

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА НА ГРИППОЗНУЮ ИНФЕКЦИЮ У ЖИВОТНЫХ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ВАКЦИНОЙ

Л.М. Цыбалова¹, Л.А. Степанова¹, М.А. Шуклина¹, А.В. Коротков¹,
М.В. Зайцева¹, В.И. Грищенко¹, Р.Ю. Котляров²

¹ ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Институт биоинженерии, ФГУ Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, Россия

Резюме. Создание кросс-реактивных вакцин, то есть вакцин, направленных на все субтипы вирусов гриппа А человека — это одна из приоритетных задач современной вакцинологии. Такого рода вакцины будут, в первую очередь, востребованы в предпандемический период и, кроме того, могут быть использованы для праймирования определенных категорий населения перед вакцинацией традиционными вакцинами из штаммов вирусов, актуальных в соответствующем эпидемическом сезоне. В отличие от традиционных вакцин универсальные не индуцируют стерилизующий иммунитет, но существенно снижают манифестацию инфекции и вероятность развития осложнений. Цель настоящей работы заключалась в оценке особенностей иммунного ответа экспериментальных животных, праймированных кандидатной универсальной вакциной, на последующую сублетальную инфекцию вирусом гриппа. Мышей иммунизировали интраназально рекомбинантным белком FlgH2-2-4M2e, содержащим консервативные пептиды двух белков вируса гриппа А: эктодомен белка М2 и аминокислотную последовательность 76–130 второй субъединицы гемагглютинина (НА2), генетически связанные с бактериальным белком флагеллином — лигандом Toll-подобных рецепторов пятого типа (TLR5). Мыши контрольной группы получали вместо кандидатной вакцины физраствор. Через 2 недели после иммунизации мыши обеих групп были заражены сублетальной дозой вируса гриппа А/Н3N2 А/Аichi/2/68. Через 2 недели после иммунизации и 1 месяц после заражения в сыворотках крови и смывах бронхоальвеолярных лаважей (БАЛ) были определены уровни иммуноглобулинов G и A. В легких определяли процентное содержание клеток CD4⁺ и CD4Tem (CD44⁺CD62L⁻), секретирующих цитокины TNFα, IFNγ, IL-2. На сублетальное заражение вирусом гриппа иммунизированные ранее мыши отвечали незначительной потерей массы тела, по сравнению с мышами контрольной группы, и более выраженной продукцией IgG и IgA в сыворотках крови и в смывах БАЛ как к пептидам, входящим в состав вакцинного препарата (M2e и aa76-130 НА2), так и к цельному вирусу гриппа А/Аichi/2/68. Количество CD4⁺ Т-клеток, секретирующих цитокины TNFα и/или IL-2 у иммунизированных мышей, значительно превосходили аналогичные пулы Т-клеток у неиммунизированных животных после заражения. Это относилось как к общим CD4⁺, так и к эффекторным Т-клеткам памяти. Именно CD4⁺ Т-клеткам памяти, по литературным данным, принадлежит ключевая роль в прайм-буст механизме действия вакцин и гетеросубтипоспецифическом иммунном ответе. В настоящем исследовании показан праймирующий эффект рекомбинантной кросс-протективной вакцины.

Ключевые слова: грипп А, рекомбинантная вакцина, экспериментальные животные, иммунный ответ.

Адрес для переписки:

Цыбалова Людмила Марковна
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, 15/17,
ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородиной МЗ РФ.
Тел./факс: 8 (812) 499-15-18.
E-mail: sovet@influenza.spb.ru

Contacts:

Liudmila M. Tsybalova
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Professora
Popova str., 15/17, Smorodintsev Research Institute of Influenza.
Phone/Fax: +7 (812) 499-15-18.
E-mail: sovet@influenza.spb.ru

Библиографическое описание:

Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Шуклина М.А., Коротков А.В.,
Зайцева М.В., Грищенко В.И., Котляров Р.Ю. Особенности иммунного
ответа на гриппозную инфекцию у животных, вакцинированных
универсальной вакциной // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 3–4.
С. 485–494. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-485-494

Citation:

Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Korotkov A.V., Shuklina M.A., Zaitseva M.V.,
Grishchenko V.I., Kotlyarov R.Yu. Features of immune response against influenza
infection in animals vaccinated with recombinant cross-protective vaccine //
Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9,
no. 3–4, pp. 485–494. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-485-494

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE AGAINST INFLUENZA INFECTION IN ANIMALS VACCINATED WITH RECOMBINANT CROSS-PROTECTIVE VACCINE

Tsybalova L.M.^a, Stepanova L.A.^a, Korotkov A.V.^a, Shuklina M.A.^a, Zaitseva M.V.^a, Grishchenko V.I.^a, Kotlyarov R.Yu.^b

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

^b Research Institute of Bioengineering, FIC «Fundamentals of Biotechnology» RAS, Moscow, Russian Federation

