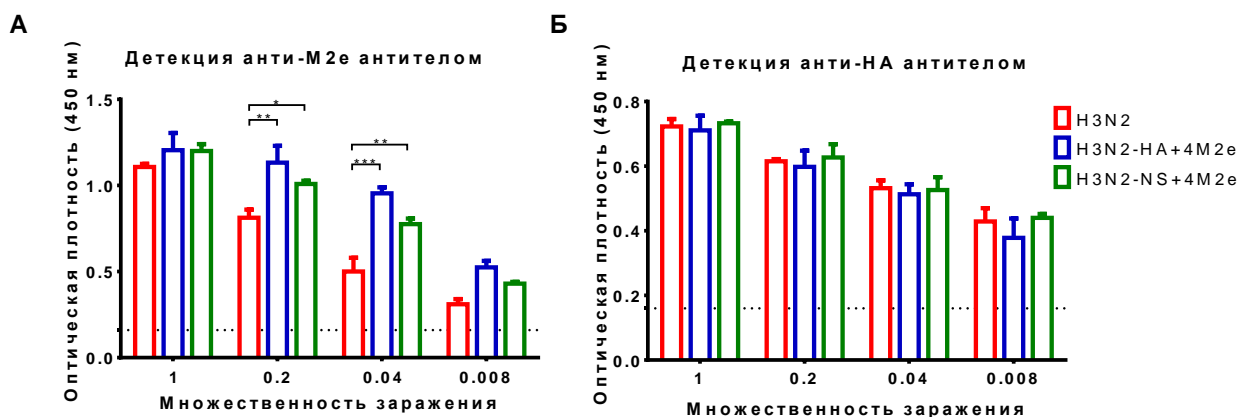


Рисунок 31 – Детекция антигенов на поверхности заражённых клеток. Клетки MDCK были заражены различными дозами вакцинных штаммов. Детекция M2e проводилась с использованием антитела 14C2 (А), а Н3 белка – с использованием 4F7 (Б). Пунктиром указан предел чувствительности метода – среднее значение оптических плотностей, детектированных у незаражённых клеток. Статистический анализ проводился методом дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

3.7. Доклиническое изучение вакцинных кандидатов на модели хорьков

3.7.1. Оценка репликативных свойств вакцинных прототипов

В доклинических исследованиях на хорьках были изучены следующие вакцинные кандидаты на основе сезонного штамма Н3N2:

Группа 1 (H3N2) – штамм ЖГВ на основе вируса А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2);
 Группа 2 (H3N2-НА+4М2е) – рекомбинантный штамм ЖГВ со вставкой 4М2е в гене НА;
 Группа 3 (H3N2-NS+4М2е) – рекомбинантный штамм ЖГВ со вставкой 4М2е в гене NS;
 Группа 4 (PBS) – плацебо.

Исследования проводили на модели хорьков, поскольку данные животные являются лучшей тест-системой для изучения вирусов гриппа человека. Вирусы гриппа типов А и В естественно инфицируют хорьков, и инфекция у них протекает как у человека со сходными клиническими симптомами инфекции (репродукция в дыхательных путях, насморк, лихорадка и т. д.) [16].

Перед началом исследования всем хорькам вживляли температурные рекордеры для непрерывного отслеживания их температуры тела. Для оценки безвредности вакцинных штаммов самцы хорьков (n=7 для каждой группы) были дважды иммунизированы соответствующей вакциной на 0-й и 21-й дни эксперимента (Рисунок 32), в дозе 7,0 IgЭИД₅₀, интраназально в объеме 500 мкл. После каждой иммунизации у хорьков собирались назальные смывы (дни 1-4 и 22-24, соответственно) для определения уровня репликации вакцинных штаммов в носовых ходах привитых животных.

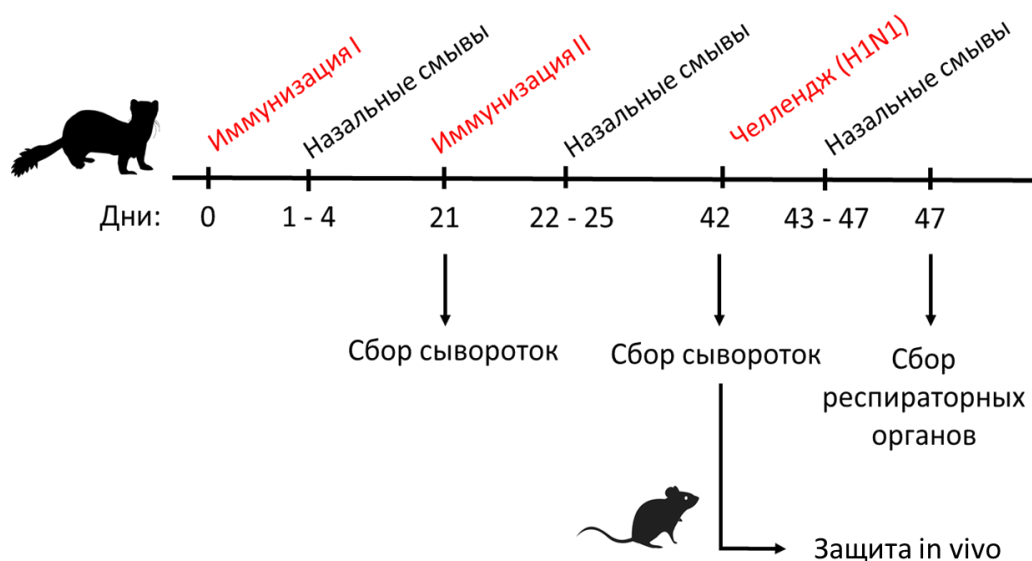


Рисунок 32 – Схема проведения доклинического исследования прототипа универсальной живой гриппозной вакцины на модели хорьков.

Титрование индивидуальных смывов хорьков с использованием куриных эмбрионов выявило высокий уровень репликации всех вакцинных штаммов в первые дни после первой иммунизации (Рисунок 33А), что свидетельствует об отсутствии влияния дополнительной вставки 4М2е на репликативные свойства вакцинного вируса. После 2-й иммунизации

практически у всех животных не наблюдалось активной репликации вируса в верхних дыхательных путях, что может свидетельствовать об уже сформированном иммунитете к данному вакцинному штамму после первой дозы (Рисунок 33Б).

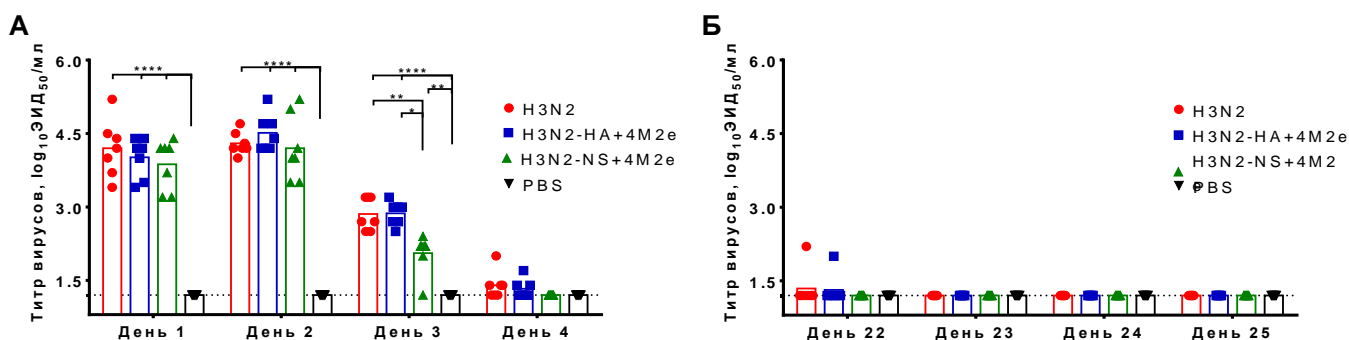


Рисунок 33 – Оценка уровня репликации штаммов ЖГВ в интраназальных смывах хорьков. Группы животных ($n = 7$) были дважды интраназально иммунизированы дозой 10^7 ЭИД₅₀ в объёме 500 мкл с интервалом в 21 день. Для определения вирусного присутствия, в течение 4-х дней после первой (А) и второй (Б) иммунизаций осуществлялся сбор назальных смывов хорьков с последующим титрованием в РКЭ. Статистический анализ проводился методом дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$.

3.7.2. Оценка безвредности вакцинных прототипов

Контроль безвредности включает в себя несколько параметров, таких как анализ массы и температуры тела животных, данные клинических наблюдений, а также патологоанатомические исследования органов респираторного тракта животных после иммунизации.

Анализ температуры, массы тела хорьков и клинических симптомов проводили в течение 28 суток – т.е. до дня 7 после повторной иммунизации, после чего у трех хорьков из группы забирали органы для патоморфологических и гистологических исследований. В указанный период не было зафиксировано существенных колебаний температуры (Рисунок 34А) и массы тела (Рисунок 34Б) у животных ни в одной из экспериментальных групп. Кроме того, общее состояние животных из групп, получивших ЖГВ, соответствовало состоянию хорьков из группы плацебо (Рисунок 34В).

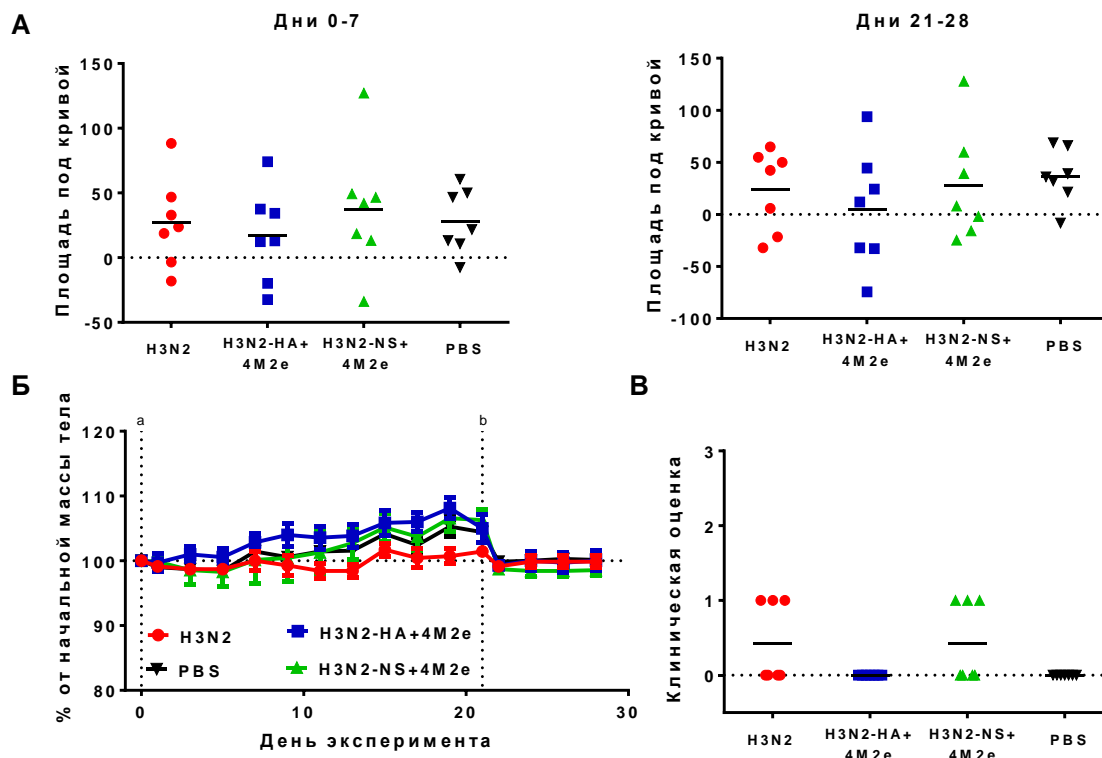


Рисунок 34 – Оценка безопасности ЖГВ на модели хорьков. **А.** Анализ площади под кривой изменения температуры тела животных в каждой группе после 1-й (слева) и 2-й (права) иммунизации, регистрируемые в течение 7 дней после каждой вакцинной дозы. **Б.** Динамика изменения массы тела животных после первой (а) и второй (b) дозы вакцины. **В.** Суммированная клиническая оценка состояния животных в течение 28 дней эксперимента.

При наружном осмотре и патологоанатомическом исследовании не было выявлено никаких макроскопически видимых изменений органов животных ни в одной из экспериментальных групп. Гистологическое исследование также показало отсутствие патологических изменений в местах введения вакцин - назальная полость, трахея, лёгкие (Рисунок 35). Оценка местно-раздражающего действия показала, что интраназальное введение вакцинных штаммов хорькам не сопровождается атрофическими, воспалительными, дистрофическими изменениями или некрозом во всех слоях слизистой оболочки носа (непосредственное место введения вакцин), а также в прилегающих тканях (хрящах и костях носа), также отсутствовали изменения в трахее и лёгких.

Таким образом, полученные результаты по клиническим наблюдениям и патоморфологическим исследованиям на хорьках свидетельствуют о безопасности изученных вакцинных кандидатов при их двукратном интраназальном введении в дозе 7,0 IgЭИД₅₀.

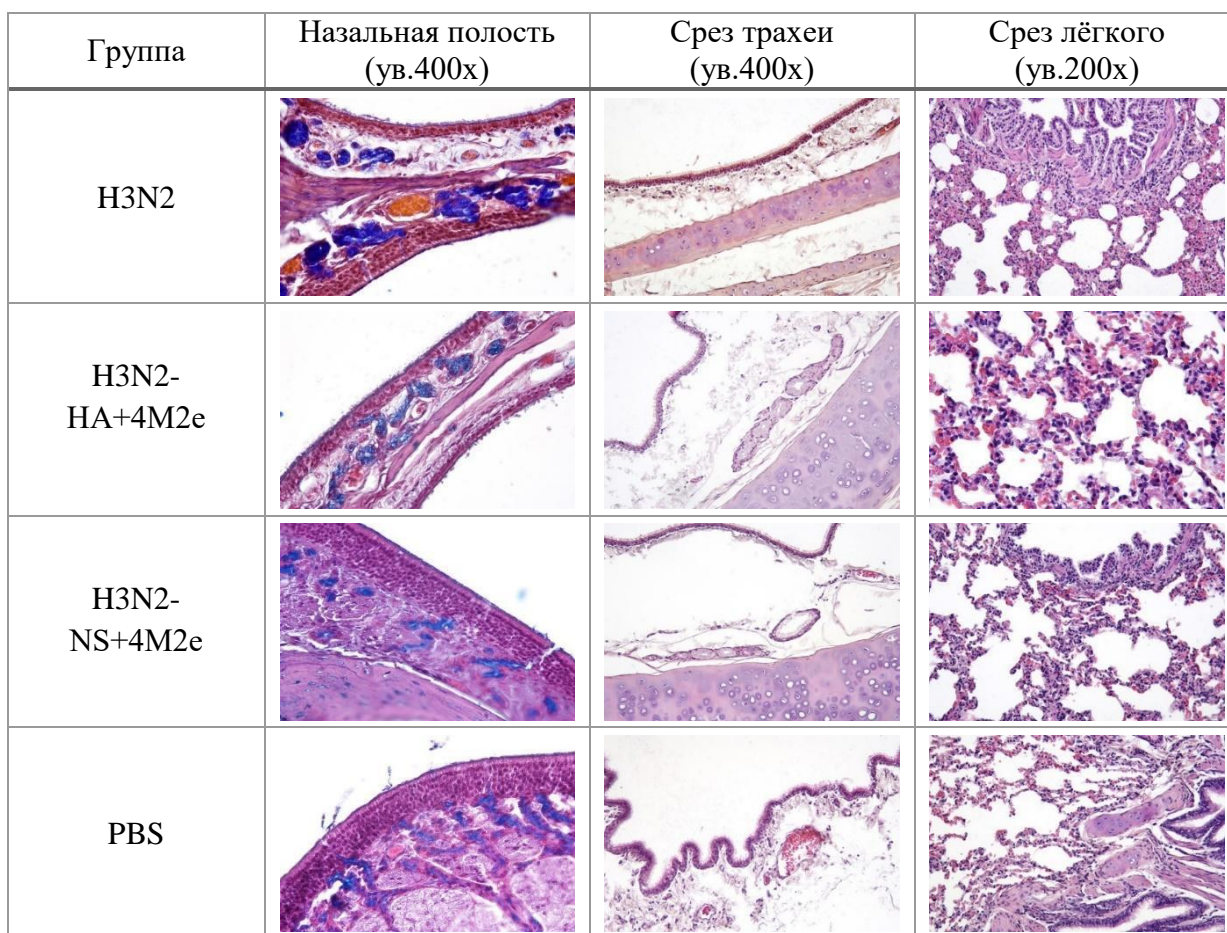


Рисунок 35 – Микрофотографии срезов органов хорьков, собранных на 28-й день эксперимента.

Окрашивание гематоксилин-эозином и альциановым синим.

3.7.3. Оценка иммуногенности вакцинных прототипов

Гуморальный иммунный ответ на интраназальное введение исследуемых прототипов ЖГВ+4M2e оценивался на 21-й день после каждой из иммунизаций. Значимый уровень антигемагглютинирующих антител к гомологичному штамму ЖГВ H3N2 был зафиксирован уже после 1-й иммунизации во всех вакцинных группах по сравнению с группой плацебо (Рисунок 36). Повторная иммунизация не привела к значимому увеличению количества данного типа антител, что является возможным следствием отсутствия вирусной репликации в носовых ходах повторно иммунизированных животных (Рисунок 33Б). Также не было отмечено кросс-реактивности сформированных антител по отношению к гетерологичному вирусу А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1).

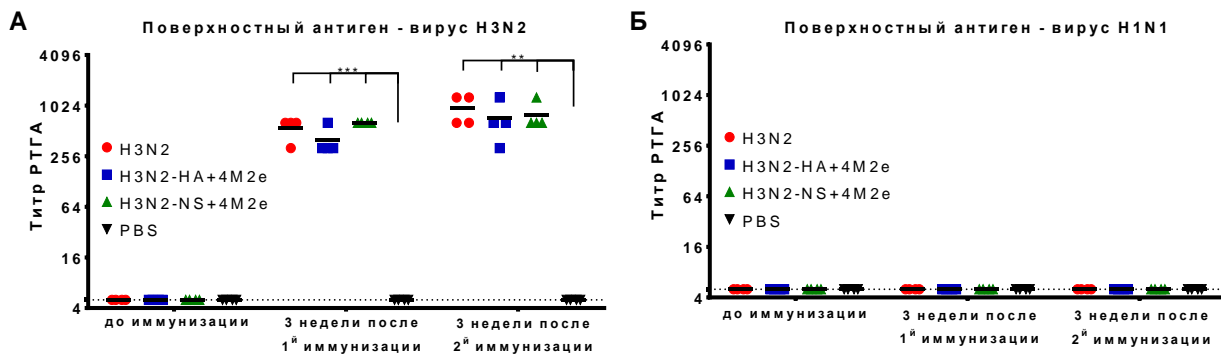


Рисунок 36 – Анализ сывороток иммунизированных животных через 21 день после каждой из иммунизаций в реакции торможения гемагглютинирующей активности. Уровень специфических антител определялся к штамму ЖГВ H3N2 (А) и патогенному вирусу А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) (Б). Статистический анализ проводился методом дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки. ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Для более детальной оценки гуморального иммунного ответа сыворотки крови хорьков, собранные через 3 недели после однократной и двукратной иммунизации, изучались в иммуноферментном анализе с использованием в качестве антигена как цельного очищенного вируса H3N2, так и рекомбинантного белка 3M2e. Высокие уровни IgG антител, связывающиеся с цельным вирусным антигеном, образовались во всех вакцинных группах уже после однократного введения вакцинных вирусов (Рисунок 37А), причем после каждой из иммунизаций отсутствовало статистически значимое различие между исследуемыми группами в силе индуцируемого ответа. Также было отмечено усиление иммунного ответа к вирусу H3N2 во всех вакцинных группах при повторной иммунизации, по сравнению с однократным введением вакцинных штаммов. При использовании в качестве антигена M2e белка значимый иммунный ответ был обнаружен только у животных, иммунизированных рекомбинантными штаммами с дополнительной вставкой M2e (Рисунок 37Б). Причем в случае введения штамма ЖГВ со вставкой 4M2e в молекулу HA (H3N2-HA+4M2e) значимый ответ наблюдался уже после первой иммунизации с последующим усилением после 2-й иммунизации, тогда как встраивание M2e эпитопов в NS ген (H3N2-NS+4M2e) привело к формированию анти-M2e ответа только после второй иммунизации. Таким образом, внесение дополнительных M2e эпитопов в геном вакцинного штамма ЖГВ H3N2 не влияет на иммуногенные свойства вакцины по отношению к цельному вирусу гриппа. В то же время, присутствие дополнительных M2e эпитопов в составе HA на поверхности вириона является более иммуногенным в плане индукции M2e-специфичных антител, чем в случае их внесения в ген NS1 белка, который экспрессируется внутри зараженной клетки, но не присутствует в составе вириона.

