

## Усиление эффективности кандидатной вакцины против гриппа сочетанием консервативных последовательностей гемагглютинаина и M2 белка

Л. М. Цыбалова<sup>1</sup> (sovet@influenza.spb.ru), Л.А. Степанова<sup>1</sup>,  
Р.Ю. Котляров<sup>2</sup>, Е. А. Блохина<sup>2</sup>, М.А. Шуклина<sup>1</sup>, Е.С. Марданова<sup>2</sup>,  
А. В. Коротков<sup>1</sup>, М. В. Потапчук<sup>1</sup>, Н. В. Равин<sup>2</sup>

<sup>1</sup> ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, Санкт-Петербург

<sup>2</sup> ФГУ «ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

### Резюме

Разработка универсальной вакцины против гриппа – вакцины, направленной на все субтипы вирусов гриппа человека, – является наиболее актуальной современной задачей в специфической профилактике гриппа. В настоящей статье дана сравнительная характеристика специфической активности нескольких вариантов рекомбинантного вакцинного белка, включающего антигенные детерминанты вируса гриппа – эктодомен белка M2 (M2e) и фрагмент второй субъединицы гемагглютинаина (аминокислотная последовательность 76 – 130). В качестве белка-носителя и адъюванта был выбран флагеллин – белок *Salmonella typhimurium* как полноразмерный, так и с deletированной гипервариабельной частью.

На экспериментальных животных показана высокая иммуногенность препаратов и способность предотвращать летальность при инфицировании вирусом гриппа. Наибольшей протективностью обладал гибридный белок Flg-HA2-4M2 – полноразмерный флагеллин с HA2 (76 – 130) и M2e на C-конце. Препарат обеспечивал 100% выживаемость при заражении высокой дозой вируса гриппа A(H3N2) – 10 LD50. Белки, содержащие только полноразмерный флагеллин с M2e или укороченную форму флагеллина с M2e на C-конце и с HA2 в гипервариабельном участке, защищали 75% животных от летальной инфекции. Белок Flg-HA2-4M2 перспективен для дальнейшего исследования в качестве вакцины.

**Ключевые слова:** грипп, вакцинация, рекомбинантный белок, иммуногенность, протективность

### Strengthening the Effectiveness of the Candidate Influenza Vaccine by Combining Conserved Sequences of Hemagglutinin and M2 protein

L.M. Tsybalova<sup>1</sup> (sovet@influenza.spb.ru), L.A. Stepanova<sup>1</sup>, R.Yu. Kotlyarov<sup>2</sup>, E.A. Blokhina<sup>2</sup>, M.A. Shuklina<sup>1</sup>,  
E.S. Mardanova<sup>2</sup>, A.V. Korotkov<sup>1</sup>, M.V. Potapchuk<sup>1</sup>, N.V. Ravin<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Federal State Budget Institution Research «Institute of Influenza» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg

<sup>2</sup> Federal State Institution «The Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences, Moscow

### Abstract

The development of universal influenza vaccine – a vaccine directed to all subtypes of human influenza A viruses – is the really actual problem task. This paper presents the comparative characteristic of the specific activity of various recombinant proteins consisting of antigenic determinants of influenza A virus – the ectodomain of the M2 protein (M2e) and a fragment of the second subunit of the hemagglutinin (the amino acid sequence 76 – 130). Flagellin – *Salmonella typhimurium* protein was used as carrier protein and as adjuvant. We use two forms of flagellin: full size and with deleted hypervariable region. The proteins showed high immunogenicity, and the ability to prevent lethal infection of influenza virus in mice. Full-length flagellin with HA2 (76 – 130) and M2e on the C-terminus (protein Flg-HA2-4M2e) demonstrated the most protective properties. It provides 100% survival immunized mice that were challenge with a high dose of influenza A (H3N2) – 10 LD50. Proteins containing only full sized flagellin with M2e or flagellin truncated form with M2e at the C-terminus and HA2 within the hypervariable region, protected 75% of animals from lethal infection. Protein Flg-HA2-4M2e is promising for further study as a vaccine.

**Key words:** influenza, vaccination, recombinant protein, immunogenicity, protection

### Введение

Главная задача в области профилактики гриппа в настоящее время заключается в создании вакцин, эффективных против широкого круга вирусов. Преимущество такого рода универсальных вакцин над традиционными очевидно: отсутствует необходимость в ежегодном получении новых реассортантов и обновлении штаммового состава вакцин; исключаются случаи несоответствия циркулирующих в конкретном сезоне вирусов и вирусов, вошедших

в состав вакцин; исключается отставание в разработке нужного количества вакцин от скорости распространения нового вируса; не требуется ежегодная вакцинация населения.

Постановка задачи создания универсальных вакцин стала возможной благодаря появлению ДНК рекомбинантных технологий. Они позволили перейти от базисного правила создания вакцин Л. Пастера: «выделить микроорганизм, инактивировать и ввести в макроорганизм» к методам, так

называемой, «обратной вакцинологии» [1], в основе которых лежит анализ *in silico* всех белков инфекционного агента и выбор в качестве иммуногенов тех, что отвечают целям разрабатываемой вакцины. По отношению к вакцинам, защищающим от всех субтипов вируса гриппа А, такими белками могут быть внутренние вирусные белки, общие для разных субтипов.