Abstract. Generating cross-reactive vaccines aimed at targeting all human influenza A virus subtypes is among high priority tasks in contemporary vaccinology. Such vaccines will be primarily demanded during pre-pandemic period as well as used to prime some population cohorts prior to vaccination with standard vaccines containing area-relevant epidemic virus. Unlike routine approach universal vaccines do not induce a sterilizing immunity, but significantly ameliorate overt infection and probable complications. Our study was aimed at evaluating characteristics of immune response in experimental animals primed with a candidate universal vaccine challenged with sublethal influenza A virus infection. Mice were immunized intranasally with the recombinant protein FlgH2-2-4M2e containing conservative peptides derived from two influenza A virus proteins: M2 protein ectodomain and 76–130 amino acid sequence from the second hemagglutinin (HA2) subunit genetically linked to bacterial flagellin protein, which is a ligand for Toll-like receptor 5 (TLR5). Control mice received saline. Two weeks after immunization, mice from both groups were infected with a sublethal dose of A/Aichi/2/68 AN3N2 influenza virus strain. Level of immunoglobulins G and A in the blood sera and bronchoalveolar lavages (BAL) were determined two weeks after immunization and 1 month post infection. Percentage of lung CD4⁺ T and CD4⁺ Tem (CD44⁺CD62L⁻) cells secreting cytokines TNF α , IFN γ , IL-2 was determined. Immunized vs. control mice responded to sublethal infection with the influenza virus by insignificant weight loss and more pronounced production of vaccine peptide-specific (M2e and aa76–130 HA2) and pan-influenza A/Aichi/2/68 virus IgG and A in the blood sera and BAL. After challenge the number of CD4⁺ T cells secreting cytokines TNF α and/or IL-2 in immunized mice significantly exceeded counterpart T cells in unimmunized animals that was true for both CD4⁺T and CD4⁺ Tem cells. Memory CD4⁺ T cells were previously shown to play a key role in the prime-boost event and heterosubtypic immune response. Thus, we were able to demonstrate a priming effect for recombinant cross-protective vaccine used in our experiment.

Key words: influenza A, recombinant vaccine, experimental animals, immune response.

Введение

В последнее десятилетие достигнуты значительные успехи в разработке так называемых «универсальных» вакцин, направленных на все субтипы вирусов гриппа А [4, 9, 20]. Две универсальные вакцины — Multimeric-001 (производство BiondVax) и Flu-v (производство компании SEEEK) — зарегистрированы [14], несколько находятся на стадии клинических исследований [20]. Вероятно, подобные вакцины или их улучшенные варианты в ближайшее время гриппа войдут в практику вакцинации против гриппа. Основное назначение таких препаратов — вакцинация населения в начальный период распространения пандемического вируса. Этот период характеризуется серьезным отставанием (в несколько месяцев) производства штаммоспецифических вакцин из пандемического вируса от начала эпидемий, вызванных этим вирусом.

Особенность универсальных вакцин состоит в том, что в их основе лежат консервативные белки/пептиды, с высокой степенью гомологии для вирусов гриппа А всех субтипов. Такие вакцины, в отличие от традиционных, содержащих поверхностные высоковариабельные вирусные белки, не обладают выраженным вируснейтрализующим эффектом, но способны значительно уменьшить манифестацию инфекции и предотвратить осложнения. Для их производства требуется несколько недель, и к началу эпидемии

в стране, вызванной пандемическим вирусом, может быть наработано достаточное количество доз для вакцинации населения. Второе возможное применение таких вакцин — праймирование отдельных контингентов населения перед сезонной вакцинацией. Показано, что иммунизация пожилых людей кросс-реактивной вакциной Multimeric-001 значительно улучшает иммунный ответ на последующую вакцинацию сезонной вакциной [2].

Вакцины на основе консервативных вирусных белков могут также быть использованы для праймирования маленьких детей. На фоне вакцинации универсальной вакциной заболевания будут протекать в облегченной форме и с полноценным иммунным ответом на все вирусные белки, а не только на поверхностные, как это происходит при вакцинации субъединичными вакцинами.

Цель настоящего исследования состояла в оценке особенностей иммунного ответа экспериментальных животных, праймированных универсальной вакциной, на последующую сублетальную инфекцию вирусом гриппа.

Материалы и методы

Рекомбинантный белок. Ген, кодирующий рекомбинантный белок Flg-HA2-2-4M2e, был сконструирован специалистами ФИЦ Биотехнологии РАН с использованием стандартных

методов генетической инженерии [24]. Белок Flg-NA2-2-4M2e содержит аминокислотную последовательность флагеллина из *Salmonella Typhimurium*, к которой на С-конце присоединен фрагмент второй субъединицы гемагглютинина — HA(aa76–130), консенсусный для вирусов гриппа А субтипов АН3 и АН7, относящихся ко второй филогенетической группе. Последовательность aa76–130 в нативном гемагглютинине входит в состав большой α -спирали и доступна с поверхности молекулы. За ним следуют 4 копии эктодомена белка М2 (М2е) вирусов гриппа А человека в сочетании М2h-М2s-М2h-М2s, где М2h — аминокислотная последовательность пептида М2е, консенсусная для вирусов гриппа А человека субтипов Н1N1, Н2N2, Н3N2; М2s — аминокислотная последовательность М2е пандемического вируса А/Н1N1/pdm09. Последовательности М2h и М2s отличаются друг от друга четырьмя аминокислотами и включение в белковую конструкцию обоих пептидов расширяет спектр защитного действия препарата. Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. Для конструирования вектора, экспрессирующего рекомбинантный белок Flg-NA2-2-4M2e, была использована плазида рQE30, куда клонировали нуклеотидную последовательность, кодирующую гибридный белок.

