

5. Matrosovich M., Matrosovich T., Carr G., Roberts N.A., H.-D. Klenk. Overexpression of the alpha-2,6-sialyltransferase in MDCK cells increases influenza virus sensitivity to neuraminidase inhibitors. *J. Virol.* 2003; 77(15): 8418-25.
6. WHO Global Influenza Surveillance Network. Manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza. Available at: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/manual_diagnosis_surveillance_influenza/en/
7. MR N.0100/4430-06-34. The isolation of influenza viruses in cell culture and embryonated eggs and their identification. Moscow; 2006. (in Russian)
8. Burtseva E.I., Breslav N.V., Kirillova E.S., Kolobukhina L.V., Pripilov A.G., Malyshev N.A., et al. The inhibitors of influenza virus neuraminidase: efficacy during postpandemic period. *Effektivnaya farmakoterapiya.* 2016; 44(2): 32-6. (in Russian)
9. Review of global influenza activity, 2015–2016. Available at: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring/updates/en/
10. Global circulation of influenza viruses (GISRS-FluNet, snapshot 24 November 2017). Available at: http://www.who.int/influenza/gisrs_laboratory/updates/summaryreport/en/
11. A weekly influenza surveillance report prepared by the Influenza Division, CDC, Atlanta, USA (FluView). Available at: <http://www.cdc.gov/flu/weekly/index.htm>
12. Joint ECDC-WHO/Europe weekly influenza updates. Available at: <http://www.flunews europe.org/>
13. Official website of FSBI «Research Institute of influenza» Ministry of Health of Russia. Available at: <http://www.influenza.spb.ru> (in Russian)
14. Weekly Epidemiological Record. 2017; 92(11): 117-28. Available at: <http://www.who.int/wer/2017/wer9211/en/>
15. Avian and other zoonotic. Available at: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/en/
16. Avian influenza A(H7N9) virus. Available at: http://who.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/en/index.html
17. Cumulative number of confirmed human cases of avian influenza A(H5N1) reported to WHO. Available at: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/H5N1_cumulative_table_archives/en/
18. Assessment of risk associated with influenza A(H5N8) virus. Available at: http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/avian_influenza/riskassessment_AH5N8_201611/en/

Поступила 29.11.17
Принята в печать 12.12.17

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

УДК 615.371:578.832].011

Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Шуклина М.А., Петров С.В., Ковалёва А.А., Потапчук М.В., Шалджян А.А., Забродская Я.А., Егоров В.В.

КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫЕ СВОЙСТВА ПРОТИВОГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА НВс4М2е

ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России, 197376, г. Санкт-Петербург

Одной из актуальнейших задач в области профилактики гриппа и предотвращения пандемий этой инфекции является создание вакцин, индуцирующих иммунный ответ против всех вирусов гриппа А, представляющих угрозу для человека. Разработка таких кросс-протективных вакцин ведется в мире более 10 лет. Несколько препаратов находятся в стадии клинических исследований. Нами был изучен рекомбинантный белок НВс4М2е, состоящий из 4 tandemно соединённых копий высококонсервативного наружного домена белка М2 вируса гриппа А, генетически слитого с белком-носителем – коровым антигеном вируса гепатита В. В качестве адъюванта в кандидатной вакцине использовался коммерческий препарат Деринат. Доклинические исследования на лабораторных животных (мыши, хорьки) показали, что иммунизация приводит к формированию высокого уровня специфических иммуноглобулинов в крови и бронхоальвеолярных лавжах. При этом вырабатываются иммуноглобулины субтипа IgG2a, наиболее важного медиатора антителозависимой цитотоксичности. Вакцина стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и образование CD4+ и CD8+ Т-клеток, синтезирующих гамма-интерферон. При экспериментальном заражении летальными дозами (5 LD₅₀) вирусов гриппа А субтипов Н1N1, Н2N2, Н3N2, Н1N1рdт09 иммунизированные животные перенесли инфекцию в лёгкой форме и практически полностью были защищены от гибели (90–100%). Репликация вируса в лёгких иммунизированных мышей снижалась на 1,8 - 4,8 log₁₀. Высокая иммуногенность вакцины и снижение тяжести экспериментальной инфекции продемонстрировано также на хорьках. Разработанная рекомбинантная вакцина Унифлю обладает высокой специфической активностью и выраженной кросс-протективностью. При условии успешных клинических исследований она может рассматриваться как предпандемическая.

Ключевые слова: *грипп А; рекомбинантная вакцина; лабораторные животные; иммуногенность; кросс-протективность.*

Для цитирования: Цыбалова Л.М., Степанова Л.А., Шуклина М.А., Петров С.В., Ковалёва А.А., Потапчук М.В., Шалджян А.А., Забродская Я.А., Егоров В.В. Кросс-протективные свойства противогриппозной вакцины на основе рекомбинантного белка НВс4М2е. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(2): 68-76

DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-68-76>

Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Petrov S.V., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Shaldzhan A.A., Zabrodskaya Ya.A., Egorov V.V.

CROSS-PROTECTIVE PROPERTIES OF AN INFLUENZA VACCINE BASED ON НВс4М2е RECOMBINANT PROTEIN

Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation

Для корреспонденции: Цыбалова Людмила Марковна, д-р мед. наук, зам. директора ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России по научной работе, руководитель отдела вакцинологии. 197376, г. Санкт-Петербург. E-mail: sovets@influenza.spb.ru

One of the main problems in the area of influenza prophylaxis and pandemic prevention is the development of cross-reactive vaccines, i.e. vaccines directed against all subtypes of human influenza viruses. Such vaccines are being developed in many countries for more than 10 years. A number of vaccines are presently undergoing clinical trials. We created Uniflu candidate vaccine based on recombinant Hbc4M2e protein consisting of 4 tandem-connected copies of the highly conserved ectodomain of M2 protein of the influenza A virus. These 4 copies were genetically fused to the carrier protein, namely hepatitis B core antigen. Commercially available Derinat was used as adjuvant in the candidate vaccine. Preclinical studies on laboratory animals (mice, ferrets) demonstrated that immunization with Uniflu leads to significantly higher level of specific immunoglobulins in the blood and bronchoalveolar lavages. Moreover, it produces immunoglobulins belonging to subtype IgG2a that is the most important mediator of antibody-dependent cytotoxicity. The vaccine under review stimulates the proliferation of T-lymphocytes, as well as the formation of CD4+ and CD8+ T-cells synthesizing γ -IFN. When infected with the lethal doses (5 LD50) of influenza A viruses of the subtypes H1N1, H2N2, H3N2, and H1N1pdm09, immunized animals typically developed mild form of illness. This kept them alive in 90-100% of cases, which demonstrated almost complete protection from death. Replication of the virus in the lungs of immunized mice was reduced by 1.8-4.8 log₁₀. High immunogenicity of the vaccine, and reduced clinical symptoms following experimental infection, were demonstrated in ferrets as well. The developed recombinant vaccine Uniflu has high specific activity and cross-protection. Uniflu can be proposed as pre-pandemic vaccine, provided that it passes clinical trials.

Key words: influenza A; recombinant vaccine; laboratory animals; immunogenicity; cross-protection.

