

МЕЖЕНСКАЯ
Дарья Андреевна

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

1.5.10 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Институт экспериментальной Медицины»

Научный руководитель: доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, заведующая лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А.Сморозинцева ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
Исакова-Сивак Ирина Николаевна

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии Научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАН
Ленева Ирина Анатольевна

доктор биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной вирусологии ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера
Зарубаев Владимир Викторович

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины»

Защита состоится «25» октября 2022 г. в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета Д 001.043.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморозинцева» МЗ РФ по адресу: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова, 15/17, тел. (812) 499 15 04;
e-mail: office@influenza.spb.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Сморозинцева» МЗ РФ и на сайте www.influenza.spb.ru
Автореферат разослан: «_____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д 001.043.01
кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

I. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Грипп – инфекционное респираторное заболевание, которое проявляет ярко выраженный сезонный характер и является причиной возникновения эпидемий и пандемий. Ежегодно регистрируется от трёх до пяти миллионов случаев тяжёлого течения заболевания и более чем 650 000 случаев летального исхода [Iuliano et al., 2018]. Несмотря на сниженную активность вирусов гриппа в сезоне 2020-2021 в результате принятых мер по сдерживанию нового заболевания, вызванного вирусом SARS-CoV-2 [Servick, 2021], вирусы гриппа продолжают циркулировать среди людей и наносить существенный социально-экономический ущерб.

Вакцинация является наиболее эффективной мерой по борьбе с распространением гриппа и снижению числа госпитализаций. Однако, вакцинация сезонными гриппозными вакцинами приводит к формированию преимущественно штамм-специфического гуморального иммунного ответа и является неэффективной против дрейфовых вариантов вирусов гриппа. Кроме того, периодически в человеческую популяцию заносятся совершенно новые, ранее не циркулировавшие антигенные варианты вируса гриппа, и, поскольку население к ним иммунологически наивно, вирусы с легкостью распространяются среди людей, вызывая глобальную пандемию. Особенную опасность представляют также активно циркулирующие среди животных и птиц в последнее десятилетие высокопатогенные вирусы гриппа, с потенциальной угрозой трансмиссии в человеческую популяцию. Именно эти особенности гриппозной инфекции объясняют пристальное внимание мирового научного сообщества к проблеме разработки универсальных гриппозных вакцин, направленных на индукцию перекрестно-реагирующих факторов иммунного ответа к наиболее консервативным участкам вирусных белков. Такие универсальные вакцины призваны обеспечить защиту против любого серотипа вируса гриппа А, в результате чего отпадает необходимость в ежегодной вакцинации, и, как следствие этого, существенно снижаются затраты на профилактику заболеваемости гриппом [Park and Taubenberger, 2016; Krammer et al., 2018].

Для разработки универсальных гриппозных вакцин чаще всего используют такие консервативные антигены вируса гриппа, как стеблевой домен молекулы гемагглютинина (НА), нейраминидаза (NA), а также внутренние белки вириона (белки полимеразного комплекса, нуклеопротеин (NP) и матричные белки М1 и М2) [Isakova-Sivak et al., 2021]. Несмотря на определенные успехи, достигнутые в последние годы в области создания универсальной гриппозной вакцины, до сих пор не представлены конструкции, полностью удовлетворяющие всем требованиям безопасности, иммуногенности, генетической стабильности, возможности крупномасштабного производства и экономической целесообразности. В этой связи разработка новых подходов к созданию универсальных гриппозных вакцин является своевременной и актуальной.

Степень разработанности темы. Эктодомен белка М2 (М2е) вируса гриппа А является наиболее широко используемой мишенью для создания универсальной гриппозной вакцины ввиду его консервативности среди различных подтипов вируса гриппа А. Однако сам по себе фрагмент М2е является слабым иммуногеном из-за своего размера, малого числа вхождения в вирион, а также из-за экранирующего действия более крупных поверхностных белков вируса гриппа А [Saelens, 2019]. Опубликовано большое количество работ, целью которых являлось усиление иммуногенности М2е с помощью различных носителей. Для повышения иммуногенности М2е чаще всего используют присоединение этого маленького пептида к более крупному белковому носителю; также используют увеличение числа повторов М2е с последующим включением получившейся структуры в различные системы доставки. Одним из таких носителей может выступать белок GCN4, который является эукариотическим транскрипционным белковым активатором. Использование такого носителя М2е (М2е-tGCN4) привело к значительной выработке М2е-специфических антител,

уровень которых обеспечил защиту вакцинированных мышей от летальной дозы ВГА, адаптированного для мышей [De Filette et al., 2008]. Другим носителем может выступать коровый фрагмент вируса гепатита В (М2е-НВс), использование которого также привело к выработке М2е-специфических антител и защите вакцинированных мышей [El Bakkouri et al., 2011]. Имеются исследования, в которых М2е присоединялся к N-концу укороченного белка теплового шока (HSP70359-610), выделенного из *Mycobacterium tuberculosis* [Ebrahimi and Tebianian, 2011]. Также в качестве носителя может быть использован пептид слияния вируса гриппа [Guo et al., 2017], различные липосомные носители [Adler-Moore et al., 2017], поверхностный белок вируса табачной мозаики [Petukhova et al., 2013], липоротейн Ag473 *Neisseria meningitidis* [Zykova et al. 2020], флагеллин [Stepanova et al. 2018; Tsybalova et al. 2018; Шуклина и др. 2020], и другие [Kolpe et al., 2017].

В настоящее время некоторые разработки находятся на различных этапах клинических испытаний. Так, вакцина АСАМ-FLU-А, основанная на первоначальной идее Neiryck [Neiryck et al., 1999], уже прошла I фазу клинических испытаний (NCT00819013, Sanofi). Внутримышечное введение АСАМ-FLU-А способствовало формированию анти-М2е антител в сыворотках крови у 90% испытуемых и не вызывала побочных действий. Однако уровень таких антител быстро снижался со временем, в результате чего дальнейшие клинические испытания АСАМ-FLU-А были приостановлены. Аналогичная идея использования вакцины на основе НВс [Tsybalova et al., 2015] была изучена при проведении клинических испытаний вакцины «Унифлю» (NCT03789539, VA Pharma LLC). Другая гриппозная вакцина, основанная на идее использования флагеллина для увеличения иммуногенности М2е [Huleatt et al., 2008], в I фазе клинических испытаний продемонстрировала высокую иммуногенность (NCT00921206, VaxInnate) [Turley et al., 2011]. Тем не менее, вакцины на основе М2е пока не были зарегистрированы для профилактики гриппозной инфекции, и разработки в данном направлении продолжаются.

Целью исследования является разработка универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена М2 белка вируса гриппа А. В соответствии с целью, были поставлены следующие задачи:

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

Научная новизна работы. Данная работа явилась первой попыткой создания универсальной живой гриппозной вакцины, индуцирующей усиленный гуморальный иммунный ответ к консервативному участку белка М2 вируса гриппа А. Впервые были сконструированы рекомбинантные штаммы живой гриппозной вакцины (ЖГВ) подтипов Н1N1, Н3N2 и Н7N9 на основе отечественного донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57, кодирующие в составе молекулы гемагглютинаина 4 копии М2е белка. Встроенные фрагменты 4М2е представляют собой консенсусные последовательности М2е всех генетических линий вирусов гриппа А, циркулирующих среди людей, свиней и птиц. Впервые был сконструирован рекомбинантный

штамм ЖГВ, экспрессирующий фрагмент 4М2е в рамке считывания NS1 белка донора аттенуации А/Ленинград/17/57, укороченного до 126 а.к. Было показано, что интраназальная иммунизация животных рекомбинантными штаммами ЖГВ+4М2е приводила к выработке статистически достоверно более высоких уровней анти-М2е антител по сравнению с классическими штаммами ЖГВ. При этом встраивание М2е эпитопов в молекулу гемагглютинина приводило к выработке статистически достоверно более высоких уровней М2е-специфических антител, по сравнению с внесением 4М2е кассеты в рамку считывания NS1 белка. Впервые проведено детальное изучение различных звеньев вирусспецифического иммунитета при иммунизации новыми вакцинными прототипами, которое показало, что наиболее вероятным механизмом, обеспечивающим перекрестную защиту иммунизированных животных от заражения гетерологичным вирусом гриппа, является секреция М2е-специфических антител В-клетками, расположенными в медиастинальных лимфатических узлах животных. Кроме того, эксперименты по пассивной иммунизации мышей сыворотками иммунизированных животных показали наиболее широкий спектр защиты у образцов из групп ЖГВ+4М2е, что также указывает на вклад М2е-специфических антител в усиление защиты от заражения гетерологичными вирусами гриппа.

Теоретическая и практическая значимость работы.

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

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

Методология и методы исследования. В работе применяли стандартные вирусологические, серологические, иммунологические, биоинформатические и статистические методы. Исследование проводилось на базе ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины».

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Вакцинные штаммы живой гриппозной вакцины, кодирующие в своем геноме дополнительные консенсусные последовательности эктодомена М2 белка, являются безвредными, иммуногенными и индуцируют у экспериментальных животных повышенные уровни М2е-специфических антител, коррелирующие со степенью защиты от заражения гетеросубтипическими вирусами гриппа А.
2. Перекрестная защита животных, иммунизированных экспериментальными прототипами универсальной живой гриппозной вакцины, обеспечивается за счет усиленной секреции М2е-специфических антител В-клетками, расположенными в медиастинальных лимфатических узлах, на ранних стадиях после заражения. При этом наиболее вероятной эффекторной функцией М2е-специфических антител является комплемент-зависимая цитотоксичность.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном проведении важнейших этапов исследования, включая анализ литературных данных по теме исследования, поиск консервативных

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

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертационного исследования были представлены на различных международных (The 8th ESWI Influenza Conference (Декабрь 4-7, 2021, онлайн), The 7th ESWI Influenza Conference (Декабрь 6-9, 2020, онлайн); 10th edition of Options for the Control of Influenza (Август 28 – Сентябрь 02, 2019, Сингапур); Научно-практическая конференция с международным участием «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» (Декабрь 4-6, 2018, Санкт-Петербург); XXI Международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина» (Апрель 14, 2018, Санкт-Петербург); 2nd International Meeting on Respiratory Pathogens (Март 7-9, 2018, Сингапур) и российских конференциях (Санкт-Петербургская молодежная школа-конференция «Достижения и перспективы в борьбе с инфекционными заболеваниями (грипп, COVID-19) на национальном и международном уровне», посвященная 120-летию со дня рождения академика А.А. Смородинцева (Сентябрь 6-7, 2021, Санкт-Петербург); XII Ежегодный всероссийский конгресс по инфекционным заболеваниям (Сентябрь 7-9, 2020, Москва).

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

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 143 страницах машинописного текста, включая 5 таблиц и 45 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, шести глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 254 источников на русском и английском языках.

II. ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Для проведения исследования были использованы клетки эпителия почки зелёной мартышки (Vero) и клетки эпителия почки собаки (Madin-Darby canine kidney, MDCK). Обе клеточные линии инкубировались при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂.

Плазмидные ДНК. Для создания прототипа универсальной гриппозной вакцины были использованы различные плазмиды на основе вектора pCIPollSapIT, содержащие полноразмерные копии генов вируса гриппа А, имеющиеся в музее отдела вирусологии им. А.А.Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» [Isakova-Sivak et al., 2011]. Плазида, кодирующая участок 4M2e (консенсусные последовательности человеческого (2 эпитопа), свиного и птичьего эпитопов) была синтезирована в ГенСкрипт (США). Синтез конструкции 4M2e, соответствующей консенсусным последовательностям линий птица/свинья, человек/свинья, свинья и человек был осуществлён компанией ООО «Евроген» (Москва, Россия).

Вирусы гриппа. В работе были использованы различные штаммы вирусов гриппа, полученных из Музея штаммов ФГБНУ «ИЭМ»: А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2); А/Ануи/1/2013 (H7N9); А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1pdm09); А/Гонконг/1073/99 (H9N2); А/Миссисипи/10/13 (H1N1pdm09); А/Нанчанг/993/95 (H3N2); А/PR8/34 (H1N1). Адаптированный к мышам вирус А/Калифорния/07/2009 (H1N1pdm09) был получен из ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава РФ.

Пептиды. Для исследования иммуногенных свойств рекомбинантных вакцинных штаммов использовался пептид 3M2e, наработанный в клетках E.coli и любезно предоставленный Dr. A. Kazaks (Латвийский Центр биомедицинских исследований и образования, Рига, Латвия).

Лабораторные животные. Мышей (самок) линии BALB/c получали из питомника «Столбовая» (Московская обл.). В опытах использовались мыши в возрасте 4-6 недель, весом 18-20 г. Также часть исследования проводилась на модели хорьков (самцы) на базе ООО «Институт доклинических исследований». Для проведения исследований на мышинной модели было получено разрешение этического комитета ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины» (№ 1/20 от 27.02.2020), а проведение испытаний на модели хорьков было одобрено биоэтической комиссией ООО «Институт доклинических исследований», Ленинградская обл. (№ 4.51/20 от 11.09.2020). Для анестезии мышей были использованы лёгкий эфирный или изофлюрановый наркозы, для анестезии хорьков - золетил-ксилазиновый наркоз.

Эволюционный анализ последовательностей M2e. Для поиска консенсусных последовательностей M2e, из базы данных Influenza Research Database (fludb.org) были получены все последовательности M генов вирусов гриппа А, выделенных от основных переносчиков вирусов гриппа – человека (27 253 последовательности), свиней (5 379 последовательностей) и птиц (15 367 последовательностей). Выравнивание всех последовательностей и построение филогенетического дерева осуществлялось с помощью сервиса MAFFT [Katoh et al., 2017], а визуализация дерева выполнялась с использованием сервера Interactive Tree Of Life (iTOL) [Letunic and Bork, 2019]. Поиск превалирующих аминокислот был выполнен с использованием Unipro UGENE [Okonechnikov et al., 2012], а визуализация полученных данных – с использованием RStudio.