Экспрессия и очистка рекомбинантных белков. С целью получения штаммов, продуцирующих рекомбинантные белки, клетки *E. coli* штамма DLT1270 трансформировали плазмидой рQE30/Flg-NA2-4M2e. Штаммы-продуценты накапливали в среде LB с ампициллином до середины логарифмической фазы роста ($OP_{600} = 0,4–0,7$) при 37°C, затем добавляли IPTG до конечной концентрации 0,1 мМ и культивировали в течение еще 4 ч при 37°C. Клетки обрабатывали лизоцимом, рекомбинантные белки очищали из клеточного лизата с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni-сорбенте.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле (ПААГ) и вестерн-блот. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в восстанавливающих условиях проводили по методу Лэммли [16]. Электрофорез проводили при 12 мА до достижения фронтом красителя (бромфенолового синего)

нижнего края геля. Гель окрашивали в растворе Кумасси G-250 в течение ночи при качении. После окрашивания гель отмывали в бидистиллированной воде и документировали при помощи системы ChemiDoc MP System (Bio-Rad, США).

Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, США). Затем мембрану блокировали в 3% растворе БСА (бычий сывороточный альбумин) в течение ночи при комнатной температуре. Белки определяли окрашиванием мембраны мышинными моноклональными антителами к белку М2 вируса гриппа А (14С2, ab5416; Abcam, Великобритания) в разведении 1:16 000 и кроличьими поликлональными антителами к флагеллину (ab93713, Abcam, Великобритания) в разведении 1:8000. Мембрану инкубировали 1 ч при комнатной температуре с антителами, разведенными в PBS с 0,1% твин 20 (PBS-T) и 3% БСА, затем отмывали в PBS-T. Белок определяли окрашиванием мембраны в течение 1 ч при комнатной температуре козьими антимышиными или антикроличьими IgG, мечеными пероксидазой хрена (Abcam, Великобритания), в разведении 1:2000 и последующей инкубацией 5 мин в ТМВ (тетраметилбензидин) Immunoblot solution (Invitrogen, США).

Лабораторные животные. В исследовании были использованы линейные мыши (самки) Balb/c массой 16–18 г (возраст 6–8 недель), полученные из сертифицированного питомника Столбовая ГУ Научный центр биомедицинских технологий РАН. Животных содержали в виварии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева Минздрава России. Основные правила содержания и ухода соответствовали нормативам, изложенным в ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными». Протокол опыта был утвержден Комиссией по биоэтике Института.

Иммунизация и заражение экспериментальных животных. Мышей иммунизировали интраназально (и/н) рекомбинантным белком в дозе 10 мкг/0,02 мл трехкратно с интервалом 2 недели (рис. 1). Иммунизацию проводили после ингаляционной анестезии смесью 2–3% изофлюран, 30% O₂, 70% N₂O. Контрольным мышам вводили и/н 0,02мл PBS.



Рисунок 1. Схема проведения эксперимента на мышах

Figure 1. The scheme of the experiment in mice

Для заражения мышей был использован штамм вируса гриппа, адаптированного к мышам, — A/Aichi/2/68 (H3N2). Мышей заражали сублетальной дозой (100 мышинных инфицирующих доз — MID100) вируса гриппа A/Aichi/2/68 на 14 день после последней иммунизации. Вирус вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии. В качестве отрицательного контроля в эксперименте использовали мышей, которым вводили PBS. После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными в течение 14 суток. Протективное действие рекомбинантного белка оценивали по динамике массы тела. В течение двухнедельного периода ежедневно в одно и то же время измеряли массу тела животных.

Получение сывороток крови и бронхоальвеолярных лаважей (БАЛ). Через 2 недели после третьей иммунизации (42 день исследования) и через месяц после заражения (72 день исследования) производили тотальный забор крови от пяти из десяти мышей каждой группы, соответственно, после их эвтаназии в CO₂-камере (VetTech Solutions, Великобритания). Полученную кровь инкубировали в течение 30 мин при температуре 37°C. Образцы крови с образовавшимися сгустками помещали на поверхность льда и охлаждали в течение 1 ч, затем центрифугировали в течение 15 мин при 400g. Аликвоты сыворотки крови (по 30 мкл) замораживали и хранили до использования при температуре –20°C. Бронхоальвеолярные смывы получали на 42 день исследования от мышей после эвтаназии путем двукратного промывания трахеи 500 мкл буферного раствора посредством IV катетера (BD Bioscience, США) и хранили до использования также при t = –20°C.