For citation: Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Shuklina M.A., Petrov S.V., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Shaldzhan A.A., Zabrodskaya Y.A., Egorov V.V. Cross-protective properties of an influenza vaccine based on Hbc4M2e recombinant protein. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(2): 68-76. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-2-68-76>

For correspondence: Liudmila M. Tsybalova, Dr.Sci.Med., Deputy director, Head of the Department of vaccinology, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, 197376, Russian Federation. E-mail: sovets@influenza.spb.ru

Information about authors:

Tsybalova L.M., <http://orcid.org/0000-0002-1193-5907>; Stepanova L.A., <http://orcid.org/0000-0002-8731-1834>;
Kovaleva A.A., <http://orcid.org/0000-0001-6905-8946>; Egorov V.V., <http://orcid.org/0000-0002-3670-8962>;
Zabrodskaya Y.A., <http://orcid.org/0000-0003-2012-9461>;

Acknowledgments. This work was conducted within the framework of the State Contract No. 13411.1008799.13.13 with the Ministry of Industry and Trade of the Russian Federation. The studies of the specific activity of the recombinant protein containing M2e in ferrets were supported by the Russian Science Foundation (Agreement No. 15-14-0043; May 19, 2015). We are grateful to our collaborators, members of the staff of the Federal Research Center for Biotechnology, Russian Academy of Sciences, for the gene engineering studies and to members of the staff of the Institute of Preclinical Studies (Leningrad Region, Vsevolzhsky District) for their help in working with ferrets.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 17 November 2017
Accepted 12 December 2017

Введение

Пандемия гриппа 2009 г. ещё раз убедительно продемонстрировала, насколько скорость производства традиционных вакцин отстаёт от скорости распространения пандемического вируса. Первые вакцины против вируса A(H1N1)pdm09 были получены в мире в сентябре–октябре 2009 г., тогда как первые эпидемии гриппа A(H1N1)pdm09 во многих странах прошли уже в июне. Подобная ситуация складывалась и в ходе пандемии 1957 и 1968 гг. [1]. Ликвидировать этот временной разрыв могут вакцины с коротким сроком производства, направленные против любых возможных возбудителей будущих пандемий. Идея создания такой универсальной вакцины возникла как результат осознания уникальной изменчивости вирусных антигенов и вытекающих отсюда неизбежных ежегодных временных и материальных затрат на обновление штаммового состава традиционных вакцин.

В последние 15 лет идут энергичные поиски композиции рекомбинантного вируса/белка, способного индуцировать защиту против всех субтипов вирусов гриппа, циркулирующих в человеческой популяции или представляющих реальную угрозу для человека [2–6]. Оценивая наиболее вероятный срок появления хотя бы одной лицензированной универсальной вакцины против гриппа А, ВОЗ называет 2020 г. [7]. Целевыми антигенами для индукции иммунного ответа на широкий спектр вирусов гриппа являются консер-

вативные вирусные белки и консервативные детерминанты поверхностных белков. Эффективное представление их иммунной системе гарантирует защиту организма от тяжелого гриппа и летальных исходов. Индукция стерильного иммунитета такими вакцинами не предусматривается и, судя по всему, невозможна. Исследования разных вариантов универсальных вакцин на экспериментальных моделях показали, что они снижают тяжесть гриппозной инфекции и исключают гибель животных после заражения летальными дозами вируса. Механизм действия универсальных традиционных вакцин в отличие от антигеноспецифических реализуется не через вируснейтрализующие антитела, а путем антителозависимой цитотоксичности и комплексозависимого цитолиза, а также антителозависимого фагоцитоза [6, 8–11].

В этой статье мы представляем рекомбинантную вакцину, направленную на эпидемические субтипы вируса гриппа АН1, Н3 и вероятный пандемический субтип АН2. Основным компонентом вакцины является рекомбинантный белок НВс4М2е, представляющий собой вирусоподобные частицы диаметром 34–36 нм, образованные коровым антигеном вируса гепатита В и эктодоменом М2 белка вируса гриппа А – М2е. Особенностью нашей конструкции является инсерция четырех tandemно соединённых копий М2е в каждую иммунодоминантную петлю вирусоподобной частицы белка НВс, что способствует усилению иммунитета и протективности препарата.

Материал и методы

Препараты. Рекомбинантная гриппозная вакцина Унифлю является лиофилизированным препаратом, содержащим в 1 дозе (0,5 мл) высокоочищенный рекомбинантный белок НВс4М2е ($40,0 \pm 5,0$ мкг) с консенсусной последовательностью М2е вирусов гриппа А человека (А/Н1N1, А/Н3N2, А/Н2N2), адьювант – Деринат (500 ± 50 мкг), фосфатно-буферный раствор (ФБР), рН 7,2–7,4. Препарат плацебо содержит те же компоненты, кроме белка НВс4М2е, который замещён белком НВс. Рекомбинантные белки были сконструированы и тестированы совместно со специалистами Федерального исследовательского центра биотехнологии РАН [12, 13]. Белки получены путем культивирования штаммов *E. coli* DLT1270 pQE60НВс/4Me2h и *E. coli* DLT1270 pQE60НВс соответственно и очищены с помощью гель-фильтрации и ионообменной хроматографии. Деринат (адьювант) представляет собой натриевую соль ДНК (олигодезоксинуклеотид) эукариотического происхождения, деполимеризованную ультразвуком до частиц с молекулярной массой 270–500 кДа, не несущих генетической информации. Регистрационный номер препарата Р N002916/01 (дата регистрации 27.02.2008).

Электрофорез (ЭФ) в полиакриламидном геле (ПААГ) и иммуноблот. SDS-ПААГ- электрофорез проводили по методике, описанной Лэммли [14]. Электрофоретическое разделение белков в ПААГ выполняли в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия и бета-меркаптоэтанола. Параметры ЭФ: 25 мА, 220 В, 50 мин. Гель окрашивали коллоидным раствором Кумасси в течение ночи, отмывали водой.

При постановке иммуноблота рекомбинантные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану («Bio-Rad», США). Белки определяли окрашиванием мембраны моноклональными антителами к белку М2 вируса гриппа А (14С2, ab5416; «Abcam», Великобритания) в разведении 1:16 000. В качестве вторичных антител использовали козы антимышинные IgG, меченные пероксидазой хрена («Abcam», Великобритания) в разведении 1:1000. Белок выявляли после инкубации мембраны с ТМБ (тетраметилбензидин) Immunoblot Solution («Invitrogen», США) в течение 15 мин.

Масс-спектрометрия. Ферментативный гидролиз белков в геле трипсином проводили согласно Н. Malen и соавт. [15]. Полученные триптические пептиды смешивали с матрицей 2,5-DHB («Bruker»), наносили на мишень Ground Steel и анализировали на MALDI-TOF/TOF масс-спектрометре UltrafleXtreme («Bruker») в режиме регистрации положительных ионов. Белки идентифицировали с использованием MASCOT (matrixscience.com) при обращении одновременно к базе данных SwissProt и локальной базе данных, в которую внесли аминокислотную последовательность рекомбинантного белка.

Электронная микроскопия. Рекомбинантные белки в объёме 0,2 мл наносили на медную сетку с субстратом коллодия. Медную сетку выдерживали 1 мин для адсорбции частиц, затем дважды отмывали дистиллированной водой. Негативное контрастирование проводили раствором фосфорновольфрамовой кислоты (2%) в течение 1 мин. После контрастирования медную сетку высушивали и исследовали на трансмиссионном электронном микроскопе JEOL JEM-1011. Для получения микрофотографий использовали цифровую камеру Morada («Olympus Inc.»).