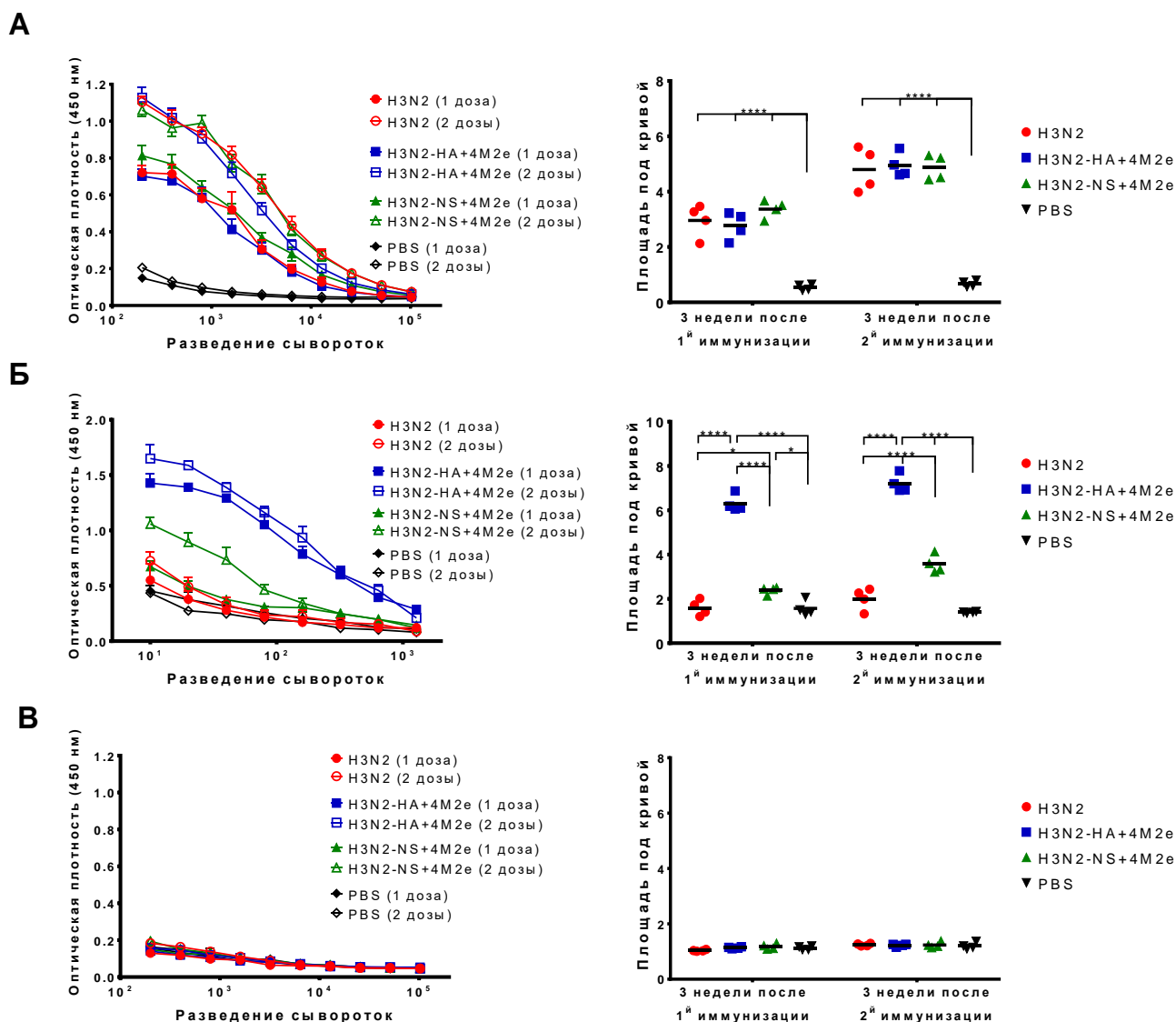


Рисунок 37 – Исследование гуморального IgG ответа привитых хорьков после каждой из иммунизаций методом ИФА. Для исследования были взяты различные антигены: (А) цельный очищенный вирус H3N2, на основе которого были разработаны прототипы универсальной живой гриппозной вакцины; (Б) рекомбинантный белок 3M2e; (В) цельный очищенный вирус H1N1, с использованием которого в дальнейшем будет произведён челлендж. Слева показаны усреднённые значения оптической плотности (при длине волны 450нм) для каждого разведения сыворотки, справа – значения площадей под кривой для графиков оптической плотности.

Статистический анализ проводился методом дисперсионного анализа ANOVA с поправкой

Тьюки. * $p < 0.05$, *** $p < 0.0001$.

Также после каждой из иммунизаций животные были проверены на наличие иммунного ответа к гетерологичному вирусу на основе H1N1, который был в дальнейшем использован для

экспериментального заражения животных. Было показано, что все животные не имели специфического иммунного ответа к вирусу H1N1 (Рисунок 37В), поскольку штаммы вируса гриппа А H1N1 и H3N2 имеют между собой значимые антигенные различия.

Для более детального изучения кросс-реактивных свойств индуцированных сывороточных IgG антител был проведен анализ их способности связываться с вирусными антигенами, экспонированными на поверхности зараженных вирусом гриппа клеток. Для этого клетки MDCK заражали различными вирусами гриппа А, несущими М гены различной природы, при этом М2е последовательности таких вирусов совпадали с последовательностями соответствующих эпитопов из кассеты 4М2е. Благодаря своей природе, белки М2, НА и NA вируса гриппа А присутствуют в значительном количестве на поверхности заражённых клеток. Таким образом, заражённые клетки будут связываться не только с НА- и NA-специфичными антителами, но и с М2е-специфичными антителами из сывороток иммунизированных хорьков. В ходе исследования было показано, что клетки, заражённые каждым из выбранных вирусов, наиболее активно связываются с IgG антителами, присутствующими в сыворотках хорьков, иммунизированных H3N2-НА+4М2е прототипами, в сравнении с сыворотками животных, привитых классическим штаммом ЖГВ H3N2 (Рисунок 38). Такой результат позволяет предположить, что усиление связывания происходит благодаря стимулированным после иммунизации анти-М2е антителам, которые эффективно распознают заражённые вирусом клетки.

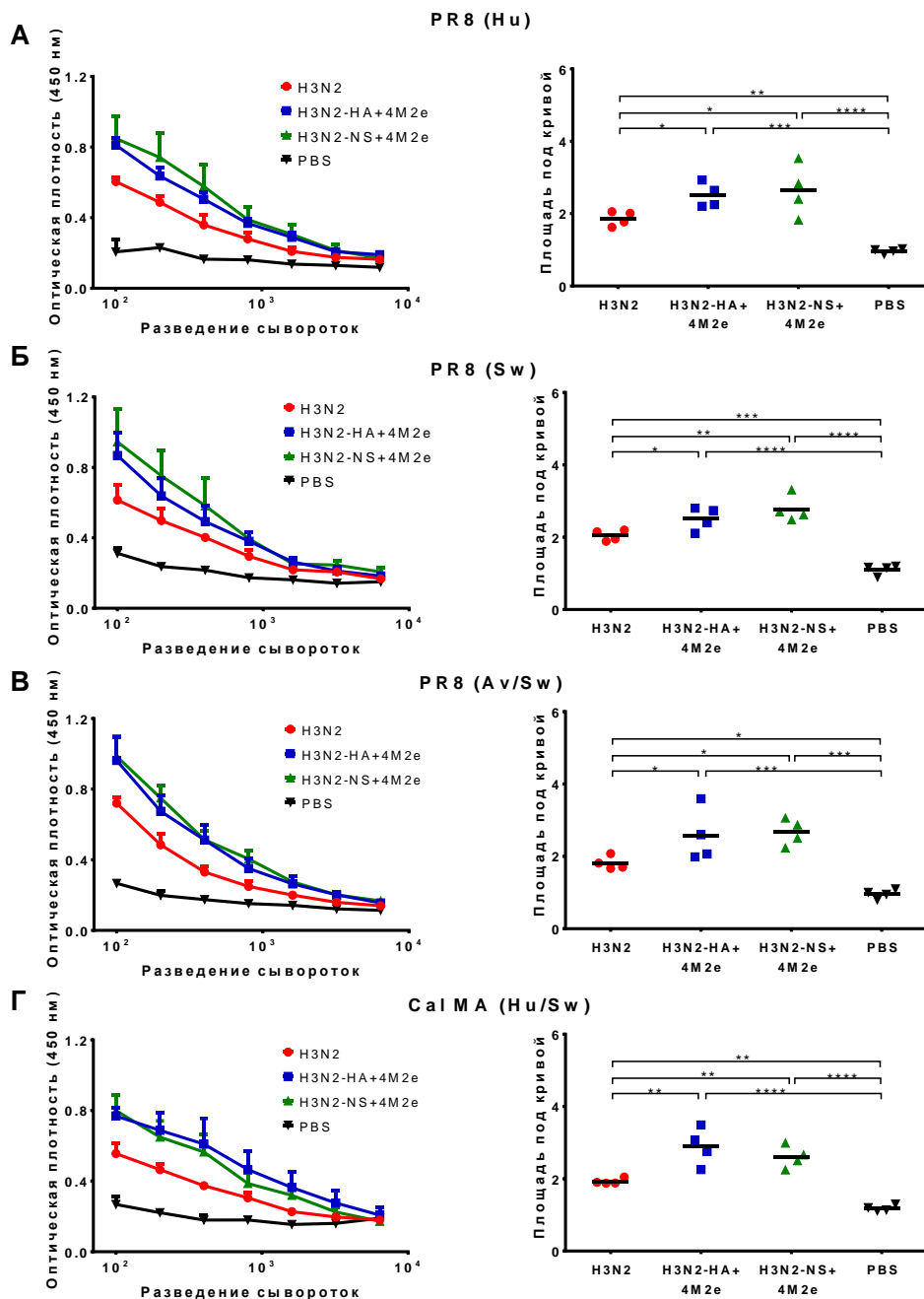


Рисунок 38 – Оценка способности IgG антител из сывороток хорьков после второй иммунизации связываться с различными антигенами. Детекция проводилась методом клеточного ИФА с использованием гриппа А: **А.** А/PR8 с М геном штамма А/Аичи/2/1968 (H3N2) (M2e линии «человек»); **Б.** А/PR8 (M2e линии «свинья»); **В.** А/PR8 (M2e линии «птица/свинья»); **Г.** Cal MA H1N1 (M2e линии «человек/свинья»). Слева показаны значения оптической плотности в зависимости от разведения сывороток. Справа – значения площадей под кривыми графиков оптической плотности, сравнение проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$.

3.7.4. Оценка кросс-протективной активности вакцинных прототипов в отношении гетерологичного вируса гриппа А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1)

3.7.4.1. Оценка вирусной нагрузки в тканях животных

В результате титрования назальных смывов, собранных ежедневно в течение 5 дней после заражения хорьков, было показано, что у группы, получавшей PBS, титр вируса держался все дни на достаточно высоком уровне (6,0 – 7,3 lgЭИД₅₀/мл). Иммунизация классическим штаммом ЖГВ привела к снижению титра вируса, однако, значимое статистическое отличие от группы PBS было достигнуто только к 47-му дню эксперимента (5-й день после челленджа). То есть, несмотря на формирование значимого анти-H3N2 ответа у привитых животных, такого иммунного ответа было недостаточно для быстрого снижения вирусной нагрузки гетерологичного челлендж-вируса в верхних дыхательных путях животных.

Иммунизация с помощью вакцинных прототипов H3N2-NA+4M2e или H3N2-NS+4M2e привела к статистически значимому снижению вирусных титров по сравнению с группой плацебо уже на 1-й день после челленджа. Также для групп, имеющих дополнительную вставку M2e в составе вакцины, было отмечено постепенное снижение вирусных титров в смывах и последующее отсутствие челлендж-вируса к 4-му дню у части животных (Рисунок 39А).

Анализ количественного присутствия челлендж-вируса в пересчёте на 1 грамм ткани показал, что иммунизация классическим штаммом ЖГВ H3N2 не привела к снижению вирусных титров в тканях трахеи и лёгких по сравнению с группой PBS. Группа ЖГВ продемонстрировала снижение вирусного титра только в тканях носовых ходов, что согласуется с данными, полученными в результате титрования назальных смывов.

В тоже время вакцина на основе модифицированного НА привела к снижению вирусных титров во всех 5 долях лёгких как по сравнению с группой PBS (R cranial, R middle), так и по сравнению с другими вакцинными группами (R caudal, L caudal, L cranial) (Рисунок 39Б). Для вакцинного штамма H3N2-NS+4M2e было отмечено снижение вируса только в 2-х долях (R caudal, L cranial). Также для обеих групп ЖГВ+4M2e было продемонстрировано снижение вирусного титра в тканях трахеи.

Несмотря на то, что во всех иммунизированных группах животных гетерологичный челлендж-вирус присутствовал в достаточном количестве во всех типах тканей, нами было показано усиление защитных свойств вакцин с дополнительными эпитопами M2e как по сравнению с группой PBS, так и по сравнению с классическим штаммом ЖГВ против действия высокой дозы гетерологичного вируса.

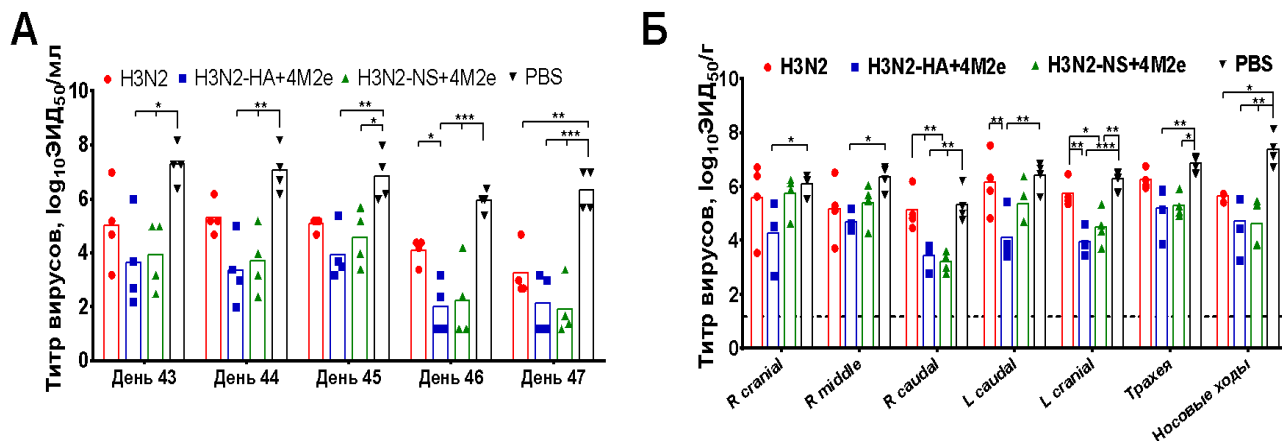


Рисунок 39 – Оценка уровня репликации челлендж-вируса H1N1 в респираторных органах хорьков. **А.** Титры вируса в назальных смывах, собранных ежедневно в течение пяти дней после челленджа. **Б.** Титры вируса в различных респираторных органах хорьков на 5 день после челленджа. Титрование проводилось с использованием РКЭ. Статистический анализ проводился методом двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки.

* - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$, **** - $p < 0.0001$.

3.7.4.2. Оценка клинических симптомов гриппозной инфекции после заражения

С помощью индивидуальных вживляемых температурных датчиков был зафиксирован рост температуры у всех групп иммунизированных животных после проведения экспериментального заражения гетерологичным челлендж-вирусом. В результате анализа динамики изменения температур, а также вычисления значений площадей под кривыми изменения температуры (ΔT) было обнаружено статистически достоверное отличие от группы контроля только у животных, привитых H3N2-HA+4M2e (Рисунок 40А). В группах H3N2 и H3N2-NS+4M2e только для одного и двух животных, соответственно, не было зафиксировано увеличения температуры, однако такая небольшая выборка не позволяет делать выводов о статистически значимых отличиях.

Анализ массы тела хорьков показал, что ни у одного животного, получавшего вакцину на основе ЖГВ, масса тела в течение 5 дней после челленджа не опустилась ниже 95%. Тем не менее, статистически значимое отличие значений площадей под кривыми изменения массы тела (Δm) было зафиксировано только для групп H3N2-HA+4M2e и H3N2-NS+4M2e по сравнению PBS, но не для группы ЖГВ H3N2 (Рисунок 40Б).

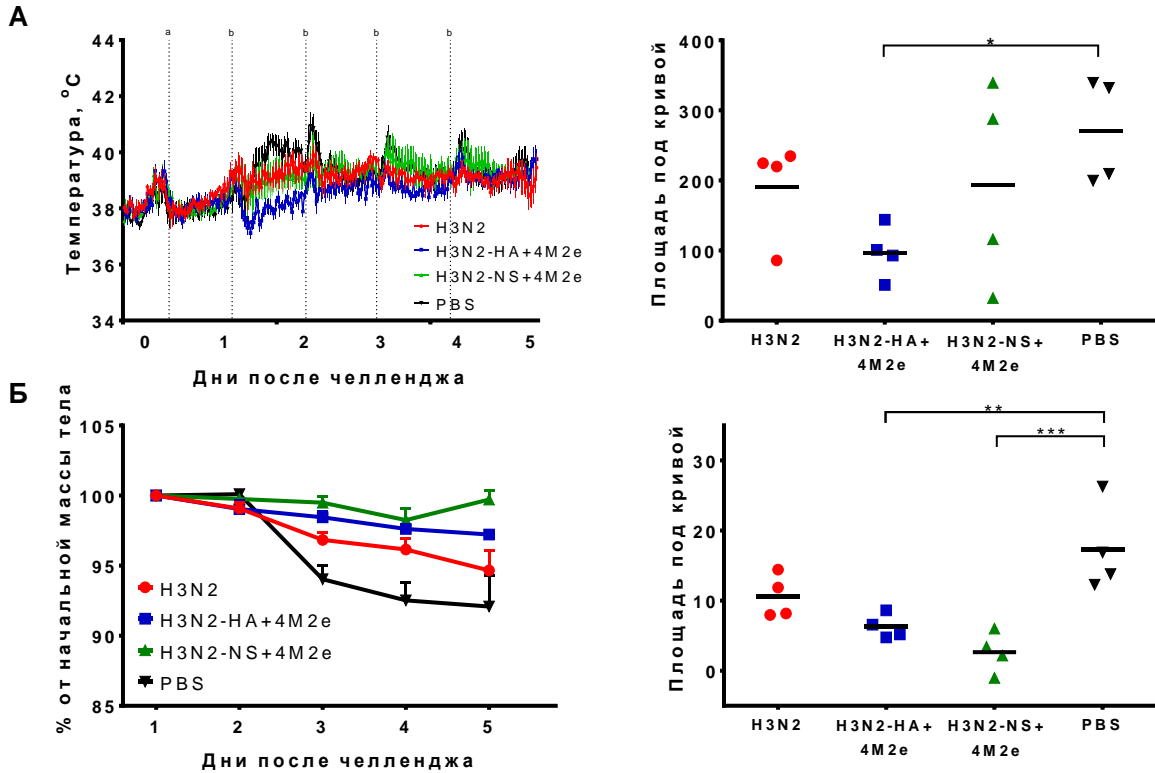


Рисунок 40 – Оценка проявления клинических симптомов инфекции у иммунизированных животных после челленджа. **А.** Температура тела каждого животного определялась с интервалом в 30 минут с использованием специальных вживляемых рекордеров. Значение площадей под кривыми изменения температуры (ΔT) рассчитывалось для каждого животного индивидуально на основе их базальной температуры. **Б.** Значение массы тела каждого животного учитывалась ежедневно и представлено на графике в процентном соотношении по отношению к начальной массе. Значение площадей под кривыми изменения веса (Δm) рассчитывалось для каждого животного индивидуально на основе их начального веса. Статистический анализ проводился методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$.