В силу высокой консервативности и обильной презентации на инфицированных клетках, эктодомен белка М2 (М2е) – один из наиболее популярных кандидатов для создания универсальных вакцин [2 – 5]. Рядом авторов была показана, в том числе и в клинических исследованиях, высокая иммуногенность конструкций с М2е на разных белковых носителях: флагеллине, коровом антигене вируса гепатита В, Р-белке норовируса, на наночастицах золота и т.д. [3, 5 – 7]. Большинство кандидатных вакцин с М2е ускоряло выздоровление при последующем заражении вирусами гриппа, уменьшало выраженность симптомов, предотвращало гибель лабораторных животных. Вместе с тем, очевидно, что для более полного купирования инфекции необходимо комбинировать М2е с другими белками, индуцирующими вирус-нейтрализующие антитела (АТ). Одна из стратегий создания вакцин широкой направленности заключается во включении в состав вакцинного белка второй субъединицы гемагглютинаина (НА2). В отличие от первой субъединицы гемагглютинаина (НА1) вторая субъединица (стебель) менее подвержена мутациям и является более консервативной [8]. Показано, что антитела к М2е и эпитомам НА2 защищают от инфекции при пассивном переносе сывороток от иммунных животных [9] и что комбинация этих эпитопов в одном препарате делает его более эффективным и универсальным [10].

Значимость НА2 специфических антител для гетеросубтипической защиты обусловлено их кросс-реактивностью, которая реализуется несколькими путями: НА2 специфические антитела ингибируют слияние вирусной и клеточной мембран, предотвращают конформационные изменения НА, индуцируемые низким рН, блокируют процесс внедрения пептида слияния в эндосомальную мембрану. Ряд авторов показали эффективность включения в вакцину укороченного фрагмента НА2, содержащего пептид слияния и большую  $\alpha$ -спираль [8, 11]. Нейтрализующие АТ к эпитомам НА образуются при вакцинации и естественной инфекции, но относительно в небольшом количестве. Предполагается, что эти АТ бустировались во время пандемии 2009 года и внесли вклад в затухание циркуляции сезонных (допандемических) вирусов гриппа А(Н1N1).

Вместе с тем, и М2е, и НА2 76 – 130, имея небольшой молекулярный вес, являются сами по себе слабыми иммуногенами и нуждаются в крупной молекуле-носителе. В качестве белкового носителя вирусных пептидов был взят флагел-

лин – жгутиковый белок *Salmonella typhimurium*. Флагеллин обладает выраженными адьювантными свойствами, так как является лигандом TLR5 и через адаптерный белок MyD88 активирует клетки CD4+ и дальнейшую индукцию синтеза специфических иммуноглобулинов. Еще одним преимуществом флагеллина как носителя является возможность введения гибридных белков на его основе интраназально.

**Цель настоящего исследования** состояла в создании рекомбинантных белков, включающих консервативные для вируса гриппа А антигенные детерминанты и в оценке их иммуногенности и протективности.

### Материалы и методы

**Конструирование и экспрессия рекомбинантных белков.** В качестве консервативных пептидов вируса гриппа, предназначенных для включения в состав рекомбинантных вакцинных белков, были выбраны:

**M2h** – консенсусная последовательность протеина М2е штаммов вируса гриппа А человека: SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD;

**M2k** – М2е вируса птичьего высоко патогенного гриппа А/Kurgan/05/2005 H5N1: SLLTEVETPTRNEWECRCSDDSSD;

**HA2** – консенсусная аминокислотная последовательность (ак 76 – 130) второй субъединицы НА вирусов гриппа А субтипов Н3 и Н7, относящихся ко второй филогенетической группе: RIQDLEKYVED TKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFETRRL RENA.

Соответственно на основе флагеллина были сконструированы три белка:

**Fig-4M2e** – молекула флагеллина с присоединенными на С конце двумя копиями М2к в последовательности М2h-М2к-М2h- М2к;

**Fig-HA2-4M2e** – последовательность флагеллина, к которой на С конце присоединен консенсусный фрагмент для субтипов Н3 и Н7 второй субъединицы (ак 76 – 130) НА и последующие 4 копии М2е (М2h-М2к-М2h- М2к);

**FigSh-HA2-4M2e** – молекула флагеллина, в которой гипервариабельная (ГВ) часть заменена на консенсусный фрагмент второй субъединицы НА (ак 76-130) вирусов гриппа А II филогенетической группы. К С-концу присоединены 4 копии М2е пептида от человеческих и птичьего вирусов.

Аминокислотная последовательность НА2 разных вирусов была взята из баз данных GISAID и GenBank. Последовательности выравнивали с использованием сервера MAFFT и алгоритмов FFT-NS-i, FFT-NS-2 и анализировали в программном пакете Unipro UGENE v.1.14.0. Поиск экспериментальных В- и CD4+ Т-клеточных эпитопов, гомологичных участкам НА2, проводили в базе данных Immune Epitope Database. Поиск вероятных Т-клеточных эпитопов осуществляли с использованием NetCTLpan1.1 Server.