Лабораторные животные. Специфическую активность лиофилизированных препаратов исследовали на мышах и хорьках. Животных содержали в стандартных условиях в соответствии с санитарно-эпидемиологическими правилами СП 2.2.1.3218-14. Линейные мыши (самки) Balb/c массой 18–20 г (возраст 6–8 нед) были получены из питомника «Столбовая» ГУ «научный центр биомедицинских технологий» РАМН. Хорьки (самки, 4–5 мес) были получены из питомника «Твой хорёк» (Краснодар). Животных содержали в контролируемых условиях окружающей среды.

Иммунизация и взятие материалов для исследования. Мышей иммунизировали внутримышечно трехкратно в двухнедельным интервалом вакцинным препаратом в дозе 40 мкг/мышь в объёме 50 мкл. Контрольным группам мышей вводили плацебо в дозе 40 мкг или ФБР, рН 7,2, в объёме 50 мкл. Хорьков иммунизировали внутримышечно вакцинным препаратом двукратно с интервалом 3 нед в дозе 40 мкг/хорёк. Контрольной группе хорьков вводили плацебо в дозе 40 мкг.

Образцы крови получали от 5 мышей каждой группы через 2 нед после 3-й иммунизации. У хорьков брали кровь из локтевой вены до иммунизации, после 1-й и 2-й иммунизации, а также для определения длительности циркуляции сывороточных специфических антител через 21, 61 день (2 мес) и 151 день (5 мес) после последней иммунизации. Бронхоальвеолярные лаважи (БАЛ) получали от 5 мышей каждой группы после эвтаназии в CO₂-камере через 2 нед после 3-й иммунизации. В нижнюю часть трахеи вводили катетер на глубину 3–5 мм и дважды промывали бронхи и лёгкие 1 мл ФБР. БАЛ центрифугировали 15 мин при 400 g, аликвотировали и замораживали при -20°C до исследования.

Иммуноферментный анализ (ИФА). ИФА проводили описанным ранее методом [16] с использованием 96-луночных планшет с высокой сорбционной способностью («Greiner», Германия). На планшеты сорбировали синтетический пептид М2е в концентрации 5 мкг/мл или НВс в концентрации 3 мкг/мл. В качестве конъюгата использовали меченные пероксидазой хрена моноклональные овечьи антимышинные IgG («Abcam») в разведении 1:20 000, моноклональные овечьи антимышинные IgG1, IgG2a («Abcam») в разведении 1:20 000, моноклональные козы антихорьковые IgG («Abcam») в разведении 1:20 000. В качестве субстрата применялся ТМБ («BD Biosciences», США). Оптическую плотность (ОП) измеряли с использованием микропланшетного ридера i-Mark («Bio-Rad») при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором ОП по крайней мере в 2 раза превышала среднее значение бланка.

Реакция торможения гемагглютинации. Реакция выполнялась общепринятым методом согласно методическим рекомендациям¹.

Специфический Т-клеточный ответ в селезёнке. Определялась способность рекомбинантных белков индуцировать в селезёнке образование специфических CD3+CD4+ и CD3+CD8+ Т-лимфоцитов, продуцирующих ИФН-γ. Спленоциты мышей выделяли на 14-е сутки после 3-й иммунизации в соответствии с протоколом «BD Pharmingen™» с рестимуляцией синтетическим

¹Выделение вирусов гриппа в клеточных культурах и куриных эмбрионах и их идентификация: Методические рекомендации. Сомина А.А., Бурцева Е.И., Лобова Т. Г. и др. М.: 2006.

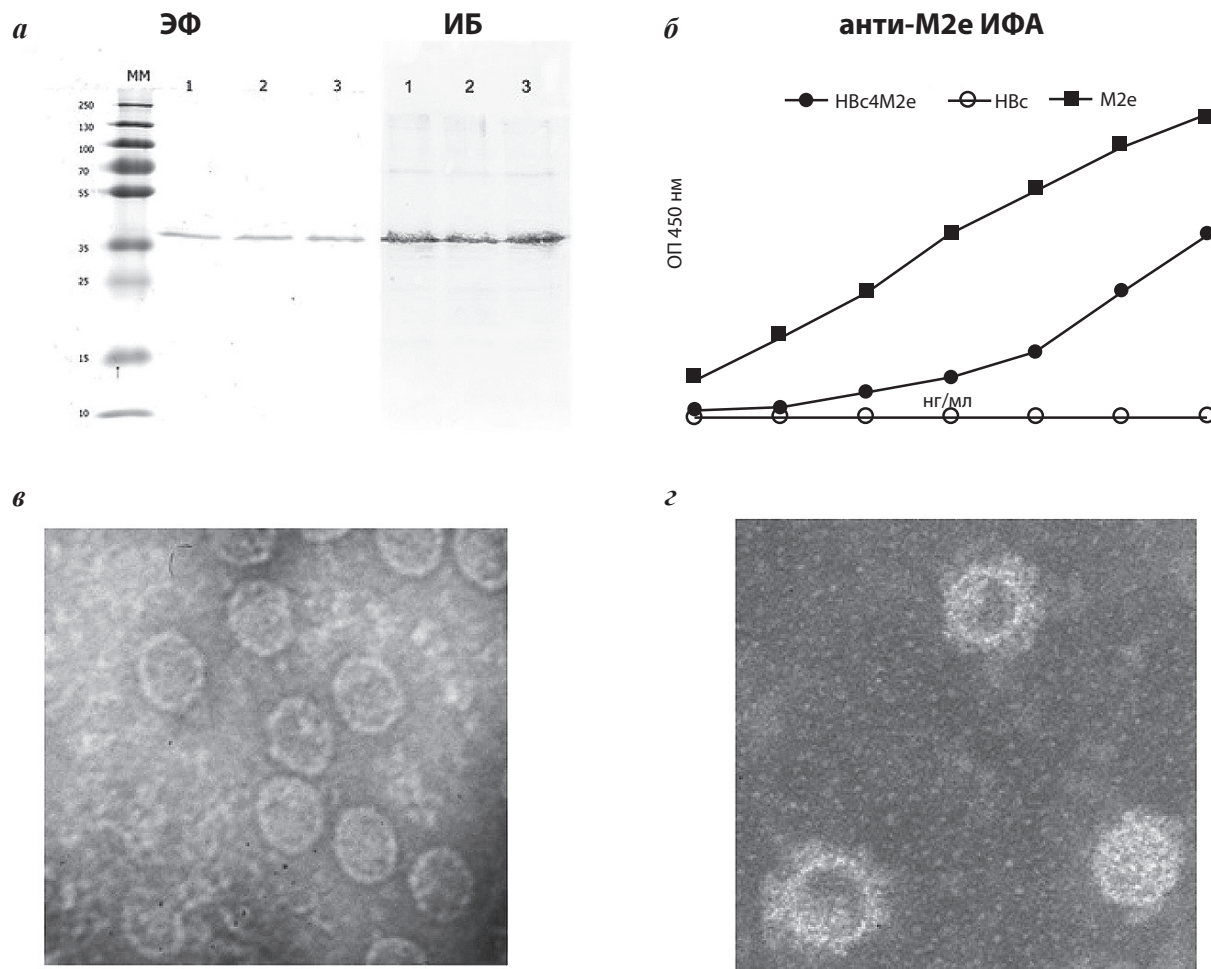


Рис. 1. Анализ рекомбинантного белка Hbc4M2e.

а – электрофорез (ЭФ) и иммуноблот (ИБ) трех серий вакцины Унифлю (дорожки 1–3) с моноклональными антителами 14C2, специфичными для M2e; *б* – антигенность рекомбинантного белка Hbc4M2e. Белки Hbc4M2e, Hbc и синтетический пептид M2e сорбировали на планшеты для ИФА с последующей обработкой моноклональными антителами 14C2, специфичными для M2e; *в* – электронная фотография вирусоподобных частиц Hbc; *з* – Hbc4M2e (шкала 50 нм).

пептидом M2e (активированная проба) или без рестимуляции (неактивированная проба) в присутствии брефелдина в течение 6 ч. Клетки отмывали, Fc-рецепторы блокировали антителами CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, «BD Pharmingen™», США) и окрашивали анти-CD3a-FITC, анти-CD4-APC («BD Pharmingen™», США) и анти-CD8-PerCP при 2–8°C в течение 30 мин. Затем клетки пермеабелизировали в соответствии с протоколом тест-системы Cytotfix/Cytoperm Plus («BD Biosciences», США) и окрашивали флуоресцирующими анти-IFN- γ -PE («BD Pharmingen», США). Интенсивность флуоресценции определяли на проточном цитофлуориметре BD FACS Canto II («Becton Dickinson», США). Анализ результатов проводили с использованием программного обеспечения BD FACS Diva версии 6.1.3 («BD Biosciences», США). Специфический ответ спленоцитов мышей (процент клеток, синтезирующих ИФН- γ) к пептиду M2e рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ спленоцитов, синтезирующих ИФН-}\gamma, = \frac{\% \text{ положительных событий в активированной пробе} - \% \text{ положительных событий в неактивированной пробе}}{\% \text{ положительных событий в активированной пробе}}$$

Вирусы и заражение экспериментальных животных.

Для заражения мышей были использованы штаммы вирусов гриппа, адаптированные к мышам: A/PR/8/34 (H1N1), A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, A/Aichi/2/68 (H3N2), A/Japan/305/57 (H2N2) в дозе 5 LD₅₀. Мышей заражали на 14-й день после последней иммунизации (по 10 мышей на одну заражающую дозу). Вирусы вводили интраназально в объеме 50 мкл/мышь после ингаляционной анестезии (2–3% изофлуран, 30% O₂, 70% N₂O). После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными в течение 14 сут (регистрация гибели и массы тела). Иммунизированных хорьков заражали эпидемическим вирусом гриппа A/Brisbane/53/07 (H1N1) через 3 нед после 2-й иммунизации и A/Texas/2012 (H3N2) через 5 мес после иммунизации в дозах 6,5–7,0 log₁₀ ТЦИД₅₀. В течение 14 дней после иммунизации проводили ежедневный клинический осмотр животных по показателям: клиническим симптомам гриппозной инфекции (активность, выделение из носа), ректальной температуре (утром и вечером), массе тела. Клинические симптомы оценивали в баллах: активное животное – 0 баллов, вялое животное – 1 балл, чихание – 1 балл, выделения из носа – 1 балл. Подсчитывали сумму баллов

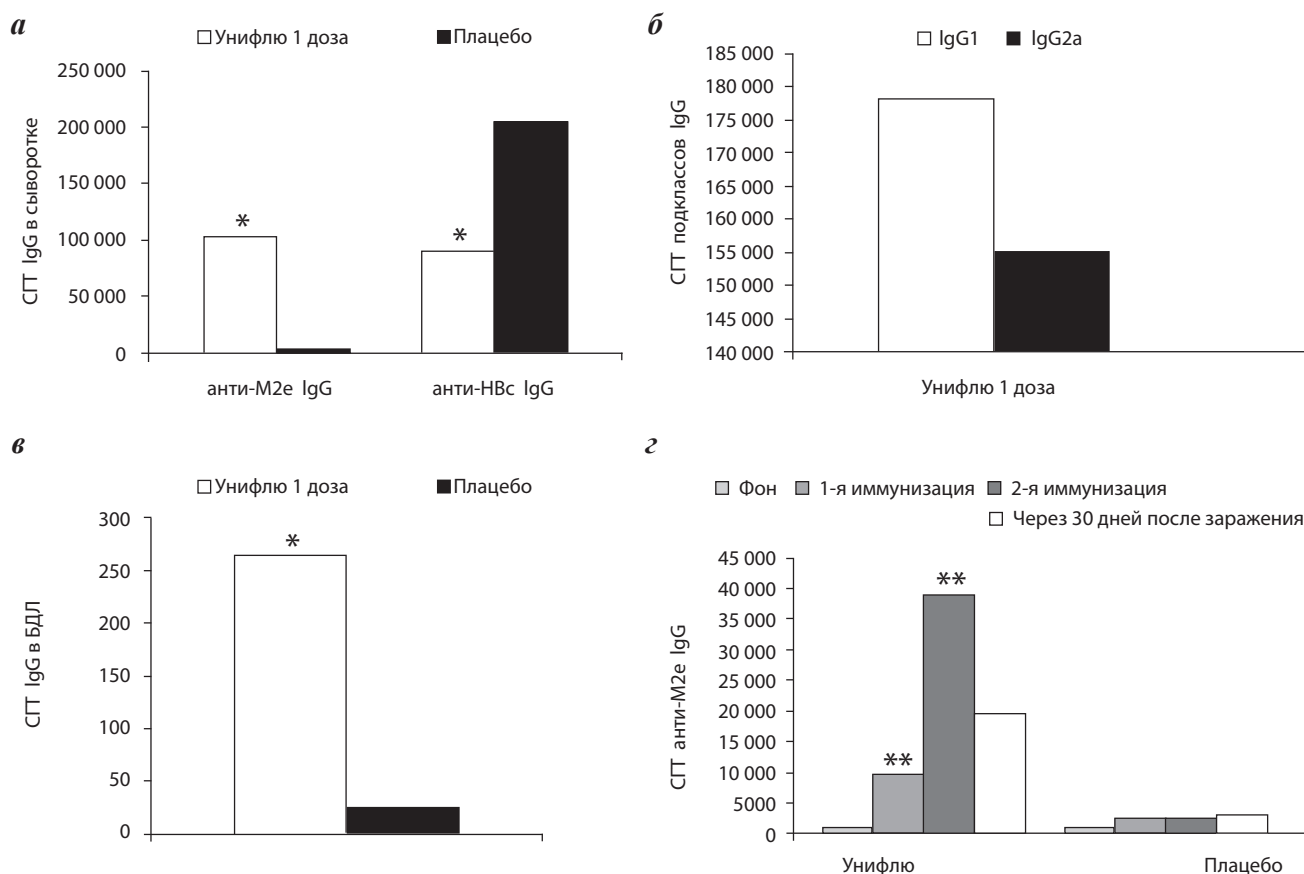


Рис. 2. Доклинические исследования иммуногенности вакцины Унифлю. M2e – специфический гуморальный ответ у мышей (а, б, в) и хорьков (з).

а – СГТ анти-M2e и анти-NPc IgG после 3-й иммунизации мышей одной дозой вакцины и плацебо; б – соотношение IgG1 и IgG2a в сыворотках крови иммунизированных мышей; в – СГТ анти-M2e IgG после 3-й иммунизации мышей в БАЛ; з – СГТ анти-M2e IgG у хорьков; * - достоверное отличие от плацебо, $p < 0,01$; ** – достоверное отличие от плацебо, $p \leq 0,05$.

для каждого животного и вычисляли среднее значение.

Репродукция вирусов гриппа в лёгких мышей. На 6-е сутки после заражения у 5 мышей из каждой группы после эвтаназии забирали лёгкие. Выделение вируса проводили титрованием лёгочной суспензии мышей на культуре клеток MDCK. 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). 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 ($\lg \text{ТЦИД}_{50}$).

Статистическая обработка. Статистическую обработку данных проводили в программе GraphPad Prism версии 6.0. Статистическую значимость различий показателей оценивали с использованием непараметрического критерия Манна – Уитни. Сравнение показателей выживаемости выполняли с помощью критерия Мантла – Кокса. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Для подтверждения идентичности рекомбинантного белка NPc4M2e использовали несколько методов. На

рис. 1 представлены результаты, подтверждающие присутствие M2e в очищенном рекомбинантном белке NPc4M2e с помощью методов иммуноблота и ИФА. Белки NPc и NPc4M2e формируют вирусоподобные частицы диаметром 35–36 нм, что продемонстрировано электронной микроскопией. Присутствие целевых компонентов – рекомбинантных белков NPc4M2e и NPc в препаратах (вакцине и плацебо) было подтверждено методом масс-спектрометрии. Для каждого белка величина Score превышала пороговое значение и составляла 119 и 271 при пороговых значениях 70 и 92, что указывает на достоверность идентификации ($p < 0,05$). В препаратах были выявлены и идентифицированы примесные белки *E. coli*, однако их содержание составляло менее 5% (4,78%), что соответствует требованиям Государственной фармакопеи, предъявляемым к генно-инженерным препаратам.

В сыворотках мышей на 39-й день исследования были определены титры анти-M2e IgG, титры подклассов иммуноглобулинов IgG (IgG1, IgG2a), анти-NPc IgG; в БАЛ определяли титры анти-M2e IgG. Установлено, что среднегеометрический титр (СГТ) анти-M2e IgG в группе иммунизированных животных составил 1:102 400,00 и достоверно отличался от СГТ в группе плацебо – 1:200,0 ($p = 0,0079$). Соотношение IgG1/IgG2a составило 1,15 (рис. 2), что свидетельствует об отсутствии

Средний индекс стимуляции (ИС) пролиферации лимфоцитов и средний процент Т-лимфоцитов селезёнки мышей опытной и контрольной групп, продуцирующих ИФН-γ, после активации пептидом M2e

№ группы	Препарат	Число мышей в группе	ИС пролиферации после активации спленоцитов пептидом M2e	Средний % спленоцитов, синтезирующих ИФН-γ	
				CD3+CD4+ИФН-γ+	CD3+CD8+ИФН-γ+
1-я	Вакцина Унифлю, 1 доза	5	1,96 ± 0,16*	0,490 ± 0,290**	0,858 ± 0,230**
2-я	Плацебо	5	1,02 ± 0,23	0,00 ± 0,00	0,000 ± 0,000

Примечание. * – достоверное отличие от 2-й группы, $p = 0,0079$ по критерию Манна—Уитни; ** – достоверное отличие от 2-й группы, $p < 0,01$ по критерию Манна—Уитни.

превалирования одного из подклассов иммуноглобулинов. Уровень антител к белку-носителю (НВс) у мышей опытных групп был в 2,3 раза ниже, чем у мышей контрольной группы, которых иммунизировали НВс: 1: 89 144,38 против 1: 204 800,0 ($p = 0,0317$).

В БАЛ мышей, иммунизированных вакциной, титры специфических IgG к M2e-пептиду также достоверно отличались от титров в группе получивших плацебо: 1:263,9 против 1:25,0 ($p = 0,0079$ по критерию Манна—Уитни).

В селезёнках мышей опытной и контрольной групп (42-й день исследования) был определён индекс пролиферации спленоцитов и процент клеток CD3+CD4+ и CD3+CD8+, синтезирующих ИФН-γ после активации пептидом M2e (см. таблицу).

Средний индекс стимуляции (ИС) пролиферации лимфоцитов и средний процент Т-лимфоцитов селезёнки мышей опытной и контрольной групп, продуцирующих ИФН-γ, после активации пептидом M2e.

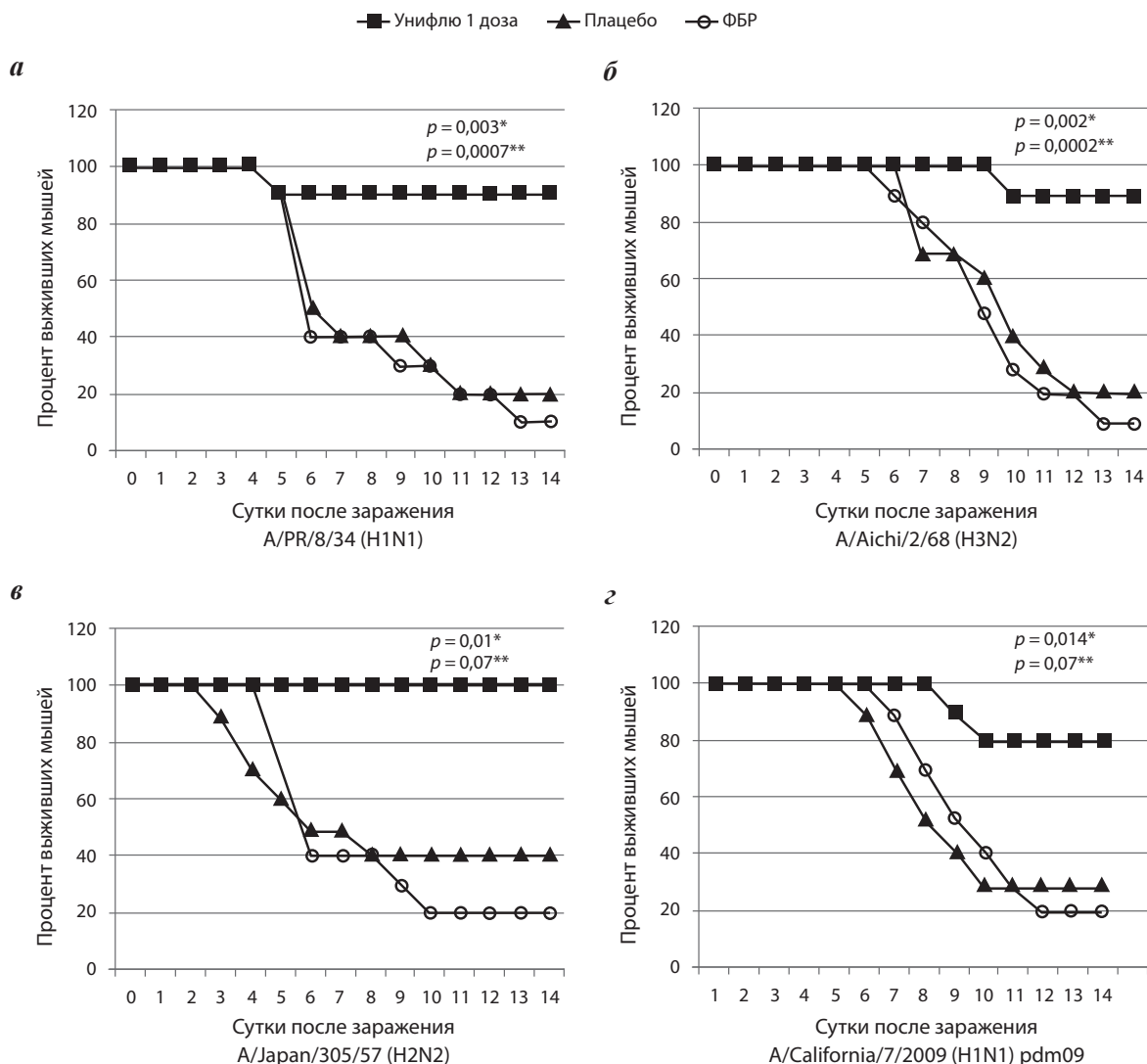


Рис. 3. Доклинические исследования протективности вакцины Унифлю на модели летальной гриппозной инфекции ($5 LD_{50}$) у мышей. а – выживаемость мышей после заражения вирусом A/PR/8/34 (H1N1); б – выживаемость мышей после заражения вирусом A/Aichi/2/68 (H3N2); в – выживаемость после заражения вирусом A/Japan305/57 (H2N2); з – выживаемость после заражения вирусом A/California/7/2009 (H1N1)pdm09; * – достоверные результаты между вакциной и плацебо; ** – достоверные результаты между вакциной и ФБР.

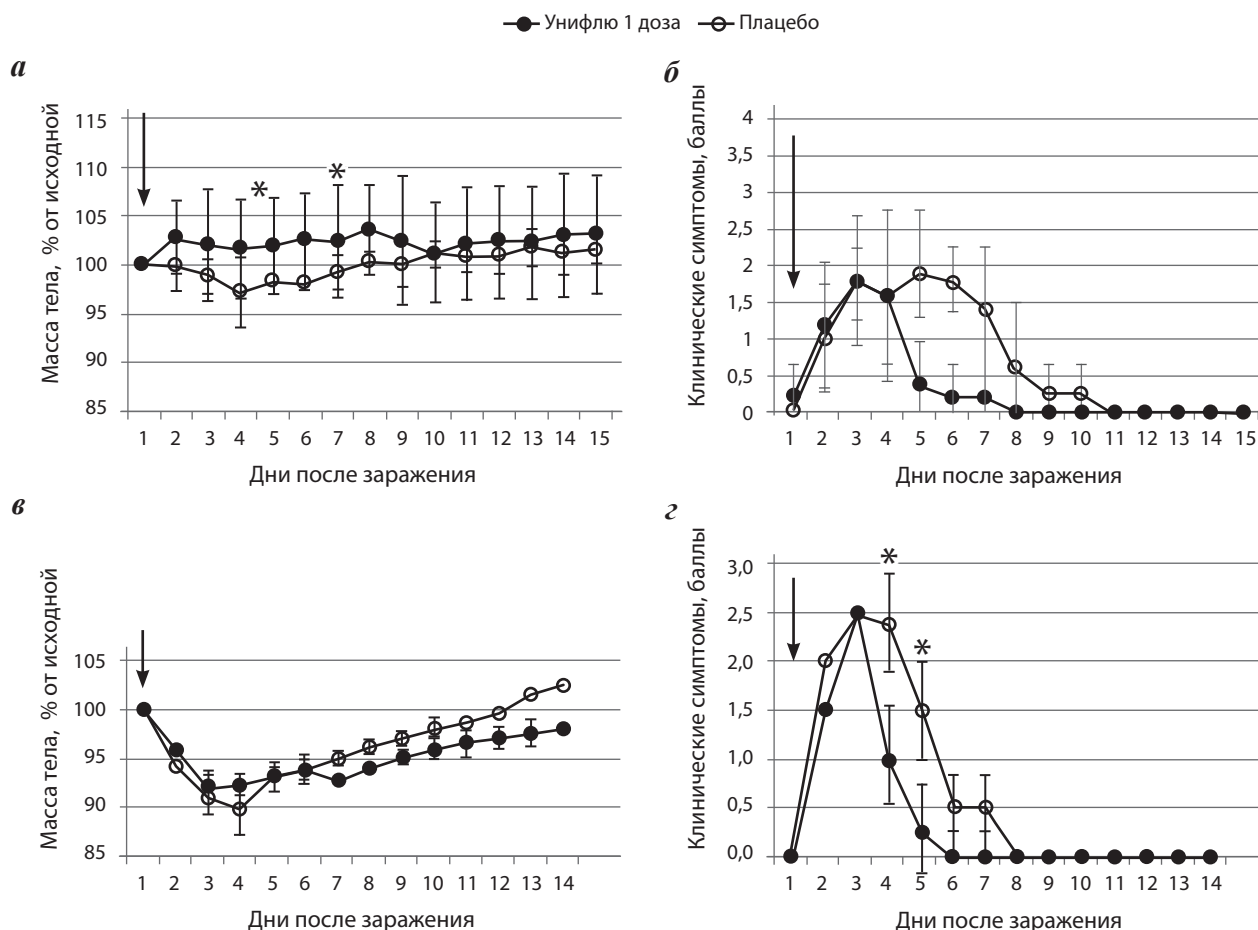


Рис. 4. Доклинические исследования протективности вакцины Унифлю на модели гриппозной инфекции у хорьков.

а – динамика массы тела и *б* – клинические симптомы (в баллах) у хорьков опытной и контрольной групп после заражения эпидемическим вирусом A/Brisbane/53/07 (H1N1) в дозе 6,5–7,0 log₁₀ ТЦИД₅₀; *в* – динамика массы тела и *г* – клинические симптомы (в баллах) у хорьков опытной и контрольной групп после заражения эпидемическим вирусом A/Texas/50/2012 (H3N2); * – достоверные различия между группами на 5–7-й день наблюдения (*p* ≤ 0,05 по критерию Манна–Уитни).

Из результатов, представленных в таблице, следует, что ИС пролиферации лимфоцитов селезёнки после активации у мышей, иммунизированных вакциной (1-я группа), был достоверно в 1,9 раз выше, чем в группе мышей, получивших плацебо (2-я группа). Также у мышей опытной группы определялись CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ Т-клетки, синтезирующие ИФН-γ, тогда как в группе плацебо такие спленоциты отсутствовали.

Исследование протективности вакцины на мышах показало, что вакцинация уменьшает тяжесть инфекции. Так, максимальная потеря массы тела в опытных группах при заражении разными вирусами, идентичными вакцине по M2e-пептиду, составляла 16,3–17,7%, тогда как в группах плацебо – 20,1–35,3%. Вакцина Унифлю обеспечивала 90–100% защиту животных от летального заражения (5 LD₅₀) вирусами гриппа А человека различных субтипов: A/PR/8/34, A/Japan/305/57, A/Aichi/2/68 (рис. 3). Выявлен защитный эффект вакцины также при заражении иммунизированных мышей гетерологичным по M2e вирусом гриппа A/California/7/2009 (H1N1)pdm09, у которого эктодомен белка M2 отличается на 4 аминокислоты от последовательности M2e других субтипов вирусов гриппа А человека и от M2e, содержащегося в вакцине. При заражении вирусом A/

California/7/2009 вакцина Унифлю обеспечила 80% выживаемость мышей. Следует отметить, что защитные свойства практически не снижались и после её хранения в течение 15 мес. Вакцинация также достоверно снижала репродукцию вирусов гриппа А разных субтипов в лёгких мышей при последующем заражении: при заражении вирусом A/PR/8/34 – на 2,65 log₁₀, A/Japan305/57 – на 4,79 log₁₀, A/Aichi/2/68 – на 1,8 log₁₀.

Защитные свойства вакцины были продемонстрированы также на хорьках, чувствительность которых к вирусу гриппа и клиника гриппа максимально близки к таковым у человека. На 21-й день после иммунизации СГТ анти-M2e-IgG составил 1:43 000 против 1:200 в группе плацебо, на 61-й день он снизился в 2 раза и составил 1:19 401, что, однако, было достоверно выше, чем у хорьков группы плацебо (*p* = 0,0397) (см. рис. 2). Через 5 мес после иммунизации анти-M2e-IgG еще определялись в крови привитых хорьков и отсутствовали в группе плацебо (*p* < 0,05).

До заражения вирусом гриппа A/Brisbane/53/07 (H1N1) по результатам реакции торможения гемагглютинации (РТГА) все хорьки были серонегативными. Через 1 мес после заражения у животных обеих групп определялся протективный титр анти-НА-антител. У хорьков, имму-

низированных препаратами НВс4М2е и НВс, он составил 1:278,6 и 1:105,6 соответственно. Через 4 мес после заражения у хорьков, получивших вакцину Унифлю, титры антител в РТГА к вирусу гриппа A/Brisbane/53/07 не изменились (СГТ = 1:278,6), а у хорьков, иммунизированных препаратом НВс (плацебо), снизились почти в 2 раза (СГТ = 1:52,8). Это свидетельствует, во-первых, о том, что обе группы хорьков перенесли гриппозную инфекцию, закончившуюся формированием протективного иммунитета, и, во-вторых, указывает на то, что иммунизация хорьков рекомбинантной вакциной на основе белка НВс4М2е не только не мешала формированию нейтрализующих антител после заражения вирусом гриппа, но и способствовала его усилению и более длительному сохранению.

После заражения вирусом A/Brisbane/53/07 (H1N1) у хорьков, иммунизированных как вакциной Унифлю, так и плацебо, было зарегистрировано повышение температуры тела до 39,0–39,7°C, но у животных опытной группы показатели были в целом ниже, и нормализация наступила раньше – к 3–6-м суткам, у контрольных – к 8–9-м суткам. Как следует из рис. 4, выздоровление хорьков опытной группы наблюдали уже на 5-е сутки после заражения, тогда как в группе плацебо – на 9–10-е. Следовательно, двукратная иммунизация животных препаратом Унифлю способствовала уменьшению длительности проявления клинических симптомов заболевания на 4–5 сут.

С целью характеристики кросс-протективности и длительности сохранения защитных свойств препарата иммунизированных животных через 4 мес после первого заражения вирусом гриппа A/Brisbane /53/07 (H1N1) заражали эпидемическим вирусом гриппа A/Texas/50/2012 (H3N2). У животных как опытной, так и контрольной группы на фоне заражения вирусом гриппа A/Texas/50/2012 (H3N2) произошло незначительное снижение массы тела. В обеих группах хорьков наблюдали снижение общей активности, наличие респираторных симптомов, что свидетельствует об активном развитии инфекции. Максимум проявлений инфекции у хорьков контрольной группы наблюдался со 2-х по 6-е сутки. К 7-м суткам клинические симптомы (чихание) наблюдались только у одного животного. У иммунизированных хорьков зафиксировано выздоровление уже на 4-е сутки после заражения ($p < 0,05$).

Обсуждение

Разработанная противогриппозная вакцина Унифлю представляет собой вирусоподобные частицы, образованные коровым антигеном вируса гепатита В, несущим в иммунодоминантных областях (иммунодоминантные петли) по 4 копии пептида М2е. Многопараметрический анализ препарата, включая электронную микроскопию и масс-спектрометрию, подтвердил структуру и состав целевого белка вакцины. В качестве адьюванта в вакцину был введен Деринат–коммерческий препарат. Действующее вещество препарата Деринат более чем на 2/3 состоит из фрагментов ДНК, оканчивающихся нуклеотидным мотивом неметилированных CpG, которые взаимодействуют с TLR9. Введение Дерината экспериментальным животным усиливает экспрессию гена TLR-9, а также вызывает дозозависимое усиление экспрессии TLR9 макрофагами, что свидетельствует об активации Деринатом врожденного иммунитета через TLR9-рецепторы на антигенпрезентирующих клетках [17, 18].

Продемонстрирована высокая иммуногенность вакцины. Иммунизация двух видов лабораторных животных, мышей и хорьков, индуцировала выраженный иммунный ответ, в первую очередь высокие титры анти-M2e-IgG в сыворотках крови. Специфические к М2е IgG определялись также в БАЛ мышей через 3 нед после вакцинации. М2е-специфические IgG не являются нейтрализующими и осуществляют противовирусную активность, связываясь с эктодоменом белка М2, который экспрессируется в больших количествах на поверхности инфицированных клеток. Механизм их действия обусловлен антителозависимой (АЗКЦ) и комплемент-зависимой клеточной цитотоксичностью [9–11]. Среди иммуноглобулинов класса G подкласса IgG2a является наиболее важными медиатором АЗКЦ у мышей линии Balb/C [19–21]. Нами показано, что после вакцинации IgG2a образовывались в достаточно высокой концентрации, и соотношении IgG1/IgG2 составляло 1,15. Как видно из рис. 2, иммунный ответ на белок НВс в составе рекомбинантного вакцинного белка НВс4М2е был значительно слабее, чем на отдельный белок-носитель НВс (плацебо). Это положительный эффект, так как высокий уровень антител к белку-носителю может снизить формирование анти-M2e-антител (феномен эпитопной супрессии, при котором иммунитет против белкового носителя приводит к редукции антительного ответа против гаптена, конъюгированного с носителем) [22].

В ответ на иммунизацию происходило образование Т-лимфоцитов, экспрессирующих ИФН- γ , относящихся к Т-клеткам-хелперам 1-го типа. Именно они вызывают изотипическое переключение синтеза Ig с IgG1 на IgG2a [23], и это согласуется с полученными данными относительно образования IgG2a в сыворотках крови после иммунизации.

Результаты доклинического изучения протективности рекомбинантной вакцины Унифлю свидетельствуют о широком спектре её защитного действия. Оно проявлялось в отношении не только вирусов гриппа А, имеющих идентичную аминокислотную последовательность пептида М2е (субтипы вируса гриппа А/Н3, А/Н2, А/Н1), но и вируса А(Н1N1)pdm09, у которого аминокислотная последовательность М2е пептида отличается по 4 позициям. С большой долей вероятности можно предположить, что такой же защитный эффект (около 80%) вакцина Унифлю будет иметь в отношении вирусов субтипа А/Н5, включая высокопатогенный вирус А/Н5N1, так как пептид М2е вирусов А(Н1N1)pdm09 и А/Н5N1 отличается всего на одну аминокислоту в позиции 12, не критичной для связывания специфических антител. Протективность вакцины по отношению к другим потенциально пандемическим вирусам гриппа птичьего происхождения требует дополнительных исследований.