Получение суспензии клеток легких. Мышечные легкие получали через 2 недели после третьей иммунизации и через месяц после сублетального заражения. Легкие удаляли асептически и помещали в пробирки типа «эппендорф» со средой RPMI-1640 содержащей 0,5 мг/мл коллагеназы (Sigma, C2674) и 25 мкг/мл ДНКазы (Sigma, D4263). Легкие гомогенизировали с использованием TissueLyser II, помещали в термошейкер (45 мин, 37°C) и избавлялись от дебриса путем фильтрации (фильтрующие шприцы с диаметром пор 70 мкм, BD Biosciences, США). Эритроциты лизировали АСК буфером (0,15M NH₄Cl, 1,0M KHCO₃, 0,1 mM Na₂EDTA, pH 7,2–7,4) альвеолярные макрофаги отмывали полной средой RPMI-1640 с 10% ЭТС, 2 mM L-глутамина, 100 IU/ml пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина. Концентрацию клеток доводили до 5 × 10⁶ кл/мл.

Иммуноферментный анализ. Сыворотки и БАЛ исследовали в ИФА с использованием 96-луночных планшет (Greiner, Германия). Титры антител определяли индивидуально у 5 мышей каждой группы. В качестве твердой фазы использовали синтетический пептид (G-37) —

5 мкг/мл, содержащий последовательности пептида M2e, консенсусного для вирусов гриппа человека (5мкг/мл), синтезированный в «НПО Верта» (Санкт-Петербург) или очищенный вирус A/Aichi/2/68 (H3N2) — 2 мкг/мл. Планшет блокировали фосфатным буферным раствором с 5% ЭТС. Использовали поликлональные овечьи антимышинные IgG и IgA (Abcam, Великобритания), меченые пероксидазой хрена. Для определения субклассов IgG также использовали поликлональные меченные пероксидазой хрена овечьи IgG1, IgG2a (Abcam, Великобритания). В качестве субстрата использовали ТМБ (тетраметилбензидин) (BD Bioscience). После инкубации в течение 15 мин проводили учет реакции на микропланшетном ридере I-Mark (BioRad) при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое давало оптическую плотность, по крайней мере, в 2 раза большую, чем бланк.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА). РТГА проводили в соответствии с Методическими рекомендациями «Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация» (М., 2006). Сыворотку, предварительно обработанную RDE (рецептор-деструктурирующий фермент) и разведенную PBS, вносили в первый ряд 96-луночного микроплшета с U-образными лунками. Далее готовили ряд последовательных двукратных разведений сыворотки в объеме 50 мкл и добавляли по 50 мкл вируса в стандартной концентрации 4ГАЕ/50 мкл. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре во все лунки вносили по 100 мкл 0,5% взвеси эритроцитов. Через 30 мин проводили учет результатов реакции. Титр антигемагглютинирующих антител выражали как величину, обратную наибольшему разведению сыворотки, при котором наблюдалось торможение агглютинации.

Мультипараметрическая проточная цитометрия. Мультипараметрическую проточную цитометрию выполняли в соответствии с протоколом BD Pharmingen™. В легких определяли CD4⁺ Т-лимфоциты, продуцирующие цитокины, после стимуляции одним из вирусных пептидов M2e или HA aa76–130, или вирусом гриппа A/Aichi/2/68. Клетки стимулировали в течение 6 ч при 37°C в присутствии брэфелдина А (1 мкг/мл) (BD Bioscience, США). После отмывания клеток полной средой RPMI, Fc-рецепторы блокировали антителами CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, BD Pharmingen, США), затем инкубировали с Zombie Aqua (Zombie Aqua Fixable Viability Kit, Biolegend, США) для выявления живых клеток. Клетки окрашивали CD3a-FITC, CD4 PerCP, CD62L-PE-Cy7, CD44-APC (BD Pharmingen, США) при температуре +2...+8°C в течение 30 мин. Затем клетки пермеабелизировали в соответствии с Протоколом тест-системы Cytotfix/Cytoperm Plus (BD Bioscience, США) и окраши-

вали TNF α -BV421, IFN γ -PE (BD Pharmingen, США), IL-2. Сбор данных (собирали 100 000 живых CD3⁺ лимфоцитов) выполняли на проточном цитометре BD FACS Canto II (Becton Dickinson, США). Данные анализировали в программном пакете Kaluza, версия 1.5a (Beckman Coulter, США).

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism v6.0. С учетом положительных результатов проверки данных на нормальность распределения (тест Колмогорова–Смирнова) статистическую значимость различий титров антител и антигенспецифических Т-клеток оценивали с использованием t-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p > 0,05$.

Результаты

Подлинность рекомбинатного белка Flg-NA2-2-4M2e была подтверждена методом электрофореза и в Вестерн-блоте. Электрофоретическая подвижность белка в ПААГ соответствовала рассчитанной молекулярной массе — 73,9 kDa, а очищенный белок взаимодействовал с моноклональными анти-M2 антителами (14C2) и поликлональными антителами к флагеллину.