Искусственно созданные гены, кодирующие химерные белки, вводили в плазмиду pQE30 (Qiagen) с помощью стандартных генно-инженерных методов. Были получены экспрессионные векторы: pQE30-Fig-4M2e, pQE30-Fig-HA2-4M2e, pQE30-FigSh-HA2-4M2e. Для создания штаммов-продуцентов рекомбинантных белков соответствующими экспрессионными векторами трансформировали штамм *E. coli* DLT1270 – производный от штамма DH10B, в хромосому которого интегрирован ген репрессора лактозного оперона *lacI*. Культуры штаммов-продуцентов выращивали в среде LB при 37 °С, при достижении оптической плотности культуры OD 600 ~ 0,5 – 0,6 в среду вносили IPTG (до 0,1 мМ). Штаммы-продуценты рекомбинантных белков культивировали далее 12 – 14 часов при 28 °С (Fig-4M2e), 4 часа при 28 °С (Fig-HA2-4M2e), либо в течение ночи при 30 °С (FigSh-HA2-4M2e). От клеточного лизата белки очистили с помощью металло-аффинной хроматографии на Ni сорбенте. Белковые препараты анализировали с помощью SDS-PAGE.

**Электрофорез и иммуноблот.** Электрофорез в полиакриламидном геле (ЭФ в ПААГ) проводили в денатурирующих условиях по методу Лэммли. Подробное описание методики приведено ранее [4]. Полосы рекомбинантных белков определяли окрашиванием мембраны мышинными моноклональными анти-M2e AT 14C2 (ab5416, Abcam, UK) и кроличьим поликлональными AT, специфичными для бактериального флагеллина (ab93713, Abcam, UK). Мембрану инкубировали 1 час при комнатной температуре с первичными антителами, разведенными в ФБР с 0,1% Твин 20 (ФБРТ) и 3% БСА, затем отмывали в ФБРТ. Белки выявляли окрашиванием мембраны в течение 1 часа при комнатной температуре вторичными антителами (козы анти-мышинные IgG, Abcam, UK), меченными пероксидазой хрена и последующей инкубацией в течение 5 мин с субстратом ТМВ (тетраметилбензидин) Immunoblot solution (Invitrogen, США).

**Лабораторные животные. Иммунизация.** В исследовании были использованы линейные мыши (самки) Balb/c массой 18 – 20 г (возраст 6 – 8 недель), полученные из питомника «Столбовая» ГУ «Научный центр биомедицинских технологий» РАН. Животных содержали в виварии ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России в соответствии с действующими правилами. Мышей иммунизировали интраназально рекомбинантными белками в дозе 6 мкг/0,1 мл трехкратно с интервалом 3 нед. Иммунизацию проводили после ингаляционной анестезии смесью 2 – 3 % изофлюран, 30 % O<sub>2</sub>, 70 % N<sub>2</sub>O. Контрольным мышам вводили и/н 0,1 мл ФБР. Все исследования проводили в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)». Протокол опыта был утвержден Комиссией по биоэтике ФГБУ «НИИ гриппа»

(протокол заседания Комиссии по биоэтике №10/1 от 14 марта 2016 г.).

**Получение сывороток крови и бронхоальвеолярных лаважей.** Образцы крови и бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) получали от пяти мышей каждой группы через 2 недели после третьей иммунизации, после эвтаназии в CO<sub>2</sub>-камере (Vet Tech Solutions, Великобритания). Для получения сыворотки кровь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37 °С. После образования сгустков крови образцы помещали на поверхность льда и охлаждали в течение 1 ч с последующим центрифугированием в течение 15 мин при 400 g. Аликвоты сыворотки крови (по 30 мкл) замораживали при температуре –20 °С. Для получения БАЛ труп животного фиксировали на операционном столике. Производили разрез кожи по средней линии от нижней челюсти. В нижнюю часть трахеи в направлении легких вводили катетер на глубину 3 – 5 мм. Дважды промывали бронхи и легкие 1 мл ФБР. БАЛ центрифугировали в течение 15 мин при 400 g, отбирали аликвоты надосадка и замораживали их при температуре –20 °С.

**Иммуноферментный анализ.** Сыворотки и БАЛ исследовали в ИФА с использованием 96-луночных планшет (Greiner, Германия). Титры антител определяли индивидуально у 5 мышей каждой группы. В качестве твердой фазы использовали синтетические пептиды (5мкг/мл), синтезированные в НПО «Верта», Санкт-Петербург : M2ek SLLTEVETPTRNEWECRCSDDSSD (M2e вируса гриппа А/Курган/05/05 (H5N1), M2eh SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD (консенсусная последовательность M2e вирусов гриппа А человека), или очищенный вирус А/Аичи/2/68 (H3N2) (2 мкг/мл) в ФБР (рН 7.2). Планшеты выдерживали в течение ночи при 4 °С. ИФА проводили по ранее описанной методике [4].