Защитный эффект вакцины продемонстрирован также на модели хорьков как непосредственно после вакцинации, так и спустя продолжительное время (4 мес). Клинические симптомы после заражения иммунизированных животных были более слабо выражены и исчезали быстрее, чем у хорьков, иммунизированных плацебо. Крайне важным, с нашей точки зрения, является тот факт, что иммунизация вакциной на основе пептида М2е не только не препятствовала формированию высоких титров нейтрализующих антигеммагглютининов при последующем заражении животных вирусом гриппа, но и усиливала образование этих антител. При этом не отмечено снижение титров антител в сыворотках через длительное время по-

сле иммунизации (4 мес) в отличие от титров антигемагглютининов у хорьков, получивших плацебо.

Ранее мы высказали предположение [13], что рекомбинантные кросс-протективные вакцины могут быть использованы для праймирования детей. Иммунизация такой вакциной не препятствует развитию естественной инфекции в легкой форме и соответственно формированию полноценного иммунного ответа на все вирусные белки, что совершенно исключается при ежегодной вакцинации детей субъединичными вакцинами.

Заключение

Таким образом, рекомбинантная вакцина Унифлю, созданная на основе эктодомена белка М2 вируса гриппа, приводит к формированию высокого уровня специфических иммуноглобулинов в крови и БАЛ, включая субтип IgG2a, наиболее важный медиатор АЗКЦ. Вакцина стимулирует пролиферацию Т-лимфоцитов и образование CD4+, CD8+ клеток, синтезирующих ИФН-γ. Вакцинация уменьшает тяжесть инфекции при экспериментальном заражении летальными дозами вирусов и защищает животных от гибели в 80–100% случаев. Она обладает выраженной кросс-протективностью и при успешном завершении клинических исследований может рассматриваться как предпандемическая.

Благодарность.

Работа выполнена в рамках государственного контракта № 13411.1008799.13.13 с Минпромторгом РФ. Исследования специфической активности рекомбинантного белка, содержащего М2е, на хорьках проведены при поддержке Российского научного фонда (соглашение 15-14-0043 от 19 мая 2015 г.).

Выражаем благодарность нашим коллегам - сотрудникам Федерального исследовательского центра биотехнологии РАН за выполненные генно-инженерные работы, а также сотрудникам Института доклинических исследований (Ленинградская область, Всеволожский район) за помощь в работе с хорьками.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1-16, 19-23 см. REFERENCES)

- Филатов О.Ю., Кашаева О.В., Бугримов Д.Ю., Климович А.А. Морфофизиологические принципы иммунологического действия ДНК эукариот. *Российский иммунологический журнал*. 2013; 7(4): 385-90.
- Бугримов Д.Ю., Лядов Д.В., Красноруцкая О.Н., Климович А.А. Оценка уровня экспрессии TLR-9 рецепторов при введении препарата Деринат. *Вестник новых медицинских технологий*. 2012; 19(2): 288-9.

REFERENCES

- Wood J.M. Developing vaccines against pandemic influenza. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2001; 356(1416): 1953-60.
- Neiryck S., Deroot I., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W., Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat. Med.* 1999; 5(10): 1157-63.
- Fiers W., De Filette M., El Bakkouri K., Schepens B., Roose K., Schotsaert M., et al. M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine*. 2009; 27(45): 6280-3.
- Steel J., Lowen A., Wang T.T., Yondola M., Gao Q., Haye K., et al. Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio*. 2010; 1(1): e00018-10.
- Hessel A., Savidis-Dacho H., Coulibaly S., Portsmouth D., Kreil T.R., Crowe B.A., et al. MVA vectors expressing conserved influenza

- proteins protect mice against lethal challenge with H5N1, H9N2 and H7N1 viruses. *PLoS One*. 2014; 9(2): e88340.
- Dehg L., Ibanes L.I., Van den Bossche V., Roose K., Youssef S.A., de Bruin A. et al. Protection against Influenza A Virus Challenge with M2e-Displaying Filamentous Escherichia coli Phages. *PLoS One*. 2015; 10(5): e0126650.
- WHO. Global Vaccine Action Plan. Available at: http://www.who.int/immunization/global_vaccine_action_plan/en/
- 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. *J. Immunol.* 2004; 172(9): 5598-605.
- El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A. et al. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J. Immunol.* 2011; 186(2): 1022-31.
- Andersson A.M., Hakansson K.O., Jensen B.A., Christensen D., Andersen P., Thomsen A. R., et al. Increased immunogenicity and protective efficacy of influenza M2e fused to a tetramerizing protein. *PLoS One*. 2012; 7(10): e46395.
- Kim M.C., Lee Y.N., Ko E.J. Supplementation of influenza split vaccines with conserved M2 ectodomains overcomes strain specificity and provides long-term cross protection. *Mol. Ther.* 2014; 22(7): 1364-74.
- Ravin N.V., Blokhina E.A., Kuprianov V.V., Stepanova L.A., Shaldjan A.A., Kovaleva A.A., et al. Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant loop region of hepatitis B core antigen: Insertion of multiple copies of M2e increases immunogenicity and protective efficiency. *Vaccine*. 2015; 33(29): 3392-7.
- Tsybalova L.M., Stepanova L.A., Kuprianov V.V., Blokhina E.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., et al. 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; 33(29): 3398-406.
- Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227(5259): 680-5.
- Malen H., Berven F.S., Fladmark K.E., Wiker H.G. Comprehensive analysis of exported proteins from Mycobacterium tuberculosis H37Rv. *Proteomics*. 2007; 7(10): 1702-18.
- Stepanova L.A., Kotlyarov R.Y., Kovaleva A.A., Potapchuk M.V., Korotkov A.V., Sergeeva M.V., et al. 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): e0119520.
- Filatov O.Yu., Kashaeva O.V., Bugrimov D.Yu., Klimovich A.A. Morphophysiological principles of immunological action of eukaryotic DNA. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal*. 2013; 7(4): 385-90. (in Russian)
- Bugrimov D.Yu., Lyadov D.V., Krasnorutskaya O.N., Klimovich A.A. Evaluation of the expression level of TLR-9 receptors upon administration of Derinat preparation. *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy*. 2012; 19(2): 288-9. (in Russian)
- De Filette M., Jou W.M., Birkett A., Lyons K., Schultz B., Tonkyro A., et al. Universal influenza A vaccine: optimization of M2-based constructs. *Virology*. 2005; 337(1): 149-61.
- Mozdzanovska K., Zharikova D., Cudic M., Otvos I., 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. *Viol. J.* 2007; 4: 118-29.
- Schmitz N., Beerli R., Bauer M., Jegerlehner A., Dietmeier K., Maudrich M., et al. Universal vaccine against influenza virus: linking TLR signaling to anti-viral protection. *Eur. J. Immunol.* 2012; 42(4): 863-9.
- Herzenberg L.A., Tokuhsa T., Park D.R. Epitope-specific regulation. II. A bistable, Igh-restricted regulatory mechanism central to immunologic memory. *J. Exp. Med.* 1982; 155(6): 1741-53.
- Spellberg B. Type 1/Type 2 Immunity in Infectious Diseases. *Clin. Infect. Dis.* 2000; 32(1): 76-102.

Поступила 17.11.17

Принята в печать 12.12.17