Наружный фрагмент M2 белка (M2e) вирусов гриппа А является слабым иммуногеном в силу малого размера (24aa). Поэтому после естественной инфекции или вакцинации антитела (АТ) к этому белку если и определяются, то в незначительных количествах и преимущественно у лиц пожилого возраста [27]. Это подтверждается и в настоящем исследовании низкими уровнями сывороточных IgG и IgA в ответ на сублетальную инфекцию у неиммунизированных мышей (контрольная группа) (рис. 2, А–Г). У мышей, предварительно иммунизированных рекомбинантным белком (кандидатной вакциной), вирусная инфекция вызывала рост анти-M2e IgG и IgA как в сыворотках крови, так и в БАЛ (рис. 2, А–Г). Антитела в РТГА после иммунизации рекомбинантным белком, содержащим участок стебля гемагглютинина, у мышей не определялись, но на вирусную инфекцию иммунизированные животные отвечали более высокими титрами IgG, направленными к целому вирусу (рис. 2Е).

Положительным фактом было также то, что у иммунизированных мышей после заражения соотношение субклассов IgG изменилось в сторону увеличения IgG2a (с 1,34% от суммарного значения IgG1 и IgG2a до 12,56%). Доказано, что именно IgG2a играют ключевую роль в антителозависимой цитотоксичности АЗЦТ [7, 18], одного из основных механизмов защиты подобного рода вакцин.

Помимо антительного ответа, иммунизация животных рекомбинантным белком Flg-NA2-2-4M2e индуцировала образование CD4⁺

Т-клеток (рис. 3А). Через две недели после иммунизации у мышей выявлялись M2e- и HA2-специфические Т-клетки, продуцирующие либо один из цитокинов — фактор некроза опухоли — 0,08% к M2e, либо два цитокина: фактор некроза опухоли (TNF α) и интерлейкин 2 (IL-2) (0,06%) к обоим пептидам. В ответ на стимуляцию цельным вирусом А/Н3N2 были выявлены CD4⁺ Т-клетки — продуценты TNF α (0,102) и CD4⁺ Т-клетки — продуценты TNF α и IL-2 (0,064). Иммунизация приводила также к появлению в легких мышей M2e-специфических CD4⁺ эффекторных Т-клеток памяти (Tem, CD44⁺CD62L⁻) (рис. 3Б), которые секретировали TNF α (0,2%) и TNF α и IL-2 (0,19%). Клетки CD4⁺Tem, специфические к HA2, относились преимущественно к двойным продуцентам TNF α +IL-2 (0,18%). На стимуляцию цельным вирусом клетки отвечали, в основном, также продукцией TNF α . Таким образом, после иммунизации увеличилось количество CD4 Т-клеток как общих, так и эффекторных, продуцирующих фактор некроза опухоли (TNF α) или одновременно TNF α и IL-2 к M2e пептиду, TNF α и IL-2 к пептиду HA2, а также увеличилось количество TNF α -продуцирующих клеток к целому вирусу.

Особенностями иммунного ответа иммунизированных мышей на вирусное заражение был гораздо более активный CD4⁺ Т-клеточный ответ по сравнению с неиммунизированными. В первую очередь это касалось увеличения количества M2e- и HA2-специфических CD4⁺ Т-клеток — продуцентов TNF α и TNF α +IL-2 (рис. 4А). Кроме того, появились клетки, продуцирующие одновременно IFN γ и TNF α , и клетки тройные продуценты: IFN γ +TNF α +IL-2.

Аналогичные результаты были получены и при оценке цитокинпродуцирующих M2e- и HA2-специфических эффекторных клеток памяти CD4⁺ Tem в легких. На рисунке 4Б представлены уровни эффекторных CD4⁺ Т-клеток памяти (Tem, CD44⁺CD62L⁻) через 1 месяц после заражения вирусом гриппа. По сравнению с неиммунизированными мышами у иммунизированных после стимуляции пептидами M2e и HA2 многократно увеличилось количество клеток, секретирующих один цитокин TNF α (2,0 и 0,27% соответственно), два цитокина TNF α +IL-2 (1,9 и 0,7%), появились продуценты двух цитокинов IFN γ +TNF α (0,3 и 0,1%) и также, как и у неиммунизированных мышей, стимуляция пептидами выявляла клетки памяти, продуцирующие три цитокина: IFN γ +TNF α +IL-2.

Эффект более сильного иммунного ответа на инфекцию у мышей, иммунизированных рекомбинантной кандидатной вакциной, отразился и в клиническом течении инфекции (рис. 5). У иммунизированных животных максимальная потеря веса — основного показателя состояния здоровья — составляла 6% на 7 день после за-

ражения, при этом вес полностью восстановился на 14 день, тогда как неиммунизированные мыши теряли до 14% веса тела (11 день) и к 14 дню наблюдения дефицит веса еще составлял 8%.

Обсуждение

Исследуемый препарат содержал консервативные фрагменты двух белков вируса гриппа А.

Эктодомен белка М2 (М2е) представляет собой последовательность, состоящую из 24 аминокислотных остатка и индуцирующую образование специфических Ig, что было показано разными исследователями [7, 9, 25]. Включенная в белок последовательность aa76–130 второй субъединицы гемагглютинина, консенсусная для вирусных субтипов Н3 и Н7 (гомология составляет 63,6%, а с учетом заменяемых аминокислот — 80%), име-

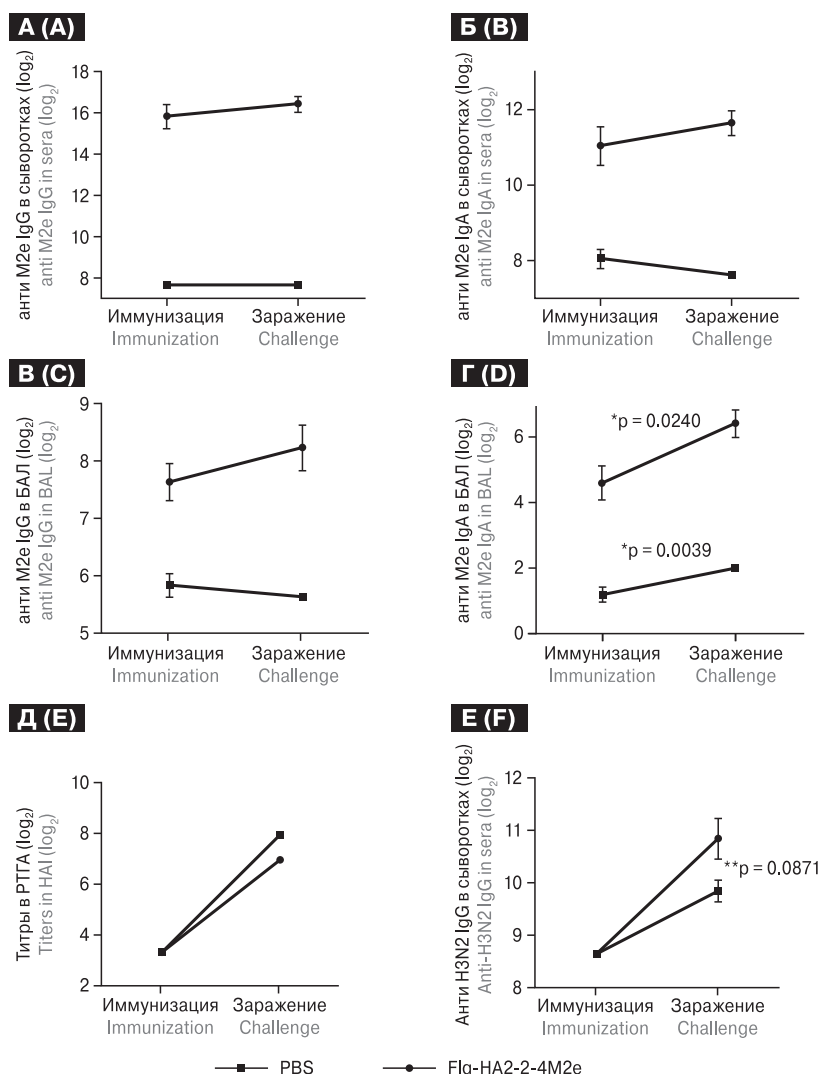


Рисунок 2. Уровни антигенспецифических антител (IgG, IgA и антигемагглютининов) в сыворотках крови (А, Б, Д, Е) и бронхоальвеолярных смывах (В, Г) мышей, иммунизированных кандидатной вакциной Flg-HA2-2-4M2e или получивших физраствор, после иммунизации и после сублетального заражения вирусом гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2)

Figure 2. Antigen-specific antibodies (IgG, IgA, antihemagglutinins) in sera (A, B, E, F) and bronchoalveolar lavages (C, D) of mice immunized with candidate vaccine Flg-HA2-2-4M2e or PBS after immunization and after challenge with the influenza virus A/Aichi/2/68 (H3N2)

Примечания. Группа 1 (●) — мыши иммунизированы трехкратно рекомбинантным белком Flg-HA2-2-4M2e, и/н, в дозе 10 мкг/мышь; группа 2 (■) — мыши получали трехкратно физ. раствор и/н 10 мкг/мышь. А–Г — различия между контрольной и опытной группой везде статистически достоверны — $p < 0,001$. * p — указаны различия между уровнем Ig после иммунизации и сублетальной инфекции; ** p — указаны различия между иммунизированными и неиммунизированными мышами после сублетальной инфекции.

Notes. Group 1 (●) — mice immunized i/n three times with protein Flg-HA2-2-4M2e at a dose of 10 $\mu\text{g}/\text{mouse}$; group 2 (■) — control (PBS). A–D — the differences between the control and experimental groups are statistically significant everywhere — $p < 0.001$. * p — statistical differences between the levels of Ig post immunization and post sublethal infection are indicated; ** p — statistical differences between the levels of Ig post sublethal infection at immunized and non-immunized mice.

ный иммунитет [21]. McKinstry K. и другие авторы показали, что в отсутствии В и CD8⁺ клеток защита осуществляется CD4⁺ Т-клетками памяти и сильно зависит от IFN γ [17, 23, 26]. В нашем опыте иммунизация кандидатной вакциной приводила к образованию специфических CD4⁺ Т-клеток памяти, как к М2е пептиду, так и к HA2 (aa76–130). Количество Т-клеток — продуцентов TNF α и TNF α +IL-2 после стимуляции каждым из этих пептидов достоверно отличалось от клеток животных контрольной группы. После сублетальной инфекции количество этих клеток у иммунизированных мышей увеличилось в несколько раз по сравнению с контрольными животными. Причем, важно, что наряду с TNF α - и IL-2-продуцирующими клетками, увеличилось количество клеток IFN γ -продуцентов. Как показано в клинических исследованиях, именно секреция Т-клетками IFN γ имеет первостепенное значение в выздоровлении от инфекции [12, 22].

Предполагается, что экспансия CD4⁺ Т-клеток лежит в основе прайм-буст механизма действия вакцин. Кроме того, CD4⁺ клетки памяти необходимы для гетеросубтипического иммунного ответа [12, 22]. Вероятно, это один из ведущих механизмов кросс-реактивности вакцин, содержащими в качестве целевых белков консервативные вирусные пептиды. Главным преимуществом таких вакцин является их направленность на большинство субтипов вируса гриппа, что было продемонстрировано ранее [1, 7, 24]. В настоящей работе показано, что подобные вакцины, стимулируя образование анти-М2е и анти-НА2 специ-

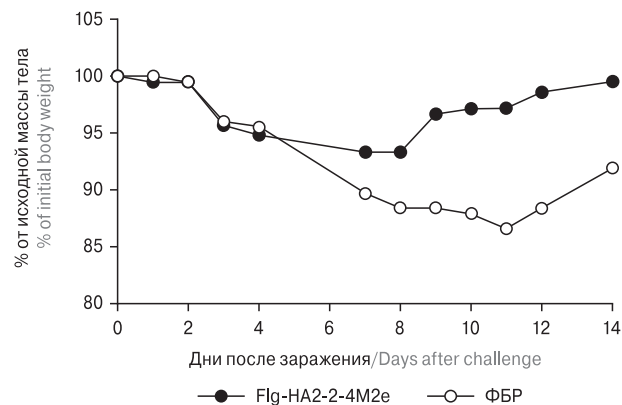


Рисунок 5. Динамика массы тела иммунизированных и неиммунизированных мышей после сублетального заражения вирусом A/Aichi/2/68

Figure 5. Dynamics of the body weight of mice post immunization and post challenge with virus A/Aichi/2/68

фических иммуноглобулинов и CD4⁺ Т-клеток, в том числе эффекторных клеток памяти, обладают праймирующим эффектом, который реализуется при последующей инфекции.

Благодарности

Авторы выражают благодарность Российскому научному фонду, при поддержке которого проводились данные исследования (Соглашение № 15-14-00043 от 19.05.2015 г.).

Список литературы/References

1. Степанова Л.А., Котляров Р.Ю., Шуклина М.А., Блохина Е.А., Сергеева М.В., Потапчук М.В., Ковалева А.А., Равин Н.В., Цыбалова Л.М. Влияние порядка присоединения фрагментов HA2 и M2е вирусов гриппа А к флагеллину на свойства рекомбинантных белков // *Acta Naturae*. 2018. Т. 10, № 1 (36). С. 90–100. [Stepanova L.A., Kotlyarov R.Ju., Shuklina M.A., Blohina E.A., Sergeeva M.V., Potapchuk M.V., Kovaleva A.A., Ravin N.V., Tsybalova L.M. Influence of the order of attachment of HA2 and M2e fragments of influenza A viruses to flagellin on the properties of recombinant proteins. *Acta Naturae*, 2018. vol. 10, no. 1 (36), pp. 90–100. (In Russ.)]
2. Atsmon J., Caraco Y., Ziv-Sefer S., Shaikevich D., Abramov E., Volokhov I., Bruzil S., Haima K.Y., Gottlieb T., Ben-Yedidia T. Priming by a novel universal influenza vaccine (Multimeric-001)-a gateway for improving immune response in the elderly population. *Vaccine*, 2014, vol. 32, no. 44, pp. 5816–5823. doi: 10.1016/j.vaccine.2014.08.031
3. Bates J.T., Honko A.N., Graff A.H., Kock N., Mizel S.B. Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice. *Mech. Ageing Dev.*, 2008, vol. 129, pp. 271–281. doi: 10.1016/j.mad.2008.01.009
4. Chen S., Zheng D., Li C., Zhang W., Xu W., Liu X., Fang F., Chen Z. Protection against multiple subtypes of influenza viruses by virus-like particle vaccines based on a hemagglutinin conserved epitope. *Biomed. Res. Int.*, 2015: 901817. doi: 10.1155/2015/901817
5. Cuadros C., Lopez-Hernandez F.G., Dominguez A.L., McClelland M., Lustgarten J. Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. *Infect. Immun.*, 2004, vol. 72, no. 5, pp. 2810–2816.
6. Cunningham A.F., Khan M., Ball J., Toellner K.M., Serre K., Mohr E. Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on Salmonella are Th1. *Eur. J. Immunol.*, 2004, vol. 34, pp. 2986–2995.
7. 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. *J. Biol. Chem.*, 2008, vol. 283 (17), pp. 11382–11387. doi: 10.1074/jbc.M800650200
8. Delaney K.N., Phipps J.P., Johnson J.B., Mizel S.B. A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice. *Viral Immunol.*, 2010, vol. 23, pp. 201–210. doi: 10.1089/vim.2009.0107
9. Deng L., Ibañez 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. doi: 10.1371/journal.pone.0126650
10. El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J. Immunol.*, 2011, vol. 186, pp. 1022–1031. doi: 10.4049/jimmunol.0902147

11. Eliasson D.G., Omokanye A., Schön 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.*, 2017, vol. 11, pp. 273–289. doi: 10.1038/mi.2017.14
12. Epstein S.L., Lo C.Y., Misplon J.A., Lawson C.M., Hendrickson B.A., Max E.E., Subbarao K. Mechanisms of heterosubtypic immunity to lethal influenza A virus infection in fully immunocompetent, T cell-depleted, beta2-microglobulin-deficient, and J chain-deficient mice. *J. Immunol.*, 1997, vol. 158, no. 3, pp. 1222–1230.
13. Hazenbos W.L., Gessner J.E., Hofhuis F.M. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. *Immunity*, 1996, vol. 5, pp. 181–188.
14. Jegerlehner A. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, pp. 5598–5605.
15. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, vol. 227, pp. 680–685.
16. McKinstry K.K., Strutt T.M., Kuang Yi, Brown D.M., Sell S., Dutton R.W., Swain S.L. Memory CD4+ T cells protect against influenza through multiple synergizing mechanisms. *J. Clin. Invest.*, 2012, vol. 122, no. 8, pp. 2847–2856. doi: 10.1172/JCI63689
17. Mozdzanovska K., Zharikova D., Cudic M., Otvos L., Gerhard W. Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Virology J.*, 2007, vol. 4: 118.
18. Nimmerjahn F., Ravetch J.V. Divergent immunoglobulin G subclasses activity through selective Fc receptor binding. *Science*, 2005, vol. 310, pp. 1510–1512.
19. Scorza B.F., Tsvetnitsky V., Donnelly J.J. Universal influenza vaccines: Shifting to better vaccines. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 26, pp. 2926–2933. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.03.085
20. Strutt T.M., McKinstry K.K., Dibble J.P., Winchell C., Kuang Y., Curtis J.D., Huston G., Dutton R.W., Swain S.L. Memory CD4+ T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nat. Med.*, 2010, vol. 16, no. 5, pp. 558–564. doi: 10.1038/nm.2142
21. Sun K., Ye J., Perez D.R., Metzger D.W. Seasonal FluMist vaccination induces cross-reactive T cell immunity against H1N1 (2009) influenza and secondary bacterial infections. *J. Immunol.*, 2011, vol. 186, no. 2, pp. 987–993. doi: 10.4049/jimmunol.1002664
22. Swain S.L., McKinstry K.K., Strutt T.M. Expanding roles for CD4(+) T cells in immunity to viruses. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, vol. 12, no. 2, pp. 136–148. doi: 10.1038/nri3152
23. 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, vol. 13, no. 8: e0201429. doi: 10.1371/journal.pone.0201429
24. Zebedee S.L., Lamb R.A. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *J. Virol.*, 1988, vol. 62, no. 8, pp. 2762–2772.
25. Zens K.D., Farber D.L. Memory CD4 T cells in influenza. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2015, vol. 386, pp. 399–421. doi: 10.1007/82_2014_401
26. Zhong W., Reed C., Blair P.J., Katz J.M., Hancock K. Influenza Serology Working Group. Serum antibody response to matrix protein 2 following natural infection with 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus in humans. *J. Infect. Dis.*, 2014, vol. 209, no. 7, pp. 986–994. doi: 10.1093/infdis/jit811

Авторы:

Цыбалова Л.М., д.м.н., руководитель отдела вакцинологии, зав. лабораторией гриппозных вакцин, советник директора ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Степанова Л.А., к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Коротков А.В., научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Шуклина М.А., младший научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Зайцева М.В., младший научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Грищенко В.И., младший научный сотрудник лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия;
Котляров Р.Ю., к.б.н., научный сотрудник отдела молекулярной биологии микроорганизмов отдела молекулярной биологии ФГБУ НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева МЗ РФ, Санкт-Петербург, Россия.

Authors:

Tsybalova L.M., PhD, MD (Medicine), Head of the Department of Vaccinology, Head of the Laboratory of Influenza Vaccines, Advisor to the Director, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Stepanova L.A., PhD (Biology), Leading Researcher, Laboratory of Influenza Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Korotkov A.V., Researcher, Laboratory of Influenza Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Shuklina M.A., Junior Researcher, Laboratory for Influenza Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Zaitseva M.V., Junior Researcher, Laboratory of Influenza Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Grishchenko V.I., Junior Researcher, Laboratory of Influenza Vaccines, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation;
Kotlyarov R.Yu., PhD (Biology), Researcher, Department of Molecular Biology of Microorganisms, Smorodintsev Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation.

Поступила в редакцию 11.08.2018
 Отправлена на доработку 21.03.2019
 Принята к печати 30.05.2019

Received 11.08.2018
 Revision received 21.03.2019
 Accepted 30.05.2019