**Вирусы и заражение мышей.** На 14-й день после последней иммунизации мышам Balb/c (по 8 мышам в опытных и контрольной группах) заражали адаптированным к мышам вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2), полученным из Коллекции вирусов гриппа и ОРЗ ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, в дозе 10LD<sub>50</sub>. Вирус А/Аичи/2/68 (H3N2) был адаптирован к мышам путем серии пассажей (мышь/куриный эмбрион). Вирус сохранил антигенные свойства исходного дикого штамма, но приобрел способность летально инфицировать мышам. Вирус вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии. После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными. Протективное действие рекомбинантных белков оценивали по динамике падения массы тела, выживаемости мышам после заражения и репродукции вируса в легких. В качестве отрицательного контроля в эксперименте использовали мышам, которым вводили 0,1 мл ФБР.

**Репродукция вирусов гриппа в легких.** На 6-ые сутки после заражения у 3 мышам из каждой группы после эвтаназии забирали легкие. Легкие го-

могенизировали, центрифугировали в течение 15 мин при 3000 об/мин. До начала работы все образцы были заморожены и хранились при температуре  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Выделение вируса проводили титрованием легочной суспензии мышей на культуре клеток MDCK. Клетки заражали серийными десятикратными разведениями легочного гомогената (в квадрипликатах) от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$  и инкубировали в термостате ( $36,0 \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) в течение 72 часов. Уровень репродукции вируса в культуральной жидкости оценивали в реакции гемагглютинации эритроцитов с 1% взвесью в физиологическом растворе. Инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Рида и Менча (1938 г.). За титр вируса принимали величину, противоположную десятичному логарифму наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную реакцию гемагглютинации и выражали в логарифмах 50% тканевой цитопатической инфекционной дозы вируса ( $\text{lg TЦИД}_{50}$ ).

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism v 6.0. Статистическую значимость различий титров антител оценивали с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни и сравнение показателей выживаемости – критерия Манта–Кокса. Различия считали значимыми при  $p < 0.05$ .

**Результаты и их обсуждение**

В процессе работы были синтезированные химерные гены, которые кодировали 3 белка, включающие молекулу флагеллина (полноразмерную или с удаленной гипервариабельной частью), эктодомены M2 белка высоко патогенного вируса грип-

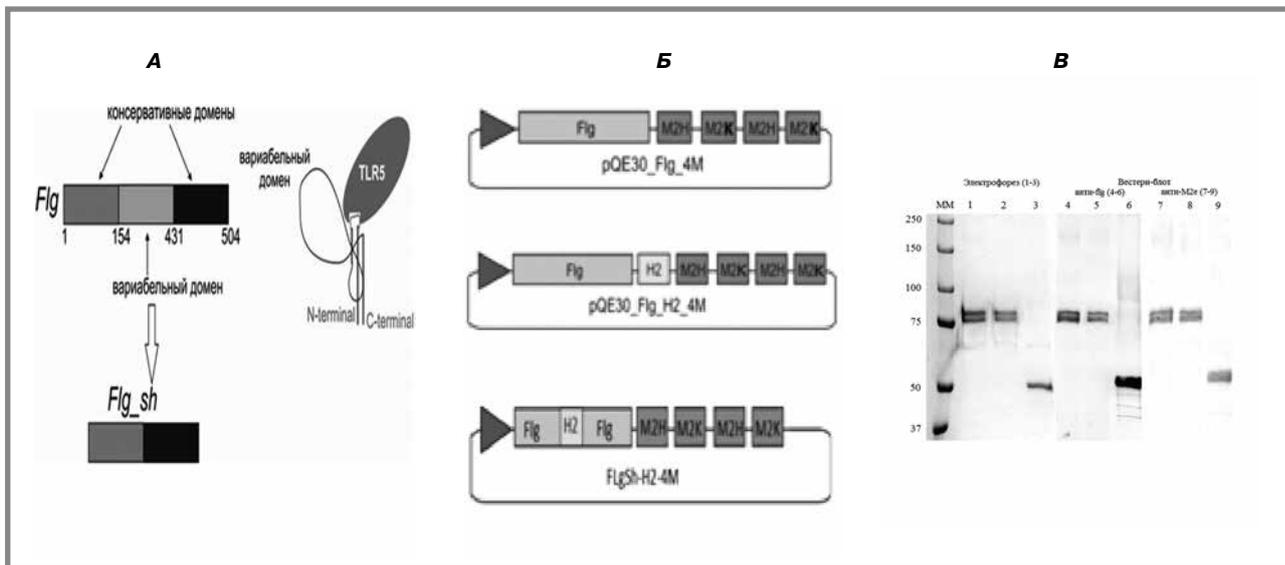
па птиц A(H5N1) и консенсусную аминокислотную последовательность M2e вирусов гриппа человека, а также аминокислотную последовательность 76 – 130 второй субъединицы гемагглютинаина, консенсусную для вирусов гриппа А субтипов H3 и H7. Последовательность расположения пептидов в рекомбинантных вакцинных белках представлена на рис. 1А.