Оценка репликативных свойств вакцинных штаммов в системах *in vitro* и *in vivo*. Активность репродукции вирусов гриппа при перmissive (33°C), повышенной (38°C) и при пониженной (26°C) температурах оценивали по результатам их титрования в РКЭ. Вирусы считали температурочувствительными (*ts* фенотип), если разница в титрах вируса при оптимальной и повышенной температурах составляла не менее 5,0 lgЭИД₅₀, и холодоадаптированными (*ca* фенотип), если разница в титрах вируса при оптимальной и пониженной температурах не превышала 3,0 lgЭИД₅₀. Инфекционная активность вирусов гриппа определялась методом предельных разведений по методу Рида и Менча [Reed and Muench, 1938], а титры выражались в 50%-ных инфекционных дозах вирусов.

Также репликативные свойства вирусов оценивались с использованием перевиваемой линии клеток MDCK. Титры вирусов определяли методом предельных разведений с детекцией вируса в реакции гемагглютинации. Титр вирусов рассчитывали по методу Рида и Менча и выражали в lgТЦИД₅₀. Для оценки кинетики накопления вирусов монослой клеток заражали исследуемыми штаммами с множественностью заражения 0,01 (т.е. 0,01 инфекционная единица вируса на каждую клетку), с последующей инкубацией клеток при температуре 33°C. Пробы культуральной жидкости отбирали каждые 12 часов, а затем титровали методом предельных разведений на клетках MDCK.

Для определения уровней репродукции вирусов в лёгких и носовых ходах мышей животных заражали интраназально исследуемыми вирусами в дозах 6-7 lgЭИД₅₀ в 50 мкл. На 3 и/или 6 сутки осуществляли забор органов и определяли титры вирусов в гомогенатах тканей путем их титрования в РКЭ методом предельных разведений.

Оценка экспрессии M2e эпитопов рекомбинантными вирусами гриппа. Подтверждение экспрессии встроенных эпитопов 4M2e рекомбинантными вирусами гриппа проводили двумя способами. Первый способ состоял в проведении вестерн-блоттинг анализа с детекцией антигена при помощи моноклонального антитела 14C2 (моноклональное антитело к M2 белку вируса гриппа А). Этот способ применялся для оценки экспрессии M2e, встроенных в молекулу HA вакцинных штаммов. Для этого сконструированные вирусы, а также соответствующие им классические штаммы ЖГВ накапливали в РКЭ, концентрировали ультрацентрифугированием на градиенте плотности сахарозы, а затем проводили электрофоретическое разделение белков с последующим переносом белковых фракций на нитроцеллюлозную мембрану. Дальнейшая обработка мембраны моноклональным антителом 14C2 позволяла судить о наличии эпитопов M2e во фракциях, соответствующих различным формам HA. Поскольку встраивание M2e эпитопов в рамку считывания NS1 белка не подразумевает наличия дополнительных молекул M2e в составе вирусной частицы, доказать экспрессию этих фрагментов методом Western blot не представляется возможным. Поэтому оценку экспрессии M2e антигена проводили путем заражения клеток MDCK исследуемыми химерными вирусами с последующей оценкой связывания зараженных клеток с моноклональным антителом 14C2 в иммуноферментном анализе.

Оценка иммуногенности и кросс-протективной активности новых вакцинных прототипов в экспериментах на мышах. Изучение иммуногенных свойств вакцинных кандидатов проводилось с использованием мышей линии BALB/c. Иммунизация животных рекомбинантными штаммами ЖГВ+4M2e проводилась параллельно с контрольными вирусами – классическими штаммами ЖГВ соответствующего подтипа. В качестве отрицательного контроля животным вводили фосфатно-солевой буфер (PBS). Мышей иммунизировали интраназально вирусами в дозе 300 МИД₅₀ (для вирусов H7N9) или 7,0 IgEID₅₀ (для вирусов H3N2, поскольку данные штаммы демонстрируют низкий уровень репликации в респираторных органах мышей), двукратно, с интервалом 3 недели. На 21-й день после каждой иммунизации у мышей осуществлялся забор крови через ретро-орбитальный синус для оценки иммунного ответа на вакцинацию. Оценка уровней сывороточных IgG антител была проведена методом ИФА. В качестве антигенов были использованы соответствующие очищенные вирусы гриппа или рекомбинантный белок 4M2e. Для вакцинных штаммов подтипов H7N9 и H3N2 были также изучены изотипы индуцируемых анти-M2e антител (IgG1 и IgG2a) в ИФА с использованием соответствующих вторичных антител. Для выявления достоверных различий между уровнями индуцируемых антител проводилась оценка площадей под кривыми оптической плотности.

Поскольку M2e-специфические антитела не являются нейтрализующими [Saelens 2019], дальнейшее изучение механизма действия данных антител включало в себя оценку их функциональной активности, в частности, комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) и антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗЦ). Для оценки КЗЦ активности антител клетки MDCK, инфицированные вирусом А/Южная Африка/3626/2013, инкубировали с сыворотками крови иммунизированных и контрольных мышей, после чего оценивали пропорцию клеток MDCK, находящихся в стадии позднего апоптоза, с помощью окрашивания пропидий иодидом и YO-PRO и анализом проб методом проточной цитометрии. АЗЦ активность антител оценивалась по уровню дегрануляции клеток натуральных киллеров (НК) при связывании с M2e-специфическими антителами, присутствующими в образцах сывороток крови иммунизированных мышей. Для этого антитела сорбировали на планшеты, предварительно покрытые рекомбинантным белком 3M2e, после чего к антителам добавляли спленоциты наивных мышей линии C57BL/6J в качестве источника мышинных НК клеток. Последующая инкубация клеток с сыворотками, их покраска мечеными антителами для выявления популяции дегранулированных НК клеток (анти-CD3, анти-

CD49b, анти-CD45.2, анти-CD107a) и анализ с помощью проточной цитометрии позволили оценить ADCC активность антител у экспериментальных животных.

На 42-й день эксперимента животных подвергали интраназальному инфицированию вирулентными челлендж-вирусами различных серотипов, взятыми в различных заражающих дозах. Защитный эффект вакцинации оценивали по уровню выживаемости животных в период 14 дней после заражения, а также по снижению потери массы тела животных по сравнению с контрольными неиммунизированными животными. Для нелетальных челлендж-вирусов протективный эффект оценивали по снижению титров вирусов в респираторном тракте мышей на 3 и/или 6 сутки после заражения.

Для исключения роли Т-клеточного иммунного ответа в защитном потенциале вакцинных штаммов были проведены эксперименты по пассивной иммунизации мышей. Для этого сыворотки мышей после двукратной иммунизации химерным прототипом или соответствующим контрольным штаммом ЖГВ вводили наивным мышам линии BALB/c внутривенно через ретро-орбитальный синус в объеме 100 мкл. Спустя 6 часов мышей заражали различными вирулентными вирусами гриппа в дозах 1-3 ЛД₅₀. Эффект от введения иммунной сыворотки оценивался по снижению массы тела и выживаемости мышей в течение 2 недель после заражения.

Изучение перспективных кандидатов в универсальную живую гриппозную вакцину в доклиническом испытании на модели хорьков.

Исследования экспериментальных штаммов ЖГВ на основе вируса А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2), экспрессирующих дополнительные эпитопы M2e в составе HA и NS1 генов вируса, проводили на модели хорьков. Эти животные являются лучшей тест-системой для изучения гриппозной инфекции, поскольку инфекция у них протекает как у человека со сходными клиническими проявлениями (репродукция в дыхательных путях, насморк, лихорадка и т. д.) [Belser et al. 2018].

Оценка безвредности и иммуногенности вакцинных кандидатов на модели хорьков. Перед началом исследования всем хорькам вживляли температурные рекордеры для непрерывного отслеживания их температуры тела. Для оценки безвредности вакцинных штаммов самцы хорьков (n=7 для каждой группы) были дважды иммунизированы соответствующим вакцинным штаммом на 0-й и 21-й дни эксперименты, в дозе 7,0 IgЭИД₅₀, интраназально в объеме 500 мкл. Контроль безвредности вакцинных кандидатов включал в себя такие параметры, как анализ массы и температуры тела животных, данные клинических наблюдений, а также патологоанатомические исследования органов респираторного тракта животных, собранных через 7 дней после второй иммунизации (n=3 для каждой группы). После каждой иммунизации у хорьков собирались назальные смывы (дни 1-4 и 22-24, соответственно) для определения уровня репликации вакцинных штаммов в носовых ходах привитых животных.

Для *оценки системного гуморального иммунного ответа* сыворотки крови хорьков, собранные через 3 недели после однократной и двукратной иммунизации, изучались в иммуноферментном анализе с использованием в качестве антигена как цельного очищенного вируса H3N2, так и рекомбинантного белка 3M2e. Для более детального изучения кросс-реактивных свойств индуцированных сывороточных IgG антител был проведен анализ их способности связываться с вирусными антигенами, экспонированными на поверхности зараженных вирусом гриппа клеток. Для этого клетки MDCK заражались различными вирусами гриппа А с М генами различной природы, при этом M2e последовательности таких вирусов совпадали с последовательностями соответствующих эпитопов из кассеты 4M2e. Далее различные разведения сывороток добавляли к зараженным клеткам и связывание антител с вирусными антигенами оценивали в ИФА.

Оценка кросс-протективной активности вакцинных штаммов в отношении патогенного гетерологического вируса гриппа H1N1. Через 3 недели после повторной иммунизации животные (по 4 хорька в группе) были подвергнуты действию высокой дозы (6,0 lgЭИД₅₀) гетерологического челлендж-вируса А/Южная Африка/3626/2013 (S.A. H1N1). В течение 4-х дней после заражения проводился забор назальных смывов хорьков, а на 5-е сутки был осуществлён забор органов дыхательной системы (лёгкие, трахея и носовые ходы) с целью определения уровня репликации патогена, а также для проведения патоморфологического исследования. Уровни репликации вируса в образцах смывов и тканей определяли путем титрования образцов на развивающихся куриных эмбрионах. Протективный эффект вакцинации также оценивали по ряду клинических параметров, включая изменения температуры и массы тела, поведенческих реакций, а также по интенсивности микроскопических повреждений в респираторных органах (трахеи и лёгкие) в гистопатологических исследованиях. С помощью индивидуальных вживляемых температурных датчиков фиксировались показатели температуры тела животных каждые 30 минут на протяжении 5 дней после экспериментального заражения. Далее этот массив данных анализировали путем вычисления площадей под кривыми разницы температур (AUC delta T) индивидуально для каждого животного.

Оценка В- и Т-клеточного ответа у иммунизированных хорьков после экспериментального заражения гетерологическим вирусом гриппа H1N1. Для более детального изучения защитных механизмов экспериментальных вакцинных штаммов против действия гетерологического челлендж-вируса, на 5-й день после экспериментального заражения также были собраны селезёнки всех животных. Далее методом проточной цитометрии была определена доля антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток после *in vitro* стимуляции выделенных спленоцитов различными антигенами. Для стимуляции были взяты цельные очищенные вирусы ЖГВ H3N2, S.A. H1N1, а также рекомбинантный белок 3M2e. Оценку уровней вирус-специфических Т клеток проводили с использованием стандартного метода внутриклеточного окрашивания цитокинов. Также на 5-й день после челленджа был осуществлён сбор медиастиальных лимфатических узлов (МЛУ) хорьков, выделенные клетки которых далее изучались на способность продуцировать IgG антитела в системе *in vitro* с антигенной стимуляцией и без стимуляции. Для определения общего уровня IgG антител, стимулированных клетками МЛУ, 2 миллиона клеток, ресуспендированных в среде CR-0, инкубировались в 96-луночных планшетах при 37°C, в атмосфере 5% CO₂. Образцы надосадков отбирались на 2-й, 4-й и 6-й дни исследования. Затем общая концентрация IgG антител в надосадках определялась в ИФА с нормализацией на IgG стандарт хорьков с известной концентрацией. Кроме того, клетки, выделенные из МЛУ, инкубировались в присутствии различных антигенов (очищенный вирус или рекомбинантный белок 3M2e), сорбированных на 96-луночных планшетах. После 24-часовой инкубации определяли уровни связавшихся антител с помощью стандартного иммуноферментного анализа. Полученные в результате реакции оптические плотности образцов служили оценкой секреции антиген-специфических антител В-лимфоцитами МЛУ.

Оценка защитного потенциала вакцинных штаммов в отношении патогенных гетерологических вирусов гриппа А в опытах по пассивной иммунизации. Для выявления кросс-протективного потенциала выработанных на иммунизацию вакцинными прототипами антител в отношении различных вирулентных вирусов гриппа, сыворотки иммунизированных хорьков были использованы в экспериментах по пассивной иммунизации мышей. Для этого использовали панель патогенных для мышей вирусов гриппа, имеющих в своём составе М гены различной природы. Пул сывороток из животных каждой группы прогревали при 56°C в течение 1 часа, после чего обработанные образцы смешивали с равным объемом патогенного вируса в дозе 3 ЛД₅₀ с последующим инкубированием 30 минут при комнатной температуре. Далее такая вирус содержащая смесь вводилась интактным мышам интраназально в объёме 50 мкл, после чего в

течение последующих 2-х недель оценивался защитный эффект иммунных сывороток по отношению к патогену.

Статистическая обработка данных. Статистический анализ для пар вирусов проводился с использованием критерия Манна-Уитни. Сравнение значений площадей под кривыми проводилось с использованием дисперсионного анализа ANOVA с поправкой Тьюки на множественное сравнение. Статистическая достоверность разницы в снижении массы тела между двумя группами определялась тестом Манна-Уитни, сравнение кривых выживаемости проводилось с использованием теста Мантела-Кокса. Различия между группами считались достоверными при $p < 0.05$.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Поиск оптимальной последовательности M2e для конструирования универсальной гриппозной вакцины

Одной из причин низкой вариабельности эктодомена M2 белка (M2e) вируса гриппа А является его неспособность вызывать иммунный ответ у инфицированного организма, в результате чего данный белок не подвержен селективному отбору со стороны популяционного иммунитета. Другой, даже более важной причиной, как считается, является генетическое родство между белками M2e и M1: аминокислотные остатки 1-9 M2e белка и M1 белка кодируются одними и теми же нуклеотидами в одной и той же рамке считывания. Аминокислотные остатки (а.о.) 10-23 M2e и 239-252 M1 также кодируются одной и той же последовательностью РНК, но транслируются в разных рамках считывания [Deng et al, 2015]. M1 белок, в свою очередь, является высококонсервативным матриксным белком вирусов гриппа А с небольшим числом известных мутаций [Fiers et al, 2009]. Одним из важнейших вопросов при создании M2e-содержащих вакцин является корректный подбор консенсусных последовательностей M2e эпитопов. Для этих целей нами были проанализированы все имеющиеся последовательности M гена в базе данных Influenza Research Database (fludb.org) на основе их видовой принадлежности [Deng et al, 2015] и эволюционного родства [Furuse et al., 2009]. Для поиска консенсусной последовательности M2e белков для конструирования универсальной вакцины были реализованы следующие подходы:

Подход 1. Анализ M2e с точки зрения видовой принадлежности организмов, из которых были выделены соответствующие вирусы, с использованием баз данных Immune Epitope Database (<http://www.iedb.org/>) и Influenza Research Database (fludb.org). В ходе реализации такого подхода были выбраны наиболее превалирующие аминокислоты для каждого положения каждого из организмов (человек, свинья и птица). Итоговая целевая кассета содержала 2 эпитопа M2e от вирусов гриппа человека (SLLTEVETPIRNEWGSRSSDSSD), и по одному – от вирусов свиней (SLLTEVETPTRSEWGRSSDSSD) и птиц (SLLTEVETPTRNEWESRSSDSSD). Следует отметить, что такой подход не учитывает возникающих сайленс-мутаций в самом гене M2, а также не учитывает возможности переноса гена M2 при преодолении межвидового барьера вируса, как это произошло при пандемии 2009-го года.

Подход 2. В данном случае проводили филогенетический анализ всех имеющихся последовательностей M генов вирусов гриппа А, выделенных от людей, птиц и свиней. В ходе реализации такого подхода были найдены 6 основных эволюционных ветвей M гена (Рис.1). Между консенсусами, полученными отдельно для каждой линии, наблюдаются отличия по 7 положениям, которые могут играть существенное значение при подборе последовательности антигена для создания универсальной гриппозной вакцины. Так, например, в литературных данных описано, что иммунизация свиней человеческим M2e с использованием различных носителей не защитила животных от летальной дозы вируса гриппа А свиной природы [Heinen et al, 2002; Liu et al, 2004;

Liu et al., 2005]. Более детальный анализ обнаруженных консенсусных последовательностей M2e белка для всех линий позволил выделить четыре различных консенсуса, максимально охватывающих вирусы гриппа всех организмов: птиц/свиней (SLLTEVETPTRNGWESKSSDSSD), человека/свиней (SLLTEVETPTRSEWESRSSGSSD), свиней (SLLTEVETPIRNGWESKSNDDSSD) и человека (SLLTEVETPIRNEWGSRNSDSSD).

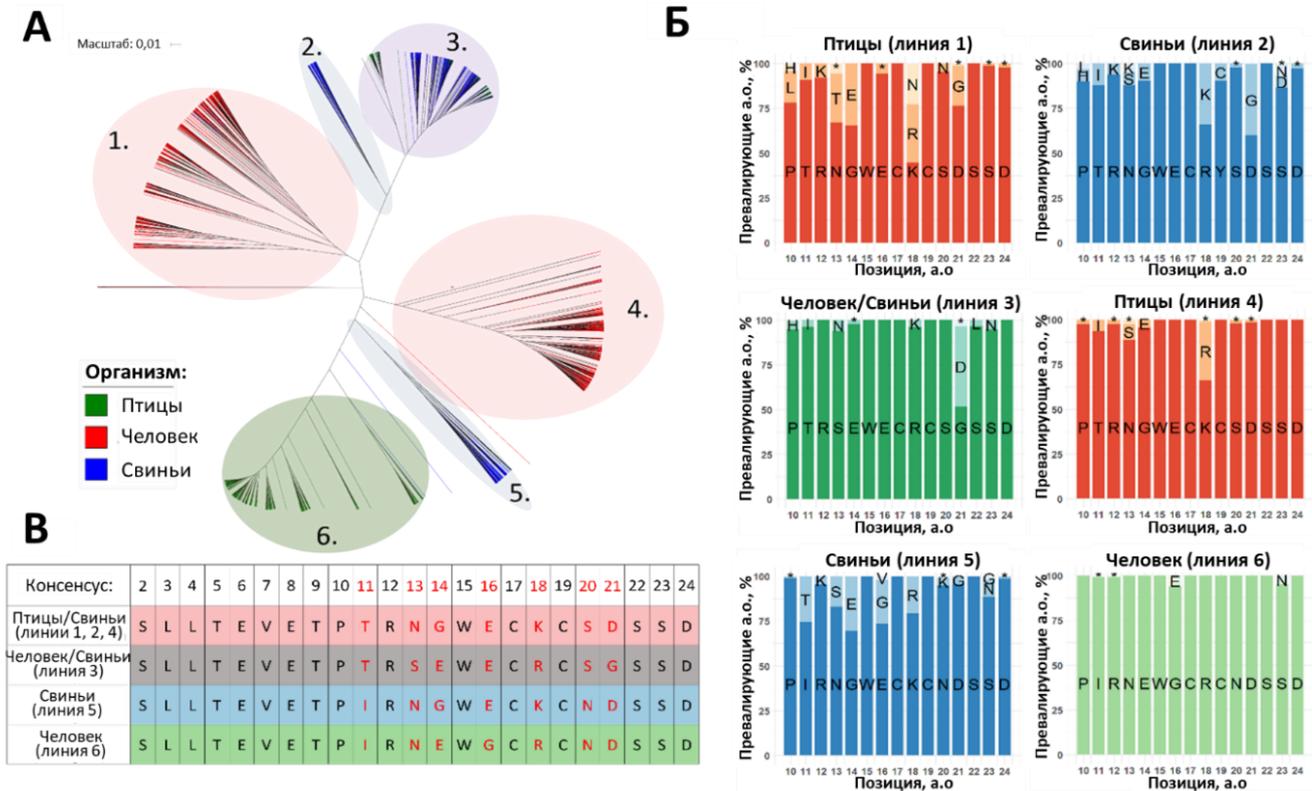


Рисунок 1 – Анализ последовательностей М гена вирусов гриппа А человека, свиньи и птицы. **А.** Филогенетическое дерево, отображающее родственность М генов различных хозяев. **Б.** Превалирующие аминокислотные остатки в каждой из полученной филогенетической линии. А.о. с общим процентным показателем ниже 3% обозначены как «*». **В.** Консенсусные последовательности, которые могут быть использованы для разработки универсальной гриппозной вакцины.

Отобранные в подходах 1 и 2 консенсусные последовательности M2e были объединены в кассеты, по 4 эпитопа в каждой, разделенных гибкими линкерами. Соответствующие нуклеотидные последовательности были химически синтезированы *de novo*, и далее использовались для клонирования в геном вакцинных штаммов ЖГВ.

2.2. Конструирование вакцинных штаммов, кодирующих дополнительные эпитопы M2e

Синтезированные кассеты 4M2e встраивали либо с N-конца молекулы гемагглютинина, либо в рамку считывания неструктурного белка NS1, укороченного до 126 аминокислот (Рис.2). В первом случае встроенные M2e эпитопы прикреплялись к молекуле HA через гибкий линкер и экспонировались в составе химерного белка на поверхности вирусных частиц. Во втором случае кассета M2e отделялась от гена NS1-126 сайтом саморасщепления P2A, что должно обеспечивать независимый процессинг вирусного белка и встроенного антигена внутри зараженной клетки.

Для конструирования химерных генов HA+4M2e были взяты 3 плазмиды, представляющие собой вектор для обратной генетики вируса гриппа rCIPolISapIT, в который были ранее встроены полноразмерные копии гена HA следующих штаммов ЖГВ: А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2),

А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) и А/Ануи/1/2013 (H7N9). В каждую из этих плазмид был встроены сайт рестрикции BsmBI между сигнальным пептидом и первой субъединицей НА, и именно по этому сайту рестрикции далее производилось клонирование синтезированной конструкции 4M2e с помощью последовательных этапов рестрикции и лигирования. Таким образом, были сконструированы химерные гены НА вирусов гриппа, несущие по 4 tandemных повтора M2e на N-конце субъединицы НА1 через линкер АААРGAA:

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

Аналогично, сайт рестрикции BsmBI был встроены в область 126 аминокислоты гена NS1 донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57. Далее, путем последовательных циклов амплификации с N-конца синтезированной кассеты 4M2e был добавлен сайт саморасщепления P2A (GATNFSLLKQAGDVEENPG↓P). Данный фрагмент P2A+4M2e затем был клонирован по сайту BsmBI в подготовленный вектор Лен17/NS стандартными методами рестрикции и лигирования (Рис.2).

С использованием сконструированных химерных генов были собраны рекомбинантные вакцинные штаммы ЖГВ с дополнительными эпитопами M2e на основе актуальных вирусов гриппа А подтипов H1N1, H3N2 и H7N9. Сборку жизнеспособных вирусов проводили с использованием 8-плазмидной системы [Hoffmann et al., 2000] путем трансфекции чувствительных клеток Vero методом электропорации, с последующим накоплением вирусов в развивающихся куриных эмбрионах. Для дальнейших экспериментов по оценке биологических свойств новых вакцинных кандидатов также были собраны парные вакцинные реассортантные штаммы ЖГВ с классическим набором генов. Все вирусы были подвергнуты полногеномному секвенированию методом Сэнгера, для подтверждения наличия встроенных M2e эпитопов в их геноме и сохранности всех аттенуирующих мутаций, отвечающих за безвредность вакцины.

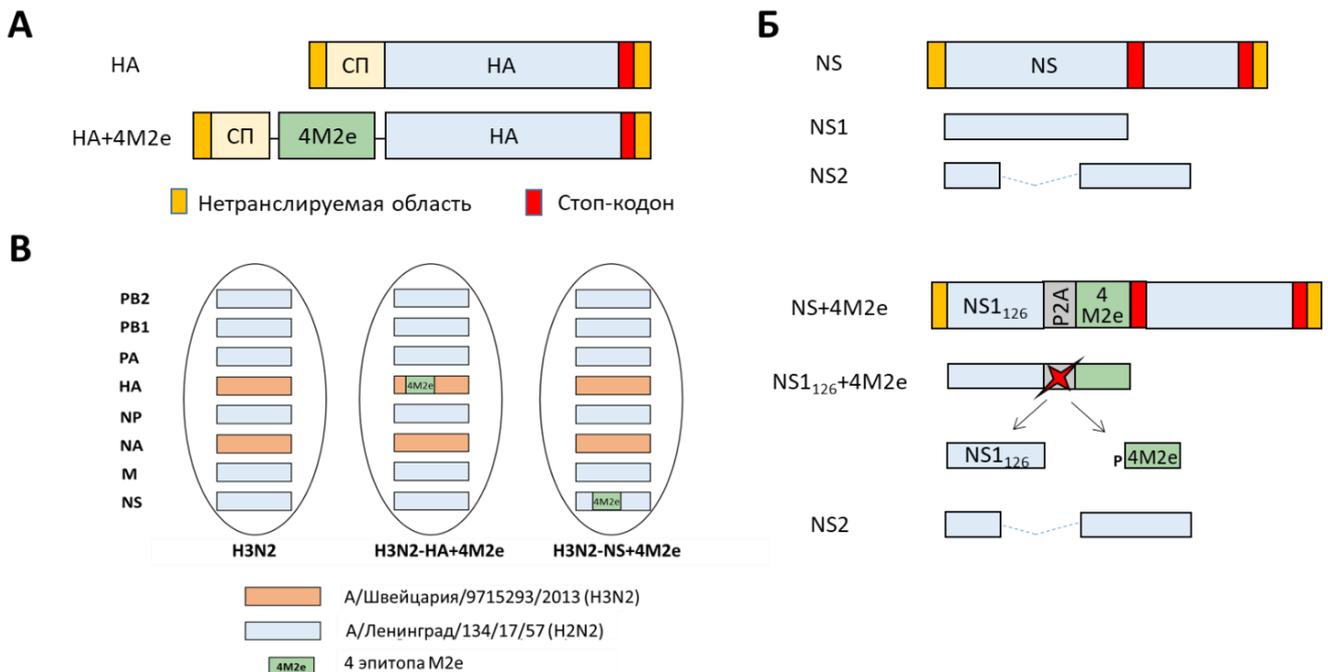


Рисунок 2 – характеристика вакцинных прототипов, сконструированных в настоящей работе. **А.** Схематическое изображение химерного гена НА, содержащего кассету 4M2e. **Б.** Схема химерного укороченного гена белка NS1, содержащего вставку 4M2e. **В.** Состав генома реассортантных штаммов ЖГВ, использованных в данной работе на примере штамма H3N2. P2A: сайт саморасщепления (GSGATNFSLLKQAGDVEENPG↓P).

2.3. Изучение ростовых характеристик вакцинных прототипов в системах *in vitro* и *in vivo*

Вакцинные штаммы ЖГВ должны обладать определенным набором биологических свойств, наиболее важными из которых являются температурочувствительный (*ts*) и холодоадаптированный (*ca*) фенотипы. Все сконструированные в настоящем проекте рекомбинантные вирусы гриппа со вставками М2е эпитопов в гене НА обладали выраженными *ts* и *ca* фенотипами, свойственными исходным классическим вакцинным штамма ЖГВ: они активно реплицировались в развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) при пониженной до 26°C температуре, но при этом были не способны активно размножаться при повышенной температуре 38°C (Рис.3А). Эти данные указывают на то, что вставка 4-х tandemных повторов М2е белка в субъединицу НА1 молекулы гемагглютинина не сказывалась на активности репликации вакцинных вирусов в системе РКЭ при различных температурах инкубации.

На примере сразу несколько штаммов было показано, что вставка кассеты 4М2е в ген NS1 вакцинного штамма ЖГВ также не повлияла на *ts* фенотип вируса, однако способность рекомбинантного штамма ЖГВ-NS+4М2е размножаться при пониженной температуре 26°C была снижена относительно его классического варианта (Рис.3А), что также было отмечено ранее для других векторных вакцинных штаммов на основе ЖГВ со вставками иммуногенных эпитопов в рамку считывания NS1 белка [Isakova-Sivak et al, 2020; Kotomina et al, 2018; Kotomina et al, 2019]. Сохранность *ts* фенотипа вирусов указывает на их безопасность, так как такие вакцинные вирусы будут размножаться только в верхних дыхательных путях привитых, вызывая образование специфического иммунитета «входных ворот» инфекции, но при этом не будут размножаться в нижних дыхательных путях, т.е. не будут вызывать клинических проявлений заболевания.

Также одной из важных характеристик вирусов гриппа является скорость накопления инфекционного материала в различных системах культивирования. Кроме РКЭ такой системой может являться перевиваемая линия клеток MDCK, которая имеет ряд преимуществ в плане стандартизации производственного процесса, независимости от поставок куриных эмбрионов, возможность быстрого масштабирования производства в условиях пандемии, а также возможность исключить компоненты животного происхождения в вакцине. В ходе настоящего исследования было показано, что вставка 4М2е существенно не влияла на ростовые характеристики рекомбинантных вакцинных штаммов ЖГВ, независимо от того, в какой ген вакцинного штамма была интегрирована кассета 4М2е (Рис.3В). Единственным наблюдаемым различием между контрольным вирусом и новым рекомбинантным вирусом являлось различие для H1N1 и H1N1+4М2е при 12-36-ти часах инкубации, которое может быть объяснено индивидуальными особенностями вируса. Однако такой сниженный уровень репликации H1N1+4М2е в первые 1,5 суток инкубации существенно не сказывался на дальнейших различиях между вирусами – после 1,5 суток инкубации отсутствует статистически достоверное различие между титрами для химерного вируса и соответствующего контроля. В ходе исследования было показано, что оптимальное время для достижения максимального вирусного титра в культуре клеток MDCK составляет 60-72 часа, как для классических штаммов ЖГВ, так и для рекомбинантных вирусов ЖГВ+4М2е (Рис.3В).

Также для всех рекомбинантных штаммов был подтвержден аттенуированный фенотип при интраназальном заражении мышей линии BALB/c: вакцинные вирусы не реплицировались в тканях нижних дыхательных путей (легкие), тогда как эти вирусы были способны к активной репликации в носовых ходах иммунизированных животных (Рис.3С).

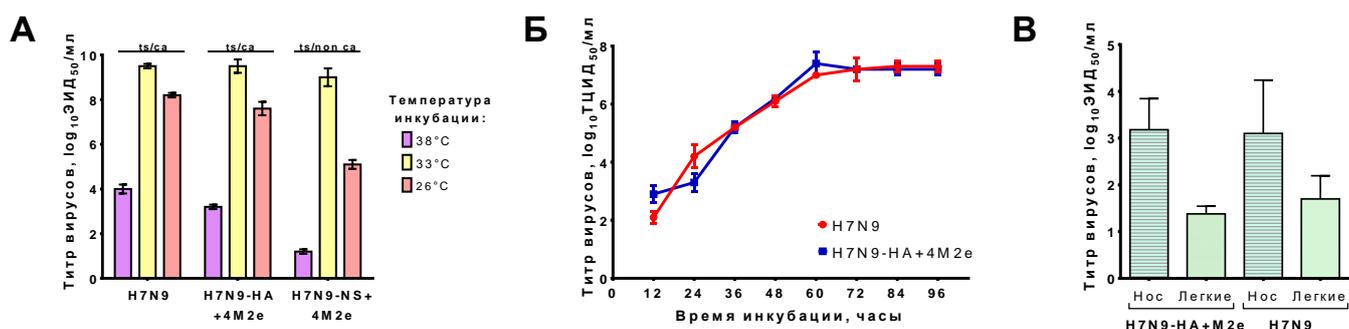


Рисунок 3 – Ростовые характеристики исследуемых вирусов гриппа на примере штамма ЖГВ H7N9. А. Инфекционная активность вакцинных штаммов в РКЭ, инкубированных при различных температурах. В. Кинетика накопления вирусов на клетках MDCK. С. Репродукция вирусов респираторном тракте мышей линии BALB/c на 3 день после заражения.

2.4. Оценка экспрессии M2e фрагментов рекомбинантными вирусами гриппа

Для подтверждения присутствия встроенных дополнительных M2e-эпитопов в молекулу HA различных штаммов ЖГВ, был проведён вестерн-блот анализ вирусных белков, разделенных в результате электрофореза очищенного на градиенте сахарозы вирусного материала в полиакриламидном геле. Для анализа были взяты все рекомбинантные вирусы H7N9-HA+4M2e, H3N2-HA+4M2e и H1N1-HA+4M2e совместно со своими контролями – штаммами ЖГВ H7N9, H3N2 и H1N1, соответственно. В результате обработки моноклональным антителом 14C2 (распознаёт 6-13 а.о. M2e) у всех рекомбинантных вирусов были обнаружены специфические полосы молекулярной массы ~55, 100 и 130 кДа, предположительно соответствующие субъединице HA1, белку HA0 и олигомерной форме HA (Рис.4А) [Veits et al., 2006], тогда как классические вакцинные штаммы не имели указанных полос связывания. Однако, у всех исследуемых вирусов был зафиксирован собственный M2 белок молекулярной массы ~15 кДа (Рис.4А).

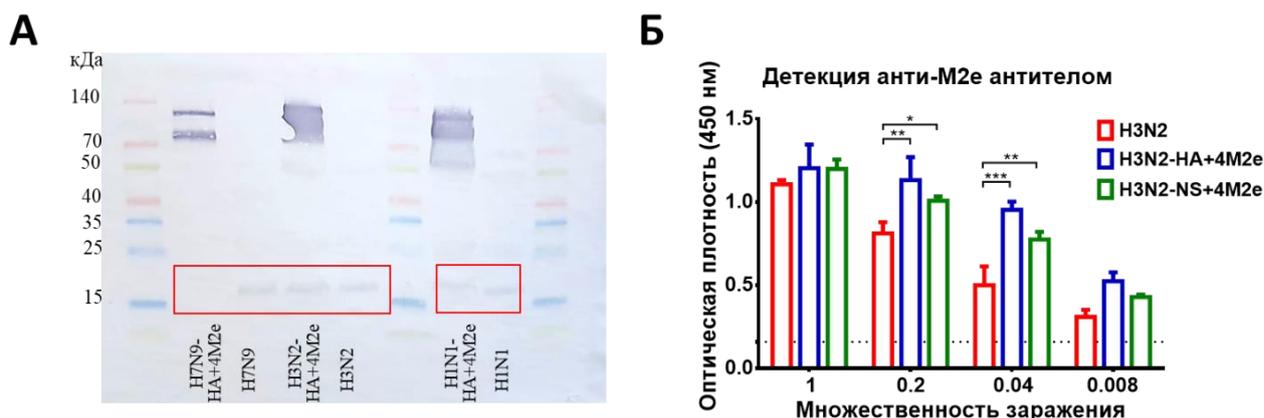


Рисунок 4 – Оценка способности вакцинных кандидатов экспрессировать M2e-фрагмент в результате анализа методом вестерн-блоттинга (А) и клеточного ИФА (В). В обоих случаях вирусы были использованы с соответствующими контролями, не имеющими вставку 4M2e, а для детекции было использовано антитело 14C2.

Также оценивалась способность модифицированных вакцинных кандидатов экспрессировать M2e-фрагменты на поверхности заражённых клеток. Клетки MDCK были заражены различными дозами исследуемых вирусов, а детекция M2e антигена на поверхности клеток проводилась с использованием антитела 14C2. При высокой множественности заражения

M2e антиген фиксировался в равных количествах как при использовании рекомбинантных штаммов H3N2+4M2e и H3N2-NS+4M2e, так и в случае штамма ЖГВ H3N2, поскольку известно, что M2 белок нарабатывается в большом количестве внутри заражённых клеток. Однако, при уменьшении заражающей дозы был обнаружен статистически достоверно больший уровень детекции M2e антигена специфическим антителом, что указывает на наличие дополнительных эпитопов M2e в составе H3N2+4M2e и H3N2-NS+4M2e вакцин (рис. 4B).

2.5. Иммуногенность экспериментальных вакцинных штаммов в опытах на мышах

Для сравнения иммуногенности вакцинных штаммов ЖГВ и ЖГВ-НА+4M2e мыши линии BALB/c были дважды иммунизированы интраназально с трёхнедельным интервалом, тогда как мыши из контрольной группы получали раствор PBS. После сбора сывороток на 42-й день эксперимента, методом ИФА определялся уровень сывороточных антител как к самому вакцинному вектору, так и к дополнительной вставке 4M2e. При использовании в качестве антигена цельного вируса гриппа были обнаружены схожие уровни IgG антител у химерных и соответствующих контрольных вакцинных штаммов ЖГВ (Рис. 5А). При использовании в качестве антигена рекомбинантного белка 3M2e было показано, что в группах ЖГВ-НА+4M2e специфические антитела к данному белку образовывались в статистически достоверно больших количествах, чем в группах мышей, иммунизированных соответствующими штаммами классической ЖГВ (Рис.5В).

Таким образом, было показано отсутствие влияния внесенных дополнительных эпитопов M2e на способность химерных вакцинных штаммов индуцировать специфический гуморальный иммунный ответ к цельному вирусу гриппа, а также усиленное образование M2e-специфических антител при иммунизации рекомбинантными вирусами гриппа. Эти антитела, как ожидается, будут обеспечивать защиту привитых животных от дрейфовых вариантов вирусов гриппа.

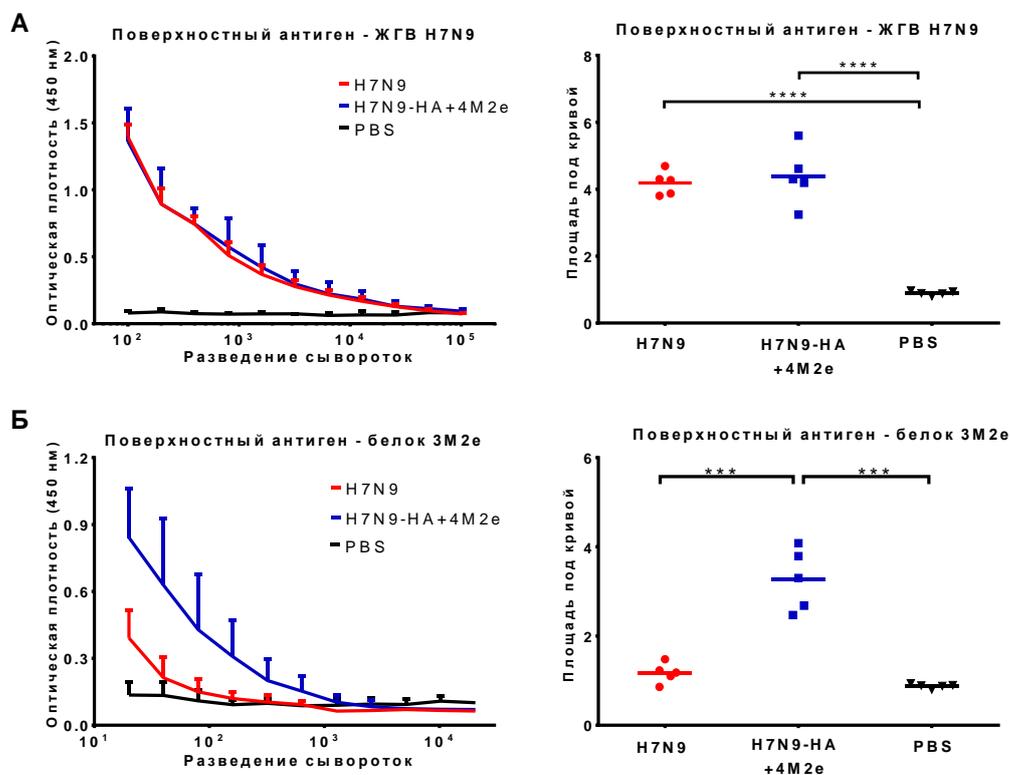


Рисунок 5 – Оценка уровней сывороточных IgG антител у мышей после двукратной иммунизации исследуемыми вакцинными штаммами на примере вируса ЖГВ H7N9. **А.** Использование в качестве подложки в ИФА цельного вируса гриппа. **Б.** Использование в качестве подложки в ИФА рекомбинантного белка 3M2e.

Оценка комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ) антител в сыворотках крови мышей после двукратной вакцинации с помощью ЖГВ H7N9-НА+4M2e и H7N9, а также на шестой день после проведения экспериментального заражения вакцинированных мышей вирулентным гетерологичным вирусом А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1) показала, что сыворотки мышей, иммунизированных вакцинным штаммом H7N9+4M2e, обладали более выраженной активностью КЗЦ, по сравнению с контрольной группой H7N9 (Рис.6В). Последующее заражение иммунизированных мышей гетерологичным вирусом гриппа приводило к еще более выраженному усилению КЗЦ активности антител в группе рекомбинантной вакцины, но не в других контрольных группах (Рис.6С). Эти данные указывают на то, что M2e-специфические антитела, индуцируемые химерным вакцинным штаммом, обладают выраженной комплемент-зависимой цитотоксичностью, что может являться одним из защитных механизмов кросс-протективного действия.

Двукратная иммунизация мышей исследуемыми вакцинными кандидатами показала, что уровень АЗЦ активности выработанных антител не отличался между химерным штаммом и классическим вариантом ЖГВ (Рис.7В). Несмотря на то, что в группе H7N9-НА+4M2e после заражения челлендж-вирусом уровень АЗЦ активность антител статистически достоверно отличалась от контрольных групп (Рис.7С), его общее значение осталось на довольно низком уровне. Возможным объяснением отсутствия значимого проявления АЗЦ активности может являться недостаточный уровень сформированных анти-M2e антител. Например, в работе Kirsteina и др. [Kirsteina et al., 2020] по созданию прототипа универсальной гриппозной вакцины на основе вирусоподобных частиц уровни M2e-антител значительно превышали уровни, полученные в настоящем исследовании. Также возможным объяснением может являться незначительность АЗЦ механизма для M2e-содержащих вакцин на основе ЖГВ, что согласуется с данными Fu и др. [Fu et al, 2009] по изучению протективного действия анти-M2e антител.

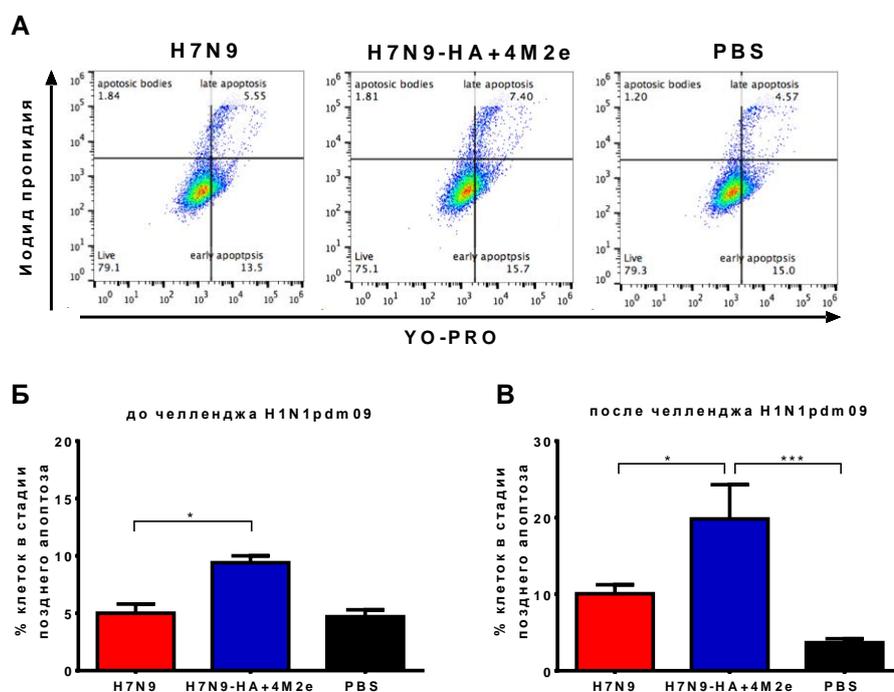


Рисунок 6 – Оценка функциональной активности антител в тесте комплемент-зависимой цитотоксичности (КЗЦ). **А.** Репрезентативные гейты в цитометрическом анализе клеток MDCK, окрашенных YO-PRO и пропидий иодидом. **В.** КЗЦ-активность сывороток крови мышей, иммунизированных указанными вакцинными вирусами, на 21 день после второй иммунизации. **С.**

КЗЦ-активность сывороток крови мышей, иммунизированных указанными вакцинными вирусами, на 6 сутки после заражения гетерологичным вирулентным вирусом гриппа.

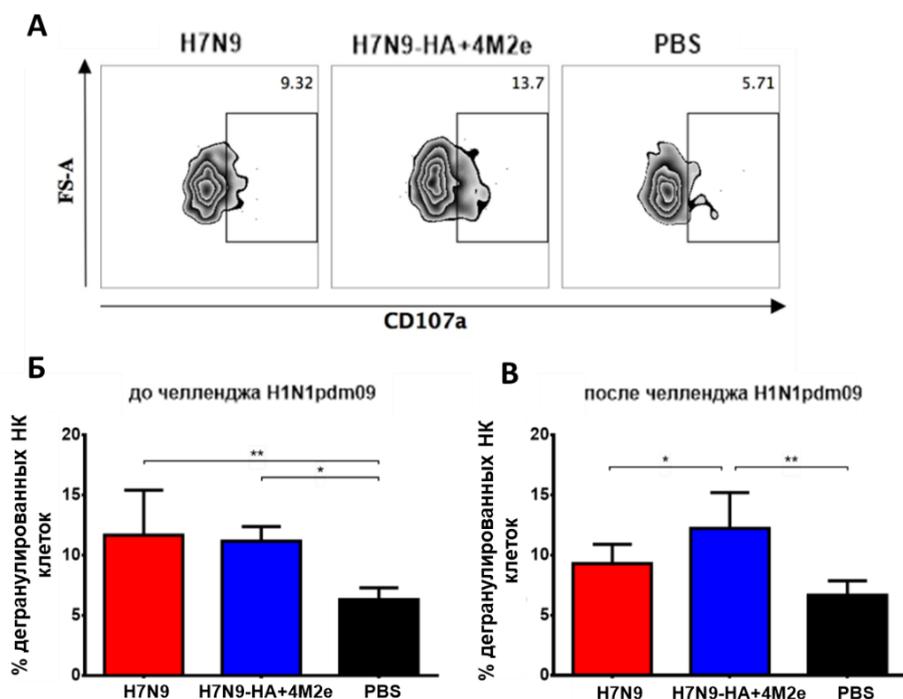


Рисунок 7 – Оценка функциональной активности антител в тесте антитело-зависимой дегрануляции НК-клеток. **А.** Репрезентативные гейты в цитометрическом анализе дегрануляции НК-клеток. **Б.** Уровень дегрануляции в присутствии сывороток крови мышей, собранных на 21 сутки после второй иммунизации указанными вакцинными кандидатами. **С.** Уровень дегрануляции в присутствии сывороток крови мышей, собранных на 6 сутки после заражения гетерологичным вирулентным вирусом гриппа.

2.6. Защитная эффективность вакцинных штаммов на модели мышей

Оценка защитного потенциала вакцинных штаммов подтипа H7N9 против нелетальных для мышей вирусов H3N2 и H9N2 проводилась путём сравнения вирусных титров в лёгких мышей на 3-й и 6-й день после экспериментального заражения животных. В случае заражения вирусом H3N2 наблюдалась полная защита мышей, вакцинированных обоими вариантами ЖГВ ($p < 0.001$ между вакцинными группами H7N9-HA+4M2e и H7N9 с контрольной группой PBS), поскольку в этих группах челлендж-вирус отсутствовал даже на 3-й день, тогда как у контрольной группы PBS он присутствовал в достаточно высоком титре. Челлендж с помощью вируса H9N2 также не выявил значимых различий между вакцинными группами, поскольку оба вакцинных штамма обеспечили защиту в достаточной мере, которая привела к отсутствию челлендж-вируса в легких мышей на 6 сутки после заражения ($p < 0.001$ между вакцинными группами H7N9-HA+4M2e и H7N9 с контрольной группой PBS).

В целом попарное сравнение классических штаммов ЖГВ и других подтипов с рекомбинантными вариантами ЖГВ-HA+4M2e имели схожий результат: при низких дозах летального челлендж-вируса ($< 10 LD_{50}$) отсутствовала достоверная разница между вакцинными группами. Все вакцинные штаммы на основе ЖГВ эффективно защищали животных от значимой потери веса и от гибели, которые наблюдались в группе PBS (Рис.8А).

Однако, при увеличении дозы челлендж-вирусов защитной эффективности самой ЖГВ оказалось недостаточно. Так, например, в случае использования челлендж-вируса А/Калифорния/7/2009 (H1N1) в дозе $300 LD_{50}$ после вакцинации ЖГВ на основе H7N9, в группах H7N9 и PBS, наблюдалась 100% смертность после заражения, тогда как в группе H7N9+4M2e выживаемость составила 60% (Рис.8В).

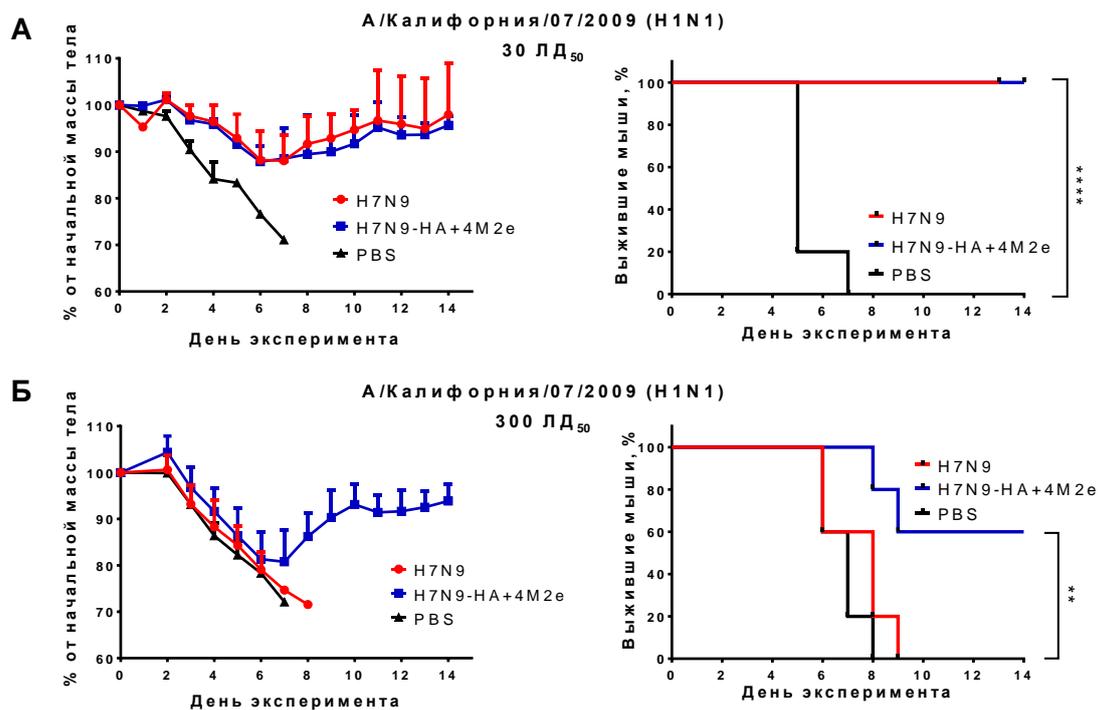


Рисунок 8 – Оценка защитной эффективности вакцинных штаммов против действия высоких доз летальных челлендж-вирусов. После двукратной иммунизации H7N9, H7N9-NA+4M2e или PBS, мыши были подвергнуты действию 30 ЛД₅₀ (А) или 300 ЛД₅₀ (Б) адаптированного для мышей вируса А/Калифорния/7/09 (H1N1). Снижение массы тела (слева) и выживаемость (справа) фиксировались ежедневно в течение 14 дней после челленджа.

Эксперименты по пассивной иммунизации интактных мышей иммунными сыворотками и последующему экспериментальному заражению животных также выявил преимущество ЖГВ-NA+4M2e перед их классическими аналогами: в группах рекомбинантных вакцинных штаммов у мышей наблюдалась меньшая потеря веса и смертность по сравнению с контрольными группами, что указывает на вклад анти-M2e антител в защитный потенциал. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о преимуществе рекомбинантных вакцинных штаммов ЖГВ-NA+4M2e перед классическим штаммом ЖГВ, поскольку они стимулируют образование существенных уровней M2e-специфичных антител, обладающих дополнительным защитным потенциалом в отношении различных штаммов вирулентных вирусов гриппа А.

2.7. Доклиническое изучение перспективных кандидатов в универсальную живую гриппозную вакцину на модели хорьков

Для проведения доклинических исследований были отобраны следующие химерные вакцинные прототипы и соответствующий контрольный штамм на основе сезонных штаммов ЖГВ:

Группа 1 (H3N2) – штамм ЖГВ на основе вируса А/Швейцария/9715293/2013 (H3N2);

Группа 2 (H3N2-NA+4M2e) – рекомбинантный штамм ЖГВ со вставкой 4M2e в гене NA;

Группа 3 (H3N2-NS+4M2e) – рекомбинантный штамм ЖГВ со вставкой 4M2e в гене NS;

Группа 4 (PBS) – плацебо.

2.7.1. Изучение безопасности и иммуногенности вакцинных штаммов на модели хорьков

Для оценки безвредности вакцинных штаммов хорькам вводили соответствующие вакцинные вирусы двукратно в дозе 7,0 lgЭИД₅₀, интраназально с интервалом 21 день. Титрование

индивидуальных смыслов хорьков с использованием куриных эмбрионов выявило высокий уровень репликации всех вакцинных штаммов в первые дни после вакцинации (на 1й день после иммунизации средний титр в каждой из вакцинных групп составил $\sim 4.5 \text{ lgЭИД}_{50}/\text{мл}$), что свидетельствует об отсутствии негативного влияния дополнительной вставки 4M2e на приживляемость живой вакцины. После 2-й иммунизации практически у всех животных не наблюдалось активной репликации вируса в верхних дыхательных путях, что может свидетельствовать об уже сформированном иммунитете к данному вакцинному штамму после первой иммунизации.

В период иммунизации не было зафиксировано существенных колебаний температуры и массы тела у животных ни в одной из экспериментальных групп. Кроме того, не было выявлено клинических проявлений заболевания. Патологоанатомическое исследование органов респираторного тракта мышей, собранных через 7 дней после второй иммунизации ($n=3$ для каждой группы) также не выявил повреждающего действия вакцинных кандидатов на внутренние органы и ткани. В результате чего был сделан вывод о безопасности изученных вакцинных кандидатов при их двукратном интраназальном введении в дозе $7,0 \text{ lgЭИД}_{50}$.

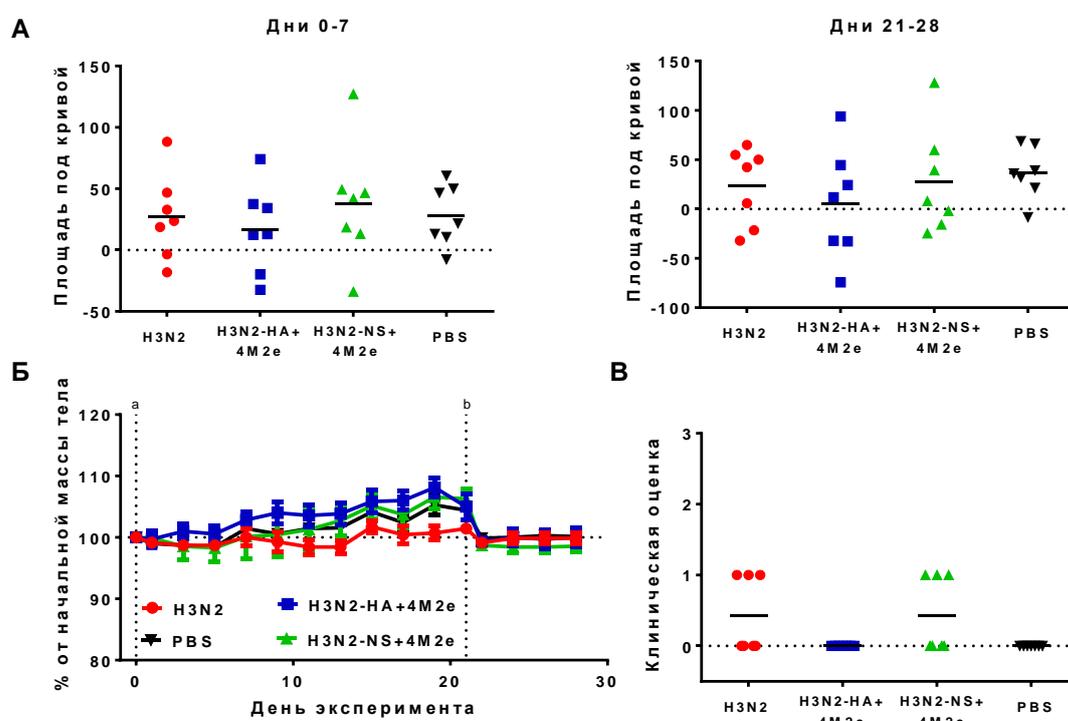


Рисунок 9 – Безвредность вакцинных прототипов в эксперименте на хорьках. **А.** Значения параметра площади под кривой ΔT для каждого хорька в течение 7 дней после 1й и 2й иммунизации. **Б.** Динамика изменения массы тела животных в период иммунизации. **В.** Оценка клинических проявлений инфекции для каждого животного в течение 28 дней эксперимента.

2.7.2. Оценка иммуногенности и протективной активности рекомбинантных вакцинных штаммов H3N2-HA+4M2e и H3N2-NS+4M2e на модели хорьков, с особым вниманием к изучению механизмов формирования иммунологической в-клеточной памяти к встроенным антигенам, а также функциональная активность индуцируемых антител

Далее проводили оценку иммуногенности вакцинных кандидатов H3N2-HA+4M2e и H3N2-NS+4M2e, в сравнении с исходным контрольным штаммом ЖГВ H3N2, а также их способность обеспечивать защиту хорьков от заражения гетерологичным вирулентным вирусом гриппа подтипа H1N1.

2.7.2.1. Системный гуморальный иммунный ответ

Для оценки гуморального иммунного ответа сыворотки крови хорьков, собранные через 3 недели после однократной и двукратной иммунизации, изучались в ИФА с использованием в качестве антигена как цельного очищенного вакцинного вируса H3N2, так и рекомбинантного белка 3M2e. Высокие уровни IgG антител, связывающиеся с цельным вирусным антигеном, образовались во всех вакцинных группах уже после однократного введения вирусов, с усиление иммунного ответа к вирусу H3N2 при повторной иммунизации (Рис.10А). При использовании в качестве антигена M2e белка иммунный ответ был обнаружен только у животных, иммунизированных рекомбинантными вакцинами с дополнительной вставкой M2e. Причем в случае введения ЖГВ со вставкой 4M2e в молекуле НА значимый ответ наблюдался уже после 1-й иммунизации с последующим усилением после 2-й иммунизации, тогда как встраивание M2e эпителиев в NS ген привело к формированию анти-M2e ответа только после 2-й иммунизации (Рис.10В).

Таким образом, включение дополнительных M2e эпитопов в состав НА на поверхности вириона стимулировало более выраженную индукцию анти-M2e антител по сравнению с экспрессией аналогичных эпитопов в рамке считывания NS1 белка, который экспрессируется внутри зараженной клетки, но не присутствует в составе вириона.

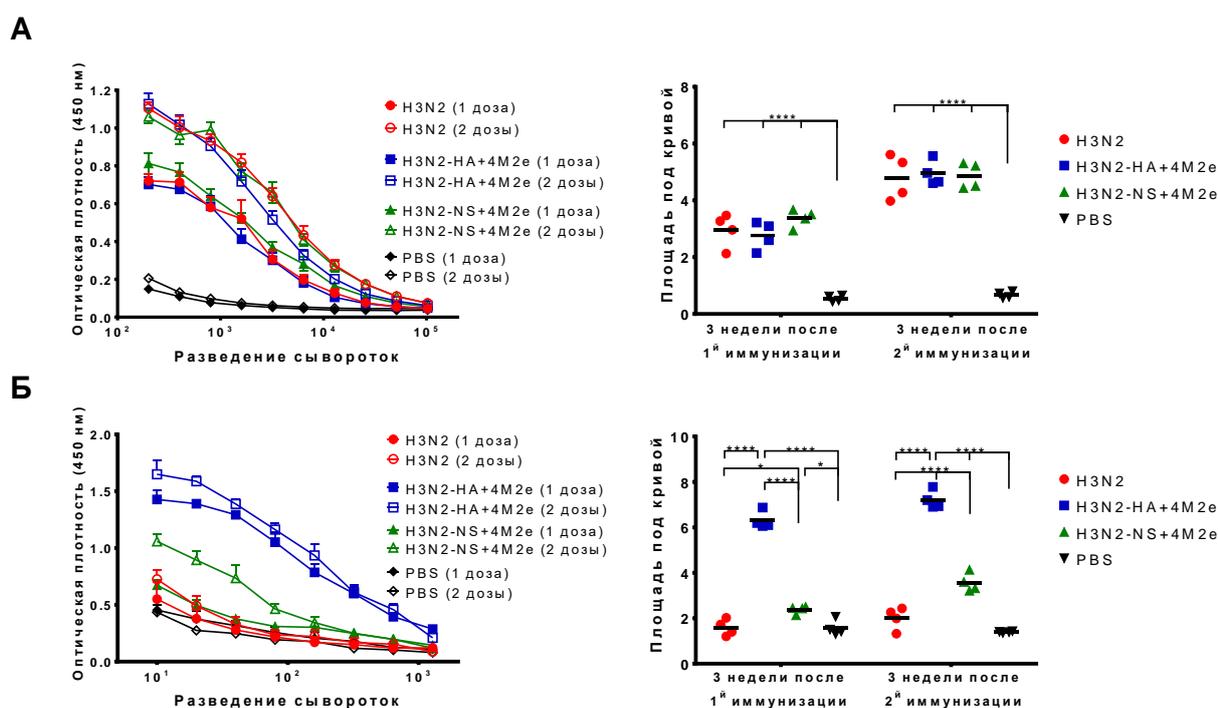


Рисунок 10 – Исследование гуморального IgG ответа привитых хорьков после каждой из иммунизаций методом ИФА с использованием в качестве антигена цельного вакцинного вируса гриппа (А) и рекомбинантного белка 3M2e (Б).

Для более детального изучения кросс-реактивных свойств индуцированных сывороточных IgG антител был проведен анализ их способности связываться с вирусными антигенами, экспонированными на поверхности зараженных вирусом гриппа клеток. Для этого клетки MDCK заражали различными вирусами гриппа А с М генами различной природы, при этом M2e последовательности таких вирусов совпадали с последовательностями соответствующих эпитопов из кассеты 4M2e. Было показано, что клетки, заражённые каждым из выбранных вирусов, наиболее активно связываются с IgG антителами, присутствующими в сыворотках хорьков,

иммунизированных прототипами ЖГВ+4M2e, в сравнении с сыворотками животных, привитых классическим штаммом ЖГВ. Такой результат позволяет предположить, что усиление связывания происходит благодаря стимулированным после иммунизации анти-M2e антителам, которые эффективно распознают заражённые вирусом клетки.

2.7.2.2. Оценка кросс-протективной активности вакцин в отношении патогенного гетерологичного вируса гриппа H1N1

Через 3 недели после повторной иммунизации животные (по 4 хорька в группе) иммунизированные животные были заражены высокой дозой ($6,0 \text{ IgЭИД}_{50}$) гетерологичного пандемического челлендж-вируса А/Южная Африка/3626/2013. В течение 4-х дней после заражения проводился забор назальных смывов хорьков, а на 5-е сутки был осуществлён забор органов дыхательной системы (лёгкие, трахея и носовые ходы) с целью определения уровня репликации патогена. Было показано, что иммунизация классическим штаммом ЖГВ привела к снижению вирусных титров в носовых ходах, однако, значимое статистическое отличие от группы PBS было достигнуто только на 5-й день после челленджа (Рис.11А). Иммунизация животных с помощью H3N2-НА+4M2e или H3N2-NS+4M2e привела к значимому снижению титра вируса в назальных смывах по сравнению с группой плацебо уже на 1-й день после челленджа. Кроме того, иммунизация классической H3N2 не привела к снижению вирусной нагрузки в тканях трахеи и лёгких по сравнению с группой PBS. В тоже время вакцина на основе модифицированного НА привела к снижению титров вируса во всех 5 долях легкого, тогда как вакцинный прототип H3N2-NS+4M2e снизил вирусную нагрузку только в 2-х долях из пяти (Рис.11В).

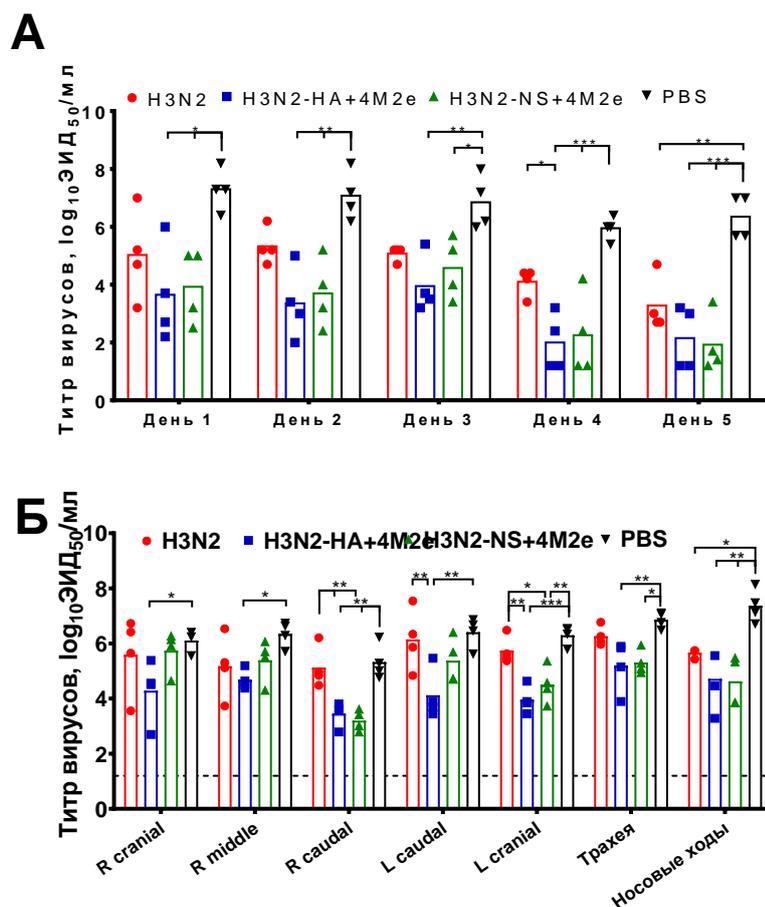


Рисунок 11 – Оценка уровня репликации челлендж-вируса H1N1 в респираторных органах хорьков. А. Уровни репликации челлендж-вируса в верхних дыхательных путях хорьков,

определенные путем титрования назальных смывов в РКЭ. **Б.** Титры вируса в гомогенатах тканей (трахея, носовые ходы, лёгочная ткань) хорьков на 5 сутки после челленджа.

Гистопатологическое исследование тканей легких хорьков на 5 сутки после челленджа выявило ряд серьезных патологических изменений в группах ЖГВ и PBS, в тканях которых были обнаружены обширные очаги серозно-геморрагической пневмонии, а также эмфизематозно увеличенные участки. Для вакцинных кандидатов H3N2+4M2e и H3N2+NS-4M2e отмечалась значительно менее выраженная патология тканей легких по сравнению с контрольными группами (Рис.12).

Таким образом, несмотря на то что у всех иммунизированных животных гетерологичный челлендж-вирус обнаруживался в достаточном количестве во всех типах тканей, нами было показано усиление кросс-протективных свойств вакцин при включении в состав генома дополнительных эпитопов M2e. И также была выявлена следующая градация эффективности вакцин: ЖГВ/HA+4M2e > ЖГВ/NS+4M2e > ЖГВ >> PBS.

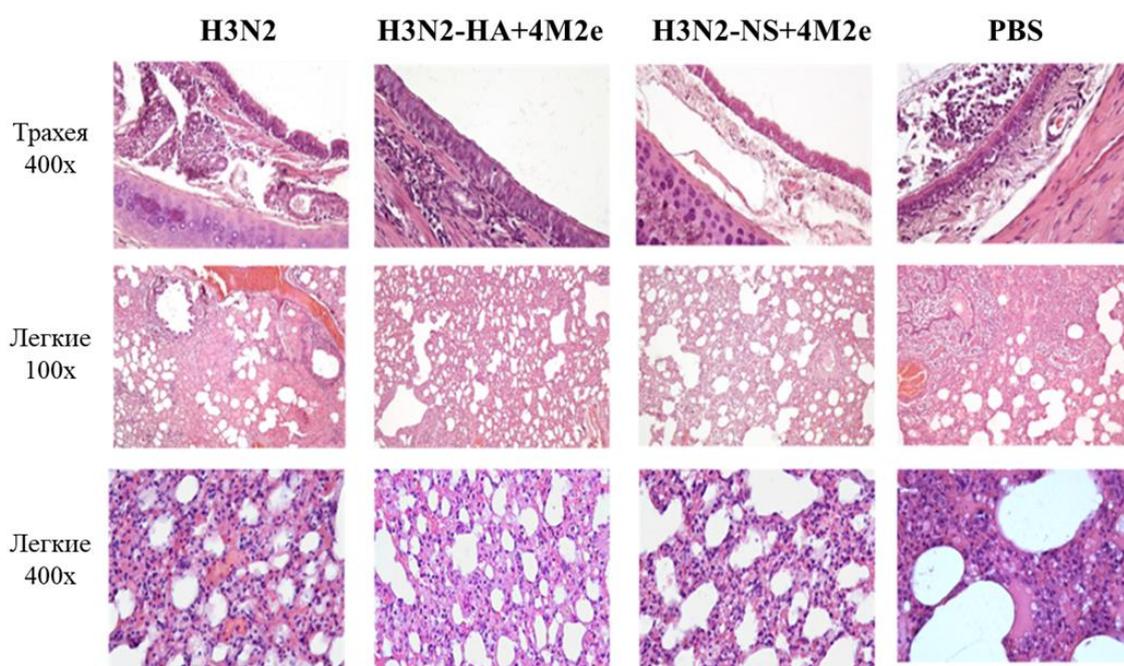


Рисунок 12 – Гистопатологический анализ респираторных органов хорьков после челленджа. Срезы тканей легких и трахеи были окрашены гематоксилином и эозином.

2.7.2.3. Оценка В- и Т-клеточного ответа у иммунизированных животных экспериментального заражения

Для более детального изучения защитных механизмов вакцин ЖГВ-HA+4M2e и ЖГВ-NS+4M2e против действия гетерологичного челлендж-вируса, на 5-й день после челленджа также были собраны селезенки всех животных. Далее методом проточной цитометрии была определена доля антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток после *in vitro* стимуляции выделенных спленоцитов различными антигенами. Для стимуляции были взяты цельные очищенные вирусы ЖГВ H3N2, А/Южная Африка/3626/2013 (H1N1), а также рекомбинантный белок 3M2e. Было показано, что значения IFN γ -продуцирующих Т-клеток сильно варьировало внутри каждой вакцинной группы, вероятно, ввиду генетической неоднородности популяции хорьков. Тем не менее, активированные CD4 и CD8 Т клетки были обнаружены у животных, иммунизированных любым вариантом ЖГВ, после стимуляции цельным вирусом гриппа. В результате стимуляции белком 3M2e не было обнаружено какого-либо существенного иммунного ответа ни в одной из

исследуемых групп. Таким образом, можно предположить, что формирование специфического Т-клеточного ответа к М2е белку не является основным механизмом защиты при иммунизации вакцинными прототипами ЖГВ+4М2е.

Также на 5-й день экспериментального заражения был осуществлён сбор медиастинальных лимфатических узлов (МЛУ), расположенных в лёгких, выделенные клетки которых далее изучались на способность продуцировать IgG антитела в системе *in vitro* с антигенной стимуляцией и без стимуляции. При отсутствии антигенной стимуляции клетки МЛУ животных из групп ЖГВ-НА+4М2е и ЖГВ-NS+4М2е после челленджа имели более выраженную способность секретировать IgG антитела не только по сравнению с группой PBS, но и с ЖГВ в каждый из дней исследования (Рис.13А). При стимуляции этих клеток вирусными антигенами (вирус Н3N2 или белок 3М2е) было показано, что все вакцины на основе ЖГВ имели высокий уровень стимулированных анти-Н3N2 IgG антител, тогда как только вакцины ЖГВ +4М2е имели способность продуцировать анти-М2е антитела (Рис.13В).

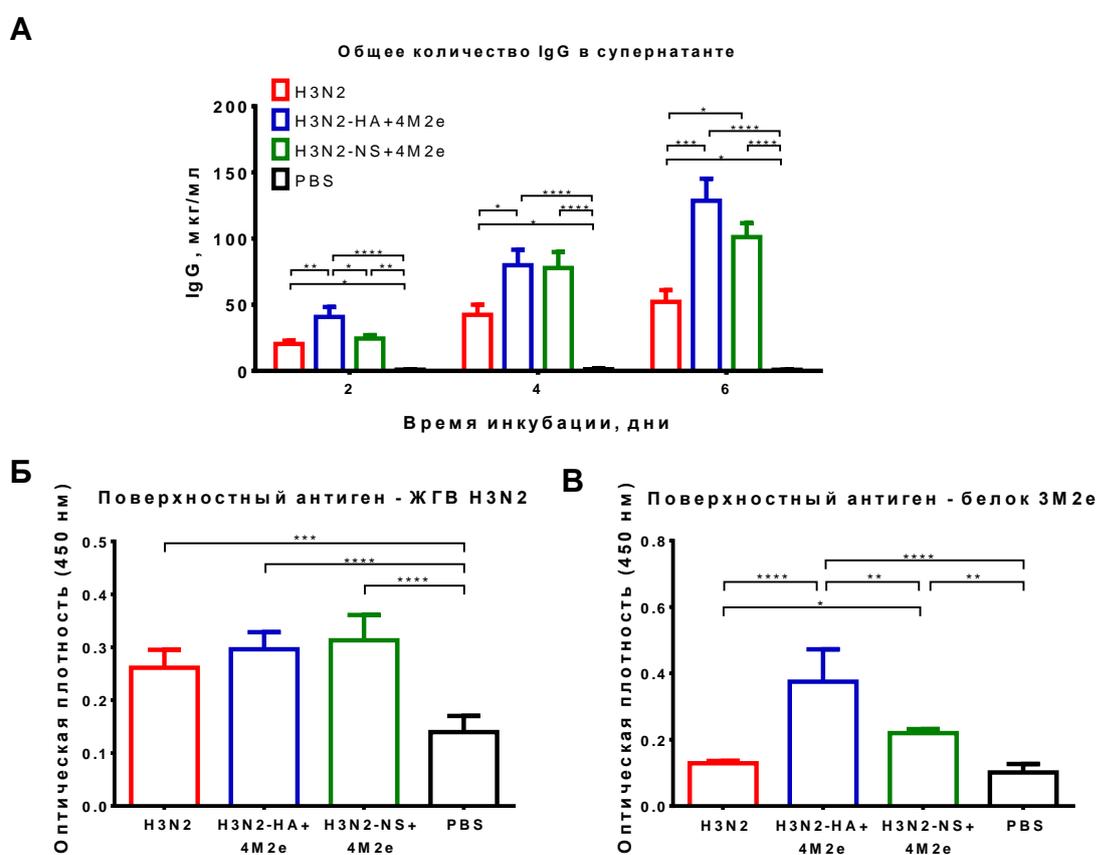


Рисунок 13 – Секретия антител клетками медиальных лимфатических узлов. **А.** Клетки после выделения инкубировались в течение 6 дней в питательной среде без стимуляции каким-либо антигеном. Надосадки собирались на 2, 4 и 6-е сутки инкубации, в которых затем определялся уровень IgG антител в ИФА. **Б.** Клетки инкубировали в течение суток в планшетах, покрытых указанным антигеном, после чего определяли связывание антител с антигеном в ИФА.

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

Для поиска взаимосвязи между уровнем иммунных реакций, стимулированных введением исследуемых вакцин, и степенью защищенности животных от гетерологичной челлендж-инфекции был проведён корреляционный анализ. В качестве количественных переменных были выбраны

значения инфекционных титров челлендж-вируса в различных тканях после челленджа пандемическим вирусом H1N1, а также различные иммунологические параметры (например, значение площадей под кривыми графиков оптической плотности, полученных в ИФА с сыворотками иммунизированных хорьков). Корреляция определялась методом Спирмена.

Не было обнаружено никакой статистически достоверной корреляции между титром вируса в легких и трахее и уровнем IgG антител к цельному вирусу H3N2 на 42-й день исследования. Однако, для данных вирус-специфических IgG антител была обнаружена статистически значимая корреляция с титром вируса в носовых ходах. Такой результат согласуется с данными литературы, в которых была показана стимуляция высокого уровня вирус-специфических кросс-реактивных мукозальных антител IgA после вакцинации ЖГВ, которые способствуют элиминации патогенного челлендж вируса из верхних дыхательных путей.

Тем не менее, наиболее ярко выраженной была корреляция между уровнем анти-M2e IgG антител и уровнем вирусной нагрузки в лёгких животных ($r=-0.7838$, $p=0.0003$). Аналогичный результат наблюдался для M2e-специфических антител, секретированных МЛУ ($r=-0.8344$, $p=0.0001$) и для общего количества IgG секретированных МЛУ *in vitro* ($r=-0.7853$, $p=0.0005$). Также все три перечисленных иммунологических показателя (рис.13BCD) показали значимую обратную корреляцию с вирусной нагрузкой животных в трахеях и носовых ходах.

Таким образом, для всех групп животных была обнаружена достоверная обратная связь снижения вирусного титра в различных респираторных органах и в первую очередь количества M2e-специфических антител, но не антител к самой ЖГВ. И секреция M2e-специфических антител В-клетками, расположенными в медиастинальных лимфатических узлах животных, может быть рассмотрена как один из основных механизмов, обеспечивающих перекрестную защиту животных.

2.7.2.5. Оценка защитного потенциала вакцин в отношении патогенных гетерологичных вирусов группа А в опытах по пассивной иммунизации

Для выявления кросс-протективного потенциала выработанных на иммунизацию вакцинными прототипами антител в отношении различных патогенных вирусов гриппа, сыворотки иммунизированных хорьков были использованы в экспериментах по пассивной иммунизации мышей. Для этого использовали панель патогенных для мышей вирусов гриппа, имеющих в своём составе М гены различной природы. Вирусная смесь инкубированная совместно с сыворотками иммунизированных хорьков, вводилась интраназально наивным мышам, после чего в течение последующих 2-х недель оценивался защитный эффект иммунных сывороток по отношению к патогену.

Оказалось, что значимый защитный эффект имели только сыворотки, полученные после вакцинации животных H3N2-NA+4M2e – мыши продемонстрировали меньшую потерю веса, а также увеличенную выживаемость против действия всех исследуемых патогенов (рис.14). Однако, сыворотки хорьков после вакцинации H3N2-NS+4M2e не имели схожего эффекта. Поскольку все вакцинные штаммы на основе ЖГВ индуцировали схожее количество вирус-специфических H3N2 антител и не приводили к формированию H1N1-специфических антител, но при этом отличались по уровню анти-M2e антител, именно они и сыграли основную роль в усилении защитной эффективности вакцин ЖГВ+M2e. Наблюдаемая градация в уровне M2e-специфических антител H3N2-NA+4M2e > H3N2-NS+4M2e > H3N2>> PBS также соответствует уровню защиты как в опытах на хорьках, так и в опытах по защите *in vivo* на модели мышей.

Суммарно, эксперимент на модели хорьков показал, что прототип универсальной живой гриппозной вакцины ЖГВ-NA+4M2e является наиболее сильным индуктором M2e-специфичных антител, что, в свою очередь, обеспечивает наиболее выраженную защиту животных от заражения вирулентным гетерологичным вирусом гриппа. При этом новая вакцина показала высокий профиль

безопасности в данных доклиническом исследовании. В дальнейшем планируется провести ряд дополнительных экспериментов по изучению пирогенности, нейровирулентности и т.п. В случае успеха, такой вакцинный штамм может быть рекомендован для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах.

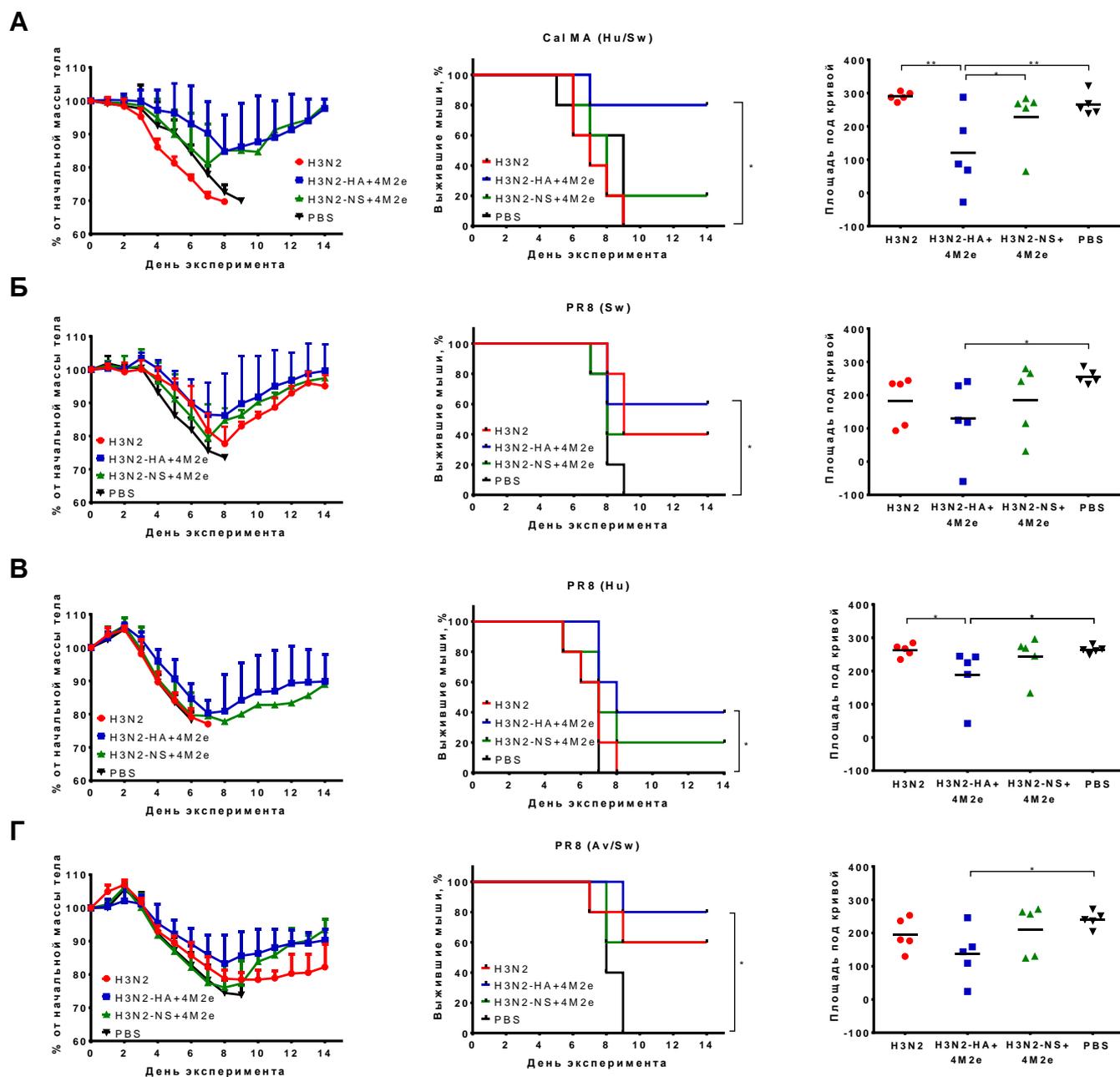


Рисунок 14 – Изучение защитного эффекта сывороток хорьков после иммунизации в опыте по защите *in vivo* на модели мышей. Сыворотки через три недели после 2-й вакцинации смешивались с 3 ЛД₅₀ патогенного челлендж вируса гриппа и вводились интраназально мышам линии C57BL/6J. В качестве челлендж-вирусов были использованы следующие штаммы: **А.** Cal MA H1N1 (последовательность M2e линии «человек/свинья»); **Б.** A/PR8 с рекомбинантным M геном (последовательность M2e линии «свинья»); **В.** A/PR8 с M геном штамма A/Аичи/2/1968 (H3N2) (последовательность M2e линии «человек»); **Г.** A/PR8 с M геном штамма A/утка/Потсдам/1402-6/1986 (H5N2) (последовательность M2e линии «птица/свинья»).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе реализации диссертационного исследования были смоделированы последовательности вставок из целевых М2е-эпитопов для конструирования живой гриппозной вакцины с максимально широким покрытием вирусов гриппа А, циркулирующих как среди людей, так и среди свиней и птиц. Была сконструирована репрезентативная панель химерных генов гемагглютинаина вакцинных штаммов ЖГВ, несущих консервативные М2е-эпитопы вируса гриппа А между сигнальным пептидом и субъединицей HA1, а также в рамке считывания неструктурного белка NS1, усеченного до 126 аминокислот. С использованием классических методов обратной генетики были получены жизнеспособные рекомбинантные вакцинные штаммы, экспрессирующие отобранные М2е-эпитопы в составе генома вакцинных штаммов ЖГВ различных подтипов. Корректная укладка М2е эпитопов на поверхности вирионов в составе химерных белков HA+4M2e была подтверждена методом вестерн-блоттинга с использованием моноклонального антитела, специфичного М2е белку. Экспрессия М2е эпитопов, встроенных в NS1 ген, была подтверждена за счет связывания 14C2 антитела с поверхностью клеток MDCK, зараженных химерными вирусами. Кроме того, встроенные в геном вакцинных штаммов ЖГВ tandemные повторы М2е были генетически стабильны, т.е. сохранялись в составе вирусных частиц после множественных пассажей вирусов в развивающихся куриных эмбрионах. Все сконструированные вакцинные кандидаты также обладали способностью к активной репликации как в развивающихся куриных эмбрионах, так и в культуре клеток MDCK. Важно отметить, что у всех вариантов сохранились необходимые фенотипические признаки, свойственные холодоадаптированным штаммам ЖГВ, а именно температурочувствительность (ts фенотип) и холодоадаптированность (ca фенотип).

В экспериментах на мышах линии BALB/c было показано, что химерные вакцинные штаммы обладают аттенуированным фенотипом и вызывают образование вирус-специфических антител на уровне соответствующих контрольных классических штаммов ЖГВ. Однако в группах мышей, привитых вакцинными прототипами ЖГВ+4M2e, обнаруживались статистически достоверно более высокие уровни сывороточных IgG антител, связывающихся с рекомбинантным М2е белком в иммуноферментном анализе. На модели мышей было показано, что рекомбинантные вакцины ЖГВ+4M2e обладали более выраженным защитным потенциалом в отношении высоких заражающих доз летальных гетерологических челлендж-вирусов, по сравнению с классическими вариантами ЖГВ. При использовании режима пассивной иммунизации удалось установить, что усиленная защитная активность вакцин ЖГВ+4M2e опосредуется антителами, а не Т-клетками, поскольку при введении иммунных сывороток от мышей, привитых штаммами ЖГВ и ЖГВ+4M2e, защитное действие в группе химерной вакцины существенно превосходило таковое в группе ЖГВ.

В доклинических исследованиях на хорьках была показана безвредность, иммуногенность и кросс-протективная активность сконструированных рекомбинантных вакцинных вирусов на основе ЖГВ H3N2, несущих вставку 4M2e либо в гене HA, либо в гене NS1. Животные, иммунизированные двукратно интраназально изученными вакцинными вирусами, не проявляли никаких признаков заболевания в период иммунизации, при этом вакцинные вирусы активно реплицировались в верхних дыхательных путях хорьков, вне зависимости от наличия или отсутствия вставки 4M2e. Гистопатологические исследования также не выявили никаких патологических процессов в органах респираторного тракта животных. Сконструированные вакцинные прототипы ЖГВ/HA+4M2e и ЖГВ/NS+4M2e, в отличие от классическим вариантом ЖГВ подтипа H3N2, индуцируют высокие уровни сывороточных М2е-специфических IgG антител, которые обладают широкой кросс-реактивностью. При этом прототип ЖГВ со вставкой 4M2e в молекуле HA был более иммуногенный в плане индукции М2е-связывающих антител, по сравнению с ЖГВ/NS+4M2e. Экспериментальное заражение иммунизированных хорьков патогенным гетерологичным вирусом гриппа подтипа H1N1 показало различную степень защищенности при иммунизации животных

различными вакцинными кандидатами. Наиболее выраженный протективный эффект показал вариант ЖГВ/НА+4М2е, который способствовал существенной снижению вирусной нагрузки как в верхних, так и в нижних отделах респираторного тракта животных. Более детальное изучение различных звеньев вирусспецифического иммунитета (включая уровни антиген-специфического В- и Т-клеточного иммунитета) показало, что наиболее вероятным механизмом, обеспечивающим перекрестную защиту иммунизированных животных от заражения гетерологичным вирусом гриппа, является секреция М2е-специфических антител В-клетками, расположенными в медиастиальных лимфатических узлах хорьков. Именно их способность продуцировать IgG антитела в ответ на антигенную стимуляцию коррелировала со снижением вирусной нагрузки в легких хорьков после челленджа. Кроме того, эксперименты по пассивной иммунизации мышей сыворотками иммунизированных хорьков показали наиболее широкий спектр защиты у образцов из группы ЖГВ/НА+4М2е, что также указывает на вклад М2е-специфических антител в усиление защиты от заражения гетерологичными вирусами гриппа.

Таким образом, в результате выполненных исследований был отобран кандидат ЖГВ/НА+4М2е для проведения первой фазы клинических испытаний на добровольцах.

ВЫВОДЫ

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

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Издания, рекомендованные ВАК РФ или входящие в международные системы цитирования и реферативные базы данных Web of Science и/или Scopus:

1. Isakova-Sivak I., Stepanova E., *Mezhenskaya D.*, Matyushenko V., Prokopenko P., Sychev I., Wong P. F., Rudenko L. Influenza vaccine: progress in a vaccine that elicits a broad immune response // *Expert Review of Vaccines*. – 2021. – Т. 20, № 9. – С. 1097-1112.

2. **Mezhenskaya D.**, Isakova-Sivak I., Matyushenko V., Donina S., Rekstin A., Sivak K., Yakovlev K., Katelnikova A., Kryshen K., Makarov V., Rudenko L. Universal Live-Attenuated Influenza Vaccine Candidates Expressing Multiple M2e Epitopes Protect Ferrets against a High-Dose Heterologous Virus Challenge // *Viruses*. – 2021. – Т. 13, № 7.
3. Park B. R., Kim K. H., Kotomina T., Kim M. C., Kwon Y. M., Jeeva S., Jung Y. J., Bhatnagar N., Isakova-Sivak I., **Mezhenskaya D.**, Rudenko L., Wang B. Z., Kang S. M. Broad cross protection by recombinant live attenuated influenza H3N2 seasonal virus expressing conserved M2 extracellular domain in a chimeric hemagglutinin // *Scientific Reports* – 2021. – Т. 11, № 1. – С. 4151.
4. **Mezhenskaya D.**, Isakova-Sivak I., Kotomina T., Matyushenko V., Kim M. C., Bhatnagar N., Kim K. H., Kang S. M., Rudenko L. A Strategy to Elicit M2e-Specific Antibodies Using a Recombinant H7N9 Live Attenuated Influenza Vaccine Expressing Multiple M2e Tandem Repeats // *Biomedicines*. – 2021. – Т. 9, № 2.
5. Kotomina T., Isakova-Sivak I., Kim K. H., Park B. R., Jung Y. J., Lee Y., **Mezhenskaya D.**, Matyushenko V., Kang S. M., Rudenko L. Generation and Characterization of Universal Live-Attenuated Influenza Vaccine Candidates Containing Multiple M2e Epitopes // *Vaccines (Basel)*. – 2020. – Т. 8, № 4.
6. **Mezhenskaya D.**, Isakova-Sivak I., Rudenko L. M2e-based universal influenza vaccines: a historical overview and new approaches to development // *Journal of Biomedical Science* – 2019. – Т. 26, № 1. – С. 76.

Тезисы:

1. **D. Mezhenskaya**, I. Isakova-Sivak, A. Katelnikova, L. Rudenko, 'Optimization of M2e cassette amino acid composition for the development of universal influenza vaccine', 2021, *Medical Academic Journal*, 21 (3), P. 127-130.
2. **D. Mezhenskaya**, I. Isakova-Sivak, V. Matyushenko, S. Donina, A. Rekstin, K. Sivak, K. Yakovlev, A. Katelnikova, K. Kryshen, V. Makarov, L. Rudenko, 'Preclinical ferret study of universal live-attenuated influenza vaccine candidates expressing multiple M2e epitopes', 2021, Abstract book of 8th ESWI Influenza Conference.
3. **D. Mezhenskaya**, I. Isakova-Sivak, L. Rudenko, 'Evolutionary analysis of influenza A virus M gene for rational design of broadly protective influenza vaccines', 2020, Abstract book of 7th ESWI Influenza Conference.
4. **Д. Меженская**, И. Исакова-Сивак, 'Увеличение защитного потенциала живой гриппозной вакцины с помощью внесения дополнительных эпитопов белка М2 в ген гемагглютинаина вакцинного штамма', 2020, *Инфекционные болезни в современном мире: эпидемиология, диагностика, лечение и профилактика. Сборник трудов XII Ежегодного Всероссийского интернет-конгресса по инфекционным болезням с международным участием*, С. 153.
5. **D. Mezhenskaia**, T. Kotomina, V. Matyushenko, A. Evsina, M.-C. Kim, S.-M. Kang, L. Rudenko, I. Isakova-Sivak, 'Live attenuated influenza vaccines expressing four M2e tandem repeats within the hemagglutinin molecule protect mice against divergent influenza viruses', 2019, Abstract book of the international conference "Options for the Control of Influenza X", P. 434.
6. V. Matyushenko, **D. Mezhenskaia**, T. Kotomina, P. Prokopenko, A. Evsina, I. Kudryavtsev, I. Isakova-Sivak, L. Rudenko, 'Functional activity of M2e-specific antibodies induced by live attenuated influenza vaccine (LAIV) carrying four M2e tandem repeats embedded in the hemagglutinin molecule', 2019, Abstract book of the international conference "Options for the Control of Influenza X", P. 369.
7. **Д. Меженская**, Т. Котомина, 'Конструирование и исследование in vivo и in vitro рекомбинантных вирусов гриппа -кандидатов в универсальную живую гриппозную вакцину', 2018, *Фундаментальная наука и клиническая медицина - Человек и его здоровье. тезисы XXI Международной медико-биологической конференции молодых исследователей*, С. 269-270.
8. **D. Mezhenskaia**, T. Kotomina, I. Isakova-Sivak, V. Matyushenko, A. Evsina, M. Kim, S. Kang, L. Rudenko. Development of broadly-reactive influenza vaccine based on live attenuated influenza vaccine viral vector, 2018, *Russian Journal of Infection and Immunity*, V.8(4), P.532-533.
9. **Д. Меженская**, Т. Котомина, И. Исакова-Сивак, 'Конструирование рекомбинантных вирусов гриппа - кандидатов в универсальную живую гриппозную вакцину', 2018, *Сборник тезисов 22-ой Международной Пушинской школы-конференции молодых ученых «БИОЛОГИЯ - НАУКА XXI ВЕКА»*, С. 299.

10. Д. Меженская, И. Исакова-Сивак, 'Изучение ростовых характеристик прототипа универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена белка М2 вируса гриппа', 2018, Студенческая наука - 2018. Рецензируемые научно-практические материалы Всероссийского научного форума студентов и молодых ученых с международным участием, С. 695.
11. D. Mezhenskaia, T. Kotomina, I. Isakova-Sivak, V. Matyushenko, D. Korenkov, A. Evsina, M.-S. Kim, S.-M. Kang, L. Rudenko, 'Live attenuated influenza vaccine as a viral vector for the development of broadly-reactive influenza vaccine', 2018, Abstract book of 2nd International Meeting on Respiratory Pathogens, Singapore,
12. Д. Меженская, Т. Котомина, И. Исакова-Сивак, 'Создание и анализ ростовых характеристик прототипа универсальной живой гриппозной вакцины на основе внеклеточного домена белка М2 вируса гриппа', 2018, Неделя науки СПбПУ. Материалы научной конференции с международным участием. Лучшие доклады, С. 170-174.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаю глубокую признательность научному руководителю диссертационной работы – д.б.н., члену-корреспонденту РАН, И.Н. Исаковой-Сивак за постоянную поддержку и бесценный опыт, переданный в ходе выполнения всех разделов работы. Выражаю благодарность д.м.н., профессору, заслуженному деятелю науки РФ Л.Г. Руденко за предоставленную возможность выполнения диссертационного исследования на базе Отдела вирусологии им. А.А.Сморозинцева ФГБНУ «ИЭМ» и критическое осмысление результатов работы. Выражаю признательность всем соавторам моих печатных работ за участие и помощь в проведении исследований, а также выражаю особую признательность сотрудникам отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ «ИЭМ» Т.С. Котоминой, В.А. Матюшенко, С.А. Дониной и А.Р. Рекстину за помощь в проведении экспериментальной работы и подготовке научных публикаций. Выражаю признательность за ценные комментарии и замечания д.б.н, профессору И.В. Киселевой и к.б.н. М.В. Сергеевой.