3.7.4.3. Гистопатологическая оценка повреждений тканей респираторного тракта хорьков после заражения

Оценка защитного потенциала вакцинных штаммов также включала себя поиск микроскопических повреждений в респираторных органах (трахеи и лёгкие) животных на 5 день после челленджа. Для всех групп животных было отмечено патологическое изменение тканей, что согласуется с ранее полученными результатами о присутствии достаточного количества вирусного материала в тканях всех групп животных (Рисунок 41). Наибольшее повреждение тканей было зафиксировано для групп ЖГВ и PBS, в легких которых были обнаружены

обширные очаги серозно-геморрагической пневмонии, а также эмфизематозно увеличенные участки (Рисунок 41А). На большинстве проанализированных слайдов из обеих контрольных групп были отмечены признаки диффузного альвеолярного повреждения (отсутствие гиалиновых мембран и выпотевания фибрина в просвет альвеол).

Анализ суммы баллов патоморфологической шкалы изменений показал, что данные имеют нормальное распределение по тесту Шапиро-Уилка, однако не выявил статистически достоверных различий между группами из-за высокой внутригрупповой дисперсии поражения разных долей лёгких ($p = 0.0985$). Тем не менее, морфометрическая оценка толщины альвеолярных септ продемонстрировала статистически достоверные различия между группами PBS и ЖГВ ($p = 0.0205$), PBS и H3N2-NA+4M2e ($p < 0.0001$), PBS и H3N2-NS+4M2e ($p = 0.0481$) (Рисунок 41Б). Полуколичественная оценка площади поврежденной ткани в препаратах также выявила различия между всеми группами на основе ЖГВ при сравнении с группой PBS (Рисунок 41В).

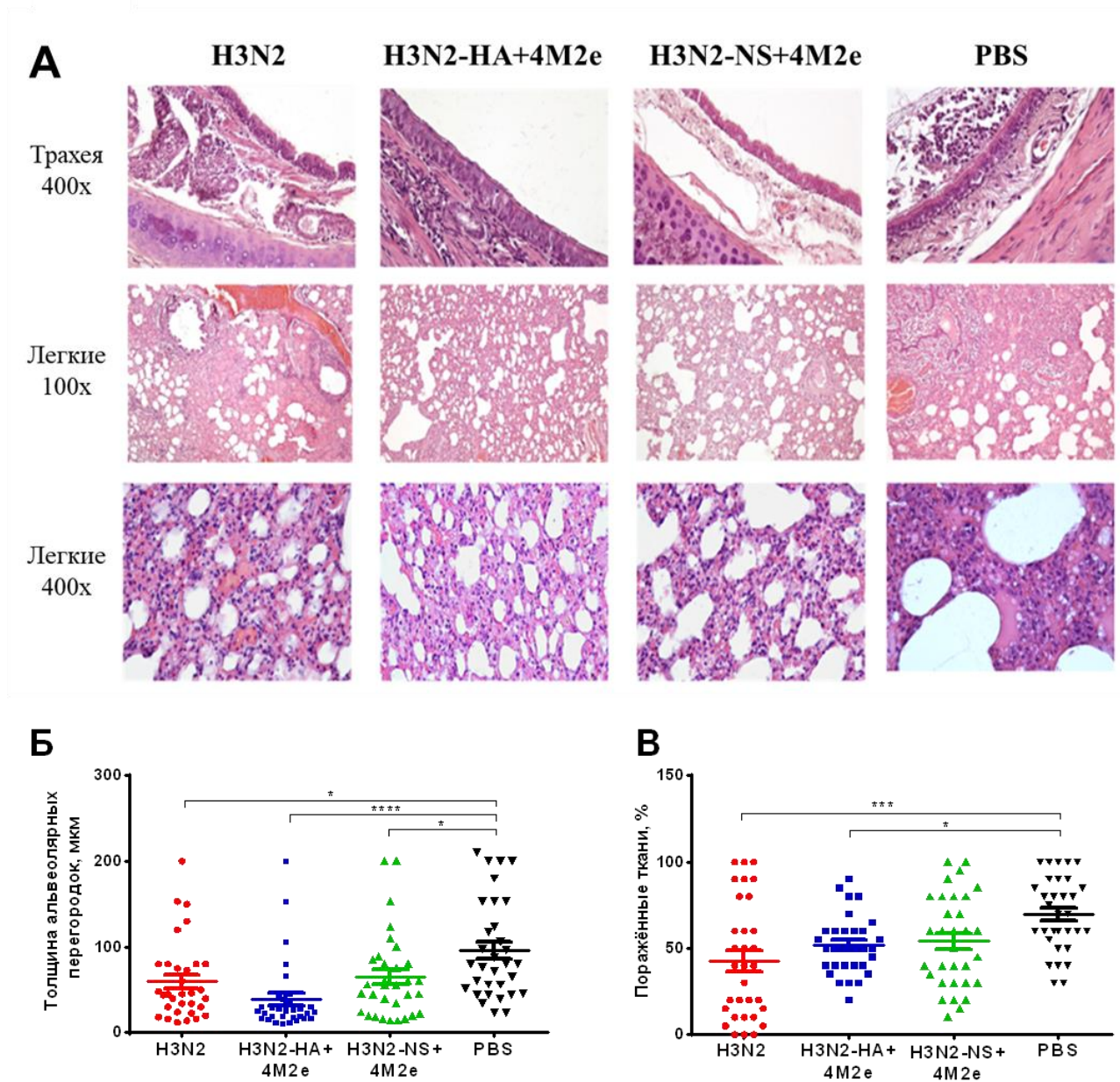


Рисунок 41 – Гистопатологический анализ респираторных органов хорьков после челленджа. Ткани трахей и лёгких были собраны на 5-й день после челленджа и зафиксированы в 10% растворе формалина. Срезы тканей были окрашены гематоксилином и эозином (А). Б. Утолщение альвеолярной перегородки оценивалось с использованием откалиброванных объективов микроскопа. В. Область поражённой лёгочной ткани выражалась в процентном соотношении от общего размера собранного участка. Статистический анализ проводился методом однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$

3.7.5. Изучение факторов иммунного ответа иммунизированных хорьков после заражения гетерологичным вирусом гриппа

Для более детального изучения защитных механизмов вакцинных штаммов H3N2-NA+4M2e и H3N2-NS+4M2e против действия гетерологичного челлендж-вируса, на 5-й день после экспериментального заражения также были собраны селезёнки всех животных. Далее методом проточной цитометрии оценивалась доля антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток после *in vitro* стимуляции выделенных спленоцитов различными антигенами. Для стимуляции были взяты цельные очищенные вирусы ЖГВ H3N2, А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1), а также рекомбинантный белок 3M2e.

Поскольку хорьки представляют собой генетически неоднородную популяцию, нами наблюдалась сильная вариация значений доли IFN γ -секретирующих Т-клеток (Рисунок 42). Тем не менее, активированные CD4 и CD8 Т-клетки были обнаружены во всех группах, получавших вакцину, после стимуляции цельным вирусом. В результате стимуляции белком 3M2e не было обнаружено какого-либо существенного ответа ни в одной из групп. Таким образом, можно предположить, что формирование специфического Т-клеточного ответа к M2e не является основным механизмом, обеспечивающим защиту животных, привитых ЖГВ+4M2e, от заражения гетерологичным вирусом гриппа.

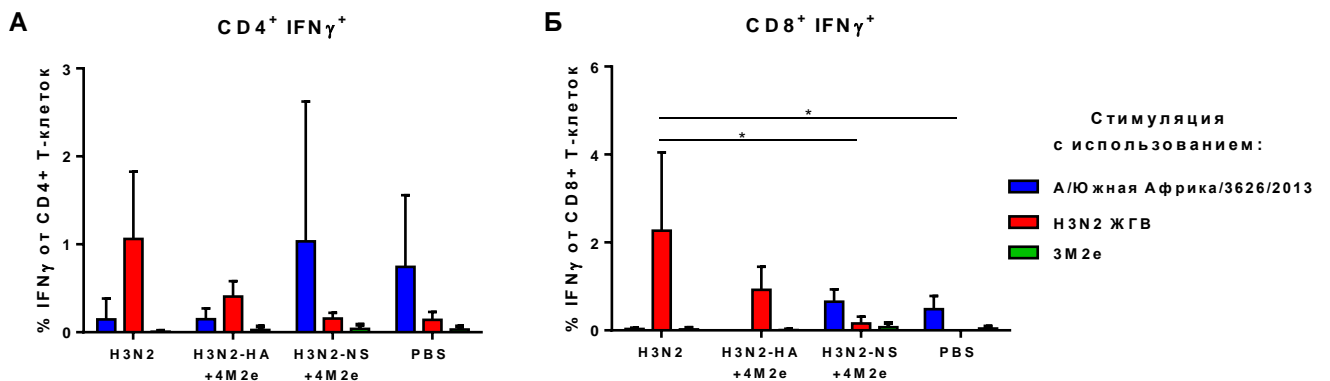


Рисунок 42 – Т-клеточный ответ иммунизированных хорьков на 5-й день после проведения челленджа гетерологичным вирусом гриппа. Выделенные спленоциты были стимулированы *in vitro* с использованием цельных вирусов H3N2 и H1N1, а также рекомбинантного белка 3M2e. Антиген-специфичный CD4 (А) и CD8 (Б) ответы оценивались методом проточной цитометрии после внутриклеточного окрашивания IFN γ .

Статистический анализ проводился методом двухфакторного дисперсионного анализа

ANOVA с поправкой Тьюки. * $p < 0.05$.

Также на 5 день после челленджа осуществлялся сбор МЛУ животных, выделенные клетки которых оценивались по способности продуцировать IgG антитела как при их инкубации в присутствии стимулятора (ЖГВ H3N2 или 3M2e белок), так и без стимуляции. Было показано, что группы животных H3N2-HA+4M2e и H3N2-NS+4M2e после челленджа вирусом H1N1 имели более выраженную способность секретировать IgG антитела в отсутствие антигенной стимуляции, как по сравнению с группой PBS, так и с группой ЖГВ в каждый из дней исследования (Рисунок 43А).

При инкубации клеток МЛУ в присутствии специфического антигена были получены результаты, в целом совпадающие с результатами анализа гуморального ответа хорьков после 2-й иммунизации – все вакцины на основе ЖГВ имели высокий уровень стимулированных анти-H3N2 IgG антител (Рисунок 43Б), тогда как только вакцины ЖГВ+4M2e имели способность продуцировать анти-M2e антитела (Рисунок 43В).

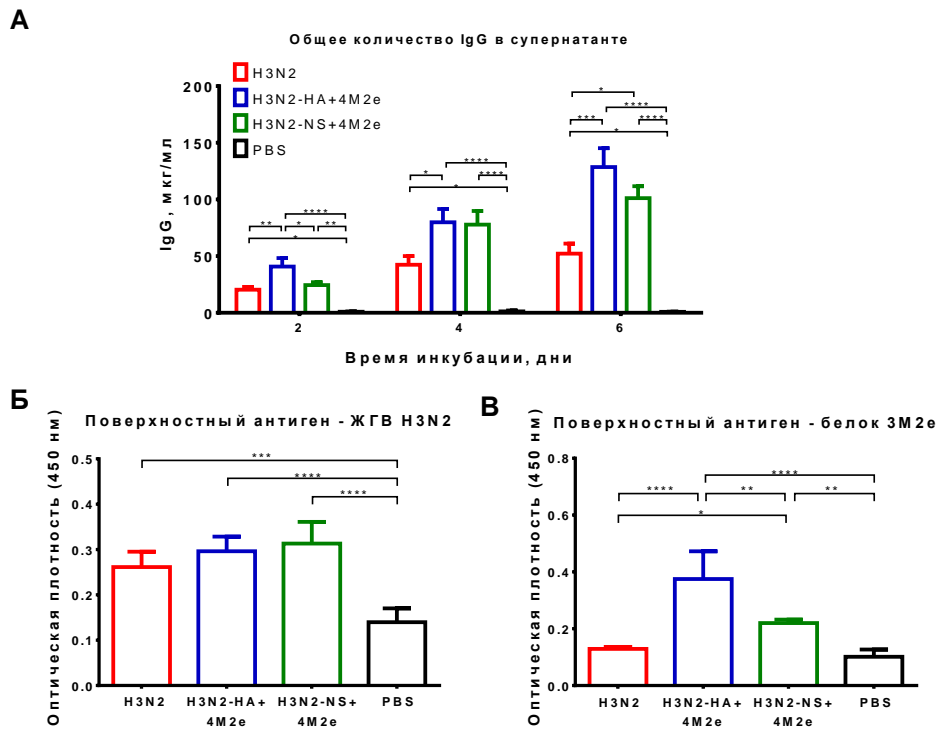


Рисунок 43 – Секретия антител клетками медиальных лимфатических узлов. **А.** Клетки инкубировали в течение 6 дней без стимуляции антигеном. Надосадки собирали на 2, 4 и 6-е сутки инкубации, в которых затем определялась концентрация IgG антител методом ИФА совместно со стандартом. **Б.** Клетки инкубировали в течение суток в планшетах, покрытым заданным антигеном. Уровни связавшихся IgG антител выявляли в ИФА. Статистический анализ проводился методом двухфакторного (А) и однофакторного (Б, В) дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$, *** - $p < 0.001$, **** - $p < 0.0001$.

3.7.6. Оценка защитного потенциала вакцинных штаммов в отношении патогенных гетерологичных вирусов гриппа А в опытах по пассивной иммунизации мышей

Для изучения кросс-протективного потенциала M2e-специфических антител, индуцированных после вакцинации хорьков вакцинными прототипами ЖГВ+M2e, сыворотки хорьков, полученные через три недели после второй иммунизации, были использованы для проведения исследования по пассивной защите мышей от различных вирулентных вирусов гриппа. Для этого сыворотки хорьков, собранные через три недели после 2-й вакцинации, смешивались с 3 ЛД₅₀ четырех патогенных для мышей челлендж-вирусов, при этом М гены данных вирусов соответствовали M2e фрагментам кассеты 4M2e, встроенной в рекомбинантные штаммы ЖГВ+4M2e. После инкубации смесь сыворотки и вируса вводили интраназально мышам линии C57BL/6J, после чего проводили оценку изменения массы тела животных и уровень их выживаемости в течение 14 дней. Было показано, что значимый защитный эффект имели только сыворотки, полученные после вакцинации хорьков вариантом H3N2-NA+4M2e – мыши продемонстрировали меньшую потерю веса, а также статистически достоверно большую выживаемость против действия всех исследованных патогенных вирусов (Рисунок 44). Стоит отметить, что сыворотки хорьков после вакцинации H3N2-NS+4M2e не имели схожего эффекта, что указывает на недостаточный защитный потенциал анти-M2e антител, индуцируемых при иммунизации хорьков вакцинным вариантом с модифицированным NS геном.

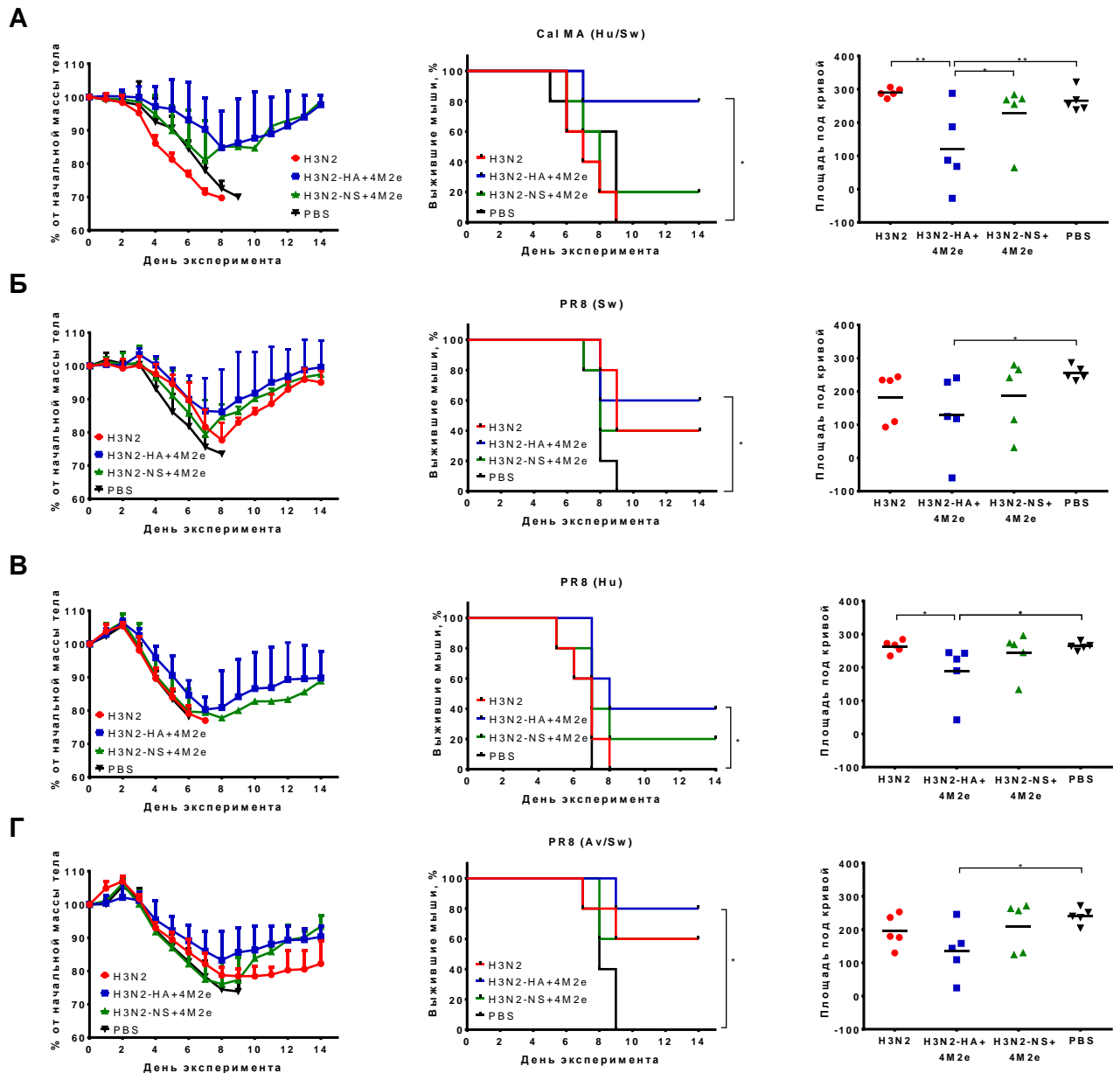


Рисунок 44 – Изучение защитного эффекта сывороток хорьков после иммунизации в опыте по защите *in vivo* на модели мышей. Сыворотки через три недели после 2-й вакцинации смешивались с 3 ЛД₅₀ патогенного челлендж вируса гриппа и вводились интраназально мышам линии C57BL/6J. Снижение веса животных (слева) и выживаемости (в центре) регистрировались ежедневно в течение 2 недель. В качестве патогенов были выбраны следующие штаммы: **А.** Cal MA H1N1 (M2e линии «человек/свинья»); **Б.** A/PR8 (M2e линии «свинья»); **В.** A/PR8 (M2e линии «человек»); **Г.** A/PR8 (M2e линии «птица/свинья»). Анализ выживаемости проводился с использованием критерия Мантела-Кокса (в центре), сравнение площадей под кривыми для графиков снижения веса (справа) проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки. * - $p < 0.05$; ** - $p < 0.01$.

3.7.7. Корреляционный анализ зависимости вирусной нагрузки в респираторных органах от количества стимулированных IgG антител после иммунизации

Для поиска взаимосвязи между уровнем стимулированных после иммунизации хорьков антител и защитным потенциалом вакцин был проведён корреляционный анализ. В качестве количественных переменных были выбраны значения инфекционных титров в различных тканях после экспериментального заражения хорьков пандемическим вирусом H1N1, а также различные иммунологические параметры (например, значение площадей под кривыми графиков оптической плотности, полученных в результате проведения ИФА с сыворотками животных после второй иммунизации). В качестве титра вируса в лёгких выступало усреднённое значение титра по всем пяти долям легкого для каждого животного. Корреляция определялась методом Спирмена.

Не было обнаружено никакой статистически достоверной корреляции между титром вируса в лёгких и уровнем IgG антител к цельному вирусу H3N2 на 42-й день исследования (Рисунок 45А, $r=-0.4265$, $p=0.1011$). Также слабая корреляция была обнаружена для анти-H3N2 антител и вирусного титра в трахее ($r=-0.4797$, $p=0.0624$). Однако, для данных вирус-специфических IgG антител была обнаружена высокая сила связи с вирусным титром в носовых ходах ($r=-0.7235$, $p=0.0021$). Такой результат согласуется с литературными данными о стимуляции высоких уровней вирус-специфических кросс-реактивных мукозальных антител IgA после вакцинации ЖГВ, которые способствуют элиминации патогенного челлендж вируса из верхних дыхательных путей животных [60, 194].