Выбор консенсусной последовательности гемагглютинаина субтипов H3 и H7 вируса гриппа обусловлен их эпидемической значимостью. Вирус A(H3N2) циркулирует в человеческой популяции с 1968 года, вызывая практически ежегодно эпидемии гриппа. Вирус А (H7N9) – один из вирусов природного резервуара, рассматривается специалистами как возможный донор генов для будущего пандемического вируса [12].

Последовательность HA2 76 – 130 представляет собой большую -спираль, эпитопы которой является мишенью для моноклональных антител [3, 8]. Аминокислотная последовательность фрагмента 76 – 130 HA2 двух субтипов H3 и H7 имеет гомологию в 63,6%; с учетом замен на аминокислоты с аналогичными физико-химическими свойствами гомология составляет 80%.

Оба целевых пептида M2e и HA2 имеют Т-клеточные (CD4+, CD8+) и В-клеточные эпитопы. К настоящему времени получен ряд моноклональных антител (mAb), реагирующих с В-клеточными эпитопами M2e и HA2 (76 – 130). Так, mAb 12D1, взаимодействуют с ак 76 – 106 и обладают нейтрализующей способностью в отношении вирусов A(H3N2) 1968 – 2003 годов циркуляции [8]. Моноклональные антитела FE1, специфичны к участку 125 – 175 HA2 и ингибируют фьюзоген-

**Рисунок 1.** *Схема молекулы флагеллина (А) и экспрессионных векторов (Б), содержащих химерные гены гибридных белков. Электрофорез рекомбинантных белков после хроматографической очистки на Ni сорбенте (1 – 3) (В)*



Примечание: Вестерн-Блоттинг рекомбинантных белков (4 – 9). Дорожка HM-маркеры молекулярного веса в кДа Дорожки: 1, 4, 7 – белок Flg HA2-4M2e; 2, 5, 8 – белок Flg 4M2e; 3, 6, 9 – белок FlgSh-HA2-4M2e.

ную активность вируса гриппа А [14]. МАТ CR6261 ингибируют рН-индуцированное конформационное изменение вирусов гриппа Н1 и Н5 и обладают нейтрализующей активностью [4], взаимодействует преимущественно с  $\alpha$ -спиралью HA2. Для М2е еще в 1980-е годы было получено МАТ 14С2, взаимодействующее с аминокислотной последовательностью 1 – 10.

После трансформации *E. coli* плазмидами, содержащими химерные гены, были получены три белка: FlgHA-4M2e, FlgShHA-4M2e, Flg4M2e. В белке FlgShHA-4M2e (см. рис. 1А) переменная часть Flg была заменена на ак 76 – 130 от второй субъединицы HA вирусов гриппа филогенетической группы II. Как видно на рисунке 1Б в белках FlgHA-4M2e и Flg4M2e целевые белки находятся на С-конце флагеллина. Последовательность аминокислот в пептиде М2е вируса птиц А(Н5N1), по сравнению с консенсусной последовательностью аминокислот вирусов гриппа человека отличается на 3 аминокислоты в положениях 8 (Т → I), 15 (Е → G) и 19 (S → N); по сравнению с М2е вируса А/Калифорния/05/09, имеет одну лишь замену N12S и индуцирует антитела, хорошо взаимодействующие с М2е вируса А (Н1N1)pdm09 [15].

Теоретическая молекулярная масса белков Flg4M2e, Flg-HA2-4M2e и FlgSh-HA2-4M2e составляла 66 кДа, 73,9 кДа и 55 кДа соответственно, что

совпадало с электрофоретической подвижностью этих белков в ПААГ (рис. 1В).