Тем не менее, наиболее ярко выраженной была связь между уровнем анти-M2e IgG антител и уровнем вирусной нагрузки в лёгких животных (Рисунок 45Б, $r=-0.7838$, $p=0.0003$). Аналогичная корреляция наблюдалась для M2e-специфических антител, секретированных МЛУ (Рисунок 45В, $r=-0.8344$, $p=0.0001$), и для общего количества IgG секретированных МЛУ *in vitro* (Рисунок 45Г, $r=-0.7853$, $p=0.0005$). Также все три перечисленных иммунологических показателя (Рисунок 45Б, В, Г) показали значимую обратную корреляцию с вирусной нагрузкой в трахеях и носовых ходах животных.

Таким образом, для всех групп животных была обнаружена статистически достоверная обратная связь снижения вирусного титра в различных респираторных органах и количества M2e-специфических антител, но не антител к цельному вирусу ЖГВ H3N2.

В целом, проведенное доклиническое исследование прототипов универсальной ЖГВ на модели хорьков показало безвредность, иммуногенность и высокую степень кросс-протективной активности кандидата H3N2-NA+4M2e, который далее может быть рекомендован для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах.

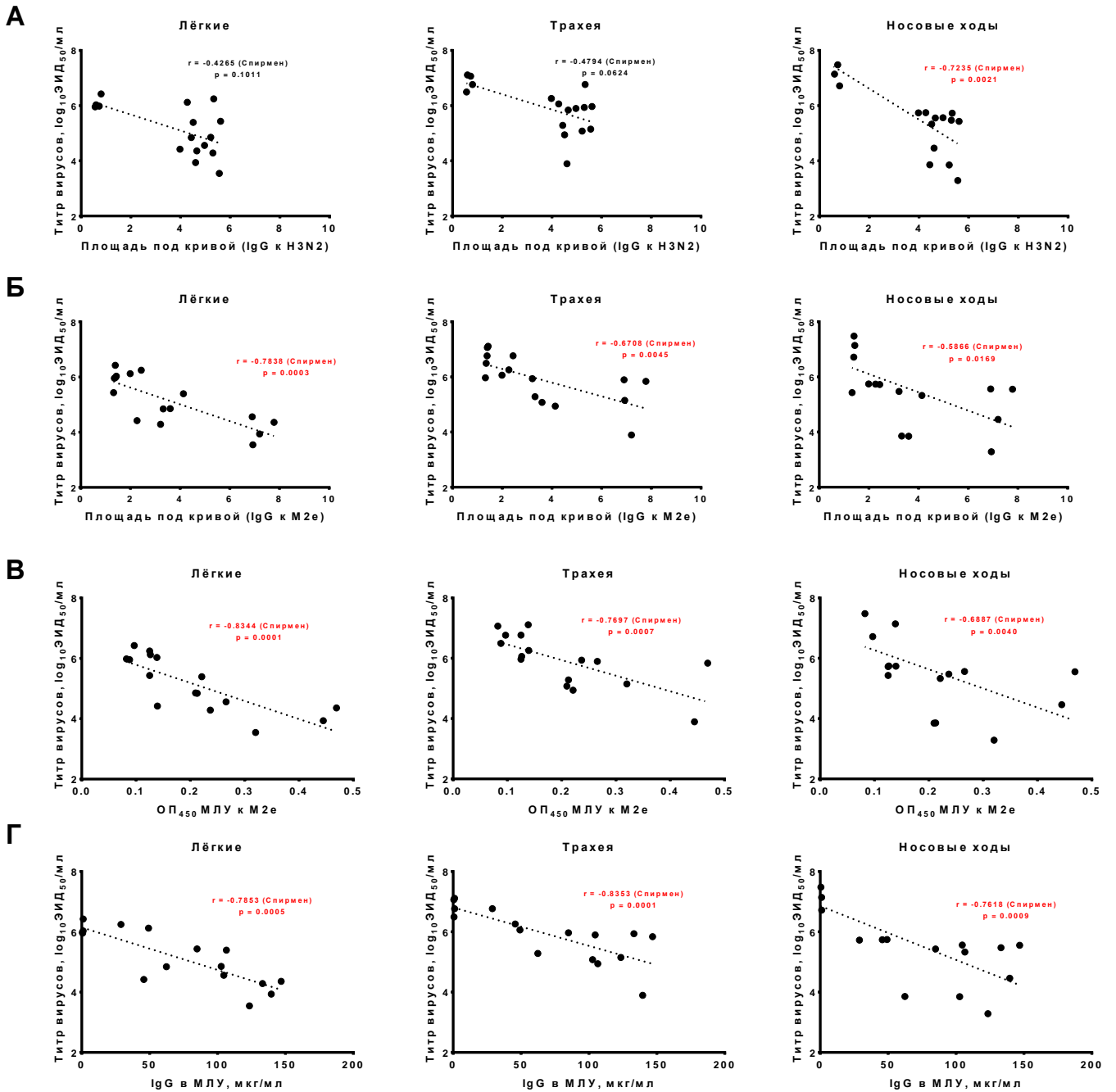


Рисунок 45 – Корреляционный анализ для вирусной нагрузки респираторных органов иммунизированных животных в зависимости от: **А.** H3N2-специфических сывороточных IgG антител через три недели после 2-й иммунизации; **Б.** M2e-специфических сывороточных IgG антител через три недели после 2-й иммунизации; **В.** M2e-специфических IgG антител, продуцируемых МЛУ, собранных на 5-й день после челленджа. **Г.** Концентрация общего числа IgG антител, продуцируемых МЛУ, собранных на 5-й день после челленджа, полученные в результате инкубации *in vitro* в течение шести дней.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Вакцинопрофилактика является одной из наиболее эффективных мер по сдерживанию и предотвращению эпидемий, вызываемых вирусами гриппа [6, 22]. Все лицензированные на данный момент вакцины против гриппа направлены на создание продолжительного гуморального иммунного ответа против вирусных гликопротеинов HA и, в меньшей степени, NA. Эти вакцины содержат 3-4 различных компонента, которые соответствуют двум подтипам вируса гриппа А (H1N1 и H3N2) и одной или двум генетическим линиям вирусов гриппа В. Инактивированные гриппозные вакцины (ИГВ) содержат вирусные антигены в различных формах (цельновирионные, сплит и субъединичные вакцины и их основным недостатком является индукция узкоспецифического гуморального иммунитета, не способного защищать привитых от дрейфовых вариантов вирусов гриппа [194].

Живая гриппозная вакцина (ЖГВ) представляет собой аттенуированный вирус гриппа, который способен репродуцироваться в верхних дыхательных путях привитых, но не способен к репродукции в легких и, тем самым, не вызывая клинических симптомов заболевания. ЖГВ успешно применяется в России с 1987 года, тогда как аналогичная вакцина в США была зарегистрирована в 2003 году, а в Европе – в 2012 г [95]. Для этих вакцин были проведены широкомасштабные исследования по безопасности, а также по ее генетической стабильности, и на сегодняшний день не было зафиксировано ни одной реверсии вакцинного вируса к дикому фенотипу [2]. ЖГВ репродуцируется в эпителии верхних дыхательных путей и вырабатывает не только гуморальный, но и местный (секреторный), а также клеточный иммунитет у привитых людей [230], которые могут способствовать защите привитых от дрейфовых вариантов вирусов гриппа. Таким образом, живые вакцины имеют преимущества перед инактивированными в плане полноценности индуцируемого иммунного ответа.

Тем не менее, все перечисленные вакцины имеют ряд ограничений, которые, в первую очередь, связаны с подбором соответствующего штамма, длительностью и сложностью производства, а также неспособностью защищать от пандемических вирусов гриппа, имеющих новую антигенную структуру. В этой связи созрела необходимость создания универсальной вакцины против гриппа, которая не имела бы перечисленных ограничений [49].

Термин «универсальная гриппозная вакцина» используется для обозначения гриппозной вакцины, которая бы обладала более широким защитным спектром действия, чем сезонная вакцина. Таким образом, вакцинируемые люди могут быть защищены не только от циркулирующих в популяции вирусов, но и от потенциальных пандемических вирусов гриппа, обладающих изменёнными HA и NA [175].

В геноме вируса гриппа А присутствуют как участки, постоянно подвергающиеся антигенному дрейфу, т.е. постепенной мутационной изменчивости, так и консервативные участки, которые зачастую остаются неизменными ввиду их функциональной значимости для жизненного цикла вируса. Большинство стратегий, направленных на создание универсальной вакцины, используют идею о выработке иммунитета (как гуморального, так и Т-клеточного) именно к этим консервативным эпитопам, чтобы иммунная система в дальнейшем смогла противостоять вирусному заболеванию даже в случае возникновения нового штамма вируса гриппа А [35, 209, 226].

Эктодомен белка М2 вируса гриппа (М2е) является высоко консервативным белком среди различных штаммов вирусов гриппа, циркулирующих в популяции. Однако, такой фрагмент является слабым иммуногеном, для увеличения иммуногенности которого используются различные более крупные носители [157]. Несмотря на значимые успехи в разработке универсальной гриппозной вакцины на основе М2е, ни один из прототипов в настоящее время не лицензирован для широкомасштабного применения на людях.

В настоящем диссертационном исследовании была изучена возможность усиления иммуногенных свойств сезонных вакцин за счёт введения увеличенного количества копий М2е белка в организм привитого с использованием в качестве системы доставки модифицированных штаммов живой гриппозной вакцины (ЖГВ). На первоначальном этапе исследования была проанализирована эволюционная изменчивость М2е-фрагмента в популяции вирусов гриппа А различных подтипов, циркулирующих среди людей, птиц и свиней. Несмотря на отмеченную консервативность участка, в его составе присутствуют аминокислотные позиции, подверженные сильной изменчивости для ускользания от действия иммунного ответа. Различные подходы к поиску консенсусных последовательностей (анализ по каждому из основных организмов-переносчиков вирусов гриппа и анализ эволюционной изменчивости) позволили смоделировать два варианта последовательностей вставок из интересующих М2е-эпитопов для конструирования живой гриппозной вакцины с максимально широким покрытием вирусов гриппа А, циркулирующих как среди людей, свиней и птиц.

В ходе выполнения работы были синтезированы кассеты, содержащие по четыре тандемных повтора М2е, соединённых между собой гибкими линкерами, которые далее встраивались в гены различных штаммов ЖГВ. В результате была сконструирована репрезентативная панель химерных генов гемагглютинаина вакцинных штаммов ЖГВ (H1N1, H3N2 и H7N9), несущих консервативные М2е-эпитопы вируса гриппа А между сигнальным пептидом и субъединицей HA1, а также в рамке считывания неструктурного белка NS1, усеченного до 126 аминокислот. С использованием классических методов обратной генетики

были получены жизнеспособные рекомбинантные вакцинные штаммы, экспрессирующие отобранные M2e-эпитопы в составе генома вакцинных штаммов ЖГВ различных подтипов. Корректная укладка M2e эпитопов на поверхности вирионов в составе химерных белков HA+4M2e была подтверждена методом вестерн-блоттинга с использованием моноклонального антитела, специфичного M2e белку. Экспрессия M2e эпитопов, встроенных в NS1 ген, была подтверждена за счет связывания 14C2 антитела с поверхностью клеток MDCK, зараженных химерными вирусами.

Сконструированные химерные вакцинные штаммы были изучены *in vitro*. Важным результатом явилось подтверждение отсутствия влияния вставки из 4-х повторов M2e на репликативные свойства вакцинных вирусов. Для всех изученных подтипов вакцинные штаммы с модификацией гемагглютинаина (HA+4M2e) сохраняли свою активность репликации как в развивающихся куриных эмбрионах, так и в культуре клеток MDCK. Кроме того, у всех рекомбинантных штаммов сохранились все необходимые фенотипические признаки, свойственные холодоадаптированным штаммам ЖГВ, а именно температурочувствительность (*ts* фенотип) и холодоадаптированность (*ca* фенотип). Единственное нарушение *ca* фенотипа было отмечено для прототипов со вставкой в ген NS (NS+4M2e), которое может повлиять на иммуногенные свойства вакцины. Однако, в статье Исаковой-Сивак и др. [94] показано, что использование аналогичного вектора-носителя для аденовирусных эпитопов приводит к значительному специфическому иммунному ответу. Сохранность *ts* фенотипа для всех исследуемых вирусов является очень важным свойством, указывающим на безопасность всех вакцин. Такие вакцинные вирусы будут размножаться только в верхних дыхательных путях привитых, вызывая образование специфического иммунитета «входных ворот» инфекции, но при этом не будут размножаться в нижних дыхательных путях, т.е. не будут вызывать клинических проявлений заболевания.

При изучении репликативных свойств вакцинных штаммов *in vitro* на другой модельной системе – клеточной культуре MDCK также не было выявлено значимых отличий между рекомбинантными и классическими штаммами ЖГВ после инкубации в течение 2-3 суток при оптимальной температуре. Было показано, что способность ЖГВ реплицироваться в чувствительных клетках напрямую связана со способностью вакцин индуцировать сильный антительный и клеточный иммунные ответы [74]. Также использование клеточных линий как, например, MDCK имеет ряд других преимуществ: простота в работе, стоимость и возможность отбора проб из надосадочной жидкости в любой момент времени для оценки кинетики репродукции вирусов гриппа.

Также для всех рекомбинантных штаммов со вставкой M2e-эпитопов в HA был подтвержден аттенуированный фенотип при интраназальном заражении мышей линии BALB/c: вакцинные вирусы не реплицировались в тканях нижних дыхательных путей (легкие), тогда как эти вирусы были способны к активной репликации в носовых ходах иммунизированных животных. Так, значение МИД₅₀ для всех изученных вакцинных вирусов было значительно ниже при детекции вируса в носовых ходах, чем МИД₅₀, вычисленная по наличию инфекционного вируса в легких. Кроме того, при заражении высокой дозой 7,0 IgЭИД₅₀ не наблюдалось гибели животных, что также указывает на безвредность сконструированных штаммов.

При изучении иммуногенности новых рекомбинантных вакцин в экспериментах на мышинной модели (BALB/c) было показано, что химерные вакцинные штаммы вызывают образование IgG антител к цельному вирусу гриппа на уровне соответствующих контрольных классических штаммов ЖГВ. Однако в группах мышей, привитых вакцинами ЖГВ+4M2e, обнаруживались статистически достоверно более высокие уровни сывороточных IgG антител, связывающихся с рекомбинантным M2e белком в иммуноферментном анализе. Кроме того, изучение изотипов этих антител показало, что преимущественно образуются антитела класса IgG1, но тем не менее антитела класса IgG2a также вырабатывались в достаточно существенном количестве, что указывает на защитный потенциал M2e-специфичных антител. Анализ литературных данных показал [51], что наличие анти-M2e IgG1 подкласса антител является необходимым фактором для обеспечения защиты мышей от последующего действия челлендж вирусов. Также было показано, что IgG2a подкласс антител имеет противовоспалительное действие, которое приводит к элиминации зараженных клеток [168]. В работе Van den Hoek и др. [222] было показано, что даже небольшие концентрации IgG2a подкласса антител играют очень важную роль в защите мышей против вируса гриппа А. Возможным объяснением достаточности даже малого количества IgG2a может являться природа рецептора FcγRI, с которым связывается только данный тип антител. Рецептор FcγRI является единственным рецептором, обладающим высоким уровнем связывания (10^8 - 10^9 M⁻¹), что в 10-100 раз превышает аффинность связывания других рецепторов [168].

Поскольку анти-M2e антитела не обладали нейтрализующей активностью, была изучена функциональная активность антител в тестах антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC). Проведенные исследования показали, что M2e-специфические антитела, индуцируемые химерной вакциной, обладают выраженной комплемент-зависимой цитотоксичностью, что может являться одним из защитных механизмов кросс-протективного действия вакцины. Индукция ADCC антител была менее выраженной как в

группе химерной вакцины, так и в группе контрольной ЖГВ, указывая на то, что данный механизм не является первостепенным для усиления иммуногенности химерных вакцин.

В исследовании также оценивалась способность рекомбинантных вакцинных кандидатов защищать лабораторных животных от заражения гетерологичными (гетеросубтипическими) вирулентными вирусами гриппа А – как в экспериментах по прямой защите (заражение привитых животных), так и в режиме пассивной иммунизации (т.е. при отсутствии кросс-протективных Т-клеток). Было показано, что классические живые гриппозные вакцины обладают высокой степенью кросс-протективности в отношении различных антигенно-удаленных вирусов гриппа А при заражении вирусами в дозах до 30 ЛД₅₀, что согласуется с данными из литературы [93, 120, 149], и не наблюдалось существенных различий в кросс-протективной активности химерной вакцины и контрольного штамма ЖГВ. Однако при увеличении заражающей дозы летального челлендж-вируса защитный эффект ЖГВ снижался, тогда как химерная вакцина продолжала обеспечивать существенный уровень защиты, указывая на способность индуцированных М2е антител оказывать протективное действие в отношении гетерологичных вирулентных вирусов гриппа. При использовании режима пассивной иммунизации удалось установить, что усиленная защитная активность вакцин ЖГВ+4М2е опосредуется антителами, а не Т-клетками, поскольку при введении иммунных сывороток от мышей, привитых штаммами ЖГВ и ЖГВ+4М2е, защитное действие в группе химерной вакцины существенно превосходило таковое в группе ЖГВ. Также оценивалась роль Т-клеточной защиты после проведения экспериментального заражения – все вакцины на основе ЖГВ привели к формированию сильного Т-клеточного ответа к самим вакцинным векторам, однако не было обнаружено преимуществ рекомбинантных вакцин в силе индуцируемого М2е-специфического Т-клеточного ответа.

Для проведения расширенного доклинического изучения безвредности, иммуногенности и кросс-протективной активности вакцин на модели хорьков была отобрана пара сконструированных рекомбинантных вакцинных вирусов на основе ЖГВ H3N2, несущих вставку 4М2е в гене НА или в гене NS1. Животные, иммунизированные двукратно интраназально изученными вакцинными вирусами, не проявляли никаких признаков заболевания в период иммунизации (отсутствовали изменения массы тела, температуры по сравнению с группой плацебо, а также не было каких-либо побочных эффектов, связанных с интраназальным введением вакцины), при этом вакцинные вирусы активно реплицировались в верхних дыхательных путях хорьков, вне зависимости от наличия или отсутствия вставки 4М2е. Гистопатологические исследования также не выявили никаких патологических процессов в органах респираторного тракта животных. Сконструированные вакцинные прототипы H3N2-NA+4М2е и H3N2-NS+4М2е, в отличие от классическим вариантом ЖГВ подтипа H3N2,

индуцируют высокие уровни сывороточных M2e-специфических IgG антител, которые обладают широкой кросс-реактивностью. При этом прототип ЖГВ со вставкой 4M2e в молекуле HA был более иммуногенный в плане индукции M2e-связывающих антител, по сравнению с H3N2-NS+4M2e. Экспериментальное заражение иммунизированных хорьков высокой дозой патогенного гетерологичного вируса гриппа подтипа H1N1 показало различную степень защищенности при иммунизации животных различными вакцинными кандидатами. Наиболее выраженный протективный эффект показал вариант H3N2-HA+4M2e, который способствовал существенному снижению вирусной нагрузки как в верхних, так и в нижних отделах респираторного тракта животных. Вариант H3N2-NS+4M2e частично защитил животных от размножения вируса в тканях легких, трахее и носовых ходах, тогда как классический вариант ЖГВ снизил вирусную нагрузку только в верхних дыхательных путях, вероятнее всего за счет индукции кросс-реактивных IgA антител на слизистых ВДП. Более детальное изучение различных звеньев вирусспецифического иммунитета (включая уровни антиген-специфического В- и Т-клеточного иммунитета) показало, что наиболее вероятным механизмом, обеспечивающим перекрестную защиту иммунизированных животных от заражения гетерологичным вирусом гриппа, является секреция M2e-специфических антител В-клетками, расположенными в медиастинальных лимфатических узлах хорьков. Именно их способность продуцировать IgG антитела в ответ на антигенную стимуляцию лучше всего коррелировала со снижением вирусной нагрузки в легких хорьков после челленджа. Кроме того, эксперименты по пассивной иммунизации мышей сыворотками иммунизированных хорьков показали наиболее широкий спектр защиты у образцов из группы ЖГВ+4M2e, что также указывает на вклад M2e-специфических антител в усиление защиты от заражения гетерологичными вирусами гриппа.