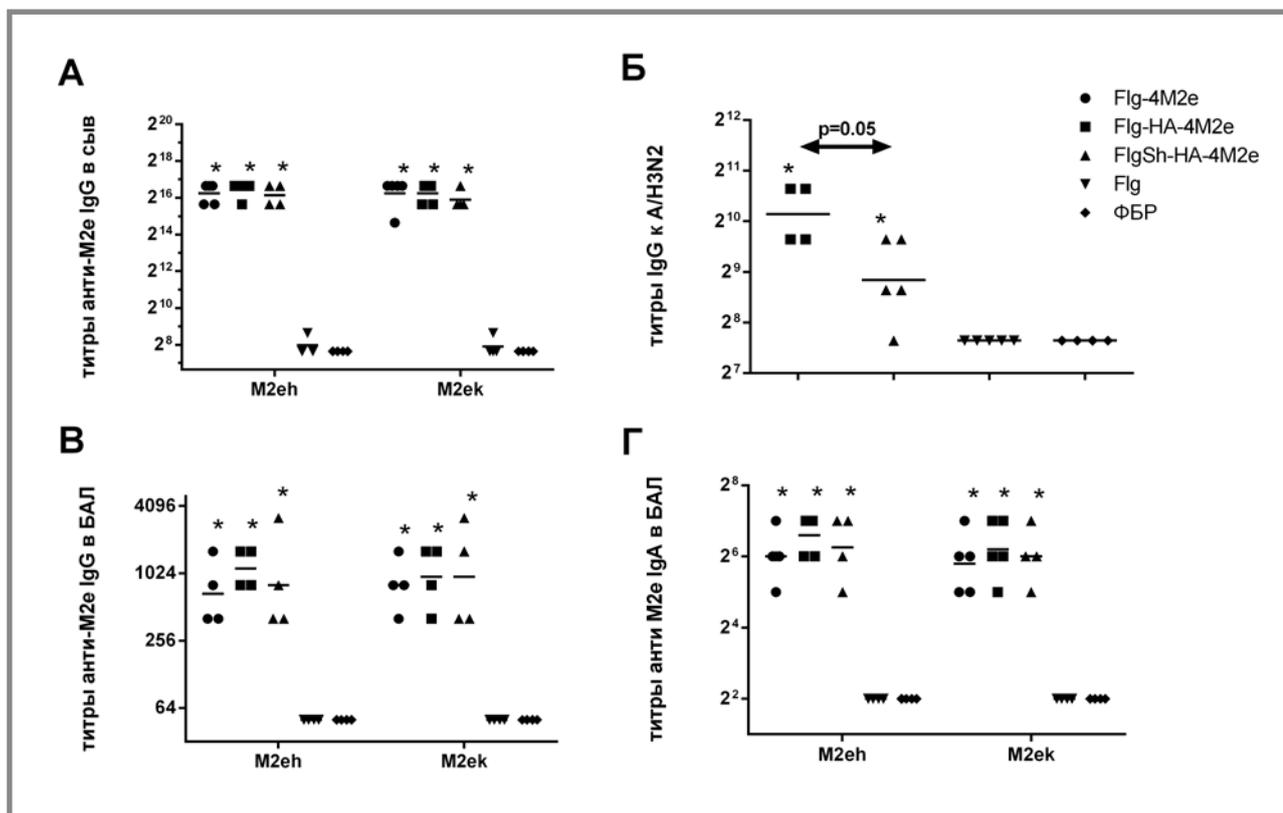
Подлинность белков была подтверждена в Вестерн-блоттинге. Очищенные с помощью хроматографии белки взаимодействовали с М2е специфическими моноклональными антителами 14С2 и антителами к флагеллину (см. рис. 1В).

Иммуноферментный анализ сывороток крови мышей, иммунизированных вакцинными белками с разной локализацией HA2, выявил взаимодействие с синтетическими пептидами М2еh и М2еk до титров 1:60 000 – 1:90 000 с отсутствием статистически достоверных различий в уровнях анти-М2е IgG (см. рис. 1А). Таким образом, удаление гипервариабельной части в молекуле Flg и замена ее на HA2 не отразились на уровне индуцируемых М2е-специфических антител. Это логично, так как показано, что лиганды TLR 5, активизирующие клетки врожденного иммунитета, а через них клетки CD4<sup>+</sup> и далее образование специфических антител, расположены именно в консервативной части молекулы флагеллина [16].

Иммунный ответ привитых мышей на HA2 также оценивали в реакции иммуноферментного анализа. Как видно на рисунке 2Б, более высокие титры IgG (1:1100) обнаружены в сыворотках мышей, привитых белком с локализацией HA 76 – 130 в гипервариабельной части молекулы флагеллина ( $p < 0,01$ ). В

**Рисунок 2.**

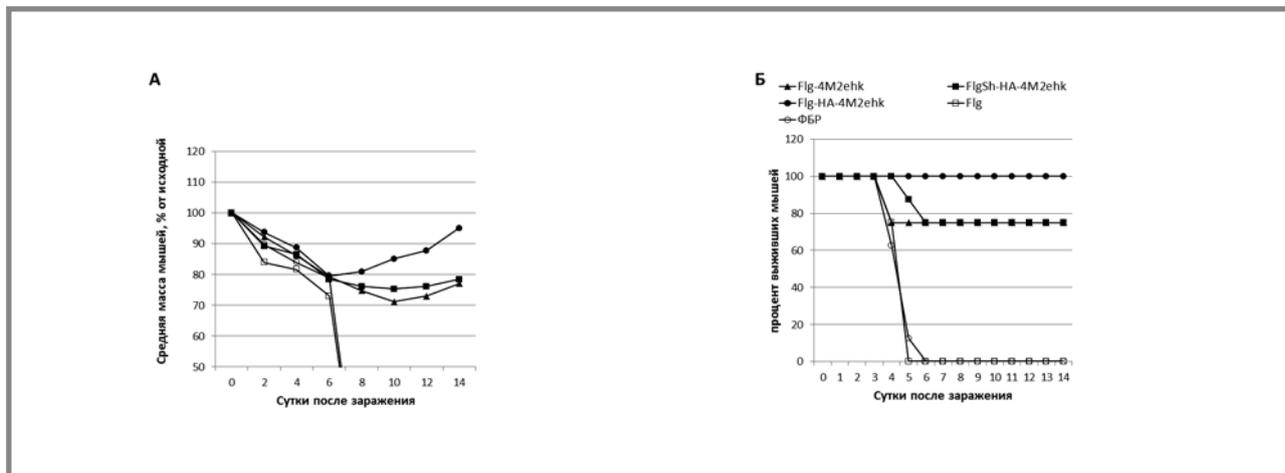
**Среднее геометрическое титров IgG в сыворотке (А) и БАЛ (В) к синтетическим пептидам М2еk (М2е Курган), М2еh (М2е человек); СГТ IgG в сыворотке к А(Н3N2) (Б) после третьей иммунизации (интраназальное введение)**



Примечание: Достоверных различий между опытными группами нет. Достоверное отличие от контрольных групп  $p < 0.01$ .

**Рисунок 3.**

**Динамика массы тела (А) и гибели (Б) мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, после заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10LD<sub>50</sub>**



Примечание: Статистическую значимость определяли с помощью теста Манна-Уитни. Различия между опытными и контрольной группами статистически достоверны  $p < 0,05$ .

целом, белки, содержащие HA2, расширяли спектр специфических иммуноглобулинов, что предположительно должно было повысить их защитные свойства по сравнению с белком Flg 4M2e. Обладают ли образующиеся антитела вирус-нейтрализующими свойствами – предмет дальнейшего изучения. Также как и вопрос может ли последовательность 76 – 130 HA2, локализованная в гипервариабельной (ГВ) части молекулы флагеллина, индуцировать образование специфических клеток CD8+, как это было показано в отношении некоторых белков, встроенных в ГВ часть флагеллина [16].

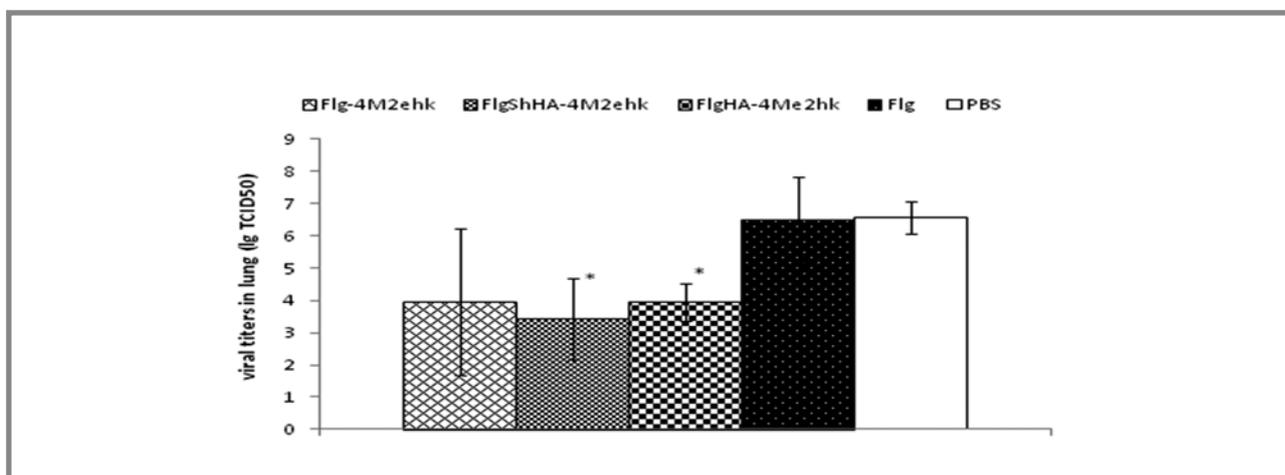
Уровни M2e-специфичных IgG и IgA в БАЛ после иммунизации каждым из трех кандидатных вакцинных белков не имели статистически значимых различий (рис. 2В, Г).

По данным литературы, основными защитными механизмами, индуцируемыми гибридными белками, содержащими пептиды с M2e и HA2, является антитело-зависимая цитотоксичность и комплемент-опосредованная NK-клеточная элиминация инфицированных клеток [3, 17], то есть вакцинные препараты на основе консервативных белков не предотвращают инфекцию, но значительно облегчают клиническую симптоматику заболевания и исключают летальные исходы.

Для ответа на вопрос: насколько иммунизация сконструированными белками защищает организм от последующей инфекции вирусом гриппа, было проведено заражение всех групп мышей высокой дозой (10LD<sub>50</sub>) вируса A/Aichi/2/68 (H3N2) (рис. 3 А, Б). При этом 100% выживаемость наблю-

**Рисунок 4.**

**Титры вирусов в легких мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, на 6-й день после заражения вирусом гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в дозе 10LD<sub>50</sub>**



Примечание: Данные выражены в виде Lg TCID50. Нижний предел обнаружения составляет 0,5 lg TCID50. Статистическую значимость определяли с помощью теста Манна-Уитни. \* $p \leq 0,05$  значения между вакцинированными и контрольными группами.

далась только у мышей, иммунизированных белком Flg-HA2-4M2e, сочетающим в себе HA2 (ак 76 – 130) и 4M2e на С-конце молекулы (см. рис. 3 Б). Иммунизация белками Flg 4M2e и Flg Sh-HA2-4M2e привела к 75% защите животных при 100% гибели мышей в контрольных группах. Высокий защитный эффект вакцинных белков подтверждает и быстрое восстановление веса животных (рис. 3А), а также существенное снижение на 6-й день болезни титров вируса в легких (на 2,5 – 3 lg) у привитых мышей, по сравнению с мышами контрольной группы (рис. 4).