Таким образом, в результате выполненных исследований была сконструирована панель рекомбинантных штаммов – кандидатов в универсальную ЖГВ, в экспериментах на животных продемонстрирована их способность обеспечивать защиту против широкого круга антигенно-удаленных вирусов гриппа, а наиболее перспективные варианты были изучены в расширенных доклинических испытаниях на модели хорьков. В результате был отобран кандидат H3N2-HA+4M2e для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ

Несмотря на успешное выполнение цели по разработке универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена M2 белка вируса гриппа А, ряд вопросов остался неосвещённым в данном диссертационном исследовании. Например, не изучался возможный защитный эффект вакцинных прототипов ЖГВ+4M2e в отношении экспериментального

заражения патогенными вирусами гриппа типа В. В литературных данных имеется единственный описанный опыт успешного проведения соответствующего эксперимента [143], и практически не имеется данных об отсутствии защитного эффекта.

Также открытым остаётся вопрос о длительности гуморального иммунитета, формирующегося в результате вакцинации с использованием ЖГВ+4М2е. Для успешного проведения последующих клинических испытаний, при проведении доклинических испытаний уровень анти-М2е должен сохраняться продолжительное время в крови привитых животных.

Ещё одним открытым вопросом является поиск дополнительных мест встраивания М2е-эпитопов в геном вакцинных вирусов гриппа. Так, в литературе описаны успешные результаты встраивания фрагмента М2е в головную субъединицу молекулы НА [107, 210], однако, не представлено данных по сравнительному анализу использования различных позиций встраивания эпитопов М2е в плане индукции кросс-протективного иммунного ответа на лабораторных животных.

Кроме того, открытым вопросом остаётся сравнение кросс-протективных свойств прототипов универсальных гриппозных вакцин, сконструированных с использованием различных стратегий (нацеленных на разные консервативные участки белков вируса гриппа). В частности, в отделе вирусологии ФГБНУ «ИЭМ» ведутся работы по созданию универсальной гриппозной вакцины на основе химерных молекул НА, показавшие многообещающие результаты в доклинических исследованиях [92, 93]. Тем не менее, полноценного сравнения между двумя подходами к настоящему времени проведено не было, что будет являться предметом наших дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Смоделированы последовательности вставок из целевых М2е-эпитопов для конструирования универсальной гриппозной вакцины с максимально широким покрытием вирусов гриппа А, циркулирующих как среди людей, так и среди свиней и птиц.
2. Продемонстрирована возможность конструирования рекомбинантных вирусов гриппа – кандидатов в универсальную живую гриппозную вакцину путем внесения в геном вакцинного штамма ЖГВ дополнительных эпитопов М2е, не нарушая при этом основные биологические характеристики вакцинных вирусов.
3. Встраивание М2е эпитопов в геном вакцинного штамма ЖГВ приводит к усиленной экспрессии М2е белка в зараженных химерным вирусом клетках.
4. Внесение дополнительных эпитопов М2е в геном вакцинного штамма ЖГВ приводит к усилению его кросс-протективных свойств за счет усиленной выработки М2е-специфических антител. При этом модификация ЖГВ путем внесения эпитопов М2е в молекулу НА является более перспективной в плане индукции М2е-специфических антител, по сравнению с модификацией гена NS1.
5. Наиболее вероятным механизмом, обеспечивающим перекрестную защиту иммунизированных животных от заражения гетерологичным вирусом гриппа, является секреция М2е-специфических антител В-клетками, расположенными в медиастинальных лимфатических узлах, в короткие сроки после экспериментального заражения.
6. Экспериментальные штаммы ЖГВ+4М2е безвредны, иммуногенны и кросс-реактивны в экспериментах на животных, указывая на то, что внесение М2е эпитопов в геном вакцинных штаммов ЖГВ является перспективной стратегией для создания универсальной живой гриппозной вакцины.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВОЗ	Всемирная организация здравоохранения
M2e	Внеклеточный домен M2 (M2 ectodomain)
РНК	Рибонуклеиновая кислота
ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
мРНК	Матричная РНК
PB2	Основной белок полимеразы 2 (Polymerase basic protein 2)
PB1	Каталитическая субъединица РНК-зависимой РНК-полимеразы (RNA-directed RNA polymerase catalytic subunit)
РА	Полимеразный кислый белок (Polymerase acidic protein)
M1	Белок 1 матрикса (Matrix protein 1)
M2	Белок 2 матрикса Matrix protein 2)
M2e	Эктодомен M2 белка (Ectodomain of M2 protein)
NP	Нуклеопротеин (Nucleoprotein)
NS1	Неструктурный белок 1 (Non-structural protein 1)
NS2	Неструктурный белок 2 (Non-structural protein 2)
а.о.	Аминокислотное основание
ВПЧ	Вирусоподобная частица
НК	Натуральные киллера
АМ	Альвеолярные макрофаги
ИГВ	Инактивированная гриппозная вакцина
ЖГВ	Живая Гриппозная вакцина
ca	Холодадаптированный фенотип (cold adapted phenotype)
ts	Температурочувствительный фенотип (temperature sensitive phenotype)
VM2e	Эктодомен белка M2 вируса гриппа В (M2 ectodomain of influenza B virus)
РКЭ	Развивающиеся куриные эмбрионы
ЭИД ₅₀	50%-ная эмбриональная инфекционная доза
ТЦИД ₅₀	50%-ная тканевая инфекционная доза
МИД ₅₀	50%-ная мышьяная инфекционная доза
ИФА	Иммуноферментный анализ
ЛД ₅₀	50%-ная летальная доза
IgA/IgG	Иммуноглобулины класса А/Г
MDCK	Культура клеток почки собаки (Madin-Darby canine kidney cells)
PBS	Фосфатно-солевой буфер (phosphate buffer saline)
TPCK	Трипсин, обработанный N-tosyl-L-phenylalanine chloromethyl ketone

ДНК	Дезоксирибонуклеиновая кислота
РНК	Рибонуклеиновая кислота
ОП	Оптическая плотность
ПЦР	Полимеразная цепная реакция
РТГА	Реакция торможения гемагглютинации
СП	Сигнальный пептид

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Александрова Г.И. Применение метода генетической рекомбинации для получения вакцинных штаммов вируса гриппа.// Вопросы вирусологии. – 1977. – №. 4. с. 387-395.
2. Александрова Г.И.,Климов А.И. Живая вакцина против гриппа.// М.: Наука. – 1994. – 151 с.
3. Калинин В. Введение в молекулярную вирусологию.// М.: Изд-во СПбГТУ. – 2002. – 301 с.
4. Шуклина М.А., Степанова Л.А., Ковалева А.А., Коротков А.В., Шалджян А.А., Зайцева М.В., Елецкая Е.И., Цыбалова Л.М. Интраназальная иммунизация рекомбинантным белком на основе М2е-пептида и фрагмента второй субъединицы гемагглютинина вирусов гриппа А индуцирует кросс-протективный гуморальный и Т-клеточный ответ у мышей.// Медицинская иммунология. – 2020. – Т. 2. – № 2. – с. 357-370.
5. Landscape of universal influenza vaccines (Unifluvac landscape). Available at: https://www.cidrap.umn.edu/sites/default/files/public/downloads/unifluvac_landscape_033120_21_print.pdf. Accessed 28 April 2021.// – 2020.
6. Aballea S., Chancellor J., Martin M., Wutzler P., Carrat F., Gasparini R., Toniolo-Neto J., Drummond M., Weinstein M. The cost-effectiveness of influenza vaccination for people aged 50 to 64 years: an international model.// Value Health. – 2007. – V. 10. – № 2. – p. 98-116.
7. Adler-Moore J.P., Ernst W., Kim H., Ward N., Chiang S.M., Do T., Fujii G. Monomeric M2e antigen in VesiVax((R)) liposomes stimulates protection against type a strains of influenza comparable to liposomes with multimeric forms of M2e.// J Liposome Res. – 2017. – V. 27. – № 3. – p. 210-220.
8. Alvarez P., Zylberman V., Ghersi G., Boado L., Palacios C., Goldbaum F., Mattion N. Tandem repeats of the extracellular domain of Matrix 2 influenza protein exposed in Brucella lumazine synthase decameric carrier molecule induce protection in mice.// Vaccine. – 2013. – V. 31. – № 5. – p. 806-812.
9. Andersson A.M., Hakansson K.O., Jensen B.A., Christensen D., Andersen P., Thomsen A.R., Christensen J.P. Increased immunogenicity and protective efficacy of influenza M2e fused to a tetramerizing protein.// PLoS One. – 2012. – V. 7. – № 10. – p. 1-11.
10. Atsmon J., Kate-Ilovitz E., Shaikevich D., Singer Y., Volokhov I., Haim K.Y., Ben-Yedidia T. Safety and immunogenicity of multimeric-001--a novel universal influenza vaccine.// J Clin Immunol. – 2012. – V. 32. – № 3. – p. 595-603.
11. Aydililo T., Escalera A., Strohmeier S., Aslam S., Sanchez-Cespedes J., Ayllon J., Roca-Oporto C., Perez-Romero P., Montejo M., Gavalda J., Munoz P., Lopez-Medrano F., Carratala J.,

- Krammer F., Garcia-Sastre A., Cordero E. Pre-existing Hemagglutinin Stalk Antibodies Correlate with Protection of Lower Respiratory Symptoms in Flu-Infected Transplant Patients.// *Cell Rep Med.* – 2020. – V. 1. – № 8. – p. 100130.
12. Balannik V., Carnevale V., Fiorin G., Levine B.G., Lamb R.A., Klein M.L., Degrado W.F., Pinto L.H. Functional studies and modeling of pore-lining residue mutants of the influenza A virus M2 ion channel.// *Biochemistry.* – 2010. – V. 49. – № 4. – p. 696-708.
 13. Baumgarth N., Kelso A. In Vivo Blockade of Gamma Interferon Affects the Influenza Virus-Induced Humoral and the Local Cellular Immune Response in Lung Tissue.// *Journal of Virology.* – 1996. – V. 70. – № 7. – p. 4411-4418.
 14. Beale R., Wise H., Stuart A., Ravenhill B.J., Digard P., Randow F. A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability.// *Cell Host Microbe.* – 2014. – V. 15. – № 2. – p. 239-247.
 15. Beebe D.P., Schreiber R.D., Cooper N.R. Neutralization Of Influenza Virus By Normal Human Sera: Mechanisms Involving Antibody And Complement.// *The Journal of Immunology.* – 1983. – V. 130. – № 3. – p. 1317-1322.
 16. Belser J.A., Barclay W., Barr I., Fouchier R.A.M., Matsuyama R., Nishiura H., Peiris M., Russell C.J., Subbarao K., Zhu H., Yen H.L. Ferrets as Models for Influenza Virus Transmission Studies and Pandemic Risk Assessments.// *Emerg Infect Dis.* – 2018. – V. 24. – № 6. – p. 965-971.
 17. Bernstein D.I., Guptill J., Naficy A., Nachbagauer R., Berlanda-Scorza F., Feser J., Wilson P.C., Solorzano A., Van der Wielen M., Walter E.B., Albrecht R.A., Buschle K.N., Chen Y.Q., Claeys C., Dickey M., Dugan H.L., Ermler M.E., Freeman D., Gao M., Gast C., Guthmiller J.J., Hai R., Henry C., Lan L.Y., McNeal M., Palm A.E., Shaw D.G., Stamper C.T., Sun W., Sutton V., Tepora M.E., Wahid R., Wenzel H., Wohlbold T.J., Innis B.L., Garcia-Sastre A., Palese P., Krammer F. Immunogenicity of chimeric haemagglutinin-based, universal influenza virus vaccine candidates: interim results of a randomised, placebo-controlled, phase 1 clinical trial.// *Lancet Infect Dis.* – 2020. – V. 20. – № 1. – p. 80-91.
 18. Berthoud T.K., Hamill M., Lillie P.J., Hwenda L., Collins K.A., Ewer K.J., Milicic A., Poyntz H.C., Lambe T., Fletcher H.A., Hill A.V., Gilbert S.C. Potent CD8+ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA-NP+M1.// *Clin Infect Dis.* – 2011. – V. 52. – № 1. – p. 1-7.
 19. Beyer W.E., Palache A.M., de Jong J.C., Osterhaus A.D. Cold-adapted live influenza vaccine versus inactivated vaccine: systemic vaccine reactions, local and systemic antibody response, and vaccine efficacy. A meta-analysis.// *Vaccine.* – 2002. – V. 20. – № 9-10. – p. 1340-53.

20. Bianchi E., Liang X., Ingallinella P., Finotto M., Chastain M.A., Fan J., Fu T.-M., Song H.C., Horton M.S., Freed D.C., Manger W., Wen E., Shi L., Ionescu R., Price C., Wenger M., Emini E.A., Cortese R., Ciliberto G., Shiver J.W., Pessi A. Universal influenza B vaccine based on the maturational cleavage site of the hemagglutinin precursor.// *Journal of virology*. – 2005. – V. 79. – № 12. – p. 7380-7388.
21. Black R.A., Rota P.A., Gorodkova N., Klenk H.D., Kendal A.P. Antibody response to the M2 protein of influenza A virus expressed in insect cells // *Journal of General Virology*. – 1993. – V. 74. – p. 143-146.
22. Boddington N.L., Pearson I., Whitaker H., Mangtani P., Pebody R.G. Effectiveness of Influenza Vaccination in Preventing Hospitalization Due to Influenza in Children: A Systematic Review and Meta-analysis.// *Clin Infect Dis*. – 2021. – V. 73. – № 9. – p. 1722-1732.
23. Braciale T.J., Sun J., Kim T.S. Regulating the adaptive immune response to respiratory virus infection.// *Nat Rev Immunol*. – 2012. – V. 12. – № 4. – p. 295-305.
24. Braz Gomes K., Lovia Allotey-Babington G., D'Sa S., Kang S.M., D'Souza M.J. Dendritic cell activation by a micro particulate based system containing the influenza matrix-2 protein virus-like particle (M2e VLP).// *Int J Pharm*. – 2022. – p. 121667.
25. Bullard B.L., Weaver E.A. Strategies Targeting Hemagglutinin as a Universal Influenza Vaccine.// *Vaccines*. – 2021. – V. 9. – № 3. – p. 257.
26. Carter D.M., Darby C.A., Johnson S.K., Carlock M.A., Kirchenbaum G.A., Allen J.D., Vogel T.U., Delagrave S., DiNapoli J., Kleanthous H., Ross T.M. Elicitation of Protective Antibodies against a Broad Panel of H1N1 Viruses in Ferrets Preimmune to Historical H1N1 Influenza Viruses.// *J Virol*. – 2017. – V. 91. – № 24.
27. Chen B.J., Leser G.P., Jackson D., Lamb R.A. The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding.// *J Virol*. – 2008. – V. 82. – № 20. – p. 10059-10070.
28. Chen J., Wang J., Zhang J., Ly H. Advances in Development and Application of Influenza Vaccines.// *Front Immunol*. – 2021. – V. 12. – p. 711997.
29. Chen L., Zanker D., Xiao K., Wu C., Zou Q., Chen W. Immunodominant CD4+ T-cell responses to influenza A virus in healthy individuals focus on matrix 1 and nucleoprotein.// *J Virol*. – 2014. – V. 88. – № 20. – p. 11760-73.
30. Chen Y.-Q., Wohlbold T.J., Zheng N.-Y., Huang M., Huang Y., Neu K.E., Lee J., Wan H., Rojas K.T., Kirkpatrick E., Henry C., Palm A.-K.E., Stamper C.T., Lan L.Y.-L., Topham D.J., Treanor J., Wrammert J., Ahmed R., Eichelberger M.C., Georgiou G., Krammer F., Wilson P.C.

- Influenza Infection in Humans Induces Broadly Cross-Reactive and Protective Neuraminidase-Reactive Antibodies.// *Cell*. – 2018. – V. 173. – № 2. – p. 417-429.e10.
31. Cheung T.K., Guan Y., Ng S.S., Chen H., Wong C.H., Peiris J.S., Poon L.L. Generation of recombinant influenza A virus without M2 ion-channel protein by introduction of a point mutation at the 5' end of the viral intron.// *J Gen Virol*. – 2005. – V. 86. – № Pt 5. – p. 1447-1454.
 32. Chizhmakov I.V., Geraghty F.M., Ogden D.C., Hayhurst A., Antoniou M., Hay A.J. Selective proton permeability and pH regulation of the influenza virus M2 channel expressed in mouse erythroleukaemia cells.// *J Physiol*. – 1996. – V. 494. – № 2. – p. 329-336.
 33. Cho K.J., Schepens B., Moonens K., Deng L., Fiers W., Remaut H., Saelens X. Crystal Structure of the Conserved Amino Terminus of the Extracellular Domain of Matrix Protein 2 of Influenza A Virus Grippled by an Antibody.// *J Virol*. – 2016. – V. 90. – № 1. – p. 611-615.
 34. Cho K.J., Schepens B., Seok J.H., Kim S., Roose K., Lee J.H., Gallardo R., Van Hamme E., Schymkowitz J., Rousseau F., Fiers W., Saelens X., Kim K.H. Structure of the extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus in complex with a protective monoclonal antibody.// *J Virol*. – 2015. – V. 89. – № 7. – p. 3700-3711.
 35. Clemens E.B., van de Sandt C., Wong S.S., Wakim L.M., Valkenburg S.A. Harnessing the Power of T Cells: The Promising Hope for a Universal Influenza Vaccine.// *Vaccines (Basel)*. – 2018. – V. 6. – № 2.
 36. Corbett K.S., Moin S.M., Yassine H.M., Cagigi A., Kanekiyo M., Boyoglu-Barnum S., Myers S.I., Tsybovsky Y., Wheatley A.K., Schramm C.A., Gillespie R.A., Shi W., Wang L., Zhang Y., Andrews S.F., Joyce M.G., Crank M.C., Douek D.C., McDermott A.B., Mascola J.R., Graham B.S., Boyington J.C. Design of Nanoparticulate Group 2 Influenza Virus Hemagglutinin Stem Antigens That Activate Unmutated Ancestor B Cell Receptors of Broadly Neutralizing Antibody Lineages.// *mBio*. – 2019. – V. 10. – № 1.
 37. Coughlan L., Sridhar S., Payne R., Edmans M., Milicic A., Venkatraman N., Lugonja B., Clifton L., Qi C., Folegatti P.M., Lawrie A.M., Roberts R., de Graaf H., Sukhtankar P., Faust S.N., Lewis D.J.M., Lambe T., Hill A., Gilbert S.C. Heterologous Two-Dose Vaccination with Simian Adenovirus and Poxvirus Vectors Elicits Long-Lasting Cellular Immunity to Influenza Virus A in Healthy Adults.// *EBioMedicine*. – 2018. – V. 29. – №. – p. 146-154.
 38. Dawson A.R., Mehle A. Flu's cues: Exploiting host post-translational modifications to direct the influenza virus replication cycle.// *Plos Pathogens*. – 2018. – V. 14. – № 9.

39. De Filette M., Martens W., Roose K., Deroo T., Vervalle F., Bentahir M., Vandekerckhove J., Fiers W., Saelens X. An Influenza A Vaccine Based on Tetrameric Ectodomain of Matrix Protein 2.// *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – V. 283. – № 17. – p. 11382-11387.
40. De Filette M., Ysenbaert T., Roose K., Schotsaert M., Roels S., Goossens E., Schepens B., Fiers W., Saelens X. Antiserum against the conserved nine amino acid N-terminal peptide of influenza A virus matrix protein 2 is not immunoprotective.// *J Gen Virol*. – 2011. – V. 92. – № Pt 2. – p. 301-306.
41. Del Campo J., Pizzorno A., Djebali S., Bouley J., Haller M., Perez-Vargas J., Lina B., Boivin G., Hamelin M.E., Nicolas F., Le Vert A., Leverrier Y., Rosa-Calatrava M., Marvel J., Hill F. OVX836 a recombinant nucleoprotein vaccine inducing cellular responses and protective efficacy against multiple influenza A subtypes.// *NPJ Vaccines*. – 2019. – V. 4. – №. – p. 4.
42. Deng L., Cho K.J., Fiers W., Saelens X. M2e-Based Universal Influenza A Vaccines.// *Vaccines (Basel)*. – 2015. – V. 3. – № 1. – p. 105-136.
43. Deng L., Ibanez L.I., Van den Bossche V., Roose K., Youssef S.A., de Bruin A., Fiers W., Saelens X. Protection against Influenza A Virus Challenge with M2e-Displaying Filamentous Escherichia coli Phages.// *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 5. – p. e0126650.
44. Desheva Y., Smolonogina T., Donina S., Rudenko L. Study of Neuraminidase-Inhibiting Antibodies in Clinical Trials of Live Influenza Vaccines.// *Antibodies (Basel)*. – 2020. – V. 9. – № 2.
45. Desheva Y., Sychev I., Smolonogina T., Rekstin A., Ilyushina N., Lugovtsev V., Samsonova A., Go A., Lerner A. Anti-neuraminidase antibodies against pandemic A/H1N1 influenza viruses in healthy and influenza-infected individuals.// *PLoS One*. – 2018. – V. 13. – № 5. – p. e0196771.
46. DiPiazza A., Richards K., Batarse F., Lockard L., Zeng H., Garcia-Sastre A., Albrecht R.A., Sant A.J. Flow Cytometric and Cytokine ELISpot Approaches To Characterize the Cell-Mediated Immune Response in Ferrets following Influenza Virus Infection.// *J Virol*. – 2016. – V. 90. – № 17. – p. 7991-8004.
47. Doyle T.M., Hashem A.M., Li C., Van Domselaar G., Larocque L., Wang J., Smith D., Cyr T., Farnsworth A., He R., Hurt A.C., Brown E.G., Li X. Universal anti-neuraminidase antibody inhibiting all influenza A subtypes.// *Antiviral Res*. – 2013. – V. 100. – № 2. – p. 567-74.
48. Ebrahimi S.M., Dabaghian M., Tebianian M., Jazi M.H. In contrast to conventional inactivated influenza vaccines, 4xM2e.HSP70c fusion protein fully protected mice against lethal dose of H1, H3 and H9 influenza A isolates circulating in Iran.// *Virology*. – 2012. – V. 430. – № 1. – p. 63-72.

49. Ebrahimi S.M., Tebianian M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines.// *Virus Genes*. – 2011. – V. 42. – № 1. – p. 1-8.
50. Eggink D., Goff P.H., Palese P. Guiding the immune response against influenza virus hemagglutinin toward the conserved stalk domain by hyperglycosylation of the globular head domain.// *J Virol*. – 2014. – V. 88. – № 1. – p. 699-704.
51. El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A., Van Rooijen N., Verbeek S., Fiers W., Saelens X. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection.// *J Immunol*. – 2011. – V. 186. – № 2. – p. 1022-1031.
52. Eliasson D.G., El Bakkouri K., Schon K., Ramne A., Festjens E., Lowenadler B., Fiers W., Saelens X., Lycke N. CTA1-M2e-DD: a novel mucosal adjuvant targeted influenza vaccine.// *Vaccine*. – 2008. – V. 26. – № 9. – p. 1243-1252.
53. Eliasson D.G., Omokanye A., Schon K., Wenzel U.A., Bernasconi V., Bemark M., Kolpe A., El Bakkouri K., Ysenbaert T., Deng L., Fiers W., Saelens X., Lycke N. M2e-tetramer-specific memory CD4 T cells are broadly protective against influenza infection.// *Mucosal Immunol*. – 2018. – V. 11. – № 1. – p. 273-289.
54. Ermler M.E., Kirkpatrick E., Sun W., Hai R., Amanat F., Chromikova V., Palese P., Krammer F. Chimeric Hemagglutinin Constructs Induce Broad Protection against Influenza B Virus Challenge in the Mouse Model.// *J Virol*. – 2017. – V. 91. – № 12.
55. Fadlallah G.M., Ma F., Zhang Z., Hao M., Hu J., Li M., Liu H., Liang B., Yao Y., Gong R., Zhang B., Liu D., Chen J. Vaccination with Consensus H7 Elicits Broadly Reactive and Protective Antibodies against Eurasian and North American Lineage H7 Viruses.// *Vaccines (Basel)*. – 2020. – V. 8. – № 1.
56. Fan J., Liang X., Horton M.S., Perry H.C., Citron M.P., Heidecker G.J., Fu T.M., Joyce J., Przysiecki C.T., Keller P.M., Garsky V.M., Ionescu R., Rippeon Y., Shi L., Chastain M.A., Condra J.H., Davies M.E., Liao J., Emini E.A., Shiver J.W. Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys.// *Vaccine*. – 2004. – V. 22. – № 23-24. – p. 2993-3003.
57. Feng J., Zhang M., Mozdzanowska K., Zharikova D., Hoff H., Wunner W., Couch R.B., Gerhard W. Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2.// *J Virol*. – 2006. – V. 80. – № 1. – p. 102.
58. Fernandez-Sesma A., Schulman J.L., Moran T.M. A Bispecific Antibody Recognizing Influenza A Virus M2 Protein Redirects Effector Cells To Inhibit Virus Replication In Vitro // *Journal of Virology*. – 1996. – V. 70. – № 7. – p. 4800-4804.

59. Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., Birkett A., Saelens X. M2e-based universal influenza A vaccine.// *Vaccine*. – 2009. – V. 27. – № 45. – p. 6280-6283.
60. Fiore A.E., Bridges C.B., Cox N.J. Seasonal influenza vaccines.// *Curr Top Microbiol Immunol*. – 2009. – V. 333. – №. – p. 43-82.
61. Fu T.-M., Freed D.C., Horton M.S., Fan J., Citron M.P., Joyce J.G., Garsky V.M., Casimiro D.R., Zhao Q., Shiver J.W., Liang X. Characterizations of four monoclonal antibodies against M2 protein ectodomain of influenza A virus.// *Virology*. – 2009. – V. 385. – № 1. – p. 218-226.
62. Furuse Y., Suzuki A., Kamigaki T., Oshitani H. Evolution of the M gene of the influenza A virus in different host species: large-scale sequence analysis.// *Virol J*. – 2009. – V. 6. – №. – p. 67.
63. Gannage M., Dormann D., Albrecht R., Dengjel J., Torossi T., Ramer P.C., Lee M., Strowig T., Arrey F., Conenello G., Pypaert M., Andersen J., Garcia-Sastre A., Munz C. Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes.// *Cell Host Microbe*. – 2009. – V. 6. – № 4. – p. 367-80.
64. Garten R.J., Davis C.T., Russell C.A., Shu B., Lindstrom S., Balish A., Sessions W.M., Xu X., Skepner E., Deyde V., Okomo-Adhiambo M., Gubareva L., Barnes J., Smith C.B., Emery S.L., Hillman M.J., Rivaller P., Smagala J., de Graaf M., Burke D.F., Fouchier R.A., Pappas C., Alpuche-Aranda C.M., Lopez-Gatell H., Olivera H., Lopez I., Myers C.A., Faix D., Blair P.J., Yu C., Keene K.M., Dotson P.D., Jr., Boxrud D., Sambol A.R., Abid S.H., St George K., Bannerman T., Moore A.L., Stringer D.J., Blevins P., Demmler-Harrison G.J., Ginsberg M., Kriner P., Waterman S., Smole S., Guevara H.F., Belongia E.A., Clark P.A., Beatrice S.T., Donis R., Katz J., Finelli L., Bridges C.B., Shaw M., Jernigan D.B., Uyeki T.M., Smith D.J., Klimov A.I., Cox N.J. Antigenic and genetic characteristics of swine-origin 2009 A(H1N1) influenza viruses circulating in humans.// *Science*. – 2009. – V. 325. – № 5937. – p. 197-201.
65. Georgieva E.R., Borbat P.P., Norman H.D., Freed J.H. Mechanism of influenza A M2 transmembrane domain assembly in lipid membranes.// *Sci Rep*. – 2015. – V. 5. – p. 11757.
66. Gianfrani C., Oseroff C., Sidney J., Chesnut R.W., Sette A. Human Memory CTL Response Specific for Influenza A Virus is Broad and Multispecific.// *Human Immunology*. – 2000. – V. 61. – №. – p. 438-452.
67. Giles B.M., Crevar C.J., Carter D.M., Bissel S.J., Schultz-Cherry S., Wiley C.A., Ross T.M. A computationally optimized hemagglutinin virus-like particle vaccine elicits broadly reactive antibodies that protect nonhuman primates from H5N1 infection.// *J Infect Dis*. – 2012. – V. 205. – № 10. – p. 1562-1570.

68. Giles B.M., Ross T.M. A computationally optimized broadly reactive antigen (COBRA) based H5N1 VLP vaccine elicits broadly reactive antibodies in mice and ferrets.// *Vaccine*. – 2011. – V. 29. – № 16. – p. 3043-3054.
69. Giurgea L.T., Morens D.M., Taubenberger J.K., Memoli M.J. Influenza Neuraminidase: A Neglected Protein and Its Potential for a Better Influenza Vaccine.// *Vaccines (Basel)*. – 2020. – V. 8. – № 3.
70. Grandea A.G., Olsen O.A., Cox T.C., Renshaw M., Hammond P.W., Chan-Hui P.Y., Mitcham J.L., Cieplak W., Stewart S.M., Grantham M.L., Pekosz A., Kiso M., Shinya K., Hatta M., Kawaoka Y., M. M. Human antibodies reveal a protective epitope that is highly conserved among human and nonhuman influenza A viruses // *PNAS*. – 2010. – V. 107. – № 28. – p. 126658-12663.
71. Grant E., Wu C., Chan K.F., Eckle S., Bharadwaj M., Zou Q.M., Kedzierska K., Chen W. Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immunodominant CD8+ T-cell responses.// *Immunol Cell Biol*. – 2013. – V. 91. – № 2. – p. 184-194.
72. 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. – V. 19. – № 12. – p. 641-647.
73. Hai R., Krammer F., Tan G.S., Pica N., Eggink D., Maamary J., Margine I., Albrecht R.A., Palese P. Influenza viruses expressing chimeric hemagglutinins: globular head and stalk domains derived from different subtypes.// *J Virol*. – 2012. – V. 86. – № 10. – p. 5774-81.
74. Haredy A.M., Takenaka N., Yamada H., Sakoda Y., Okamoto M., Yamamoto N., Omasa T., Ohtake H., Mori Y., Kida H., Yamanishi K., Okamoto S. An MDCK cell culture-derived formalin-inactivated influenza virus whole-virion vaccine from an influenza virus library confers cross-protective immunity by intranasal administration in mice.// *Clin Vaccine Immunol*. – 2013. – V. 20. – № 7. – p. 998-1007.
75. Hashemi H., Pouyanfard S., Bandehpour M., Noroozbabaei Z., Kazemi B., Saelens X., Mokhtari-Azad T. Immunization with M2e-displaying T7 bacteriophage nanoparticles protects against influenza A virus challenge.// *PLoS One*. – 2012. – V. 7. – № 9. – p. e45765.
76. Hatta Y., Boltz D., Sarawar S., Kawaoka Y., Neumann G., Bilsel P. M2SR, a novel live influenza vaccine, protects mice and ferrets against highly pathogenic avian influenza.// *Vaccine*. – 2017. – V. 35. – № 33. – p. 4177-4183.
77. Hatta Y., Boltz D., Sarawar S., Kawaoka Y., Neumann G., Bilsel P. Novel influenza vaccine M2SR protects against drifted H1N1 and H3N2 influenza virus challenge in ferrets with pre-existing immunity.// *Vaccine*. – 2018. – V. 36. – № 33. – p. 5097-5103.

78. Heinen P.P., Rijsewijk F.A., de Boer-Luijtzev E.A., Bianchi A.T. Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2–nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus // *Journal of General Virology* –2002. – V. 83. – №. – p. 1851-1859.
79. Helenius A. Unpacking the Incoming Influenza Virus.// *Cell*. – 1992. – V. 69. – №. – p. 577-578.
80. Hirsch R.L., Winkelstein J.A., Griffin D.E. The role of complement in viral infections. III. Activation of the classical and alternative complement pathways by Sindbis virus // *The Journal of Immunology*. – 1980. – V. 124. – № 5. – p. 2507-2510.
81. Hoffmann E., Neumann G., Kawaoka Y., Hobom G., Webster R.G. A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids.// *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2000. – V. 97. – № 11. – p. 6108-6113.
82. Hoft D.F., Babusis E., Worku S., Spencer C.T., Lottenbach K., Truscott S.M., Abate G., Sakala I.G., Edwards K.M., Creech C.B., Gerber M.A., Bernstein D.I., Newman F., Graham I., Anderson E.L., Belshe R.B. Live and inactivated influenza vaccines induce similar humoral responses, but only live vaccines induce diverse T-cell responses in young children.// *J Infect Dis*. – 2011. – V. 204. – № 6. – p. 845-853.
83. Holsinger L.J., Lamb R.A. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds.// *Virology*. – 1991. – V. 183. – № 1. – p. 32-43.
84. Hughey P.G., Roberts P.C., Holsinger L.J., Zebedee S.L., Lamb R.A., Compans R.W. Effects of antibody to the influenza A virus M2 protein on M2 surface expression and virus assembly // *Virology*. – 1995. – V. 212. – № 2. – p. 411-421.
85. Huleatt J.W., Nakaar V., Desai P., Huang Y., Hewitt D., Jacobs A., Tang J., McDonald W., Song L., Evans R.K., Umlauf S., Tussey L., Powell T.J. 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. – V. 26. – № 2. – p. 201-214.
86. Hutchinson E.C., Charles P.D., Hester S.S., Thomas B., Trudgian D., Martinez-Alonso M., Fodor E. Conserved and host-specific features of influenza virion architecture.// *Nat Commun*. – 2014. – V. 5. – №. – p. 4816.
87. Hutchinson E.C., Curran M.D., Read E.K., Gog J.R., Digard P. Mutational analysis of cis-acting RNA signals in segment 7 of influenza A virus.// *J Virol*. – 2008. – V. 82. – № 23. – p. 11869-11879.
88. Ichinohe T., Pang I.K., Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel.// *Nat Immunol*. – 2010. – V. 11. – № 5. – p. 404-410.

89. Imai M., Watanabe S., Ninomiya A., Obuchi M., Odagiri T. Influenza B virus BM2 protein is a crucial component for incorporation of viral ribonucleoprotein complex into virions during virus assembly.// *J Virol.* – 2004. – V. 78. – № 20. – p. 11007-11015.
90. Impagliazzo A., Milder F., Kuipers H., Wagner M.V., Zhu X., Hoffman R.M., van Meersbergen R., Huizingh J., Wanningen P., Verspuij J., de Man M., Ding Z., Apetri A., Kukrer B., Sneekes-Vriese E., Tomkiewicz D., Laursen N.S., Lee P.S., Zakrzewska A., Dekking L., Tolboom J., Tettero L., van Meerten S., Yu W., Koudstaal W., Goudsmit J., Ward A.B., Meijberg W., Wilson I.A., Radosevic K. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen.// *Science.* – 2015. – V. 349. – № 6254. – p. 1301-1306.
91. Isakova-Sivak I., Chen L.M., Matsuoka Y., Voeten J.T.M., Kiseleva I., Heldens J.G.M., van den Bosch H., Klimov A., Rudenko L., Cox N.J., Donis R.O. Genetic bases of the temperature-sensitive phenotype of a master donor virus used in live attenuated influenza vaccines: A/Leningrad/134/17/57 (H2N2).// *Virology.* – 2011. – V. 412. – № 2. – p. 297-305.
92. Isakova-Sivak I., Korenkov D., Smolonogina T., Kotomina T., Donina S., Matyushenko V., Mezhenskaya D., Krammer F., Rudenko L. Broadly protective anti-hemagglutinin stalk antibodies induced by live attenuated influenza vaccine expressing chimeric hemagglutinin.// *Virology.* – 2018. – V. 518. – №. – p. 313-323.
93. Isakova-Sivak I., Matyushenko V., Kotomina T., Kiseleva I., Krutikova E., Donina S., Rekestin A., Larionova N., Mezhenskaya D., Sivak K., Muzhikyan A., Katelnikova A., Rudenko L. Sequential Immunization with Universal Live Attenuated Influenza Vaccine Candidates Protects Ferrets against a High-Dose Heterologous Virus Challenge.// *Vaccines (Basel).* – 2019. – V. 7. – № 3.
94. Isakova-Sivak I., Matyushenko V., Stepanova E., Matushkina A., Kotomina T., Mezhenskaya D., Prokopenko P., Kudryavtsev I., Kopeykin P., Sivak K., Rudenko L. Recombinant Live Attenuated Influenza Vaccine Viruses Carrying Conserved T-cell Epitopes of Human Adenoviruses Induce Functional Cytotoxic T-Cell Responses and Protect Mice against Both Infections.// *Vaccines (Basel).* – 2020. – V. 8. – № 2.
95. Isakova-Sivak I., Rudenko L. Safety, immunogenicity and infectivity of new live attenuated influenza vaccines.// *Expert Rev Vaccines.* – 2015. – V. 14. – № 10. – p. 1313-29.
96. Isakova-Sivak I., Stepanova E., Mezhenskaya D., Matyushenko V., Prokopenko P., Sychev I., Wong P.F., Rudenko L. Influenza vaccine: progress in a vaccine that elicits a broad immune response.// *Expert Review of Vaccines.* – 2021. – V. 20. – № 9. – p. 1097-1112.

97. Ito T., Gorman O.T., Kawaoka Y., Bean W.J., Webster R.J. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins.// *Journal of Virology*. – 1991. – V. 65. – №. – p. 5491-5498.
98. Iuliano A.D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J.M., Schanzer D., Cowling B.J., Wu P., Kyncl J., Ang L.W., Park M., Redlberger-Fritz M., Yu H., Espenhain L., Krishnan A., Emukule G., van Asten L., Pereira da Silva S., Aungkulanon S., Buchholz U., Widdowson M.A., Bresee J.S., Global Seasonal Influenza-associated Mortality Collaborator N. Estimates of global seasonal influenza-associated respiratory mortality: a modelling study.// *Lancet*. – 2018. – V. 391. – № 10127. – p. 1285-1300.
99. Jameson J., Cruz J., Terajima M., Ennis F.A. Human CD8+ and CD4+ T Lymphocyte Memory to Influenza A Viruses of Swine and Avian.// *The Journal of Immunology*. – 1999. – V. 162. – №. – p. 7578–7583.
100. Jegerlehner A., Schmitz N., Storni T., Bachmann M.F. Influenza A Vaccine Based on the Extracellular Domain of M2: Weak Protection Mediated via Antibody-Dependent NK Cell Activity.// *The Journal of Immunology*. – 2004. – V. 172. – № 9. – p. 5598-5605.
101. Job E.R., Ysenbaert T., Smet A., Christopoulou I., Strugnell T., Oloo E.O., Oomen R.P., Kleanthous H., Vogel T.U., Saelens X. Broadened immunity against influenza by vaccination with computationally designed influenza virus N1 neuraminidase constructs.// *NPJ Vaccines*. – 2018. – V. 3. – №. – p. 55.
102. Kacskovics I. Fc receptors in livestock species.// *Vet Immunol Immunopathol*. – 2004. – V. 102. – № 4. – p. 351-362.
103. Katoh K., Rozewicki J., Yamada K.D. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization.// *Brief Bioinform*. – 2017. – V. 20 – №.4. – p. 1160-1166.
104. Kendal A.P. Cold-adapted live attenuated influenza vaccines developed in Russia: can they contribute to meeting the needs for influenza control in other countries?// *Eur J Epidemiol*. – 1997. – V. 13. – № 5. – p. 591-609.
105. Kim A., Boronina T.N., Cole R.N., Darrah E., Sadegh-Nasseri S. Distorted Immunodominance by Linker Sequences or other Epitopes from a Second Protein Antigen During Antigen-Processing.// *Sci Rep*. – 2017. – V. 7. – p. 46418.
106. Kim K., Omori R., Ueno K., Iida S., Ito K. Host-Specific and Segment-Specific Evolutionary Dynamics of Avian and Human Influenza A Viruses: A Systematic Review.// *PLoS One*. – 2016. – V. 11. – № 1. – p. e0147021.

107. Kim K.H., Jung Y.J., Lee Y., Park B.R., Oh J., Lee Y.N., Kim M.C., Jeeva S., Kang S.M. Cross protection by inactivated recombinant influenza viruses containing chimeric hemagglutinin conjugates with a conserved neuraminidase or M2 ectodomain epitope.// *Virology*. – 2020. – V. 550. – p. 51-60.
108. Kim K.H., Kwon Y.M., Lee Y.T., Kim M.C., Hwang H.S., Ko E.J., Lee Y., Choi H.J., Kang S.M. Virus-Like Particles Are a Superior Platform for Presenting M2e Epitopes to Prime Humoral and Cellular Immunity against Influenza Virus.// *Vaccines (Basel)*. – 2018. – V. 6. – № 4.
109. Kim K.H., Lee Y.T., Park S., Jung Y.J., Lee Y., Ko E.J., Kim Y.J., Li X., Kang S.M. Neuraminidase expressing virus-like particle vaccine provides effective cross protection against influenza virus.// *Virology*. – 2019. – V. 535. – p. 179-188.
110. Kim M.C., Lee J.S., Kwon Y.M., O E., Lee Y.J., Choi J.G., Wang B.Z., Compans R.W., Kang S.M. Multiple heterologous M2 extracellular domains presented on virus-like particles confer broader and stronger M2 immunity than live influenza A virus infection.// *Antiviral Res.* – 2013. – V. 99. – № 3. – p. 328-335.
111. Kim M.C., Lee Y.N., Ko E.J., Lee J.S., Kwon Y.M., Hwang H.S., Song J.M., Song B.M., Lee Y.J., Choi J.G., Kang H.M., Quan F.S., Compans R.W., Kang S.M. Supplementation of influenza split vaccines with conserved M2 ectodomains overcomes strain specificity and provides long-term cross protection.// *Mol Ther.* – 2014. – V. 22. – № 7. – p. 1364-1374.
112. Kim M.C., Song J.M., O E., Kwon Y.M., Lee Y.J., Compans R.W., Kang S.M. Virus-like particles containing multiple M2 extracellular domains confer improved cross-protection against various subtypes of influenza virus.// *Mol Ther.* – 2013. – V. 21. – № 2. – p. 485-92.
113. Kirkpatrick E., Qiu X., Wilson P.C., Bahl J., Krammer F. The influenza virus hemagglutinin head evolves faster than the stalk domain.// *Sci Rep.* – 2018. – V. 8. – № 1. – p. 10432.
114. Kirkpatrick Roubidoux E., McMahon M., Carreno J.M., Capuano C., Jiang K., Simon V., van Bakel H., Wilson P., Krammer F. Identification and Characterization of Novel Antibody Epitopes on the N2 Neuraminidase.// *mSphere*. – 2021. – V. 6. – № 1.
115. Kirsteina A., Akopjana I., Bogans J., Lieknina I., Jansons J., Skrastina D., Kazaka T., Tars K., Isakova-Sivak I., Mezhenkaya D., Kotomina T., Matyushenko V., Rudenko L., Kazaks A. Construction and Immunogenicity of a Novel Multivalent Vaccine Prototype Based on Conserved Influenza Virus Antigens.// *Vaccines (Basel)*. – 2020. – V. 8. – № 2.
116. Koel B.F., Burke D.F., Bestebroer T.M., van der Vliet S., Zondag G.C., Vervaet G., Skepner E., Lewis N.S., Spronken M.I., Russell C.A., Eropkin M.Y., Hurt A.C., Barr I.G., de Jong J.C., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A., Smith D.J. Substitutions near the receptor

- binding site determine major antigenic change during influenza virus evolution.// *Science*. – 2013. – V. 342. – № 6161. – p. 976-979.
117. Kolpe A., Schepens B., Fiers W., Saelens X. M2-based influenza vaccines: recent advances and clinical potential.// *Expert Rev Vaccines*. – 2017. – V. 16. – № 2. – p. 123-136.
 118. Kolpe A., Schepens B., Ye L., Staeheli P., Saelens X. Passively transferred M2e-specific monoclonal antibody reduces influenza A virus transmission in mice.// *Antiviral Res*. – 2018. – V. 158. – №. – p. 244-254.
 119. Korenkov D., Isakova-Sivak I., Rudenko L. Basics of CD8 T-cell immune responses after influenza infection and vaccination with inactivated or live attenuated influenza vaccine.// *Expert Rev Vaccines*. – 2018. – V. 17. – № 11. – p. 977-987.
 120. Korenkov D.A., Laurie K.L., Reading P.C., Carolan L.A., Chan K.F., Isakova S., II, Smolonogina T.A., Subbarao K., Barr I.G., Villanueva J., Shcherbik S., Bousse T., Rudenko L.G. Safety, immunogenicity and protection of A(H3N2) live attenuated influenza vaccines containing wild-type nucleoprotein in a ferret model.// *Infect Genet Evol*. – 2018. – V. 64. – №. – p. 95-104.
 121. Koroleva M., Batarse F., Moritzky S., Henry C., Chaves F., Wilson P., Krammer F., Richards K., Sant A.J. Heterologous viral protein interactions within licensed seasonal influenza virus vaccines.// *NPJ Vaccines*. – 2020. – V. 5. – № 1. – p. 3.
 122. Krammer F., Fouchier R.A.M., Eichelberger M.C., Webby R.J., Shaw-Saliba K., Wan H., Wilson P.C., Compans R.W., Skountzou I., Monto A.S. NAction! How Can Neuraminidase-Based Immunity Contribute to Better Influenza Virus Vaccines?// *mBio*. – 2018. – V. 9. – № 2.
 123. Krammer F., Hai R., Yondola M., Tan G.S., Leyva-Grado V.H., Ryder A.B., Miller M.S., Rose J.K., Palese P., Garcia-Sastre A., Albrecht R.A. Assessment of influenza virus hemagglutinin stalk-based immunity in ferrets.// *J Virol*. – 2014. – V. 88. – № 6. – p. 3432-3442.
 124. Krammer F., Palese P. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines.// *Curr Opin Virol*. – 2013. – V. 3. – № 5. – p. 521-530.
 125. Krammer F., Smith G.J.D., Fouchier R.A.M., Peiris M., Kedzierska K., Doherty P.C., Palese P., Shaw M.L., Treanor J., Webster R.G., García-Sastre A. Influenza.// *Nature Reviews Disease Primers*. – 2018. – V. 4. – № 1.
 126. Laliberte-Gagne M.E., Bolduc M., Garneau C., Olivera-Ugarte S.M., Savard P., Leclerc D. Modulation of Antigen Display on PapMV Nanoparticles Influences Its Immunogenicity.// *Vaccines (Basel)*. – 2021. – V. 9. – № 1.
 127. Lamb R.A., Choppin P.W. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides.// *Biochemistry*. – 1979. – V. 76. – № 10. – p. 4908-4912.

128. Lamb R.A., Choppin P.W. Identification of a Second Protein (M2) Encoded by RNA Segment 7 of Influenza Virus.// *Virology*. – 1981. – V. 112. – №. – p. 729-737.
129. Lamb R.A., Lai C.J. Conservation of the Influenza Virus Membrane Protein (M1) Amino Acid Sequence and an Open Reading Frame of RNA Segment 7 Encoding a Second Protein (M2) in H1N1 and H3N2 Strains.// *Virology*. – 1981. – V. 112. – №. – p. 746-751.
130. Lamb R.A., Zebedee S.L., Richardson C.D. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected-cell surface // *Cell*. – 1985. – V. 40. – №. – p. 627-633.
131. Leclerc D., Rivest M., Babin C., Lopez-Macias C., Savard P. A novel M2e based flu vaccine formulation for dogs.// *PLoS One*. – 2013. – V. 8. – № 10. – p. e77084.
132. Lee S.Y., Kang J.O., Chang J. Nucleoprotein vaccine induces cross-protective cytotoxic T lymphocytes against both lineages of influenza B virus.// *Clin Exp Vaccine Res*. – 2019. – V. 8. – № 1. – p. 54-63.
133. Lee Y.N., Kim M.C., Lee Y.T., Kim Y.J., Kang S.M. Mechanisms of Cross-protection by Influenza Virus M2-based Vaccines.// *Immune Netw*. – 2015. – V. 15. – № 5. – p. 213-221.
134. Lee Y.N., Lee Y.T., Kim M.C., Hwang H.S., Lee J.S., Kim K.H., Kang S.M. Fc receptor is not required for inducing antibodies but plays a critical role in conferring protection after influenza M2 vaccination.// *Immunology*. – 2014. – V. 143. – № 2. – p. 300-309.
135. Lee Y.T., Kim K.H., Ko E.J., Kim M.C., Lee Y.N., Hwang H.S., Lee Y., Jung Y.J., Kim Y.J., Santos J., Perez D.R., Kang S.M. Enhancing the cross protective efficacy of live attenuated influenza virus vaccine by supplemented vaccination with M2 ectodomain virus-like particles.// *Virology*. – 2019. – V. 529. – №. – p. 111-121.
136. Lee Y.T., Ko E.J., Lee Y., Kim K.H., Kim M.C., Lee Y.N., Kang S.M. Intranasal vaccination with M2e5x virus-like particles induces humoral and cellular immune responses conferring cross-protection against heterosubtypic influenza viruses.// *PLoS One*. – 2018. – V. 13. – № 1. – p. e0190868.
137. Leiding T., Wang J., Martinsson J., DeGrado W.F., Arskold S.P. Proton and cation transport activity of the M2 proton channel from influenza A virus // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – V. 107. – № 35. – p. 15409-15414.
138. Letunic I., Bork P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments.// *Nucleic Acids Res*. – 2019. – V. 47. – № W1. – p. W256-W259.
139. Lillie P.J., Berthoud T.K., Powell T.J., Lambe T., Mullarkey C., Spencer A.J., Hamill M., Peng Y., Blais M.E., Duncan C.J., Sheehy S.H., Havelock T., Faust S.N., Williams R.L., Gilbert A., Oxford J., Dong T., Hill A.V., Gilbert S.C. Preliminary assessment of the efficacy of a T-cell-

- based influenza vaccine, MVA-NP+M1, in humans.// *Clin Infect Dis.* – 2012. – V. 55. – № 1. – p. 19-25.
140. Lin S.C., Lin Y.F., Chong P., Wu S.C. Broader Neutralizing Antibodies against H5N1 Viruses Using Prime-Boost Immunization of Hyperglycosylated Hemagglutinin DNA and Virus-Like Particles.// *Plos One.* – 2012. – V. 7. – № 6.
141. Lin S.C., Liu W.C., Jan J.T., Wu S.C. Glycan masking of hemagglutinin for adenovirus vector and recombinant protein immunizations elicits broadly neutralizing antibodies against H5N1 avian influenza viruses.// *PLoS One.* – 2014. – V. 9. – № 3. – p. e92822.
142. Lingel A., Bullard B.L., Weaver E.A. Efficacy of an Adenoviral Vectored Multivalent Centralized Influenza Vaccine.// *Sci Rep.* – 2017. – V. 7. – № 1. – p. 14912.
143. Liu W., Li H., Chen Y.-H. N-terminus of M2 protein could induce antibodies with inhibitory activity against influenza virus replication.// *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* – 2003. – V. 35. – № 2. – p. 141-146.
144. Liu W., Zou P., Chen Y.H. Monoclonal antibodies recognizing EVETPIRN epitope of influenza A virus M2 protein could protect mice from lethal influenza A virus challenge.// *Immunol Lett.* – 2004. – V. 93. – № 2-3. – p. 131-6.
145. Liu W., Zou P., Ding J., Lu Y., Chen Y.H. Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design.// *Microbes Infect.* – 2005. – V. 7. – № 2. – p. 171-7.
146. Liu W.C., Lin C.Y., Tsou Y.T., Jan J.T., Wu S.C. Cross-Reactive Neuraminidase-Inhibiting Antibodies Elicited by Immunization with Recombinant Neuraminidase Proteins of H5N1 and Pandemic H1N1 Influenza A Viruses.// *J Virol.* – 2015. – V. 89. – № 14. – p. 7224-34.
147. Lotfi Z., Golchin M., Khalili-Yazdi A., Khalili M. Immunological properties of the SLLTEVET epitope of Influenza A virus in multiple display on filamentous M13 phage.// *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* – 2019. – V. 65. – №. – p. 76-80.
148. Lu I.N., KIRSTEINA A., FARINELLE S., WILLIEME S., TARS K., MULLER C.P., KAZAKS A. Structure and applications of novel influenza HA tri-stalk protein for evaluation of HA stem-specific immunity.// *PLoS One.* – 2018. – V. 13. – № 9. – p. e0204776.
149. Lu X., Edwards L.E., Desheva J.A., Nguyen D.C., Rekstin A., Stephenson I., Szretter K., Cox N.J., Rudenko L.G., Klimov A., Katz J.M. Cross-protective immunity in mice induced by live-attenuated or inactivated vaccines against highly pathogenic influenza A (H5N1) viruses.// *Vaccine.* – 2006. – V. 24. – № 44-46. – p. 6588-93.
150. Maassab H.F. Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees c.// *Nature.* – 1967. – V. 213. – № 5076. – p. 612-614.

151. Maassab H.F. Biologic and immunologic characteristics of cold-adapted influenza virus.// *J Immunol.* – 1969. – V. 102. – № 3. – p. 728-732.
152. Madsen A., Dai Y.N., McMahon M., Schmitz A.J., Turner J.S., Tan J., Lei T., Alsoussi W.B., Strohmeier S., Amor M., Mohammed B.M., Mudd P.A., Simon V., Cox R.J., Fremont D.H., Krammer F., Ellebedy A.H. Human Antibodies Targeting Influenza B Virus Neuraminidase Active Site Are Broadly Protective.// *Immunity.* – 2020. – V. 53. – № 4. – p. 852-863 e7.
153. Matsuzaki Y., Katsushima N., Nagai Y., Shoji M., Itagaki T., Sakamoto M., Kitaoka S., Mizuta K., Nishimura H. Clinical features of influenza C virus infection in children.// *Journal of Infectious Diseases.* – 2006. – V. 193. – № 9. – p. 1229-1235.
154. Matsuzaki Y., Sugawara K., Mizuta K., Tsuchiya E., Muraki Y., Hongo S., Suzuki H., Nakamura K. Antigenic and genetic characterization of influenza C viruses which caused two outbreaks in Yamagata City, Japan, in 1996 and 1998.// *Journal of Clinical Microbiology.* – 2002. – V. 40. – № 2. – p. 422-429.
155. McCown M.F., Pekosz A. The influenza A virus M2 cytoplasmic tail is required for infectious virus production and efficient genome packaging.// *J Virol.* – 2005. – V. 79. – № 6. – p. 3595-605.
156. Mcgeoch D., Fellnert P., C. N. Influenza virus genome consists of eight distinct RNA species // *Biochemistry.* – 1976. – V. 73. – № 9. – p. 3045-3049.
157. Mezhenskaya D., Isakova-Sivak I., Rudenko L. M2e-based universal influenza vaccines: a historical overview and new approaches to development.// *J Biomed Sci.* – 2019. – V. 26. – № 1. – p. 76.
158. Monto A., Kendal A. EFFECT OF NEURAMINIDASE ANTIBODY ON HONG KONG INFLUENZA.// *The Lancet.* – 1973. – V. 301. – № 7804. – p. 623-625.
159. Monto A.S., Petrie J.G., Cross R.T., Johnson E., Liu M., Zhong W., Levine M., Katz J.M., Ohmit S.E. Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection.// *J Infect Dis.* – 2015. – V. 212. – № 8. – p. 1191-9.
160. Morgan S.B., Holzer B., Hemmink J.D., Salguero F.J., Schwartz J.C., Agatic G., Cameroni E., Guarino B., Porter E., Rijal P., Townsend A., Charleston B., Corti D., Tchilian E. Therapeutic Administration of Broadly Neutralizing FI6 Antibody Reveals Lack of Interaction Between Human IgG1 and Pig Fc Receptors.// *Front Immunol.* – 2018. – V. 9. – №. – p. 865.
161. Morrison B.J., Roman J.A., Luke T.C., Nagabhushana N., Raviprakash K., Williams M., Sun P. Antibody-dependent NK cell degranulation as a marker for assessing antibody-dependent cytotoxicity against pandemic 2009 influenza A(H1N1) infection in human plasma and

- influenza-vaccinated transchromosomal bovine intravenous immunoglobulin therapy.// *J Virol Methods*. – 2017. – V. 248. – №. – p. 7-18.
162. Moser C., Muller M., Kaeser M.D., Weydemann U., Amacker M. Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system.// *Expert Rev Vaccines*. – 2013. – V. 12. – № 7. – p. 779-91.
163. Mould J.A., Paterson R.G., Takeda M., Ohigashi Y., Venkataraman P., Lamb R.A., Pinto L.H. Influenza B Virus BM2 Protein Has Ion Channel Activity that Conducts Protons across Membranes.// *Developmental Cell*. – 2003. – V. 5. – № 1. – p. 175-184.
164. Nachbagauer R., Feser J., Naficy A., Bernstein D.I., Guptill J., Walter E.B., Berlanda-Scorza F., Stadlbauer D., Wilson P.C., Aydillo T., Behzadi M.A., Bhavsar D., Bliss C., Capuano C., Carreno J.M., Chromikova V., Claeys C., Coughlan L., Freyn A.W., Gast C., Javier A., Jiang K., Mariottini C., McMahon M., McNeal M., Solorzano A., Strohmeier S., Sun W., Van der Wielen M., Innis B.L., Garcia-Sastre A., Palese P., Krammer F. A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial.// *Nat Med*. – 2021. – V. 27. – № 1. – p. 106-114.
165. Nachbagauer R., Krammer F., Albrecht R.A. A Live-Attenuated Prime, Inactivated Boost Vaccination Strategy with Chimeric Hemagglutinin-Based Universal Influenza Virus Vaccines Provides Protection in Ferrets: A Confirmatory Study.// *Vaccines (Basel)*. – 2018. – V. 6. – № 3.
166. Nachbagauer R., Miller M.S., Hai R., Ryder A.B., Rose J.K., Palese P., Garcia-Sastre A., Krammer F., Albrecht R.A. Hemagglutinin Stalk Immunity Reduces Influenza Virus Replication and Transmission in Ferrets.// *J Virol*. – 2015. – V. 90. – № 6. – p. 3268-73.
167. Neiryneck S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein.// *Nature Medicine*. – 1999. – V. 5. – № 10. – p. 1157-1163.
168. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Fcγ receptors as regulators of immune responses.// *Nat Rev Immunol*. – 2008. – V. 8. – № 1. – p. 34-47.
169. Nussing S., Sant S., Koutsakos M., Subbarao K., Nguyen T.H.O., Kedzierska K. Innate and adaptive T cells in influenza disease.// *Front Med*. – 2018. – V. 12. – № 1. – p. 34-47.
170. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., team U. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit.// *Bioinformatics*. – 2012. – V. 28. – № 8. – p. 1166-7.
171. Okuda K., Ihata A., Watabe S., Okada E., Yamakawa T., Hamajima K., Yang J., Ishii N., Nakazawa M., Okuda K., Ohnari K., Nakajima K., Xin K.Q. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene.// *Vaccine*. – 2001. – V. 19. – №. – p. 3681-3691.

172. Omer I., Rosenberg A., Sefty H., Pando R., Mandelboim M., Mendelson E., Keinan-Boker L., Glatman-Freedman A., Israel Influenza Surveillance N. Lineage-matched versus mismatched influenza B vaccine effectiveness following seasons of marginal influenza B circulation.// *Vaccine*. – 2022. – V. 40. – № 6. – p. 880-885.
173. Omokanye A., Ong L.C., Lebrero-Fernandez C., Bernasconi V., Schon K., Stromberg A., Bemark M., Saelens X., Czarnewski P., Lycke N. Clonotypic analysis of protective influenza M2e-specific lung resident Th17 memory cells reveals extensive functional diversity.// *Mucosal Immunol*. – 2022.
174. Palese P., Schulman J.L. Differences in RNA Patterns of Influenza A Viruses.// *Journal of Virology*. – 1976. – V. 17. – № 3. – p. 876-884.
175. Park J.K., Taubenberger J.K. Universal Influenza Vaccines: To Dream the Possible Dream?// *ACS Infect Dis*. – 2016. – V. 2. – № 1. – p. 5-7.
176. Park K.S., Seo Y.B., Lee J.Y., Im S.J., Seo S.H., Song M.S., Choi Y.K., Sung Y.C. Complete protection against a H5N2 avian influenza virus by a DNA vaccine expressing a fusion protein of H1N1 HA and M2e.// *Vaccine*. – 2011. – V. 29. – № 33. – p. 5481-7.
177. Paterson R.G., Takeda M., Ohigashi Y., Pinto L.H., Lamb R.A. Influenza B virus BM2 protein is an oligomeric integral membrane protein expressed at the cell surface.// *Virology*. – 2003. – V. 306. – № 1. – p. 7-17.
178. Paules C., Subbarao K. Influenza.// *The Lancet*. – 2017. – V. 390. – № 10095. – p. 697-708.
179. Pejovski D., Zeng W., Rockman S., Brown L.E., Jackson D.C. A lipopeptide based on the M2 and HA proteins of influenza A viruses induces protective antibody.// *Immunol Cell Biol*. – 2010. – V. 88. – № 5. – p. 605-611.
180. Petukhova N., Gasanova T., Stepanova L., Rusova O., Potapchuk M., Korotkov A., Skurat E., Tsybalova L., Kiselev O., Ivanov P., Atabekov J. Immunogenicity and Protective Efficacy of Candidate Universal Influenza A Nanovaccines Produced in Plants by Tobacco Mosaic Virus-based Vectors.// *Current Pharmaceutical Design*. – 2013. – V. 19. – № 31. – p. 5587-5600.
181. Pinto L.H., Holsinger L.J., Lamb R.A. Influenza virus M2 protein has ion channel activity.// *Cell*. – 1992. – V. 69. – №. – p. 517-528.
182. Pons M.W. A reexamination of influenza single- and double-stranded RNAs by gel electrophoresis // *Virology*. – 1976. – V. 69. – №. – p. 789-792.
183. Ramos E.L., Mitcham J.L., Koller T.D., Bonavia A., Usner D.W., Balaratnam G., Fredlund P., Swiderek K.M. Efficacy and safety of treatment with an anti-m2e monoclonal antibody in experimental human influenza.// *J Infect Dis*. – 2015. – V. 211. – № 7. – p. 1038-1044.

184. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints.// *The American Journal Of Hygiene*. – 1938. – V. 27. – № 3. – p. 493-497.
185. Reid A.H., Taubenberger J.K., Fanning T.G. Evidence of an absence: the genetic origins of the 1918 pandemic influenza virus.// *Nat Rev Microbiol*. – 2004. – V. 2. – № 11. – p. 909-914.
186. Reneer Z.B., Skarlupka A.L., Jamieson P.J., Ross T.M. Broadly Reactive H2 Hemagglutinin Vaccines Elicit Cross-Reactive Antibodies in Ferrets Preimmune to Seasonal Influenza A Viruses.// *mSphere*. – 2021. – V. 6. – № 2.
187. Roubidoux E.K., McMahon M., Carreño J.M., Capuano C., Jiang K., Simon V., Bakel H.v., Wilson P., Krammer F. Novel epitopes of human monoclonal antibodies targeting the influenza virus N1 neuraminidase.// *bioRxiv*. – 2021. – V. – №. – p. 2021.02.26.433142.
188. Ryder A.B., Nachbagauer R., Buonocore L., Palese P., Krammer F., Rose J.K. Vaccination with Vesicular Stomatitis Virus-Vectored Chimeric Hemagglutinins Protects Mice against Divergent Influenza Virus Challenge Strains.// *J Virol*. – 2015. – V. 90. – № 5. – p. 2544-50.
189. Saelens X. The Role of Matrix Protein 2 Ectodomain in the Development of Universal Influenza Vaccines.// *J Infect Dis*. – 2019. – V. 219. – № Supplement_1. – p. S68-S74.
190. Sarawar S., Hatta Y., Watanabe S., Dias P., Neumann G., Kawaoka Y., Bilsel P. M2SR, a novel live single replication influenza virus vaccine, provides effective heterosubtypic protection in mice.// *Vaccine*. – 2016. – V. 34. – № 42. – p. 5090-5098.
191. Sautto G.A., Kirchenbaum G.A., Ecker J.W., Bebin-Blackwell A.G., Pierce S.R., Ross T.M. Elicitation of Broadly Protective Antibodies following Infection with Influenza Viruses Expressing H1N1 Computationally Optimized Broadly Reactive Hemagglutinin Antigens.// *Immunohorizons*. – 2018. – V. 2. – № 7. – p. 226-237.
192. Sautto G.A., Ross T.M. Hemagglutinin consensus-based prophylactic approaches to overcome influenza virus diversity.// *Vet Ital*. – 2019. – V. 55. – № 3. – p. 195-201.
193. Schnell J.R., Chou J.J. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus.// *Nature*. – 2008. – V. 451. – № 7178. – p. 591-5.
194. Schultz-Cherry S., Jones J.C. Influenza vaccines: the good, the bad, and the eggs.// *Adv Virus Res*. – 2010. – V. 77. – №. – p. 63-84.
195. Servick K. COVID-19 measures also suppress flu-for now.// *Science*. – 2021. – V. 371. – № 6526. – p. 224.
196. Simhadri V.R., Dimitrova M., Mariano J.L., Zenarruzabeitia O., Zhong W., Ozawa T., Muraguchi A., Kishi H., Eichelberger M.C., Borrego F. A Human Anti-M2 Antibody Mediates Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity (ADCC) and Cytokine Secretion by Resting

- and Cytokine-Preactivated Natural Killer (NK) Cells.// *PLoS One*. – 2015. – V. 10. – № 4. – p. e0124677.
197. Smith D.J., Lapedes A.S., de Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus.// *Science*. – 2004. – V. 305. – № 5682. – p. 371-6.
198. Smith G.E., Sun X., Bai Y., Liu Y.V., Massare M.J., Pearce M.B., Belser J.A., Maines T.R., Creager H.M., Glenn G.M., Flyer D., Pushko P., Levine M.Z., Tumpey T.M. Neuraminidase-based recombinant virus-like particles protect against lethal avian influenza A(H5N1) virus infection in ferrets.// *Virology*. – 2017. – V. 509. – №. – p. 90-97.
199. Smorodintseff A.A., Tushinsky M.D., Drobyshevskaya A.I., Korovin A.A., Osetroff A.I. Investigation on Volunteers Infected with the Influenza Virus.// *The American Journal of the Medical Sciences*. – 1937. – V. 194. – № 2. – p. 159-170.
200. Song J.M., Wang B.Z., Park K.M., Rooijen N.V., Quan F.S., Kim M.C., Jin H.T., Pekosz A., Compans R.W., Kang S.M. Influenza Virus-Like Particles Containing M2 Induce Broadly Cross Protective Immunity.// *PLoS One*. – 2011. – V. 6. – № 1. – p. 14538-145348.
201. Soria-Guerra R.E., Nieto-Gomez R., Govea-Alonso D.O., Rosales-Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: implications on vaccine development.// *J Biomed Inform*. – 2015. – V. 53. – №. – p. 405-14.
202. Stauffer S., Feng Y., Nebioglu F., Heilig R., Picotti P., Helenius A. Stepwise priming by acidic pH and a high K⁺ concentration is required for efficient uncoating of influenza A virus cores after penetration.// *J Virol*. – 2014. – V. 88. – № 22. – p. 13029-46.
203. Stepanova E., Krutikova E., Wong P.-F., Matyushenko V., Bazhenova E., Isakova-Sivak I., Rudenko L. Safety, Immunogenicity, and Protective Efficacy of a Chimeric A/B Live Attenuated Influenza Vaccine in a Mouse Model.// *Microorganisms*. – 2021. – V. 9. – № 2. – p. 259.
204. Stepanova L.A., Mardanova E.S., Shuklina M.A., Blokhina E.A., Kotlyarov R.Y., Potapchuk M.V., Kovaleva A.A., Vidyaeva I.G., Korotkov A.V., Eletskaia E.I., Ravin N.V., Tsybalova L.M. 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. – V. 25. – № 1. – p. 33.
205. Stoloff G.A., Caparros-Wanderley W. Synthetic multi-epitope peptides identified in silico induce protective immunity against multiple influenza serotypes.// *Eur J Immunol*. – 2007. – V. 37. – № 9. – p. 2441-9.

206. Stouffer A.L., Acharya R., Salom D., Levine A.S., Di Costanzo L., Soto C.S., Tereshko V., Nanda V., Stayrook S., DeGrado W.F. Structural basis for the function and inhibition of an influenza virus proton channel.// *Nature*. – 2008. – V. 451. – № 7178. – p. 596-9.
207. Strohmeier S., Carreño J.M., Brito R.N., Krammer F. Introduction of Cysteines in the Stalk Domain of Recombinant Influenza Virus N1 Neuraminidase Enhances Protein Stability and Immunogenicity in Mice.// *Vaccines*. – 2021. – V. 9. – № 4. – p. 404.
208. Su S., Fu X., Li G., Kerlin F., Veit M. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics.// *Virulence*. – 2017. – V. 8. – № 8. – p. 1580-1591.
209. Sun W., Luo T., Liu W., Li J. Progress in the Development of Universal Influenza Vaccines.// *Viruses*. – 2020. – V. 12. – № 9.
210. Sun W., Zheng A., Miller R., Krammer F., Palese P. An Inactivated Influenza Virus Vaccine Approach to Targeting the Conserved Hemagglutinin Stalk and M2e Domains.// *Vaccines*. – 2019. – V. 7. – № 3. – p. 117.
211. Susukida T., Aoki S., Shirayanagi T., Yamada Y., Kuwahara S., Ito K. HLA transgenic mice: application in reproducing idiosyncratic drug toxicity.// *Drug Metab Rev*. – 2020. – V. 52. – № 4. – p. 540-567.
212. Takeda M., Pekosz A., Shuck K., Pinto L.H., Lamb R.A. Influenza A Virus M2 Ion Channel Activity Is Essential for Efficient Replication in Tissue Culture.// *Journal of Virology*. – 2002. – V. 76. – № 3. – p. 1391-1399.
213. Talbot H.K., Rock M.T., Johnson C., Tussey L., Kavita U., Shanker A., Shaw A.R., Taylor D.N. Immunopotential of trivalent influenza vaccine when given with VAX102, a recombinant influenza M2e vaccine fused to the TLR5 ligand flagellin.// *PLoS One*. – 2010. – V. 5. – № 12. – p. e14442.
214. Tang Y., Zaitseva F., Lamb R.A., Pinto L.H. The gate of the influenza virus M2 proton channel is formed by a single tryptophan residue.// *J Biol Chem*. – 2002. – V. 277. – № 42. – p. 39880-6.
215. Tompkins S.M., Zhao Z.S., Lo C.Y., Mispion J.A., Liu T., Ye Z., Hogan R.J., Wu Z., Benton K.A., Tumpey T.M., Epstein S.L. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1.// *Emerg Infect Dis*. – 2007. – V. 13. – № 3. – p. 426-35.
216. Topham D.I., Tripp R.A., Doherty P.C. CD8+ T Cells Clear Influenza Virus by Perforin or Fas-Dependent Processes // *The Journal of Immunology*. – 1997. – V. 159. – № 11. – p. 5197-5200.
217. Treanor J.J., Tierney E.L., Zebedee S.L., Lamb R.A., Murphy B.R. Passively Transferred Monoclonal Antibody to the M2 Protein Inhibits Influenza A Virus Replication in Mice // *Journal of Virology*. – 1990. – V. 64. – № 3. – p. 1375-1377.

218. Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Kotlyarov R.Y., Blokhina E.A., Shuklina M.A., Mardanova E.S., Korotkov A.V., Potapchuk M.V., Ravin N.V. Strengthening the Effectiveness of the Candidate Influenza Vaccine by Combining Conserved Sequences of Hemagglutinin and M2 protein.// *Epidemiology and Vaccine Prevention*. – 2017. – V. 16. – № 3. – p. 65-70.
219. Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Kuprianov V.V., Blokhina E.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Gorshkov A.N., Kasyanenko M.A., Ravin N.V., Kiselev O.I. 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. – V. 33. – № 29. – p. 3398-3406.
220. Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Mardanova E.S., Kotlyarov R.Y., Potapchuk M.V., Petrov S.A., Blokhina E.A., Ravin N.V. Combination of M2e peptide with stalk HA epitopes of influenza A virus enhances protective properties of recombinant vaccine.// *PLoS One*. – 2018. – V. 13. – № 8. – p. e0201429.
221. Turley C.B., Rupp R.E., Johnson C., Taylor D.N., Wolfson J., Tussey L., Kavita U., Stanberry L., Shaw A. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults.// *Vaccine*. – 2011. – V. 29. – № 32. – p. 5145-5152.
222. Van den Hoecke S., Ehrhardt K., Kolpe A., El Bakkouri K., Deng L., Grootaert H., Schoonooghe S., Smet A., Bentahir M., Roose K., Schotsaert M., Schepens B., Callewaert N., Nimmerjahn F., Staeheli P., Hengel H., Saelens X. Hierarchical and Redundant Roles of Activating FcγR3 in Protection against Influenza Disease by M2e-Specific IgG1 and IgG2a Antibodies.// *J Virol*. – 2017. – V. 91. – № 7.
223. Vasin A.V., Temkina O.A., Egorov V.V., Klotchenko S.A., Plotnikova M.A., Kiselev O.I. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins.// *Virus Res*. – 2014. – V. 185. – №. – p. 53-63.
224. Veits J., Wiesner D., Fuchs W., Hoffmann B., Granzow H., Starick E., Mundt E., Schirrmeier H., Mebatsion T., Mettenleiter T.C., Romer-Oberdorfer A. Newcastle disease virus expressing H5 hemagglutinin gene protects chickens against Newcastle disease and avian influenza.// *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2006. – V. 103. – № 21. – p. 8197-8202.
225. Venkataraman P., Lamb R.A., Pinto L.H. Chemical rescue of histidine selectivity filter mutants of the M2 ion channel of influenza A virus.// *J Biol Chem*. – 2005. – V. 280. – № 22. – p. 21463-72.
226. Vijayanand S., Gomes K.B., Gala R.P., Uddin M.N., D'Souza M.J. Exploring the Potential of T-Cells for a Universal Influenza Vaccine.// *Vaccines (Basel)*. – 2020. – V. 8. – № 4.

227. Wang J., Pielak R.M., McClintock M.A., Chou J.J. Solution structure and functional analysis of the influenza B proton channel.// *Nat Struct Mol Biol.* – 2009. – V. 16. – № 12. – p. 1267-71.
228. Wang R., Song A., Levin J., Dennis D., Zhang N.J., Yoshida H., Koriazova L., Madura L., Shapiro L., Matsumoto A., Yoshida H., Mikayama T., Kubo R.T., Sarawar S., Cheroutre H., Kato S. Therapeutic potential of a fully human monoclonal antibody against influenza A virus M2 protein.// *Antiviral Res.* – 2008. – V. 80. – № 2. – p. 168-77.
229. Wang T.T., Tan G.S., Hai R., Pica N., Ngai L., Ekiert D.C., Wilson I.A., Garcia-Sastre A., Moran T.M., Palese P. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes.// *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 2010. – V. 107. – № 44. – p. 18979-84.
230. Wareing M.D., Tannock G.A. Live attenuated vaccines against influenza; an historical review.// *Vaccine.* – 2001. – V. 19. – № 25-26. – p. 3320-30.
231. Watanabe T., Watanabe S., Ito H., Kida H., Kawaoka Y. Influenza A virus can undergo multiple cycles of replication without M2 ion channel activity.// *J Virol.* – 2001. – V. 75. – № 12. – p. 5656-62.
232. Webby R.J., Webster R.G. Are we ready for pandemic influenza?// *Science.* – 2003. – V. 302. – № 5650. – p. 1519-22.
233. Wharton S.A., Belshe R.B., Skehel J.J., Hay A.J. Role of virion M2 protein in influenza virus uncoating: specific reduction in the rate of membrane fusion between virus and liposomes by amantadine.// *J Gen Virol.* – 1994. – V. 75 (Pt 4). – №. – p. 945-8.
234. Winter G., Fields S. Cloning of influenza cDNA into M13: the sequence of the RNA segment encoding the A/PR/8/34 matrix protein // *Nucleic Acids Research* –1980. – V. 8. – № 9. – p. 1965-1974.
235. Wise H.M., Hutchinson E.C., Jagger B.W., Stuart A.D., Kang Z.H., Robb N., Schwartzman L.M., Kash J.C., Fodor E., Firth A.E., Gog J.R., Taubenberger J.K., Digard P. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain.// *PLoS Pathog.* – 2012. – V. 8. – № 11. – p. e1002998.
236. Wohlgemuth N., Lane A.P., Pekosz A. Influenza A Virus M2 Protein Apical Targeting Is Required for Efficient Virus Replication.// *J Virol.* – 2018. – V. 92. – № 22.
237. Wong T.M., Allen J.D., Bebin-Blackwell A.G., Carter D.M., Alefantis T., DiNapoli J., Kleanthous H., Ross T.M. Computationally Optimized Broadly Reactive Hemagglutinin Elicits Hemagglutination Inhibition Antibodies against a Panel of H3N2 Influenza Virus Cocirculating Variants.// *J Virol.* – 2017. – V. 91. – № 24.

238. Wu F., Huang J.H., Yuan X.Y., Huang W.S., Chen Y.H. Characterization of immunity induced by M2e of influenza virus.// *Vaccine*. – 2007. – V. 25. – № 52. – p. 8868-73.
239. Yang J., Jing L., James E.A., Gebe J.A., Koelle D.M., Kwok W.W. A Novel Approach of Identifying Immunodominant Self and Viral Antigen Cross-Reactive T Cells and Defining the Epitopes They Recognize.// *Front Immunol*. – 2018. – V. 9. – №. – p. 2811.
240. Yang J.,Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions.// *Nucleic Acids Res*. – 2015. – V. 43. – № W1. – p. W174-81.
241. Yardeni T., Eckhaus M., Morris H.D., Huizing M., Hoogstraten-Miller S. Retro-orbital injections in mice.// *Lab Anim (NY)*. – 2011. – V. 40. – № 5. – p. 155-60.
242. Yassine H.M., Boyington J.C., McTamney P.M., Wei C.J., Kanekiyo M., Kong W.P., Gallagher J.R., Wang L., Zhang Y., Joyce M.G., Lingwood D., Moin S.M., Andersen H., Okuno Y., Rao S.S., Harris A.K., Kwong P.D., Mascola J.R., Nabel G.J., Graham B.S. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection.// *Nat Med*. – 2015. – V. 21. – № 9. – p. 1065-70.
243. Yoon S.W., Webby R.J., Webster R.G. Evolution and ecology of influenza A viruses.// *Curr Top Microbiol Immunol*. – 2014. – V. 385. – №. – p. 359-75.
244. Zebedee S.L.,Lamb R.A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions // *Journal of Virology*. – 1988. – V. 62. – №. – p. 2762-2772.
245. Zebedee S.L.,Lamb R.A. Growth restriction of influenza A virus by M2 protein antibody is genetically linked to the M1 protein.// *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1989. – V. 86. – № 3. – p. 1061-5.
246. Zens K.D., Chen J.K., Farber D.L. Vaccine-generated lung tissue-resident memory T cells provide heterosubtypic protection to influenza infection.// *JCI Insight*. – 2016. – V. 1. – № 10.
247. Zhao G., Sun S., Du L., Xiao W., Ru Z., Kou Z., Guo Y., Yu H., Jiang S., Lone Y., Zheng B.Z., Zhou Y. An H5N1 M2e-based multiple antigenic peptide vaccine confers heterosubtypic protection from lethal infection with pandemic 2009 H1N1 virus.// *Virology Journal*. – 2010. – V. 7. – №. – p. 151-156.
248. Zharikova D., Mozdzanowska K., Feng J., Zhang M., Gerhard W. Influenza type A virus escape mutants emerge in vivo in the presence of antibodies to the ectodomain of matrix protein 2.// *J Virol*. – 2005. – V. 79. – № 11. – p. 6644-54.
249. Zheng D., Chen S., Qu D., Chen J., Wang F., Zhang R., Chen Z. Influenza H7N9 LAH-HBc virus-like particle vaccine with adjuvant protects mice against homologous and heterologous influenza viruses.// *Vaccine*. – 2016. – V. 34. – № 51. – p. 6464-6471.

250. Zhong W., Gross F.L., Holiday C., Jefferson S.N., Bai Y., Liu F., Katz J.M., Levine M.Z. Vaccination with 2014-15 Seasonal Inactivated Influenza Vaccine Elicits Cross-Reactive Anti-HA Antibodies with Strong ADCC Against Antigenically Drifted Circulating H3N2 Virus in Humans.// *Viral Immunol.* – 2016. – V. 29. – № 4. – p. 259-62.
251. Zhong W., Reed C., Blair P.J., Katz J.M., Hancock K., Influenza Serology Working G. Serum antibody response to matrix protein 2 following natural infection with 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus in humans.// *J Infect Dis.* – 2014. – V. 209. – № 7. – p. 986-94.
252. Zhu X., Turner H.L., Lang S., McBride R., Bangaru S., Gilchuk I.M., Yu W., Paulson J.C., Crowe J.E., Jr., Ward A.B., Wilson I.A. Structural Basis of Protection against H7N9 Influenza Virus by Human Anti-N9 Neuraminidase Antibodies.// *Cell Host Microbe.* – 2019. – V. 26. – № 6. – p. 729-738 e4.
253. Zottig X., Al-Halifa S., Cote-Cyr M., Calzas C., Le Goffic R., Chevalier C., Archambault D., Bourgault S. Self-assembled peptide nanorod vaccine confers protection against influenza A virus.// *Biomaterials.* – 2021. – V. 269. – №. – p. 120672.
254. Zykova A., Blokhina E.A., Kotlyarov R.Y., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Kuprianov V.V., Ravin N.V. Highly Immunogenic Nanoparticles Based on a Fusion Protein Comprising the M2e of Influenza A Virus and a Lipopeptide.// *Viruses.* – 2020. – V. 12. – № 1133.