### Выводы

1. Полученные конструкции рекомбинантных белков обладали высокой иммуногенностью и защитным эффектом. Наибольшую специфическую активность имел гибридный белок, состоящий из полноразмерного флагеллина с аминокис-

лотными последовательностями HA2 (76 – 130) и M2e на С-конце молекулы флагеллина.

2. Замещение гипервариабельной области флагеллина на пептид 76 – 130 второй субъединицы геммаглютинаина (HA2) не снижало уровень продукции M2e-специфических IgG и IgA. Вместе с тем, гуморальный ответ на пептид 76 – 130 HA2 был более выражен при локализации его в гипервариабельной части молекулы флагеллина, чем на С-конце.
3. Полученные результаты показали перспективность дальнейшей разработки рекомбинантного белка Flg4M2eHA в качестве вакцинного препарата.

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

### Литература/References

1. Sette A., Rappuoli R. Reverse vaccinology: Develocping vaccines in the Era of Genomics. *Immunity*. 2010; 33 (4): 530 – 541.
2. Ebrahimi S., Tebianian M. Influenza A viruses: why focusing on M2e-based universal vaccines. *Virus Genes*. 2011; 42: 1 – 8.
3. Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B. et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*. 2009; 27: 6280 – 6283.
4. Stepanova L., Kotlyarov R., Kovaleva A., Potapchuk M., Sergeeva M., Tsybalova L. Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin. *PLoS ONE*. 2015; 10 (3): 22.
5. Wang L., Hess A., Chang T., Wang Y., Wang Y.C., Champion J.A., Compans R.W. et al. Nanoclusters self-assembled from conformation-stabilized influenza m2e as broadly cross-protective influenza vaccines. *Nanomedicine*. 2013; 10: 473 – 482.
6. Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., Saelens X. Universal m2 ectodomain-based influenza a vaccines: Preclinical and clinical developments. *Expert Rev. Vaccine*. 2009; 8: 499 – 508.
7. Turley C., Rupp R., Johnson C., Taylor D., Wolfson J. et al. Safety and immunogenicity of a recombinant m2e-flagellin influenza vaccine (stf2.4xm2e) in healthy adults. *Vaccine*. 2011; 29: 5145 – 5152.
8. Wang, T., Tan, G., Hai R., Pica N., Ngai L., Ekiert D.C. et al. Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides protection against distinct viral subtypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010; 107: 18979 – 18984.
9. Corti D., Suguitan A., Pinna D., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B.M., Vanzetta F. et al. Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *J. Clin. Invest*. 2010; 120: 1663 – 1673.
10. Zang H., Wang L., Compans R., Wang B. Universal Influenza Vaccines, a Dream to Be Realized Soon. *Viruses*. 2014; 6 (5): 1974 – 1991.
11. Steel J., Lowen A., Wang T., Yondola M., Gao Q., Haye K. et al. Influenza virus vaccine based on the conserved haemagglutinin stalk domain. *MBio*. 2010; 1: 1 – 9.
12. Zhou L., Ren R., Yang L., Bao C., Wu J., Wang D. et al. Sudden increase in human infection with avian influenza A(H7N9) virus in China, Semptember-December 2016 Western Pac Surveill Response J. 2017; 8 (1): 1 – 9.
13. Ekiert D., Friesen R., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W. et al. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza a viruses. *Science*. 2011; 333: 843 – 850.
14. Gocnik M., Fislova T., Mucha V., Sladkova T. et al. *J. of General virology*. 2008; 89: 958 – 967.
15. Tsybalova L., Stepanova L., Kuprianov V., Blokhina E., Potapchuk M., Korotkov A. 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; 05: 3398 – 3406.
16. Bates J., Aaron H., James P., Jason M. Enhanced antigen processing of flagellin fusion proteins promotes the antigen-specific CD8+ T cell response independently of TLR5 and MyD88. *J. Immunol*. 2011; 186 (11):6255 – 62.
17. Jegerlehner N., Schmitz T., Storni M., Bachmann J. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J. Immunol*. 2004; 172: 5598 – 5605.

### ИНФОРМАЦИЯ МИНЗДРАВА

## Об утверждении порядка и сроков проведения профилактических осмотров граждан в целях выявления туберкулеза

Минюстом России зарегистрирован приказ Минздрава России от 21.03.2017 № 124н «Об утверждении порядка и сроков проведения профилактических осмотров граждан в целях выявления туберкулеза», разработанный совместно с профессиональным медицинским сообществом.

В соответствии с приказом для массового обследования детского населения в целях выявления туберкулеза будут использоваться кожные пробы с аллергенами туберкулезными (аллерген туберкулез-

ный очищенный в стандартном разведении – детям от 1 до 7 лет (включительно), аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении – детям от 8 до 14 лет (включительно)), а для детей в возрасте от 15 до 17 лет (включительно) – аллерген туберкулезный рекомбинантный в стандартном разведении) или рентгенологическое флюорографическое исследование органов грудной клетки (легких).

Источник <https://www.rosminzdrav.ru>: