

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

ШУКЛИНА
Марина Александровна

**ИММУНОГЕННОСТЬ И КРОСС-ПРОТЕКТИВНОСТЬ ХИМЕРНЫХ
БЕЛКОВ, ВКЛЮЧАЮЩИХ КОНСЕРВАТИВНЫЕ УЧАСТКИ
ГЕМАГГЛЮТИНИНА, НУКЛЕОПРОТЕИНА И БЕЛКА М2
ВИРУСОВ ГРИППА А**

1.5.10 – вирусология

ДИССЕРТАЦИЯ

*на соискание ученой степени
кандидата биологических наук*

Научный руководитель:
доктор медицинских наук
Л.М. Цыбалова

Санкт-Петербург

2025

СОДЕРЖАНИЕ

1. ВВЕДЕНИЕ	4
2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
2.1. Вирус гриппа.	10
2.1.1. Жизненный цикл вируса гриппа	11
2.2. Вирусные белки, как целевые антигены для разработки вакцин широкого спектра защиты. Иммуногенность вирусных белков.....	15
2.2.1. Эктодомен белка М2	15
2.2.2. Гемагглютинин	20
2.2.3. Нуклеопротеин.....	28
2.3. Вакцины против гриппа нового поколения.....	39
2.4. Адъювантные свойства бактериального белка флагеллина	43
2.4.1. Активация флагеллином врожденного иммунного ответа в слизистых оболочках	45
2.4.2. Применение флагеллина в качестве адъюванта при разработке вакцин. ...	47
2.4.3. Флагеллин как потенциальный носитель гаптенов.....	50
2.4.4. Препараты на основе флагеллина в клинических исследованиях.....	50
2.5. Заключение	51
3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.	53
3.1. Материалы.	53
3.1.1. Рекомбинантные белки	53
3.1.2. Синтетические пептиды.....	54
3.1.3. Лабораторные животные.	54
3.1.4. Вирусы.....	55
3.1.5. Куриные эмбрионы.	55
3.1.6. Клеточные культуры.	56
3.2. Методы.....	56
3.2.1. Биоинформационные методы.....	56
3.2.2. Вирусологические методы.....	56
3.2.3. Микробиологические методы.	57
3.2.4. Физико-химические методы.....	58
3.2.5. Иммунологические и серологические методы.	60
3.2.6. Биологические методы.....	63
3.2.7. Статистическая обработка полученных результатов.....	67
4. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	68
4.1. Дизайн рекомбинантных белков	68
4.1.1. Рекомбинантные белки	68
4.1.2. Оценка чистоты и подлинности белков, стабильность при хранении	77
4.1.3. Оценка биологической активности флагеллина в составе рекомбинантных белков	79

4.2.	Иммуногенность и протективная активность рекомбинантных гриппозных белков.	80
4.2.1.	Расширение спектра иммунного ответа и усиление протективности при сочетании консервативных последовательностей гемагглютинина и М2 белка.	80
4.2.2.	Взаимосвязь иммуногенности рекомбинантного белка с порядком присоединения антигенов.	88
4.2.3.	Инсерция CTL-эпитопов нуклеопротеина для повышения иммуногенности и протективной эффективности рекомбинантного белка против вируса гриппа А	90
4.2.4.	Усиление М2е-специфического серологического ответа у иммунизированных мышей после гриппозной инфекции.....	97
4.2.5.	Усиление гетерологичной защиты при комбинированной вакцинации мышей кандидатным вакцинным белком и ИГВ	99
4.2.6.	Активация врожденного иммунитета рекомбинантным белком Flg-NA2-4M2ehs	102
4.2.7.	Определение С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови мышей после введения кандидатного вакцинного белка Flg-NA2-4M2ehs	104
4.3.	Исследование безопасности и специфической активности кандидатной вакцины на хорьках при интраназальном и подкожном введении.....	105
4.3.1.	Безопасность кандидатной вакцины у хорьков	106
4.3.2.	Формирование антиген-специфических антител у хорьков при интраназальном и подкожном введении кандидатной вакцины.....	106
4.3.3.	Антиген-специфический Т-клеточный ответ у хорьков при интраназальном и подкожном введении кандидатной вакцины.....	109
4.3.4.	Исследование защитного действия кандидатной вакцины на хорьках при заражении вирусом гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09)	110
5.	ОБСУЖДЕНИЕ	113
6.	ВЫВОДЫ.....	123
7.	СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	124
8.	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	127
9.	ПРИЛОЖЕНИЯ	166
9.1.	Приложение 1	166
9.2.	Приложение 2	167
9.3.	Приложение 3	168
9.4.	Приложение 4.....	169

1. ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования.

Попытки решить проблему профилактики гриппа - самой массовой инфекции современности – начались еще во второй половине 30-х годов XX столетия сразу после открытия возбудителя заболевания. Первые прототипы вакцин были созданы в СССР под руководством А.А. Смородинцева (живая вакцина) и в США под руководством E.D. Kilbourne (инактивированная вакцина). За прошедшее столетие усовершенствованные вакцины стали достаточно эффективным средством профилактики заболевания и снижения тяжести гриппозной инфекции. Вместе с тем, существует ряд серьезных проблем, связанных с эффективностью и производством современных гриппозных вакцин. Во-первых, узкая специфичность вируснейтрализующих антител, индуцируемых существующими вакцинами, делает их неэффективными против дрейфовых вариантов вируса и, тем более, против новых штаммов вируса, обладающих пандемическим потенциалом. Во-вторых, длительность производственного цикла – требуется 5-6 месяцев с момента появления нового эпидемического или пандемического штамма до начала массовой вакцинации, что не может предотвратить развитие эпидемии/пандемии. В-третьих, использование при производстве большинства вакцин ценного пищевого сырья – куриных яиц. Кроме того, в последние годы проблемой культивирования вирусов гриппа на куриных эмбрионах является потеря способности вирусов накапливаться до высоких титров и изменение антигенных свойств. Все это подтверждает необходимость не только оптимизировать существующие технологии (переход на культуральные вакцины, добавление высоко эффективных адъювантов), но и создание принципиально новых вакцин, обеспечивающих более эффективную, широкую и длительную защиту и имеющих короткий цикл производства [415]. Стратегической задачей ВОЗ является разработка к 2027 году гриппозных вакцин, способных обеспечивать защиту от тяжелого гриппа по крайней мере в течение 5 лет. При этом требование к формированию стерильного иммунитета, обязательного для современных вакцин, отсутствует [414].

В настоящее время для создания вакцин используют ряд технологических платформ, таких как вирусоподобные и невирусоподобные наночастицы, вирусные векторы, рекомбинантные белки, рибонуклеиновые кислоты. Существенное внимание разработчиками уделяется вакцинам на основе вирусных рекомбинантных белков [377]. Помимо возможности легкого моделирования требуемого профиля иммунного ответа, безопасности и скорости производственного цикла, большим преимуществом подобных

вакцин является их хорошая переносимость и безопасность для прививаемых, что обеспечивает им применение среди контингентов населения с тяжелыми соматическими заболеваниями, среди пожилых людей и детей раннего возраста.

Принципиальной особенностью новых вакцин является использование в качестве действующего начала консервативных вирусных белков или их компонентов, которые обеспечивают защиту от вирусов гриппа разных субтипов. К настоящему времени разработан ряд кандидатных вакцин на основе эктодомена белка M2 (M2e). Показана их способность индуцировать выраженный M2e-специфический гуморальный ответ и обеспечивать защиту экспериментальных животных от заражения вирусами гриппа А разных подтипов [189, 269]. Другой перспективный целевой антиген для разработки вакцины – консервативные участки второй субъединицы гемагглютинаина (HA2). Антитела, направленные к эпитопам, локализованным в стеблевой части гемагглютинаина, являются кросс-реактивными и обладают нейтрализующим эффектом в пределах филогенетической группы [398, 272]. Кандидатные вакцины на основе HA2 способны индуцировать гуморальный и Т-клеточный ответ и обеспечивать защиту от гомологичных и гетерологичных вирусов одной филогенетической группы [43, 136, 11]. Перспективным направлением также является разработка вакцин на основе нуклеопротеина (NP) [302]. Вакцины, направленные на NP, могут обеспечить перекрестную защиту от различных штаммов. Показано, что кандидатные вакцины на основе NP способны индуцировать выраженные NP-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные ответы, включая образование тканерезидентных CD8⁺ Т-клеток (T_{rm}) в легких. В области конструирования и исследования свойств рекомбинантных белков с включением консервативных фрагментов вирусных белков и находятся наши разработки.

Цель настоящей работы состояла в исследовании механизмов иммуногенности, формирования иммунологической памяти и защитных свойств рекомбинантных белков, содержащих консервативные участки гемагглютинаина, белка M2 и нуклеопротеина вируса гриппа А, а также созданной на их основе кандидатной вакцины.

Задачи работы:

- 1) Обоснование дизайна рекомбинантных белков, включающих последовательность флагеллина и консервативные участки белков вирусов гриппа А. Получение и физико-химическая характеристика рекомбинантных белков различных конструкций.

- 2) Выбор оптимального рекомбинантного белка на основе результатов исследования специфического гуморального и Т-клеточного иммунного ответа у лабораторных животных после интраназальной иммунизации.
- 3) Изучение специфической активности выбранного белка (прототипного вакцинного) при разных способах введения – интраназальном и парентеральном.
- 4) Исследование диапазона и выраженности защитного действия рекомбинантного вакцинного белка на модели летальной гриппозной инфекции.
- 5) Исследование безопасности и специфической активности кандидатной вакцины на хорьках.

Научная новизна работы.

Впервые получены химерные белки на основе флагеллина с включением в разной последовательности целевых антигенов, как в область гипервариабельного домена, так и к С концу. Показано влияние особенностей конструкции на характер иммунного ответа и защиту на модели летальной гриппозной инфекции.

Показана способность белков вызывать выраженный иммунный ответ, как при интраназальном, так и при парентеральном способе введения у лабораторных животных, а также охарактеризована реакция врожденного иммунного ответа. Впервые сопоставлен уровень и характер иммунного ответа на рекомбинантный вакцинный белок и его протективная эффективность в отношении гомо- и гетерологичных вирусов (H3N2, H1N1pdm09, H7N9, H5N1, H2N2).

Изучено влияние иммунизации химерным белком на выраженность и характер иммунного ответа при комбинированной вакцинации с ИГВ и при заражении сублетальными дозами вирусов гриппа.

В ходе доклинических исследований показана безопасность и специфическая активность новой кандидатной вакцины на хорьках.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Результаты исследования расширяют представления о механизмах формирования протективного иммунитета и его направленности при иммунизации препаратами на основе консервативных пептидов вируса гриппа.

Охарактеризованные по иммуногенности и защитной эффективности белки составляют линейку для выбора рекомбинантного белка – как в качестве компонента, так и в качестве самостоятельной основы для универсальной противогриппозной вакцины. При необходимости антигенная вставка может быть модифицирована или актуализирована.

На основании полученных данных был отобран кандидатный рекомбинантный белок Flg-NA2-4M2ehs, на основе которого разработана вакцина «Грифлавак». Проведен полный цикл доклинических испытаний, а отчет направлен в Минздрав России. Подготовлены проекты протокола клинического исследования (КИ) вакцины, брошюры исследователя для получения разрешения для КИ.

Кросс-протективная рекомбинантная вакцина против вирусов гриппа А Грифлавак предполагается для вакцинации населения в начальный период распространения пандемического вируса, а также для иммунизации отдельных категорий населения (пожилых людей, лиц, имеющих медицинские противопоказания к традиционным вакцинам) в период сезонной вакцинации.

Результаты исследования иммунного ответа на вирусные белки были включены в лекции сертификационного курса по вирусологии (дополнительная профессиональная программа «Вирусология», СЗГМУ им. И. И. Мечникова).

Основные положения, выносимые на защиту:

- 1) Рекомбинантные белки, включающие фрагмент второй субъединицы НА (aa 76-130), эктодомен белка М2 и участки NP белка вируса гриппа А, генетически слитые с бактериальным белком флагеллин, являются безопасными и индуцируют широкий спектр иммунных реакций.
- 2) Порядок присоединения фрагментов НА2 и М2е к флагеллину оказывает существенное влияние на формирование местного и системного антительного ответа.
- 3) Наилучшую защиту экспериментальных животных от летального заражения разными подтипами вирусов гриппа А обеих филогенетических групп обеспечивала иммунизация рекомбинантным белком Flg-NA2-4M2ehs.
- 4) Как интраназальное, так и подкожное введение вакцинного белка индуцировало высокий уровень кросс-реактивной защиты от гриппа у экспериментальных животных. Однако интраназальный способ введения приводил к более выраженному снижению репликации вируса в легких.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и проведении экспериментов на мышах, участии в дизайне рекомбинантных белков, проведении всех иммунологических исследований (ИФА, мультипараметрическая проточная цитометрия, ELISPOT), статистической обработке и анализе полученных результатов, написании научных статей и их подготовки к публикациям. Иммунологические исследования в рамках доклинических исследований вакцины Грифлавак.

Плазмиды, кодирующие рекомбинантные белки, были получены в Федеральном исследовательском центре «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (руководитель работ - д.б.н. Н. В. Равин). Методическая помощь при культивировании *E. coli*, накоплении рекомбинантных белков и при культивировании используемых в работе штаммов вирусов гриппа была оказана сотрудниками лаборатории гриппозных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Хроматографическая очистка белков проводилась в лаборатории генной инженерии и экспрессии рекомбинантных белков ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Токсикологические исследования проводились сотрудниками лаборатории безопасности лекарственных средств ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России. Содержание хорьков, манипуляции, заборы биологических образцов и клиническое наблюдение проводилось сотрудниками АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ» (научный руководитель - д.м.н. Макаров В.Г.).

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность результатов диссертационного исследования основана на: воспроизводимости экспериментальных данных, применении современных методов исследования, репрезентативном объеме материала, корректной статистической обработкой полученных результатов.

Материалы диссертационного исследования были представлены на международных конференциях: The fifth ESWI influenza conference, 2014, Riga; International conference “Trends in influenza research” Saint-Petersburg, 2017; International Conference Universal Influenza Vaccines 2018, Lausanne, Switzerland; Международная конференция «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» СПб, 2018; International conference "Perspective technologies in vaccination and immunotherapy", Saint-Petersburg, 2020; III Международный форум «Дни вирусологии 2022», СПб; Всероссийская конференция молодых ученых «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике», СПб, 2023; V Международный форум «Дни вирусологии 2024», СПб.

Публикации по теме работы.

По теме диссертации опубликовано 23 печатные работы: 13 научных статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 10 тезисов докладов.

Объем и структура диссертации.

Диссертация изложена на 169 страницах машинописного текста, включая 20 таблиц и 38 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания

использованных материалов и методов, собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 441 источник на русском и английском языках.

Работы выполнены при финансовой поддержке:

- 1) Гранта РНФ №15-14-00043 и 15-14-00043-П на тему «Разработка кандидатной рекомбинантной вакцины, направленной на эпидемические и потенциально пандемические вирусы гриппа, на основе консервативных антигенов гемагглютинина и белка М2»
- 2) Государственного задания МЗ РФ на тему «Физико-химическая характеристика и оценка безопасности мукозальной рекомбинантной гриппозной вакцины на основе консервативных участков вирусных белков НА и М2», 2021-2023гг.
- 3) Государственного задания МЗ РФ на тему «Завершение доклинических исследований противогриппозной универсальной вакцины «Грифлавак», 2023-2024гг.
- 4) Субсидий молодым ученым, молодым кандидатам наук вузов, отраслевых и академических институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга:
 - 2017 г. тема проекта «Усовершенствование метода внутриклеточного окрашивания цитокинов для оценки Т-клеточного поствакцинального иммунитета»;
 - 2018 г. тема проекта «Исследование иммунного ответа на сублетальную инфекцию вирусом гриппа А у мышей, иммунизированных рекомбинантной кандидатной кросс-протективной вакциной»;
 - 2019 г. тема проекта «Исследование особенностей иммунного ответа на рекомбинантные вакцинные белки у мышей разных генетических линий»;
 - 2020 г. тема проекта «Исследование гуморального и Т-клеточного ответа у мышей при интраназальной иммунизации вакцинным рекомбинантным белком на основе консервативных белков вирусов гриппа А».

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1. Вирус гриппа.

Семейство Orthomyxoviridae включает четыре типа вирусов гриппа: А, В, С и D. Среди них вирусы гриппа А и В являются основными возбудителями острых респираторных заболеваний у человека. Вирусы гриппа А и В способны вызывать сезонные эпидемии, а вирус гриппа А и периодические пандемии, что делает его одной из наиболее значимых угроз для общественного здоровья. По данным ВОЗ, ежегодно гриппом заражается около 1 миллиарда человек, из которых 3–5 миллионов переносят заболевание в тяжелой форме, а летальных исходов насчитывается от 300 000 до 650 000 [440]. Клинические проявления гриппа варьируются от легких до тяжелых. Тяжелая форма гриппа может сопровождаться осложнениями, такими как пневмония и отек легких. В самых тяжелых случаях развивается дыхательная недостаточность и отек мозга, что может привести к летальному исходу. До 95% смертей связаны с вторичными бактериальными пневмониями [251].

Геном вируса гриппа представлен одноцепочечной РНК отрицательной полярности, состоящей из 8 сегментов (у типов А и В). Каждый сегмент кодирует один или несколько вирусных белков. Сегменты РНК упакованы в нуклеокапсид, который состоит из нуклеопротеина (NP) и связанных с ним вирусных полимеразных комплексов (PB1, PB2, PA). Геном вируса гриппа характеризуется высокой изменчивостью, что обусловлено двумя основными механизмами: антигенным дрейфом (точечные мутации) и антигенным шифтом (реассортация геномных сегментов) [198, 405].

Вирионы вируса гриппа имеют различную форму, наиболее распространенной из которых является сферическая. Вирусная оболочка состоит из липидного бислоя, содержащего три вирусных трансмембранных белка: гемагглютинин (HA), нейраминидаза (NA) и M2. Этот липидный бислой происходит от плазматической мембраны хозяина и, как известно, содержит как обогащенные холестерином липидные рафты, так и нерафинированные липиды [331, 431, 262]. HA - самый крупный белок оболочки, составляющий около 80%, за ним следует NA, составляющий около 17% белков вирусной оболочки. M2 - очень незначительный компонент оболочки, всего 16-20 молекул на вирион. HA и NA, в отличие от M2, связаны исключительно с липидными рафтами в вирусной липидной мембране [262, 334]. Сразу под вирусной липидной мембраной находится M1, который образует матрицу, содержащую вирусные рибонуклеопротеины (vRNP). Эти vRNP являются ядром вируса и состоят из вирусных отрицательно заряженных РНК, связанных с нуклеопротеином (NP) и очень небольшим

количеством белка NEP. Каждый фрагмент генома покрыт отдельным белком (капсидом). Все фрагменты в совокупности покрыты белковой оболочкой, образуя нуклеокапсид. Нуклеокапсид вирусов гриппа имеет спиральный тип симметрии. На одном конце вРНП находятся три полимеразных белка (PB1, PB2 и PA), которые составляют комплекс вирусной РНК-полимеразы (Рис.1) [262, 121, 263].

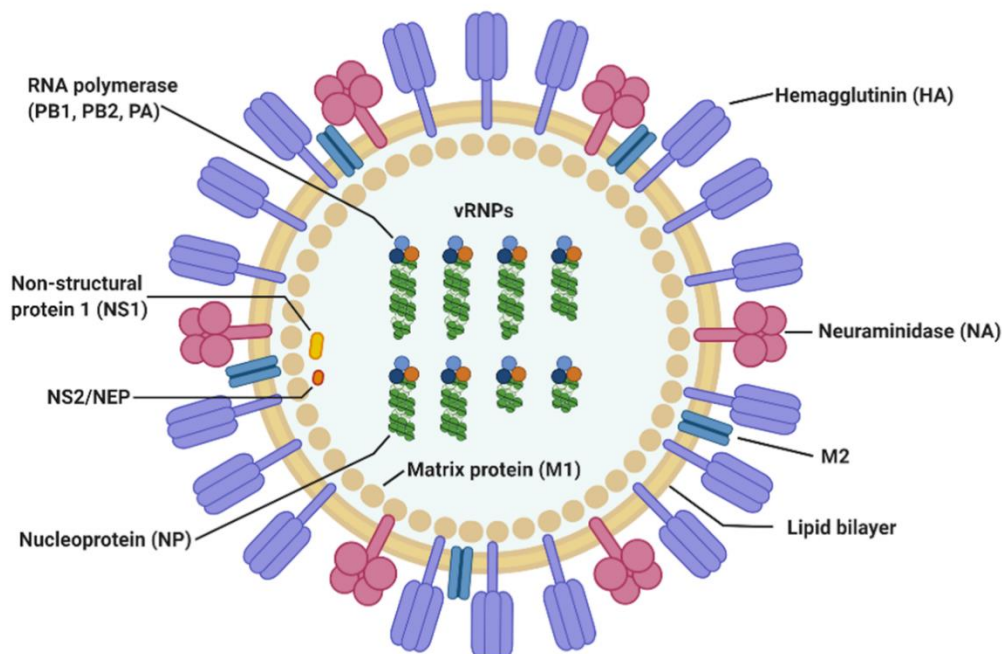


Рисунок 1 – Структура вируса гриппа А [181]

2.1.1. *Жизненный цикл вируса гриппа*

Жизненный цикл вируса гриппа включает несколько ключевых этапов: проникновение в клетку-хозяина, транспорт вирусных рибонуклеопротеинов в ядро, транскрипцию и репликацию вирусного генома, экспорт вРНП из ядра, а также сборку и почкование вирусных частиц на плазматической мембране клетки-хозяина.

Проникновение вируса в клетку.

Основная функция в этом процессе принадлежит гемагглютанину (НА), который представляет собой гомотримерный белок, формирующий шипы на поверхности вирусной оболочки. Эти шипы связываются с сиаловыми кислотами на мембране клетки-хозяина, что является первым этапом в процессе инфицирования [343]. Предшественник НА, НА0, состоит из двух субъединиц: НА1, содержащей домен связывания с рецептором, и НА2, содержащей пептид слияния. Эти субъединицы соединены дисульфидными связями [157]. Специфичность связывания НА с рецепторами клетки определяется типом связи с остатками сиаловых кислот: $\alpha(2,6)$ -связь характерна для вирусов человека, а $\alpha(2,3)$ -связь — для вирусов птиц и лошадей.

Эпителий респираторного тракта свиней имеет оба типа рецепторов, что делает свиней важным резервуаром для рекомбинации вирусов гриппа А, включая образование пандемических штаммов [343].

После связывания с сialовыми кислотами вирус проникает в клетку путем рецептор-опосредованного эндоцитоза, образуя эндосому. Внутри эндосомы низкий рН (около 5-6) вызывает конформационные изменения в НА0, что приводит к обнажению пептида слияния НА2. Этот пептид встраивается в мембрану эндосомы, обеспечивая слияние вирусной и эндосомальной мембран [343, 157].

Низкий рН также активирует ионный канал М2, который представляет собой тетрамерный трансмембранный белок, функционирующий как протон-селективная помпа [153, 285]. Активация М2 приводит к подкислению вирусного ядра, что способствует высвобождению вРНК из матриксного белка М1. После этого вРНК транспортируются в цитоплазму [284].

Транспорт вРНК в ядро.

Транскрипция и репликация вирусного генома происходят в ядре клетки-хозяина. Для транспорта вРНК в ядро используются сигналы ядерной локализации, присутствующие в вирусных белках NP, PA, PB1 и PB2. Эти сигнальные последовательности взаимодействуют с клеточными кариоферинами, такими как импортины α и β , что обеспечивает ядерный импорт вРНК [45].

Транскрипция и репликация вирусного генома.

Вирусный геном гриппа состоит из одноцепочечной РНК отрицательной полярности. Для начала транскрипции геном должен быть преобразован в РНК положительной полярности, которая служит матрицей для синтеза вирусных мРНК. Репликация генома осуществляется без использования праймеров. Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза (RdRp) инициирует синтез РНК благодаря частичной комплементарности 5' и 3' концов генома, которые образуют петлевые структуры, необходимые для репликации. Предполагается, что ключевую роль играют динуклеотидные пары оснований, формирующиеся на концах генома [76, 90, 122, 21].

Вирус гриппа А кодирует всего 11 белков, что делает его зависимым от клеточных механизмов для эффективной репликации. Одним из ключевых процессов является "кэп-захват", уникальный механизм, позволяющий вирусу использовать клеточные мРНК для инициации собственной транскрипции. Зрелые клеточные мРНК содержат 5'-метилированный кэп и поли(А)-последовательность, тогда как вирусные РНК лишены 5'-кэпа. Исследования показали, что 5'-метилированные кэпы вирусных мРНК на самом

деле происходят из клеточных мРНК, что привело к открытию механизма "кэп-захвата" [91, 291, 46, 47, 199].

Вирусная RdRp состоит из трех субъединиц: PB1, PB2 и PA. Белок PB2 обладает эндонуклеазной активностью и связывается с 5'-кэпами клеточных мРНК, отщепляя фрагмент длиной 10-15 нуклеотидов. Этот фрагмент используется в качестве праймера для инициации вирусной транскрипции [222]. Интересно, что RdRp гриппа предпочтительно связывается с фосфорилированной формой клеточной РНК-полимеразы II (Pol II), что указывает на синхронизацию "кэп-захвата" с активностью клеточной транскрипции [110].

Из восьми сегментов вирусного генома шесть кодируют по одному белку, а сегменты 7 и 8 — по два белка благодаря альтернативному сплайсингу. Сегмент 7 кодирует матричные белки M1 и M2, а сегмент 8 — неструктурные белки NS1 и NEP. Белки M2 и NEP образуются в результате сплайсинга и присутствуют в меньших количествах по сравнению с M1 и NS1 [12]. Вирус использует клеточный механизм сплайсинга для экспрессии этих белков, одновременно подавляя сплайсинг клеточных мРНК.

Механизм полиаденилирования вирусных мРНК отличается от клеточного. Полиаденилирование происходит благодаря "механизму заикания" RdRp. Вирусный геном содержит участок из 5-7 урациловых остатков (U-участок) вблизи 5'-конца, который служит сигналом для полиаденилирования. RdRp, оставаясь связанной с 5'-концом матричной РНК, многократно "заикается" на U-участке, что приводит к синтезу поли(А)-последовательности [124, 144, 314, 292, 294]. Интересно, что белок NS1 также участвует в подавлении полиаденилирования клеточных мРНК [64]. Это позволяет вирусу перенаправлять клеточные ресурсы на синтез собственных мРНК.

Экспорт вРНП из ядра.

Из ядра экспортируются только вРНП с отрицательной полярностью [337]. Этот процесс происходит по CRM1-зависимому пути через ядерные поры. Нуклеопротеин (NP), входящий в состав вРНП, непосредственно взаимодействует с CRM1, хотя гидролиз ГТФ, обычно сопровождающий CRM1-зависимый экспорт, в данном случае не наблюдается. Это указывает на уникальный механизм экспорта, в котором связывание NP с CRM1 играет ключевую роль.

Матричный белок M1 также участвует в этом процессе. M1 взаимодействует с вРНП через свой С-концевой домен, а его N-концевая часть содержит сигнал ядерной локализации (NLS), который может быть замаскирован при связывании с ядерным экспортным белком (NEP). NEP, в свою очередь, связывается с CRM1, что

сопровождается гидролизом ГТФ. Таким образом, формируется комплекс "гирляндной цепи", в котором М1 связывает вРНП, а NEP взаимодействует с CRM1, обеспечивая транспорт вРНП из ядра [45, 4, 27]. Современные методы визуализации *in vivo* позволили детально изучить перемещение вРНП в инфицированных клетках. Было показано, что NP преимущественно локализуется на апикальной стороне ядра, что указывает на полярный характер экспорта вирусного генома [236, 108].

Сборка и почкование вирусных частиц.

После экспорта из ядра вРНП направляются к плазматической мембране, где происходит сборка новых вирусных частиц. Вирус гриппа, будучи оболочечным вирусом, использует липидный бислой клетки-хозяина для формирования своей оболочки. Хотя вирусные частицы могут образовываться даже при отсутствии вРНП, наличие ключевых вирусных белков, таких как гемагглютинин (НА), нейраминидаза (NA) и ионный канал М2, является обязательным для формирования инфекционных вирионов [262].

Почкование вирусных частиц происходит на апикальной мембране поляризованных клеток. Белки НА, NA и М2 транспортируются к этому участку мембраны, где они встраиваются в липидный бислой. Хвостовая часть белка М2 играет важную роль в формировании вирусных частиц: мутации или делеции в этой области приводят к образованию аномально удлинённых вирионов [169]. Матриксный белок М1, расположенный под липидным бислоем, участвует в завершающих этапах сборки и почкования вирусных частиц [263, 53].

Упаковка вирусного генома в вирионы остается предметом активных исследований. Существуют две основные модели, объясняющие этот процесс: модель случайной упаковки [109, 24] и модель специфической упаковки [347]. Согласно первой модели, вирусные геномные сегменты случайным образом включаются в вирионы. Вторая модель предполагает наличие специфических сигналов упаковки в вирусных сегментах, которые определяют их включение в вирионы. Экспериментальные данные, такие как идентификация сигналов упаковки в 5' и 3' некодирующих и кодирующих областях вирусного генома, поддерживают модель специфической упаковки [128, 255, 401, 226, 127]. Одним из ключевых этапов почкования является удаление сиаловых кислот с поверхности клетки-хозяина. Этот процесс осуществляется нейраминидазой (NA), которая расщепляет остатки сиаловой кислоты в гликопротеинах и гликолипидах. Без активности NA вирусные частицы не могут отщепиться от плазматической мембраны, что подчеркивает важность этого фермента для завершения жизненного цикла вируса [278].

2.2. Вирусные белки, как целевые антигены для разработки вакцин широкого спектра защиты. Иммуногенность вирусных белков

Принципиальным подходом для создания вакцин, направленных на широкий круг вирусов гриппа является выбор в качестве действующего начала наиболее консервативных вирусных белков или кодирующих их РНК. В настоящее время внимание исследователей концентрируется преимущественно на белках М2, NP, стеблевой части НА.

2.2.1. Эктодомен белка М2

Матричный белок 2 (М2) вируса гриппа А играет ключевую роль в жизненном цикле вируса. Он выполняет три основные функции:

- Разборка вирусного остова: М2 действует как ионный канал, обеспечивая приток протонов и ионов калия в кислой среде эндосом, что ослабляет взаимодействие между матричным белком 1 (М1) и вирусными рибонуклеопротеинами (вРНП), подготавливая их к высвобождению в цитозоль [209, 285, 353].
- Сборка и почкование: М2 взаимодействует с М1, способствуя сборке вирионов, а также регулирует почкование, изменяя кривизну мембраны и способствуя отщеплению новых вирионов [60, 316].
- Влияние на клетки-хозяева: М2 активирует инфламмосомы в миелоидных клетках и подавляет аутофагию через LC3-взаимодействующий мотив [163, 30].

Эктодомен М2 (М2е) представляет собой фрагмент белка М2 вируса гриппа А, выступающий из вирусной мембраны, состоящий из 23 аминокислотных остатков. Высокая степень консервативности М2е среди всех подтипов вируса гриппа А свидетельствует о его важной роли в жизненном цикле вируса. Однако, несмотря на эту консервативность, функциональная значимость М2е до сих пор малоизучена. Согласно одной из гипотез, М2е может участвовать в контроле ориентации белка М2 (N-out, C-in), хотя для этой функции не требуется строгой специфичности первичной последовательности, за исключением предпочтительного наличия кислого аминокислотного остатка перед трансмембранной областью [280, 410]. Консервативность первых 9 аминокислотных остатков М2е объясняется тем, что они кодируются геномным сегментом 7, который несет много информации. Он включает в себя сигнал упаковки для вирусной РНК, начало открытой рамки считывания для двух белков (М1 и М2), а также донорный сайт сплайсинга для транскрипта М2 [161].

Консервативность остатков 10–24 в М2е обусловлена перекрытием с С-концом белка М1, что дополнительно подчеркивает важность этой области для вирусной репликации.

Иммунопротекторный потенциал М2е был впервые продемонстрирован в исследованиях с использованием анти-М2е моноклональных антител. С тех пор сотни публикаций подтвердили, что конструкции на основе М2е способны обеспечивать защиту от вируса гриппа А [370, 345, 264, 189]. Основные выводы этих исследований заключаются в том, что антитела специфичные к М2е, необходимы для защиты и что иммунитет на основе М2е может снизить репликацию вируса и заболеваемость, причем при заражении практически любым подтипом вируса гриппа А.

Однако М2е сам по себе является низкоиммуногенным антигеном. Для преодоления этой проблемы существует несколько подходов. Присоединение М2е к различным белкам-носителям, в том числе способным к самосборке в вирусоподобные частицы (ВПЧ). Например, коровый антиген вируса гепатита В (НВс) или капсид бактериофага Q β , обладают несколькими преимуществами: они легко производятся в прокариотических экспрессионных системах и могут стимулировать Th1-опосредованный иммунный ответ благодаря своим адьювантным свойствам [264, 39, 162]. Несмотря на преимущества ВПЧ, их использование может создавать определенные трудности. Например, ВПЧ на основе НВс могут вызывать сильный иммунный ответ против капсида носителя, что затрудняет интерпретацию серологических тестов для диагностики гепатита В.

Важным аспектом также является использование конструкций с несколькими копиями М2е, расположенными в тандеме («голова к хвосту»). Такие конструкции вызывают более сильный М2е-специфический иммунный ответ по сравнению с одиночными копиями М2е. Это объясняется большей доступностью антигена для В-клеточных рецепторов и эффектом avidности [152]. Например, нанокольца на основе нуклеопротеина респираторно-синцитиального вируса человека, несущие тандемные повторы М2е, индуцируют защитные уровни анти-М2е IgG и IgA антител после интраназальной иммунизации мышей [152].

Интересно, что взрослое население, по-видимому, уже имеет предсуществующий иммунный ответ к М2. Это подтверждается наличием сывороточных IgG, реагирующих с М2, экспрессируемым клетками 293FT. Более того, уровень М2-специфических антител повышался при инфицировании пандемическим вирусом H1N1 2009 года [438]. Таким образом, однократная иммунизация вакциной на основе М2е, может эффективно усилить М2е-специфические ответы у взрослых, включая пожилых людей, но может не дать такого эффекта у непривитых детей.

Механизм действия M2e-индуцированного иммунного ответа

M2e-специфические антитела, как правило, не вызывают прямого ингибирования вируса *in vitro*, хотя существуют исключения. Например, пандемический вирус A/Singapore/1/57 (H2N2), A/HK/8/68 и A/USSR/90/77 (H1N1) демонстрируют снижение бляшкообразования в присутствии 5 мкг/мл M2e-специфических моноклональных антител 14C2 [430]. С другой стороны, мыши, иммунизированные M2e, защищены от заражения любым подтипом вируса гриппа А не смотря на относительно низкую заражающую дозу (1–4 МЛД₅₀).

Механизм защиты, обеспечиваемый M2e-специфическими антителами, в настоящее время хорошо изучен. Согласно общепринятой модели, IgG-антитела образуют иммунные комплексы на поверхности инфицированных респираторных эпителиальных клеток, экспрессирующих M2. Эти комплексы распознаются Fcγ-рецепторами, которые экспрессируются на альвеолярных макрофагах (Рис. 2) [380, 103, 350]. Интересно, что альвеолярные макрофаги также играют ключевую роль в защите, опосредованной широко реактивными НА-специфическими моноклональными антителами, предположительно за счет антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP) вирионов гриппа и инфицированных клеток [148]. Учитывая, что в вирионах гриппа присутствует очень мало молекул M2, вероятно, что основной мишенью для альвеолярных макрофагов являются инфицированные клетки, а не свободные вирионы. Уничтожение инфицированных клеток и, возможно, вирионов, находящихся в процессе почкования (поскольку макрофаги предпочитают поглощать жесткие частицы [35]), замедляет прогрессирование заболевания, вызванное вирусной репликацией.

Альвеолярные макрофаги также являются важным источником интерферона I типа (IFN) в ответ на инфекцию респираторными вирусами [150, 200]. IFN I типа, продуцируемый альвеолярными макрофагами, может индуцировать прямой противовирусный ответ в соседних клетках. Кроме того, IFN I типа стимулирует экспрессию хемокина CCL2, который рекрутирует воспалительные моноциты, способствующие восстановлению эпителиальных клеток в очаге поражения [260].

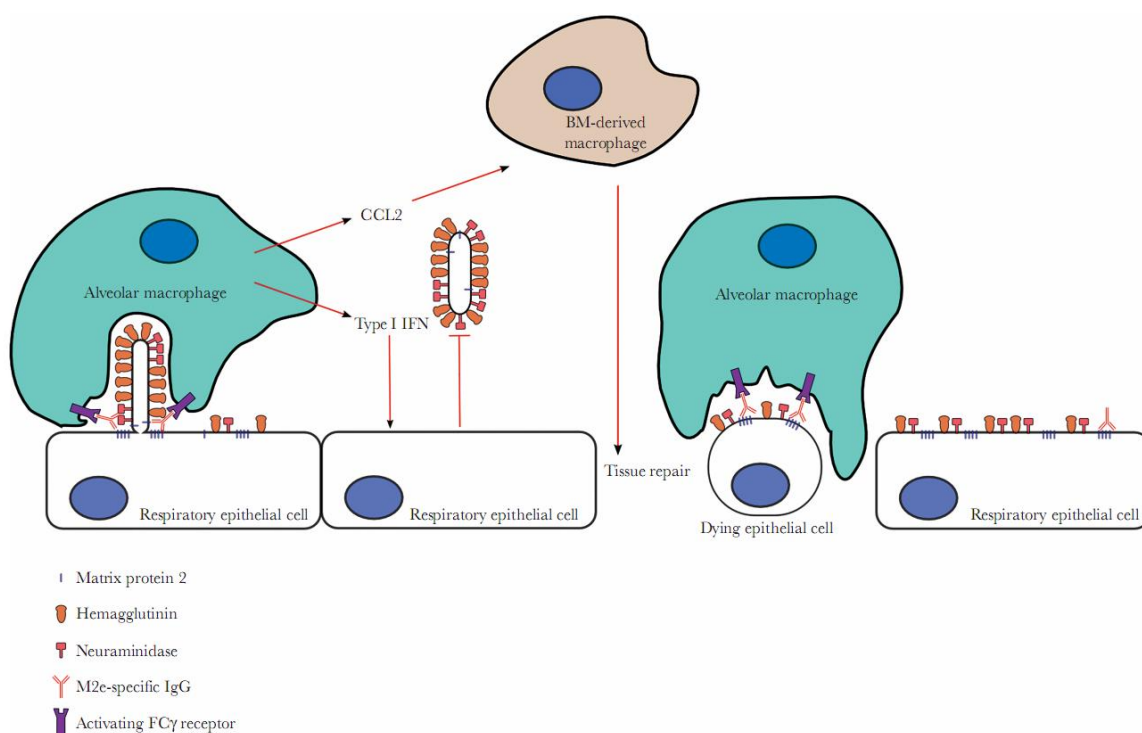


Рисунок 2 — Схема вероятного механизма защиты, обеспечиваемой M2e-специфическими IgG [321]. Клетки, зараженные вирусом гриппа А, экспрессируют на своей поверхности вирусные белки, включая гемагглютинин (НА), нейраминидазу (НА) и М2. В процессе почкования вирионы отделяются от клетки, при этом М2 локализуется в области «горлышка» отпочковывающегося вириона. М2е на поверхности почкующихся вирионов и инфицированных клеток опсонизируется анти-М2е IgG. Эти антитела, в свою очередь, связываются с активирующими Fcγ-рецепторами, экспрессируемыми на альвеолярных макрофагах. Альвеолярные макрофаги захватывают почкующиеся вирионы и М2-содержащие мембранные фрагменты инфицированных клеток. Инфицированные клетки, отделяющиеся от соседних эпителиальных клеток, также могут быть опсонизированы анти-М2е IgG и фагоцитированы макрофагами в зависимости от взаимодействия с Fcγ-рецепторами. Активированные макрофаги вырабатывают IFN I типа, который индуцирует противовирусное состояние в соседних эпителиальных клетках, подавляя репликацию вируса. Кроме того, IFN I типа стимулирует выработку хемокина CCL2, который привлекает макрофаги из костного мозга, способствующие восстановлению поврежденных тканей.

Показано, что иммунная защита, опосредованная M2e, может также стимулировать адаптивный иммунный ответ против других вирусных белков. Во-первых, специфичные к нуклеопротеину (NP) CD8⁺ Т-клеточные ответы были сопоставлены у мышей, вакцинированных солевым раствором и M2e-ВПЧ, после сублетального заражения вирусом гриппа А. При этом животные, иммунизированные M2e, демонстрировали высокий уровень защиты и минимальную потерю массы тела [333, 332]. Возможно, иммунные комплексы, содержащие анти-M2e IgG, также распознаются дендритными клетками, которые захватывают, процессируют и представляют фрагменты инфицированных клеток Т-клеткам в дренирующих лимфатических узлах. Т-клеточные ответы, направленные против консервативных

внутренних белков вируса гриппа, имеют важное значение, так как они ассоциируются с широкой защитой [112]. Во-вторых, M2e-специфические CD4⁺ Т-клетки могут не только непосредственно участвовать в защите, но и стимулировать выработку НА-специфических антител в ответ на вирусную инфекцию [105].

Было показано, что вакцины на основе M2e способны подавлять репликацию вируса гриппа А у хорьков [266]. В исследованиях хорьки, иммунизированные вакциной, содержащей M2e, связанный с двумя различными носителями, продемонстрировали высокие титры M2e-специфичных IgG антител в сыворотке крови и снижение выделения вируса в легких после заражения вирусом A/PR8 [118]. В 2017 году было установлено, что иммунизация хорьков везикулами наружных мембран бактерий, презентующих 4 tandemных повтора M2e, приводит к более значительному снижению титров вируса в легких по сравнению с традиционной вакциной против гриппа после заражения пандемическим вирусом H1N1pdm09 [402]. У вакцинированных свиней также наблюдалась умеренная защита от заболевания после аэрозольного заражения свиным вирусом H1N1 (108 ТЦИД50), несмотря на различие в 6 аминокислотных остатках между M2e в составе вакцины (адъювантные M2e ВПЧ) и в вирусе, которым заражали [149]. Кроме того, вакцины на основе M2e показали частичную эффективность в защите кур от экспериментального заражения вирусами птичьего гриппа, включая высокопатогенный штамм H5N1 [432, 211].

Есть основания предполагать, что анти-M2e ответ несет потенциальную клиническую пользу. Во-первых, предсуществующий гуморальный иммунитет к M2 белку (который в основном направлен против M2e) продемонстрировал тенденцию к обратной корреляции с частотой инфицирования пандемическим вирусом H1N1pdm09 в зависимости от возрастной группы среди жителей США [438]. Во-вторых, клинические исследования I фазы подтвердили безопасность вакцин на основе M2e, хотя у добровольцев, получивших низкую дозу M2e слитого с флагеллином подкожно, наблюдались местные и системные побочные эффекты, вероятно, обусловленные компонентом флагеллина, активирующим TLR-5 (клинические испытания NCT00819013, NCT00921973, NCT00921947, NCT00921206, NCT00603811 и NCT01184976). Анти-M2e IgG могут оказывать терапевтическое действие у людей. Это было продемонстрировано в плацебо-контролируемом двойном слепом исследовании с контролируемым заражением, в котором использовались рекомбинантные моноклональные человеческие IgG1 TCN-032, специфичные к высококонсервативному N-концу белка M2. Внутривенное введение TCN-032 в дозе 40 мг/кг через день после интраназального заражения вирусом H3N2 человека привело к значительному снижению

общего количества ежедневных симптомов на 35% по сравнению с плацебо и ускорило выздоровление на 2 дня [304]. Важно отметить, что лечение также продемонстрировало хороший профиль безопасности.

Основными поверхностными белками вириона вируса гриппа являются гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА). Вирусы гриппа А классифицируются на 18 подтипов по НА и 11 подтипов по НА. Эти 18 подтипов НА разделены на две филогенетические группы: группа 1 и группа 2 (Рис. 3).

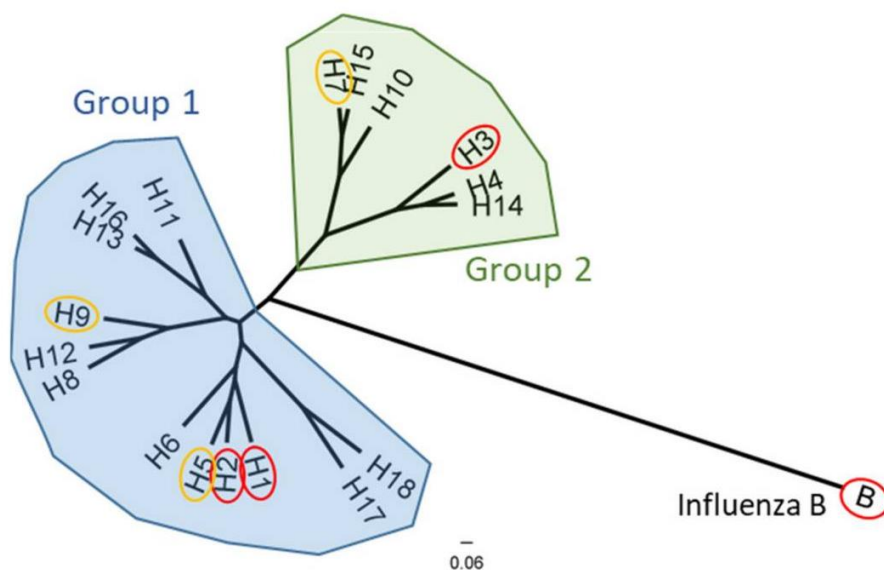


Рисунок 3 – Филогенетическое соотношение гемагглютининов вирусов гриппа А и В [51]. Обозначены 1я (синий) и 2я (зеленый) филогенетические группы. Красным цветом обведены подтипы, циркулирующие среди людей, а желтым цветом - подтипы, которые инфицируют птиц, но признаны потенциально пандемическими для зоонозной передачи.

пептид, домен слияния, трансмембранный домен, цитоплазматический домен, а также общие структурные мотивы [273].

НА представляет собой гликопротеин, который на поверхности вириона организован в виде гомотримера [121]. Каждый мономер синтезируется в виде неактивного полипептидного предшественника (НА0), который затем расщепляется протеазами клетки на две субъединицы: НА1 и НА2.

Субъединица НА2 формирует стеблевую область белка, а также содержит трансмембранный домен и цитоплазматический хвост, закрепляющий НА в оболочке вириона. В свою очередь, субъединица НА1 включает сигнальный пептид на N-конце и глобулярный головной домен, который содержит сайт связывания рецептора. Этот домен отвечает за взаимодействие вируса с сиаловой кислотой на поверхности клетки-хозяина, обеспечивая его адгезию и последующее проникновение в клетку [49].

Стратегии, ориентированные на стеблевую часть гемагглютинаина

Один из подходов к разработке универсальных вакцин против гриппа заключается в стимулировании выработки широко реактивных антител, нацеленных на консервативную стеблевую область гемагглютинаина. В отличие от глобулярного головного домена, стеблевая часть НА менее подвержена селективному давлению со стороны иммунной системы, так как находится на поверхности вириона в относительно стабильной форме [187]. Это делает ее более консервативной среди различных подтипов вируса, несмотря на определенную степень вариабельности белковой последовательности.

Антитела, специфичные к головному домену НА, блокируют связывание вируса с сиаловой кислотой на клетках, тем самым предотвращая его проникновение. В отличие от них, антитела, нацеленные на стеблевую область, действуют через альтернативные механизмы. Они могут ингибировать конформационные изменения НА при низком pH, что препятствует слиянию вируса с эндосомальной мембраной и, соответственно, высвобождению вирусного генома в цитоплазму. Кроме того, предполагается, что такие антитела могут блокировать созревание вируса, ингибируя расщепление неактивного предшественника НА0 [193]. Данные исследований подтверждают, что эффективность антител, направленных против стеблевой части НА, во многом зависит от Fc-опосредованных взаимодействий, играющих важную роль в механизмах вирусной нейтрализации *in vivo* [94, 95].

Антитела, нацеленные на стеблевую область гемагглютинаина (НА), демонстрируют широкую перекрестную реактивность как внутри одного подтипа, так и

между различными подтипами внутри одной группы, а в некоторых случаях — даже между вирусами, относящимися к группам 1 и 2 [261].

Несмотря на значительный интерес к таким антителам, их индукция с помощью вакцинации остается сложной задачей из-за иммунодоминантности глобулярного головного домена НА. Для решения этой проблемы разработано несколько стратегий, включая создание конструкций НА с удаленным головным доменом, гипергликозилирование головного домена, экспрессию только длинной α -спирали стеблевой области, а также применение химерных и мозаичных вариантов НА. Эти подходы направлены на снижение иммунного ответа к головному домену и усиление выработки антител, специфичных к консервативному стеблю.

Гемагглютинины с удаленным головным доменом

Один из подходов к усилению иммунного ответа против консервативного стебля гемагглютина (НА) заключается в удалении его иммунодоминантного головного домена, что приводит к образованию так называемого «безголового» НА. Однако НА является метастабильным белком, который в ходе инфекционного цикла вируса претерпевает значительные конформационные изменения при низком pH [61]. Удаление головного домена НА1 дестабилизирует структуру НА2, что может приводить к утрате нативных конформационных эпитопов, распознаваемых антителами.

Первая попытка создания вакцины на основе безголового НА была предпринята в 1983 году: головной домен НА1 удаляли с помощью химической обработки кислотой и восстановителем [140]. Однако такая вакцина не обеспечивала защиту, вероятно, из-за денатурации стеблевых эпитопов. Позднее предпринимались попытки экспрессировать только субъединицу НА2 в различных системах, включая рекомбинантный бакуловирус и *E. coli*, однако полученные антигены не сохраняли нативную структуру и не распознавались нейтрализующими антителами против стебля [412, 61, 357].

С тех пор было разработано несколько стратегий стабилизации стеблевой области НА в ее нативной, нейтральной по pH конформации. Например, Steel J. и соавторы модифицировали НА подтипов Н1 и Н3, вводя стабилизирующие линкерные пептиды, а затем иммунизировали мышей двумя дозами ДНК-плазмид, кодирующих модифицированный белок, с последующей бустерной иммунизацией вирусоподобными частицами [354]. Этот подход обеспечил полную защиту животных от заражения гомологичным штаммом вируса (с минимальной потерей массы тела ~5%) и индуцировал образование гетеросубтипических перекрестно-реактивных антител *in vitro*.

Другие группы исследователей разрабатывали стабильные тримерные формы безголового гемагглютинина, экспрессируя их либо в виде растворимых белков [164, 381, 378, 238], либо на поверхности вирусоподобных частиц (ВПЧ) [366] и наночастиц [424, 89, 71].

Один из подходов заключался в создании растворимого «мини-НА» – тримерного варианта стеблевой области Н1, полученного путем многократных структурных мутаций [164]. Трехкратная иммунизация этим «мини-НА» обеспечивала полную защиту мышей от потери массы тела и летального исхода после заражения гетерологичным вирусом гриппа Н1 или гетеросубтипичным Н5. При этом сыворотки вакцинированных животных демонстрировали как нейтрализующую активность, так и эффекторные функции, опосредованные антителозависимой клеточной цитотоксичностью (АЗКЦ).

Другой подход заключался в стабилизации тримерной структуры стебля Н1 путем шести итеративных циклов структурных мутаций с последующей презентацией его на поверхности наночастиц [424]. Эта вакцина обеспечивала полную защиту мышей от гетеросубтипичного заражения вирусом Н5, однако у хорьков степень защиты была частичной. Антитела, индуцированные этой вакциной, связывали *in vitro* гемагглютинины подтипов Н1, Н2, Н5 и Н9 (группа 1), но демонстрировали слабую реактивность в отношении подтипов Н3 и Н7 (группа 2). При этом количество нейтрализующих антител против гетеросубтипичных штаммов было ограниченным, что свидетельствует о возможном вовлечении дополнительных механизмов защиты, таких как АЗКЦ или комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC).

Безопасность вакцины Н1ssF на основе стабилизированного тримера Н1 была подтверждена в клинических испытаниях фазы I с участием 52 добровольцев (NCT03814720). Также было показано, что Н1ssF индуцирует перекрестно-реактивные нейтрализующие антитела против консервативного стебля НА вирусов группы 1, несмотря на существующий иммунный ответ против головного домена Н1. Эти антительные ответы были стойкими, причем нейтрализующие антитела сохранялись более года после вакцинации [407].

Химерные гемагглютинины

Для преодоления нестабильности «безголовых» конструкций и усиления выработки антител к стеблевой части гемагглютинина была разработана стратегия прайм-буст иммунизации с использованием химерных НА. В рамках этого подхода проводится многократная последовательная иммунизация химерными белками НА, содержащими одинаковую стеблевую область, но с разными «экзотическими» головными доменами. Такая тактика позволяет сфокусировать иммунный ответ на

консервативный стебель, снижая при этом влияние иммунодоминантного головного домена.

Ключевым преимуществом этого метода является то, что химерные конструкции представляют стеблевую область в составе полноразмерного НА, что способствует сохранению ее нативной конформации. Этот подход был изучен в качестве основы для вакцин против вирусов гриппа подтипов Н1 [195, 320, 165, 258, 167, 232], Н3 [241] и гриппа В [116].

Клинические испытания I фазы с участием 65 добровольцев продемонстрировали безопасность и иммуногенность химерных НА-вакцин [257, 37]. Участники исследования получили две дозы различных комбинаций химерных НА, представленных в форме живого аттенуированного вируса, инактивированного вируса или инактивированного вируса с адъювантом. Вакцинация была признана безопасной и индуцировала устойчивый антителы ответ против Н1. Наилучшие результаты наблюдались у участников, получивших две дозы химерного НА в форме инактивированного вируса с адъювантом: у них титры антител против стеблевой области сохранялись на уровне ~4-кратного превышения исходного уровня в течение 1,5 лет.

Гипергликозилированный гемагглютинин

Другой подход к усилению иммунного ответа, специфичного для стеблевой области гемагглютинина, заключается в гипергликозилировании головного домена НА1. Эта модификация маскирует иммунодоминантные эпитопы, снижая их доступность для иммунной системы и тем самым перенаправляя иммунный ответ на стеблевую часть [230]. В экспериментах на мышах трехкратная иммунизация гипергликозилированным Н1 индуцировала более мощный антителы ответ против стеблевой области гомологичного Н1 по сравнению с НА дикого типа [101]. Кроме того, вакцинация гипергликозилированным Н1 вызывала более широкую перекрестную реактивность антител против двух гетерологичных вирусов Н1, а также против гетеросубтипичного вируса Н5. При этом вакцинированные мыши были полностью защищены от летального исхода при заражении химерным вирусом, хотя имели незначительную потерю массы тела.

«Мозаичный» гемагглютинин

Другая стратегия перенаправления иммунного ответа на стеблевую область НА – создание «мозаичных» конструкций, в которых иммунодоминантные эпитопы головного домена НА1 заменяются аминокислотными последовательностями из антигенов, слабо распознаваемых иммунной системой. В одном из подходов иммунодоминантные антигенные участки головного домена Н3 были заменены фрагментами птичьего НА

(H10 или H14) [50]. В результате вакцинации мышей этим рекомбинантным мозаичным НА НЗ индуцировался усиленный стебле-специфичный иммунный ответ, превосходящий по эффективности ответ, вызванный коммерческой инактивированной сезонной вакциной.

Пептид слияния

Для преодоления проблем, связанных с экспрессией стабильного безголового НА и иммунодоминантностью головного домена НА1, некоторые стратегии фокусируются на небольших консервативных участках стебля, таких как длинная альфа-спираль (ЛАН) или пептид слияния.

В одной из стратегий ЛАН из НЗ была конъюгирована с белком-носителем, что позволило усилить иммуногенность антигена [398]. Двукратная иммунизация мышей этой вакциной обеспечила полную защиту от летального исхода после заражения гетерологичным вирусом НЗ. Однако при этом наблюдалась значительная потеря массы тела (~15%), свидетельствующая о выраженном заболевании. Защита против гетеросубтипичного вируса Н5 была частичной, а против Н1 отсутствовала.

Другие исследования показали аналогичные результаты. Так, экспрессия ЛАН и слияния пептида из Н5 в *E. coli* с последующей рефолдингом белка из телец включения [214] позволила получить вакцину, которая полностью защищала мышей от потери веса и смерти при заражении гомологичным вирусом Н5. Однако защита от гетерологичных Н5 и гетеросубтипичного Н1 была неполной.

Еще одна модификация, при которой ЛАН Н1 экспрессировали на вирусоподобных частицах НВс, обеспечила полную защиту от смертности при заражении гомологичным Н1, гетерологичным Н1 и гетеросубтипичным Н9 [63]. Тем не менее, несмотря на защиту от летального исхода, у вакцинированных мышей сохранялась значительная потеря веса: ~15% при заражении Н1, 7% при Н1 (гетерологичный) и 19% при Н9.

Таким образом, хотя вакцины на основе пептида слияния способны индуцировать гетеросубтипичную защиту, но они не предотвращают заболевание.

Ограничения стратегий вакцинации, направленных на стеблевой домен

Несмотря на способность стебель-направленных вакцин вызывать широкий перекрестный иммунитет, их эффективность ограничивается слабой иммуногенностью стеблевого домена, что требует трехкратной иммунизации для выработки устойчивого ответа. Кроме того, зараженные гомосубтипичными штаммами животные, хотя и были защищены от гибели, но переносили заболевание, теряя более 10% массы тела. Это, вероятно, связано с тем, что защитное действие стеблевых антител в значительной

степени обусловлено Fc-опосредованными механизмами, такими как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) и комплемент-зависимая цитотоксичность (CDC). Поскольку эти механизмы не препятствуют инфекции, а способствуют клиренсу вируса, защита становится менее надежной, несмотря на расширение спектра перекрестной реактивности [193, 172].

Хотя стеблевая область НА более консервативна, чем головной домен, она не является абсолютно неизменной и подвержена вариабельности внутри подтипов. Более того, она испытывает селективное давление со стороны иммунной системы, что подтверждается обнаружением вирусных мутантов, способных избегать действия стеблевых антител [279].

Также остаются неоднозначные данные о роли стеблевых антител в защите людей от инфекции. В одном исследовании, в котором анализировалась передача вируса гриппа от человека к человеку, была выявлена положительная корреляция между уровнем антител к стеблю НА и сниженным риском инфицирования [268]. Однако в другом исследовании, учитывавшем уровень антител к головному домену, значимой связи между титром стеблевых антител и защитой от заражения обнаружено не было [67].

Стратегии, основанные на консенсусных последовательностях гемагглютинина

В отличие от стебле-направленных стратегий, консенсусные подходы ориентированы на полноразмерный белок НА и направлены на создание синтетического НА, который представляет разнообразие циркулирующих вариантов. Для этого используются вычислительные методы, позволяющие сконструировать обобщенную последовательность НА.

Несмотря на общую концепцию, разработано несколько вариантов консенсусных стратегий:

- Консенсусные последовательности – создаются на основе всех известных НА, представленных в филогенетическом дереве.
- "Микроконсенсусные" иммуногены – формируются путем выделения консенсуса для каждой основной филогенетической ветви и последующего комбинирования таких иммуногенов в коктейль.
- Централизованные иммуногены – направлены на минимизацию погрешности выборки, формируются из репрезентативных НА, отобранных из каждой крупной ветви филогенетического дерева.
- Иммуногены "COBRA" – используют несколько раундов построения консенсуса, что позволяет снизить смещение выборки.

Ключевое отличие консенсусных стратегий от стебле-направленных заключается в том, что они преимущественно индуцируют нейтрализующие антитела против головного домена НА, который, является на сегодняшний день основным коррелятом защиты от гриппа у человека [261, 106]. Как правило, консенсусные вакцины разрабатываются для конкретного подтипа вируса с перспективой расширения на несколько подтипов и последующего объединения различных конструкций в мультивалентную вакцину.

Elliott et al. разработали четыре микро-консенсусных иммуногена для повышения кросс-реактивности против H3 подтипа. Эти гены экспрессировались в ДНК-плазмиде и вводились мышам в виде коктейля. Вакцинация вызвала сильный антительный ответ против 8 штаммов (1968–2014) и клеточный иммунитет, обеспечив защиту от летального заражения двумя штаммами H3N2. Этот подход показал, что коктейль микро-консенсусных иммуногенов может улучшить кросс-реактивность против разнообразных популяций НА [107].

В работе Weaver et al. предложили стратегию создания синтетического НА, локализованного в центральном узле филогенетического дерева, чтобы минимизировать различия между штаммами. Централизованные гены H1, H3 и H5, экспрессированные в аденовирусном векторе, обеспечили улучшенную кросс-защиту у мышей против нескольких штаммов. Комбинированная мультивалентная вакцина (H1, H2, H3, H5) сохранила кросс-реактивность и обеспечила полную защиту от летального заражения несколькими штаммами, подтвердив эффективность подхода [403, 404].

В методе COBRA (Computationally Optimized Broadly Cross-Reactive Antigen) используется несколько этапов создания консенсусных последовательностей. Этот подход был применен для разработки вакцин против гриппа А подтипов H1 [57, 58, 327, 326], H2 [309], H3 [413], H5 [133, 10, 74, 315, 274] и свиного H1 [342]. Иммуногены COBRA экспрессировались на платформах вирусоподобных частиц, наночастиц ферритина [326] и рекомбинантных вирусов гриппа [327].

Первые исследования COBRA для H5 были сосредоточены на клейде 2 и показали кросс-реактивность у мышей, хорьков [133, 134], кур [315] и нечеловекообразных приматов (NHP) [135]. Расширение стратегии на все клейды H5 с использованием коктейля из трех COBRA иммуногенов продемонстрировало защитные титры антител против 25 вирусов из 11 клейдов, но кросс-защита оценивалась только для отдельных иммуногенов, а не для коктейля.

Для H1 были разработаны девять COBRA иммуногенов, из которых четыре показали повышенную кросс-реактивность. Трехвалентный коктейль индуцировал

защитные титры антител против 10 из 15 штаммов H1, включая сезонные и пандемические штаммы. У хорьков с предсуществующим иммунитетом наблюдалась повышенная кросс-реактивность. [57, 58]

Из 17 разработанных COBRA иммуногенов H3 четыре показали перспективные результаты у мышей. [413] У наивных хорьков кросс-реактивность была ограниченной, но у предварительно иммунизированных хорьков COBRA иммуногены вызывали более широкий ответ по сравнению с НА дикого типа. Это указывает на их эффективность в усилении кросс-реактивного иммунитета у лиц с предсуществующим иммунитетом. [9]

Для обеспечения защиты от множества подтипов, циркулирующих в человеческой популяции, потребуется мультивалентная вакцина, включающая несколько иммуногенов, стимулирующих различные варианты НА. Будущие исследования должны подтвердить, что такая мультивалентная вакцина, содержащая антигенные участки из разных подтипов, не снижает свою эффективность из-за интерференции. Однако в одном из экспериментов, где мышей вакцинировали четырехвалентной вакциной, не было зафиксировано снижения эффективности, что подтверждает перспективность этого подхода для создания надежного защитного иммунного ответа против нескольких подтипов вирусов гриппа А.

2.2.3. *Нуклеопротеин*

Организация NP-геномного комплекса и доменная структура молекулы NP схожа с таковыми у большинства ssRNA(-) респираторных вирусов. Протомер NP состоит из двух структурно организованных доменов: N-концевого домена (NTD) и C-концевого основного домена (CTD). Согласно современным представлениям, участок связывания нуклеиновых кислот располагается между NTD и CTD [308]. Молекула NP вируса гриппа способна связывать 24 нуклеотида, причем это число является строго фиксированным [362, 277]. Важно отметить, что в отсутствие вирусной РНК белок NP проявляет склонность к связыванию с РНК хозяина. Для предотвращения этого процесса и поддержания мономерного состояния протомеры NP шаперонируются фосфопротеином, что также способствует предотвращению образования неполноценных или пустых вирионов [373].

Кристаллическая структура рекомбинантных комплексов NP-РНК представляет собой упорядоченный комплекс [425, 93], который формируются в результате спонтанной сборки мультимерных форм при взаимодействии соответствующих доменов [156, 297]. В инфицированной клетке белок NP существует в нескольких функциональных состояниях: мономеры NP ассоциированы с фосфопротеином,

олигомеры NP связаны с вирусной РНК и организованы в рибонуклеокапсид, а мультимерные формы NP образуют релаксированную структуру, обеспечивающую доступность РНК для вирусной полимеразы [295].

Белок NP выполняет множество ключевых функций в жизненном цикле вируса, включая:

- 1) защиту вирусной РНК от деградации клеточными ферментами за счет физического разделения и маскировки от иммунного распознавания;
- 2) формирование спиральной структуры рибонуклеопротеинового комплекса (РНП);
- 3) регуляцию транскрипции и репликации вирусной РНК гистоноподобным образом;
- 4) индукцию иммуносупрессии путем ингибирования синтеза эффекторных цитокинов и подавления FcR-опосредованного сигналинга [325].

Изначально нуклеопротеин (NP) не рассматривался в качестве приоритетной мишени для разработки вакцин против гриппа, поскольку данный антиген не экспонируется на поверхности вирусной частицы, а антитела, направленные против NP, не обладают нейтрализующей активностью. Однако дальнейшие исследования продемонстрировали, что эпитопы NP индуцируют мощный вирус-специфический Т-клеточный ответ, а анти-NP антитела способны индуцировать клеточно-опосредованные защитные реакции. Начиная с 1980-х годов, NP стал перспективной мишенью для создания универсальных вакцин против гриппа, в основном благодаря высокой степени консервативности NP среди антигенно далеких вирусов.

Известно, что антиген NP преимущественно индуцирует цитотоксический ответ как со стороны CD4⁺, так и CD8⁺ Т-клеток (CTL). Это связано с тем, что пептиды NP могут синтезироваться инфицированными клетками или образовываться в результате фагоцитоза экзогенных рибонуклеопротеинов (РНП), после чего они презентуются в комплексе с молекулами МНС класса I или II, соответственно [188]. Обе популяции Т-клеток способны распознавать инфицированные вирусом клетки и осуществлять их специфический цитолиз [182], что играет критическую роль в элиминации патогена. Таким образом, вакцинация, направленная на индукцию Т-клеточного ответа против консервативных эпитопов NP, рассматривается как перспективная стратегия для создания перекрестного противовирусного иммунитета.

В отличие от другого внутреннего антигена гриппа — PB1, который в равной степени служит мишенью для CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток [18], NP считается основной мишенью для CD8⁺ CTL [139, 419]. Однако CD4⁺ CTL, представляющие собой относительно небольшую субпопуляцию среди CD4⁺ Т-клеток (основную часть которых составляют Т-хелперы) [349], также играют важную роль в противовирусном

иммунитете. Показано, что при инфицировании вирусом гриппа CD4⁺ CTL преимущественно нацелены на антигены NP и M [408, 62].

Поскольку белок NP был обнаружен на мембранах инфицированных эпителиальных клеток [42], он может служить мишенью для гуморального иммунного ответа. Однако на сегодняшний день остается малоизученным характер выработки, механизмы действия и защитный потенциал анти-NP-антител, которые активно продуцируются в ответ на инфекцию или вакцинацию [386, 79]. Теоретически такие антитела могут способствовать элиминации вируса, опосредуя врожденные иммунные реакции, такие как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) или антителозависимый клеточный эндоцитоз [336]. Эта гипотеза подтверждается экспериментальными данными, демонстрирующими способность анти-NP-антител активировать естественные киллеры (NK-клетки) *ex vivo* [386], а также индуцировать уничтожение инфицированных гриппом клеток *in vitro* с использованием сывороток пациентов, у которых наблюдается интенсивный гуморальный ответ против NP, но низкие титры антител к гемагглютинуину и нейраминидазе [176]. Предполагается, что функция анти-NP-антител может быть опосредована через рецепторы FcγRI [210]. Несмотря на то, что основные компоненты иммунной системы, вовлеченные в анти-NP-ответ, идентифицированы, для разработки эффективных универсальных вакцин против гриппа на основе NP-эпитопов необходимы дальнейшие исследования.

Разработка прототипов вакцин широкого спектра действия на основе NP

Нуклеопротеин (NP) вируса гриппа уже на протяжении почти четырех десятилетий рассматривается как перспективная мишень для создания гриппозных вакцин с широкой защитой [437]. Это обусловлено тем, что Т-клеточный ответ, индуцируемый этим антигеном, демонстрирует высокую степень перекрестной реактивности. Например, в одном из ранних исследований было показано, что цитотоксические Т-лимфоциты (CTL), полученные от мышей, иммунизированных вирусом гриппа определенного подтипа, способны распознавать трансфекционные L-клетки мыши, экспрессирующие NP другого подтипа. При этом распознавание гетерологичных L-клеток, экспрессирующих гемагглютинин (HA), не наблюдалось [368].

В 1985 году Wraith et al. впервые использовали нуклеопротеин (NP) вируса гриппа X31 (H3N2) в качестве вакцинного антигена. После обработки бромелайном и дезоксихолатом аммония был получен препарат NP с остаточными количествами гемагглютинина (HA). Иммунизация мышей BALB/c 50 мкг этого препарата вызвала формирование высоких уровней специфичных к X31 цитотоксических Т-клеток памяти

в селезёнке через 3 недели, что подтвердило роль NP в индукции Т-клеточного иммунитета [417].

Для проверки этой гипотезы исследователи приготовили более чистый препарат NP из вируса Х31, содержащий менее 3% примесей НА, и изучили его иммуногенность и способность обеспечивать перекрестную защиту у мышей. Основным результатом этого исследования стало выживание 75% мышей, иммунизированных NP, после летального заражения гетерологичным вирусом H1N1. Однако клинические проявления у выживших животных существенно не улучшились. Эти данные свидетельствуют о том, что NP-специфические цитотоксические Т-клетки способствовали элиминации вируса, но не предотвращали развития инфекции [418].

Дальнейшие попытки усовершенствовать вакцину на основе нуклеопротеина (NP) были предприняты Tite et al., которые экспрессировали NP вируса гриппа A/NT/60/68 (H3N2) в *Salmonella typhimurium* и исследовали его иммуногенные свойства на модели мышей. Как и в предыдущих исследованиях с очищенным NP, мыши, иммунизированные внутривенно, демонстрировали защиту от летального заражения гетерологичным вирусом H1N1, но не от заболевания. Важно отметить, что внутривенная иммунизация этим антигеном также приводила к более раннему снижению вирусной нагрузки в легких [367].

Основным механизмом защиты, опосредованной NP, считается индукция Т-клеточного иммунного ответа. Для этого антиген должен продуцироваться внутри клетки-мишени на основе экзогенной мРНК или ДНК, доставляемой с помощью вирусных векторов или липидных наночастиц. мРНК-платформы представляют собой перспективный инструмент для разработки вакцин на основе NP благодаря их низкому риску инсерционного мутагенеза, высокой эффективности, ускоренным срокам разработки и экономической доступности [212]. Было предложено несколько вакцинных кандидатов, состоящих из мРНК, кодирующей NP [123, 243, 126]. Наилучшие результаты были достигнуты при использовании мРНК, кодирующей NP, в комбинации с мРНК, экспрессирующими другие антигены вируса гриппа. Это подчеркивает потенциал комбинированных подходов для усиления иммуногенности и обеспечения более широкой защиты против различных штаммов вируса.

Было проведено несколько исследований, направленных на разработку ДНК-вакцин, кодирующих нуклеопротеин (NP), которые вводились внутримышечно без использования адъювантов. В первом таком исследовании Ulmer et al. продемонстрировали, что ДНК-вакцина на основе NP индуцирует Т-клеточный ответ через презентацию антигена в комплексе с МНС-I и обеспечивает перекрестную защиту

в мышинной модели [375]. Авторы также выявили лимфопролиферативный эффект и секрецию Th1-цитокинов (IFN γ и IL-2) CD4⁺ Т-клетками после рестимуляции спленоцитов антигеном NP in vitro [376].

Epstein et al. показали, что мыши, иммунизированные ДНК NP с последующим усилением аденовирусным вектором, экспрессирующим NP, демонстрировали более высокие титры специфических IgG в сыворотке, увеличение числа эффекторных Т-клеток и лучшую защиту от летального заражения различными штаммами вируса гриппа, включая высокопатогенный H5N1, по сравнению с мышами, получившими только ДНК NP [114].

Lo et al. использовали комбинацию ДНК и аденовирусных векторов, экспрессирующих антигены NP, M2 или NP+M2, и показали, что схема вакцинации «прайм-буст» (первичная иммунизация ДНК, затем буст аденовирусным вектором) индуцирует системный гуморальный и клеточный иммунный ответ, а также обеспечивает защиту от гомологичного заражения, сопоставимую с иммунизацией холодоадаптированными вирусами. При этом только комбинация антигенов NP и M2 в схеме «прайм-буст» обеспечила защиту от заражения вирусом H5N1 [234]. Впоследствии Rao et al. проверили эффективность аналогичной стратегии вакцинации на моделях мышей и хорьков. Их результаты показали, что вакцины на основе ДНК или аденовирусных векторов, содержащих HA, NP и M2, способны индуцировать специфические гуморальные реакции. Однако полная защита от летальной дозы высокопатогенного вируса H5N1 достигалась только при использовании HA-кодирующих или комбинированных ДНК и аденовирусных векторов [306].

В качестве инструмента для доставки гена NP в клетки были предложены различные векторные платформы. Среди них рекомбинантный вектор MVA-NP+M1, разработанный Berthoud et al. [38], заслуживает особого внимания. На сегодняшний день данная вакцина успешно прошла фазы I и IIa клинических исследований, продемонстрировав способность индуцировать быстрый Т-клеточный ответ у представителей различных возрастных групп, а также повышать уровень специфических Т-клеток у пожилых людей [15]. Однако статистически значимых улучшений в течении заболевания, вызванного интраназальной инфекцией у вакцинированных лиц, зафиксировано не было [229]. Для усиления иммунного ответа и повышения уровня уже существующих перекрестно-реактивных Т-клеток, способных обеспечивать защиту от гетеросубтипичных вирусов гриппа А, MVA-NP+M1 была скомбинирована с лицензированной инактивированной гриппозной вакциной. Эта комбинация была протестирована в фазе IIb клинических испытаний на людях старше 65 лет [358, 54].

Хотя исследование подтвердило увеличение величины Т-клеточного ответа, значимого повышения титров гемагглютинирующих антител или корреляции между клиническими проявлениями заболевания и количеством IFN γ + Т-клеток выявлено не было. Кроме того, была разработана пентавалентная NP-кодирующая вакцина на основе штамма вакцины Wyeth (вектор, аналогичный MVA), которая продемонстрировала иммуногенность и защитный потенциал в исследованиях на модели заражения вирусом H5N1 [293].

Кандидатная вакцина ChAdOx1-NP+M1, разработанная Dicks et al. на основе вектора аденовируса шимпанзе ChAdOx1 [92] продемонстрировала хороший профиль безопасности при введении добровольцам и способность индуцировать устойчивый Т-клеточный иммунный ответ [14]. Дальнейшие исследования, проведенные Arunkumar et al., подтвердили эффективность стратегии праймирующей вакцинации с использованием ChAdOx1-NP+M1 и последующей бустерной вакциной MVA-NP+M1. Такая схема вакцинации привела к активной наработке IFN γ -экспрессирующих CD4+ Т-клеток [17].

В экспериментах на мышах наилучшие результаты защиты от заражения вирусами гриппа подтипов H3N2, H7N9 и H10N8 были достигнуты при использовании векторов, одновременно экспрессирующих химерные HA, NP и M1 [17]. Эти данные были подтверждены в дальнейших исследованиях на модели хорьков, где иммунизация в режиме прайм-буст с использованием векторов на основе ChAdOx1 и MVA, экспрессирующих указанные антигены, привела к значительному подавлению репликации вируса H3N2 в респираторном тракте [242].

Кроме того, исследования на свиньях продемонстрировали, что эффект первичной иммунизации вакцинами ChAdOx2 и MVA, экспрессирующими антигены NP, M1 и NA, зависел от способа введения. Внутривенное введение вызывало системный антительный ответ, тогда как аэрозольная иммунизация способствовала образованию специфических Т-клеток и IgG на слизистых оболочках. Важно отметить, что в обоих случаях наблюдалось снижение вирусывыделения и уменьшение повреждения легких при заражении вирусом H3N2 [387].

Siro et al. разработали векторные вакцины на основе аденоассоциированного вируса (AAV), экспрессирующие антигены H1, M1 и NP. Эти вакцины продемонстрировали способность индуцировать выраженный специфический Т-клеточный и антительный ответ у мышей. Однако только трехвалентная вакцина, содержащая все три антигена, значительно повышала выживаемость мышей при заражении вирусом соответствующего подтипа [340]. В отличие от этих результатов, исследования Demminger et al. показали, что иммунизация мышей моновалентными

вакцинами на основе AAV, экспрессирующими NA, HA или химерный HA (сНА), вызывала не только выраженный системный и мукозальный гуморальный ответ, но и обеспечивала защиту от заражения гомологичным штаммом вируса гриппа [88].

Lee et al. в своих исследованиях описали протективные свойства NP двух линий вируса гриппа В, закодированных в аденовирусном векторе Ad5. Авторы выявили индукцию перекрестно-реактивных антител и CD8⁺ Т-клеточного ответа, а также продемонстрировали перекрестную защиту от гетерологичных штаммов в мышинной модели [218].

Для вакцины против гриппа у свиней был использован вирус парагриппа Orf в качестве вектора для экспрессии NP и/или HA вируса гриппа свиней. Полученные вакцины, экспрессирующие как HA и NP, так и только HA показали индукцию перекрестных нейтрализующих антител, а также высокие уровни вирус-специфических Т-клеток памяти. Примечательно, что иммунизация вектором, содержащим гены HA и NP, приводила к увеличению количества CD8⁺ Т-клеток, развитию Th2 ориентированного иммунного ответа и обеспечивала дополнительную защиту от инфекции, вызванной вирусом гриппа [180].

Теоретически иммуногенность рекомбинантного нуклеопротеина может быть усилена за счет добавления костимулирующих адъювантов или слияния с функциональными экзогенными или олигомеризационными доменами. Исследование Zheng et al. гриппозной вакцины на основе рекомбинантного белка NP, экспрессированного в бактериальной системе с адъювантом C48/80 и без него показали, что высокие титры IgG в сыворотке были обнаружены у всех иммунизированных животных, но наилучшая защита от летального заражения различными штаммами гриппа наблюдалась при внутривенном введении NP в комплексе с адъювантом [436]. Аналогичные результаты были получены Guo et al., которые продемонстрировали, что вакцина на основе комбинации рекомбинантного NP вируса гриппа A/PR/8/34 (H1N1) и холерного токсина, вводимая внутривенно, обеспечивает полную защиту от гомологичного вируса и частичную защиту при гетерологичном заражении вирусами птичьего гриппа H5N1 и H9N2 [142].

Еще одним перспективным адъювантом для рекомбинантного NP является бис-(3',5')-циклический димерный аденозинмонофосфат (с-di-AMP), предложенный Sanchez et al. Внутривенное введение этого адъюванта стимулировало выработку специфических к NP сывороточных и секреторных антител, а также индуцировало устойчивый Th1-ответ, сопровождающийся выработкой IFN γ и IL-2 [323].

В исследовании Cookenham et al. рекомбинантный NP вводили молодым и пожилым мышам в комплексе с новым адъювантом SLA-SE на основе сквалена. Было выявлено умеренное увеличение количества NP-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток в спленоцитах, интенсивная выработка анти-NP IgG2c антител, а также усиление вирусного клиренса и повышение выживаемости. Однако значительных изменений в количестве CD8⁺ Т-клеток памяти у вакцинированных мышей обнаружено не было [70].

Li et al. показали, что комбинация рекомбинантных белков NP и M1 индуцировала цитотоксические анти-NP (но не анти-M1) Т-клеточные ответы и обеспечивала защиту от гомологичного вируса только при использовании физического радиочастотного адъюванта (RFA). При этом иммунизация с RFA не повышала уровни анти-NP и анти-M1 антител по сравнению с адъювантом AddaVax и не увеличивала уровень провоспалительного цитокина IL-6 в сыворотке [225]. Кроме того, авторы продемонстрировали, что замена адъюванта AddaVax на CpG 1018 усиливала NP-индуцированный CD8⁺ Т-клеточный ответ и улучшала защиту от летальных инфекций. Эта замена также привела к переключению типа иммунного ответа на Th1 (основной противовирусный эффекторный путь, опосредованный IFN γ -секретирующими клетками) вместо Th1/Th2-сбалансированного ответа (опосредованного IL-4-продуцирующими Т-лимфоцитами) [224].

Попытка повысить иммуногенность рекомбинантного нуклеопротеина вируса гриппа A/WSN/1933 (H1N1) была предпринята Del Campo et al. с использованием стратегии антигенной мультимеризации. Исследователи дополнили последовательность NP доменом олигомеризации OVX313, создав NP-гептамер под названием OVX836, состоящий из семи копий антигена NP [86]. Этот полимер продемонстрировал значительно более высокую иммуногенность по сравнению с NP дикого типа, что объясняется его усиленным поглощением дендритными клетками. OVX836 индуцировал выраженные NP-специфические CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеточные ответы, включая образование тканерезидентных CD8⁺ Т-клеток (Trm) в легких у мышей [85].

В клиническом исследовании I фазы внутримышечное введение вакцины OVX836 в дозах до 180 мкг подтвердило ее безопасность и иммуногенность [411]. В последующем исследовании IIa фазы сравнивались более высокие дозы OVX836 (300 и 480 мкг) с дозой 180 мкг с точки зрения безопасности, иммуногенности и защиты от сезонных гриппоподобных заболеваний. Все дозы продемонстрировали благоприятный профиль безопасности и индуцировали выраженный клеточный иммунный ответ в дозозависимой манере, что подтверждалось увеличением количества IFN γ -секретирующих клеток в периферической крови уже через неделю после вакцинации

[221]. Важно отметить, что в этом исследовании была показана эффективность вакцины порядка 80% против сезонных вирусов гриппа H3N2, что свидетельствует о способности индуцированных Т-клеток обеспечивать защиту вакцинированных лиц от естественной гриппозной инфекции. Однако в данном исследовании не изучалась потенциальная роль анти-NP антител, которые также могут вносить вклад в защиту от инфекции.

Изменчивость последовательностей нуклеопротеина и ее влияние на эффективность вакцин на основе NP

Несмотря на то, что нуклеопротеин считается одним из наиболее консервативных белков среди различных подтипов вируса гриппа А, он подвержен медленным эволюционным изменениям, которые позволяют вирусу ускользать от распознавания цитотоксическими Т-лимфоцитами (CTL) [379]. Ряд исследований продемонстрировал, что в NP происходят ключевые аминокислотные замены, которые ассоциируются с ускользанием от CTL-опосредованного иммунного ответа у человека [361, 313, 393, 44].

Было установлено, что мутации в критических эпитопах, включающих аминокислотные остатки 103-111, 251-259, 380-388, 383-391 и 418-426, могут нарушать антигенную презентацию через молекулы МНС-I. В частности, замены в положениях 103 (K203R), 259 (S259L), 384 (R384K/G), 421 (D421E), 423 (P423S) и 425 (I425M) способны полностью блокировать распознавание вируса CD8⁺ CTL [393, 312]. Эти изменения могут приводить к тому, что эффекторные Т-клетки, сформированные в ответ на инфицирование предыдущими штаммами гриппа, теряют способность распознавать новые варианты вируса [312].

В работе Isakova-Sivak I. et al. был проведен анализ сохранности иммунных эпитопов нуклеопротеина (NP) у циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа H1N1 и H3N2 по сравнению с NP вируса-донора, используемого в лицензированной живой гриппозной вакцине (ЖГВ) [166]. Результаты анализа показали, что только 8 из 18 (44,4%) эпитопов NP, полученных от вируса A/Leningrad/134/17/57 (H2N2), сохранились среди современных вирусов H1N1 и H3N2. Это свидетельствует о том, что большинство предсказанных иммунодоминантных эпитопов NP, специфичных для цитотоксических Т-лимфоцитов, которые были выявлены в вакцинных прототипах, разработанных на основе старых штаммов вируса гриппа А, отсутствуют у подавляющего большинства современных циркулирующих вирусов гриппа.

Эти данные имеют как минимум два важных негативных последствия:

- Массовое применение вакцин на основе NP, созданных на основе устаревших вирусов гриппа, может привести к стимуляции клонов CTL, которые не

способны распознавать клетки, инфицированные современными сезонными вирусами гриппа. Это не только снижает эффективность вакцинации, но и создает неоправданную нагрузку на иммунную систему вакцинированных лиц.

– Многие из новых эпитопов NP, появившихся в современных вирусах гриппа, не будут распознаваться Т-клетками, индуцированными вакциной, поскольку эти эпитопы отсутствовали в более старых штаммах, использованных для разработки вакцины.

Хорошо известно, что, помимо индукции Т-клеточного ответа, антиген нуклеопротеина способен стимулировать выработку NP-специфических антител. Ряд исследований, посвященных изучению защитных свойств как рекомбинантного NP, так и пассивной иммунизации сыворотками, полученными от животных, иммунизированных NP, продемонстрировали эффективность такого подхода при заражении гетеросубтипичными вирусами гриппа.

Более того, были описаны моноклональные антитела, способные связываться только с определенными подтипами вируса гриппа А, что указывает на критическое влияние некоторых вариаций в последовательности NP на взаимодействие с антителами [249]. В исследовании Bodewes et al. человеческое моноклональное анти-NP-антитело демонстрировало различную интенсивность связывания с вирусами H1N1 и H3N2, что свидетельствует о вариациях в сродстве антитела к соответствующим NP [42]. Эти данные позволяют предположить, что медленные эволюционные изменения в белке NP могут влиять не только на его распознавание Т-клетками, но и на связывание с анти-NP антителами.

В исследовании Carragher et al. иммунизация мышей рекомбинантным NP привела к значительному повышению титров специфических IgG и снижению репликации вируса. Однако у животных с дефицитом антител такого эффекта не наблюдалось. Аналогично, пассивная иммунизация наивных мышей, лишенных В-клеток, или интактных мышей сывороткой, содержащей антитела против NP, значительно снижала вирусную нагрузку в легких [55].

LaMere et al. показали, что введение анти-NP антител мышам с истощенными В-клетками обеспечивало частичную гетерологичную защиту и снижение вирусной нагрузки. Авторами продемонстрирована ключевая роль FcR-опосредованных механизмов в реализации защитного действия анти-NP антител *in vivo* [210].

В исследовании Fujimoto et al. трансгенные мыши, экспрессирующие гены анти-NP-антител, полученные из В-клеток особей, переболевших гриппом H5N1, оказались устойчивы к летальному заражению как вирусом H5N1, так и адаптированным к мышам

вирусом H1N1. Эти данные подтверждают, что анти-NP-антитела участвуют в перекрестной защите от гриппа, вероятно, через непрямые противовирусные механизмы, такие как АЗКЦ или активация каскада комплемента [129].

В целом, NP-специфические антитела могут вносить значительный вклад в перекрестную защиту, индуцированную вакцинами на основе NP, что делает их важным компонентом иммунного ответа, который не следует игнорировать. Хотя NP-специфические антитела традиционно считаются высоко кросс-реактивными, исследования с использованием моноклональных антител против NP выявили различия в антигенности этого белка между эволюционно разнородными вирусами гриппа [385].

Таким образом, NP наряду с эктодоменом белка M2 (M2e) является одним из наиболее изученных антигенов для создания вакцин, направленных на индукцию перекрестно-реактивного иммунитета [247].

На сегодняшний день множество экспериментальных вакцин на основе NP прошли доклинические и клинические исследования. Эти вакцины разрабатывались с использованием разнообразных платформ, включая рекомбинантные белки в сочетании с адъювантами или олигомеризующими доменами, ДНК/мРНК-вакцины, а также вакцины на основе вирусных векторов. Большинство опубликованных исследований подтвердили широкий спектр действия таких вакцин. Однако не все кандидатные вакцины, прошедшие клинические испытания, продемонстрировали достаточную эффективность у людей [36].

В дополнение к индукции клеточно-опосредованного иммунитета, антиген нуклеопротеина способен стимулировать выработку высоких уровней анти-NP антител. Однако этот аспект иммунного ответа часто остается недооцененным в доклинических исследованиях прототипов гриппозных вакцин на основе NP, вероятно, из-за того, что анти-NP антитела не обладают прямой нейтрализующей активностью. Тем не менее, такие антитела могут связываться с клетками, инфицированными вирусом, и опосредовать защитные механизмы через Fc-зависимые реакции, такие как АЗКЦ или активация комплемента [176, 55, 175].

Важно учитывать, что медленные эволюционные изменения в последовательности NP могут влиять на его антигенные свойства, что, в свою очередь, может снижать способность анти-NP антител, индуцированных вакцинацией, эффективно связываться с NP современных циркулирующих штаммов вируса гриппа. Это подчеркивает необходимость тщательного мониторинга изменчивости NP и учета этих изменений при разработке вакцин, чтобы обеспечить их актуальность и эффективность против постоянно эволюционирующих вирусов. Выбор конкретного

антигена может иметь важные последствия для применения вакцины против циркулирующих в настоящее время вирусов гриппа и даже незначительное несовпадение эпитопов вакцины и циркулирующих вирусов может значительно снизить потенциальную эффективность вакцины.

2.3. Вакцины против гриппа нового поколения.

В настоящее время для профилактики гриппа используются два основных типа вакцин: инаktivированные и живые. Инаktivированные вакцины, в свою очередь, делятся на три категории: цельновирioнные, расщепленные (сплит-вакцины) и субъединичные. Каждый из этих типов представляет собой либо цельные инаktivированные вирионы, либо фрагменты разрушенных вирионов, либо очищенные поверхностные белки вируса гриппа различных подтипов.

Вакцины содержат антигены штаммов вируса гриппа, которые, по прогнозам, будут циркулировать в текущем эпидемическом сезоне и требуют ежегодного обновления штаммового состава. Эти препараты преимущественно стимулируют гуморальный иммунный ответ, обеспечивая защиту только от тех штаммов вируса, которые включены в их состав. Современные трехвалентные инаktivированные вакцины содержат антигены вирусов гриппа подтипов H1N1, H3N2 и одной линии вируса гриппа B. Кроме того, для клинического применения одобрены тетравалентные вакцины, которые включают две линии вируса гриппа B.

Сезонные вакцины против гриппа обеспечивают умеренную защиту от гриппа. Однако эффективность может существенно различаться в зависимости от типа вируса и возрастной группы, что указывает на необходимость адаптации стратегий вакцинации, особенно для пожилых людей и против штамма A/H3N2, и ежегодного анализа эффективности вакцин. По данным метаанализа 2024 года объединенный показатель эффективности вакцинации против любого гриппа составил 41,4 %. Для конкретных штаммов этот показатель составил 55,4 % против A/H1N1, 26,8 % против A/H3N2, 47,2 % против B/Yamagata и 40,6 % против B/Victoria, причем эффективность против A/H3N2 была значительно ниже, чем против A/H1N1 и B/Yamagata [141].

В связи с повышенным вниманием к рискам пандемии гриппа и ограниченной эффективности традиционных гриппозных вакцин, производимых на куриных эмбрионах, непрерывно ведутся разработки так называемой «универсальной» вакцины против гриппа. Всемирная организация здравоохранения в Глобальной стратегии по гриппу на 2019-2030 гг также ставит задачи разработки вакцин широкого спектра действия [415].

Существуют различные определения универсальной вакцины против гриппа. Глобальный план действий ВОЗ в отношении вакцин поставил цель разработать универсальную вакцину против гриппа к 2020 году, но признал сложность точного определения того, что «универсальный» означает для объема защиты [416]. При определении предпочтительных характеристик продукта для гриппозных вакцин ВОЗ подчеркнула глобальную потребность в вакцинах «универсального типа против гриппа А» и применила рабочее определение, которое включает защиту от тяжелого гриппа А в течение не менее 5 лет и возможность применения для групп риска в странах с низким и средним доходом [414]. Стратегический план исследований в направлении улучшения противогриппозных вакцин Национального института аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID) конечной целью ставит разработку универсальных противогриппозных вакцин, которые эффективны по крайней мере на 75% против симптоматической инфекции, защищают от вирусов гриппа А 1-й и 2-й филогенетических групп, обеспечивают надежную защиту как минимум на 1 год и подходят для всех возрастных групп [115]. Однако на сегодняшний день ни одна разрабатываемая вакцина не достигла ни одной из этих целей. Одним из ключевых направлений, описанных в стратегии, является углубление понимания иммунных коррелятов защиты — защитных механизмов, которые активируются либо при естественной инфекции, либо при вакцинации [246, 196, 73]. Хотя титр в РТГА остается общепризнанным коррелятом защиты для гриппозных вакцин, другие иммунные маркеры могут указать на дополнительные мишени для разработки вакцин. Например, корреляция между уровнем анти-нейраминидазных антител и защитой [132] позволяет предположить, что увеличение содержания нейраминидазы в составе вакцин может повысить их эффективность [341].

Пандемия COVID-19 стала катализатором беспрецедентно быстрой разработки вакцин против SARS-CoV-2. Уже через год после начала пандемии началось глобальное внедрение вакцин, прошедших ускоренные клинические испытания. Для создания вакцин использовались различные платформы, включая мРНК, вирусные векторы и инактивированные вакцины. Вакцины на основе мРНК и вирусных векторов впервые были применены в таких масштабах.

Платформы, использованные для разработки вакцин против COVID-19, могут быть адаптированы и для создания гриппозных вакцин. Компании Moderna и Sanofi Pasteur уже разрабатывают мРНК-вакцины против гриппа [318, 213, 13]. Предварительные данные свидетельствуют о том, что такие вакцины способны стимулировать более сильный клеточный иммунный ответ, обеспечивая уровень

клинической защиты, сопоставимый с другими усовершенствованными вакцинами, но обладают повышенной реактогенностью, что ограничивает их широкое применение. Дальнейшее совершенствование мРНК-вакцин может включать снижение реактогенности или добавление дополнительных вирусных антигенов, таких как нейраминидаза, для повышения иммуногенности. Одной из перспективных идей является включение в состав вакцины множества штаммов вируса гриппа, что может обеспечить более широкую защиту от будущих вариантов [16]. Также ведутся разработки вакцин на основе вирусных векторов [82, 197, 388], включая вакцину VXA-A1.1, которая в настоящее время проходит II фазу клинических испытаний [228].

До пандемии COVID-19 одним из наиболее перспективных подходов к созданию универсальной вакцины против гриппа было стимулирование выработки антител к консервативным участкам белка гемагглютинина [83, 41, 257, 268]. В настоящее время эти вакцины находятся на стадии клинических испытаний.

Еще одним перспективным направлением является разработка вакцин на основе консервативных вирусных белков, таких как нуклеопротеин (NP), который менее подвержен мутациям, чем поверхностные белки [194, 369]. Такие вакцины могут обеспечить перекрёстную защиту против разных штаммов за счёт активации Т-клеточного иммунитета (CD4+/CD8+) [146]. Хотя они не предотвратят заражение, их применение может снизить тяжесть заболевания, подавляя репликацию вируса, а также повысить устойчивость вакцин к эволюции патогена [194].

Дополнительным направлением исследований является совершенствование живых аттенуированных вакцин против гриппа [250]. Еще одной стратегией является комбинирование нескольких усовершенствованных подходов, таких как добавление адъювантов или использование более высоких доз антигенов. Также активно изучаются новые адъюванты [389]. Внутрикожное введение вакцин, хотя и потенциально повышающее иммуногенность, пока не получило широкого распространения [301].

На начало 2025 года по данным Базы данных «Универсальная технология вакцины против гриппа» (Universal Influenza Vaccine Technology Landscape) на стадии клинических исследований находится 42 вакцинных кандидата, 174 на стадии доклинических испытаний [377]. В этой базе данных обобщена информация из реестров клинических испытаний и научных исследований, опубликованных за последнее время. Существуют 6 основных платформ для разработки вакцин нового поколения: на основе вируса гриппа (Influenza virus-based), на основе нуклеиновых кислот, вирусоподобные частицы (Virus-like particles - VLP), невирусоподобные наночастицы (Non-VLP nanoparticles), рекомбинантные белки и вакцины на основе вирусных векторов.

Одной из наиболее исследованных вакцин является вакцина Multimeric-001, представляющая собой рекомбинантный белок, содержащий консервативные линейные эпитопы антигенов HA, NP и M1, в комбинации с масляным адъювантом Montanide ISA-51. Она продемонстрировала хороший профиль безопасности и иммуногенности в ходе I и II фаз клинических исследований [20]. Кроме того, в исследованиях с участием пожилых людей Multimeric-001 использовался в качестве праймирующей вакцины перед введением стандартной трехвалентной инактивированной гриппозной вакцины. Такая схема вакцинации привела к усиленному образованию противовирусных антител по сравнению с группой, не получавшей праймирования [237, 19]. Несмотря на эти обнадеживающие результаты, данная вакцина не способствовала снижению тяжести гриппа и, таким образом, не вызвала желаемых результатов в клиническом исследовании III фазы у пожилых людей (NCT03450915). Одной из возможных причин недостаточной эффективности вакцины может быть слабая индукция антиген-специфических Т-клеток.

Адъювант Montanide ISA-51 был применен в составе синтетической гриппозной вакцины FLU-v, содержащей пептиды вирусных белков NP, M1 и M2. Внутривенное введение этой вакцины в ходе клинических испытаний I фазы продемонстрировало способность индуцировать активные вирус-специфические CTL-ответы у здоровых участников [290]. Более того, была выявлена положительная корреляция между этим эффектом и более легким течением заболевания, а также снижением вирусной нагрузки при заражении вирусом гриппа H3N2 дикого типа [289].

Иммуногенность вакцины FLU-v у здоровых добровольцев была дополнительно подтверждена в клиническом исследовании фазы IIb [383]. Последующие исследования, включая испытания с контролируемым заражением вирусом H1N1 [288] и исследование III фазы [287], подтвердили ее эффективность в профилактике гриппа.

Вакцина FP-01.1 состоит из шести 35-мерных пептидов, модифицированных фторуглеродом, которые содержат консервативные эпитопы NP, M1, PB1 и PB2, способные индуцировать Т-клеточный ответ как CD4+, так и CD8+. FP-01.1 рассматривается в качестве кандидата для прайминга и усиления иммунного ответа против различных штаммов вируса гриппа А. В ходе клинических исследований I фазы вакцина продемонстрировала высокий профиль безопасности, а также способность стимулировать перекрестно-реактивные IFN γ -секретирующие CD4+ и CD8+ Т-клетки в дозе 150 мкг на пептид [125]. Однако результаты последующих клинических исследований FP-01.1 не опубликованы.

2.4. Адьювантные свойства бактериального белка флагеллина

Одним из перспективных подходов к усилению иммунного ответа является использование флагеллина в качестве белкового носителя и адьюванта.

Флагеллин является основным структурным белком бактериального жгутика — хлыстоподобной внеклеточной структуры, отвечающей за подвижность жгутиковых бактерий [59, 390]. Помимо обеспечения подвижности, бактериальный жгутик участвует в адгезии, формировании биопленок, постинфекционном распространении и иммунной модуляции, что делает его важной структурой для выживания бактерий. Поскольку жгутик является эволюционно консервативной структурой, присутствие его основного компонента, мономера флагеллина, служит для иммунной системы хозяина сигналом бактериальной инфекции. Флагеллин, наряду с другими молекулярными структурами, обычно ассоциированными с патогенами, называют патоген-ассоциированным молекулярным паттернам (Pathogen-Associated Molecular Patterns, PAMPs) [317]. Hayashi et al. одними из первых показали распознавание флагеллина Toll-подобными рецепторами 5 (TLR5). В своих исследованиях они подробно описали активацию NF- κ B и экспрессию цитокинов [348].

Для обнаружения вторжения патогенов и инициирования защитных реакций врожденная иммунная система использует ряд паттерн-распознающих рецепторов (PRR), включая (1) Toll-подобные рецепторы (TLR), (2) RIG-I-подобные рецепторы, (3) NOD-подобные рецепторы, и (4) рецепторы лектинов C-типа (CLRs) [356, 202]. Человеческие TLR и их ассоциированные лиганды (PAMPs) включают: TLR1 (липопептиды), TLR2/6 (липопротеин), TLR3 (двунитевая РНК), TLR4 (липополисахариды), TLR5 (флагеллин), TLR7/8 (однонитевая РНК) и TLR9 (олигодезоксинуклеотиды CpG) [203].

Когда PAMP связывается с соответствующим TLR, в месте инфекции запускается врожденный иммунный ответ [168]. В этом процессе участвуют три группы клеток:

- 1) Эпителиальные клетки в таких распространенных местах инфекции, как кишечник, дыхательные и мочеполовые пути, экспрессируют множество TLR [131, 1].
- 2) В месте инфекции также присутствуют резидентные врожденные лейкоциты, такие как дендритные клетки (ДК), макрофаги и тучные клетки, которые активируются под воздействием PAMPs и высвобождают воспалительные цитокины [244].
- 3) Циркулирующие лимфоциты рекрутируются в очаг инфекции, когда PAMPs активируют TLR-экспрессирующие эндотелиальные клетки кровеносных сосудов, что способствует привлечению иммунных клеток [6].

В целом, присутствие РАРPs в месте инфекции активирует TLR-экспрессирующие иммунные клетки, что приводит к выработке воспалительных цитокинов и клиренсу патогена клетками врожденного иммунитета [5].

Помимо запуска врожденного иммунного ответа, РАРPs также играют важную роль в развитии адаптивного иммунитета. В периферических тканях адаптивный иммунитет активируется, когда незрелые ДК фагоцитируют микробные антигены для презентации. При наличии РАРPs TLR-сигнализация активирует ДК, переключая их из режима сбора антигенов в режим презентирования. Стимуляция незрелых ДК с помощью РАРPs способствует изменению экспрессии рецепторов, что позволяет ДК мигрировать из периферических тканей в дренирующие лимфатические узлы. Во время этой миграции ДК проходят процесс созревания, что позволяет им эффективно презентировать антигены и стимулировать наивные Т-клетки [154]. В лимфатических узлах ДК активируют наивные антиген-специфические Т-клетки, предоставляя им два необходимых сигнала: (1) антиген в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости (МНС) и (2) костимулирующие молекулы, такие как В7-1 (CD80) и В7-2 (CD86). РАРP-опосредованная TLR-сигнализация является основным путем, с помощью которого ДК активируются и созревают для экспрессии костимулирующих молекул, необходимых для активации Т-клеток. В зависимости от экспрессии костимулирующих молекул и цитокинов, вырабатываемых ДК, происходит первичная активация CD4⁺ (дифференцировка в TH1 или TH2 клетки) и CD8⁺ Т-клеток, что приводит к развитию адаптивного иммунитета. Таким образом, РАРPs активируют ДК через TLR-сигнализацию и вызывают антиген-специфический адаптивный иммунный ответ [100].

Поскольку РАРPs служат важным «сигналом опасности» для иммунной системы, их можно включать в современные субъединичные вакцины для повышения их эффективности [422]. За годы развития вакцинных технологий антигенные компоненты вакцин эволюционировали от живых и инактивированных патогенов к синтезированным субъединичным антигенам, что повысило безопасность и упростило масштабирование производства. Получение только антигенных частей патогенов в гетерологичных системах экспрессии позволяет эффективно производить неинфекционные антигены [397]. Однако безопасность этих компонентов также означает, что в них отсутствуют типичные структуры патогенов, необходимые для активации иммунной системы. Другими словами, иммунная система не воспринимает очищенные антигены как угрозу. Поэтому возникла необходимость включать макромолекулы патогенов, такие как РАРPs, в состав вакцин, чтобы вызвать надежный иммунный ответ [307, 252].

2.4.1. Активация флагеллином врожденного иммунного ответа в слизистых оболочках

Поверхности слизистых оболочек в дыхательных, мочеполовых, почечных и кишечных путях обильно снабжены рецепторами TLR5 на эпителиальных клетках. Эти клетки первыми сталкиваются с патогенами и их токсинами. Наличие TLR5 на эпителиальных клетках слизистых оболочек и иммунных клетках, таких как дендритные клетки и макрофаги, подчеркивает роль флагеллина как адъюванта для слизистых [305]. Исследования кишечных CD11c+ клеток lamina propria (LPC) показали, что флагеллин является важным стимулятором кишечного иммунитета, даже в большей степени, чем липополисахариды [391]. Поскольку на LPC отсутствуют рецепторы TLR4, активация TLR5 в первую очередь отвечает за высвобождение хемокинов и цитокинов (IL-8, IL-12 и IL-6) на поверхности слизистой оболочки. Эпителиальное обнаружение флагеллина сопровождается высвобождением цитокинов, которые привлекают иммунные клетки к поверхности слизистой оболочки. Эти иммунные клетки, такие как дендритные клетки, Т-клетки и В-клетки, связывают сильный врожденный ответ с адаптивным иммунитетом.

Защитный иммунитет, достигаемый при мукозальной вакцинации, обеспечивается следующими механизмами: (1) интенсивное высвобождение цитокинов и хемокинов, (2) образование оксида азота на поверхности слизистой оболочки и (3) выработка IgA на поверхности слизистой оболочки [391]. Мукозальное применение флагеллина обеспечивает надежную двойную защиту, вызывая как мукозальный (IgA), так и системный (IgG) иммунный ответ. IgA, транспортируемый на слизистые поверхности, такие как дыхательные, желудочно-кишечные и мочеполовые пути, а также в молоко лактирующих животных, играет критическую роль в защите новорожденных. Множество исследований были направлены на изучение потенциала флагеллина в качестве адъюванта для мукозального применения. Исследования на моделях таких заболеваний, как *Porphyromonas gingivalis* [299], *Plasmodium falciparum* [300] и *Vibrio vulnificus* [217], подтвердили усиление иммунного ответа на слизистых к флагеллину при совместном введении или соединении с антигеном. Альтернативные пути введения флагеллина в слизистую, такие как субконъюнктивальный и интраперитонеальный, продемонстрировали эффективность в борьбе с инфекциями, вызванными *Pseudomonas aeruginosa*. Было показано, что профилактическое применение флагеллина предотвращает воспаление и развитие кератита в мышинных моделях [201].

Для включения флагеллина в субъединичную вакцину с целью усиления иммунного ответа существует несколько стратегий: (1) простое смешивание флагеллина с антигеном, (2) генетическое связывание флагеллина с антигеном и (3) использование только TLR5-активирующих доменов флагеллина, связанных с антигенами. Простое смешивание мономеров флагеллина с вакцинным антигеном может приводить к некоторому усилению иммунного ответа на антиген [145]. Однако более эффективно действует флагеллин, связанный с антигенами, поскольку одновременная презентация антигенов и PAMPs для ДК должна эффективно инициировать адаптивный иммунитет [158]. Наконец, для повышения экспрессии белка в конструкции слияния антигена и флагеллина были предприняты усилия по идентификации минимального домена флагеллина, необходимого для активации TLR5 [256].

Флагеллин из *S. typhimurium* можно разделить на четыре домена: D0, D1, D2 и D3, расположенных в структуре, напоминающей бумеранг [322]. Структура флагеллина приведена на рисунке 4 [426, 427].

С позиции белковой последовательности домены флагеллина расположены, начиная с N-конца, как D0-D1-D2-D3-D2-D1-D0. Когда мономеры флагеллина полимеризуются, образуя нить жгутика, D0 и D1 встраиваются в сердцевину нити, а D2 и D3 выступают над ее поверхностью. Сравнительный анализ флагеллинов различных бактерий показал, что D0 и D1 являются высоко консервативными, в то время как D2 и D3 демонстрируют большую вариабельность в последовательности и структуре [427]. Экспериментальные данные подтвердили, что синтетический полипептид CBLB502, включающий только домены D0 и D1, полностью сохраняет способность активировать NF- κ B-сигнальный путь через TLR5, демонстрируя необязательность доменов D2 и D3 для передачи сигнала [52].

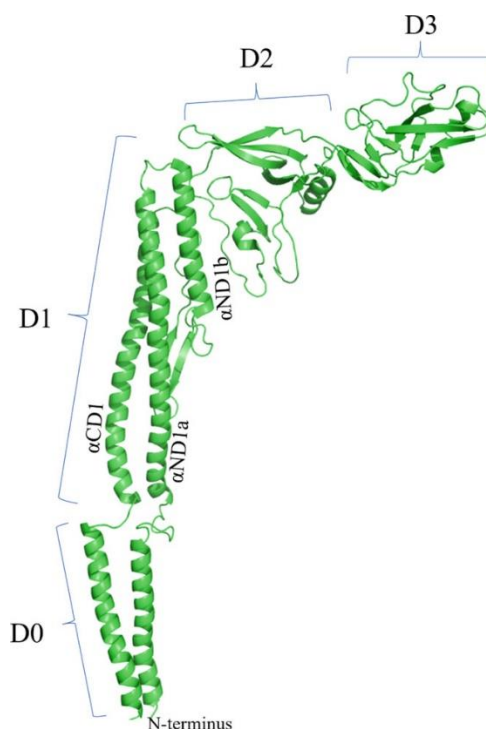


Рисунок 4. Кристаллическая структура флагеллина. Показана 3D-структура полноразмерного флагеллина (Protein Data Bank ID: 1UCU) [2]

2.4.2. Применение флагеллина в качестве адъюванта при разработке вакцин.

Было показано, что при совместном введении с вакцинными антигенами полноразмерные мономеры флагеллина вызывают системный и мукозальный антительный иммунный ответ [69]. Иммунизация инактивированным вирусом гриппа с добавлением полноразмерного флагеллина приводила к комплексному гуморальному ответу и рекрутированию гранулоцитов, моноцитов/макрофагов в дыхательные пути. Была отмечена полная защита от высокодозного заражения (но, что интересно, не наблюдалось значительного повышения уровня мукозального IgA, как можно было бы ожидать) [344]. В других исследованиях гуморальный иммунный ответ и определенная степень защиты наблюдались против *Plasmodium vivax* [25], вируса папилломы человека [216] и вируса ящура [145].

Вскоре стало ясно, что физическое соединение флагеллина с антигенами вакцины способствует более быстрому и сильному усилению иммуногенности чем совместное введение флагеллина. Слитая конструкция антигена с РАРР обеспечивает одновременное поступление двух необходимых сигналов, (1) антигена и (2) РАРРs для коstimуляторных молекул, в одну и ту же антиген презентирующую клетку (АПК) для активации и созревания [422]. Для сравнения, если антигены и РАРРs не связаны, то АПК может получить только один из сигналов, что приведет к менее эффективной презентации антигена.

Huleatt и его коллеги первыми продемонстрировали важность физической связи между антигеном и РАР в исследовании, где куриный овалбумин (OVA) был соединен с С-концом полноразмерного флагеллина из *Salmonella typhimurium*. Полученный антиген-специфический клеточный и гуморальный иммунный ответ по силе был сопоставим с эффектом, достигаемым при использовании полного адъюванта Фрейнда [159].

Для дальнейшего подтверждения повышения защитной эффективности за счет связывания флагеллина, в рамках исследования был проведен дополнительный эксперимент, в котором флагеллин был соединен с антигенами *Listeria monocytogenes*. Эффект был подтвержден при вакцинации слитой конструкции флагеллина с антигенами *Listeria monocytogenes*, которая стимулировала антиген-специфический CD8⁺ Т-клеточный ответ и обеспечивала выраженную защиту при бактериальном заражении. Аналогичное усиление иммунного ответа было продемонстрировано и в случае других патогенов, таких как вирус гриппа и малярия [25, 351]. Кроме того, связывание антигенов с N-концом флагеллина также применялось для вакцин против таких патогенов, как уropатогенная *Escherichia coli* [184], вирус оспы [87] и модель вируса иммунодефицита человека [84].

Вместе с тем, использование полноразмерного флагеллина в качестве адъюванта сопряжено с потенциальными рисками из-за его выраженных воспалительных и антигенных свойств. В высоких дозах он может вызывать тяжелые системные воспалительные реакции, включая повреждение печени у мышей [421]. Удаление гипервариабельных областей и их замена на HIV-p24 не только увеличивало выработку антител IgA, но также снижало нежелательные воспалительные эффекты у мышей [423].

Структурные и функциональные исследования флагеллина показали, что для активации TLR5 необходимы только консервативные домены D0 и D1, в то время как гипервариабельные домены D2 и D3 не играют существенной роли в этом процессе [186]. Это связано с рядом причин. Во-первых, полноразмерный флагеллин может вызывать выраженный цитокиновый шторм, что приводит к значительному воспалению и локальному повреждению тканей. Во-вторых, гипервариабельные области (D2 и D3) способствуют выработке нейтрализующих антител против флагеллина, что может снижать его эффективность в качестве адъюванта [310]. Наконец, мутационные и структурные исследования подтвердили, что эти области не играют ключевой роли в связывании с TLR5 и передаче сигнала.

Таким образом, дальнейшее развитие флагеллина в качестве адъюванта предполагает использование его укороченной формы, содержащей только домены D0 и

D1. Уменьшение молекулярной массы флагеллина вдвое позволяет создавать более компактные конструкции, что имеет несколько преимуществ: (1) облегчает процесс рефолдинга белков антигена и флагеллина, (2) увеличивает уровень экспрессии белка. Кроме того, отсутствие гипервариабельных областей снижает выработку антител против флагеллина, что повышает его эффективность и безопасность [265].

Флагеллин активирует как TLR5, так и цитозольный NOD-подобный рецептор 4 (NLRC4), что способствует организации адаптивного иммунного ответа против специфических патогенов. Однако исследования с точечными заменами показали, что флагеллин, лишенный способности активировать NLRC4, индуцирует значительно более высокие титры антител по сравнению с флагеллином дикого типа. Это свидетельствует о том, что активация NLRC4 может подавлять активацию TLR5. Li et al. пришли к выводу, что TLR5 является основным путем, опосредующим иммунную стимуляцию, вызванную флагеллином [223].

На этом основании был разработан укороченный флагеллин (1-99aa), включающий ключевую область связывания R89. Связывание этого укороченного флагеллина с антигенами приводит к значительному увеличению титров антител, высвобождению цитокинов и обеспечивает защиту от таких патогенов, как *Pasteurella multocida* [98], вируса гепатита А утки серотипа 3 [371] и *Actinobacillus pleuropneumoniae* [68]. Кроме того, была разработана субъединичная вакцина против вируса ящура, включающая самособирающиеся наночастицы (i301), белок VP1 и укороченный флагеллин (1-99aa). Наночастицы, содержащие флагеллин, вызвали значительное увеличение числа антиген-специфических нейтрализующих антител и обеспечили высокий уровень защиты в экспериментах на морских свинках [281]. Эти данные подтверждают, что TLR5 является основным путем, через который флагеллин проявляет свои адъювантные свойства.

В другом подходе небольшой пептид флагеллина (85-111aa, обозначенный как pFlg), содержащий участок связывания с TLR5, был прикреплен к липосомам для доставки опухолевых антигенов или ДНК в дендритные клетки. Было показано, что липосомы, содержащие pFlg, напрямую связываются с ДК, и это связывание коррелировало с экспрессией TLR5. Это указывает на то, что pFlg на липосомах может способствовать направленной доставке антигенов в ДК через взаимодействие с TLR5 [117]. Аналогичный подход был применен для создания вакцины против цирковируса свиней 2 (PCV2). Пептид pFlg был присоединен к С-концу капсидного белка PCV2, который способен к самосборке в вирусоподобные частицы. Вакцинация привела к

усилению гуморального и клеточного иммунного ответа, а также к снижению виремии после заражения [137].

2.4.3. Флагеллин как потенциальный носитель гаптенов

Флагеллин играет двойную роль в разработке вакцин, выступая как в качестве адъюванта, так и в качестве носителя гаптенов. Флагеллин, слитый с неиммуногенными низкомолекулярными молекулами (гаптенами), позволяет иммунной системе вырабатывать специфические антитела против них.

Примером успешного применения флагеллина в качестве носителя гаптенов является исследование, в котором кокаиновый гаптен GRE был соединен с флагеллином. Конструкция флагеллин-GRE вызвала более высокий уровень антител против GRE у мышей по сравнению с другими группами [235]. На основе этих результатов была разработана конъюгированная вакцина, в которой флагеллин был соединен с липополисахаридом, не содержащим липид-A. Эта вакцина вызвала целенаправленный иммунный ответ, что привело к 80% выживаемости через 28 дней после заражения [65].

Эти исследования демонстрируют, что флагеллин способен эффективно индуцировать как антиген-, так и гаптен-специфический иммунный ответ. Однако для полного понимания механизмов взаимодействия между гаптенами и флагеллином, а также для оптимизации его использования в качестве носителя гаптенов необходимы дальнейшие исследования [117, 233].

2.4.4. Препараты на основе флагеллина в клинических исследованиях

Использование флагеллина в качестве адъюванта раскрывает его высокий потенциал в усилении иммунного ответа через активацию TLR5. Так, вакцина против гриппа VAX102 (STF2.4×M2e), которая состоит из флагеллина *Salmonella typhimurium* типа 2, слитого с четырьмя tandemными повторами M2e вируса гриппа А успешно прошла первую фазу клинических исследований с участием 60 человек. Все иммунные реакции находились в пределах допустимого диапазона, и серьезных побочных эффектов выявлено не было [235]. Доклинические и клинические исследования субъединичной вакцины против SARS-CoV-2, сочетающей флагеллин *Escherichia coli* и RBD-домены спайк-белка выявили наличие широко нейтрализующих антител IgG и IgA, при этом профиль безопасности также оказался благоприятным [310].

Еще одним примером успешного применения флагеллина является противораковая генная терапия Mobilan. Эта терапия была создана с использованием

аденовирусного вектора, несущего гены TLR5 и флагеллина. В исследованиях на мышах Mobilan продемонстрировал высокую эффективность, вызывая активацию иммунитета, снижение метастазирования и замедление роста опухоли. При введении в простату человека Mobilan вызвал саморазрешающееся воспаление и инфильтрацию иммунных клеток в ткани простаты. Терапия показала хорошую переносимость препарата и безопасность во всех тестируемых дозах [245].

Однако, продвижение флагеллина в клинических испытаниях и его коммерциализация сталкиваются с рядом проблем, включая реактогенность. Так, при введении вакцины VAX102 (STF 2.4×M2e) одновременно с трехвалентной инактивированной гриппозной вакциной были отмечены легкие или умеренные побочные эффекты, такие как головная боль, утомляемость и мышечная боль, однако общая переносимость вакцины была оценена как хорошая [359]. Но при использовании более высоких доз (3 мкг и 10 мкг) в рамках отдельного исследования, где тестировался только компонент STF 2,4×M2e, наблюдались серьезные побочные эффекты. Эти эффекты были связаны с повышением уровня цитокинов и С-реактивного белка [372]. При дальнейших исследованиях четырехвалентной вакцины VAX102 при применении более высоких доз зафиксированы выраженные клинические симптомы у нескольких участников, хотя в целом переносимость оставалась удовлетворительной [374].

2.5. Заключение

Обеспечение длительного и широкого защитного иммунного ответа против гриппа вакцинными препаратами остается сложной задачей, требующей мультидисциплинарного подхода. Современные стратегии создания противогриппозных вакцин широкого профиля направлены на использование консервативных вирусных белков, пептидов или кодирующих их мРНК. С этой позиции особое внимание вызывают стеблевая область НА, белки M2 и NP. Предлагаются разные решения для расширения противовирусной направленности и усиления иммунного ответа содержащих их препаратов. Разработаны стратегии, включающие модификации структуры НА, такие как удаление головного домена, гипергликозилирование, химерные и мозаичные конструкции, а также экспрессия фрагментированных антигенов. Перспективным направлением является внедрение стабилизационных мутаций в стеблевую область НА, направленных на поддержание ее нативной конформации.

Для усиления иммуногенности белка M2 используются дополнительные стратегии, включая адъюванты, вирусоподобные частицы, белковые носители и платформенные технологии, такие как векторные системы и мРНК-вакцины.

Мощный клеточно-опосредованный иммунный ответ, обеспечивающий защиту от различных подтипов вируса гриппа, индуцируемый нуклеопротеином (NP) подтвержден рядом прототипных вакцин. Векторные и мРНК-вакцины, экспрессирующие NP, демонстрируют обнадеживающие результаты в доклинических испытаниях и на ранних стадиях клинических исследований.

Несмотря на значительный прогресс в молекулярном картировании вирусных белков, изучении механизмов иммунного ответа и разработке инновационных вакцинных платформ, цель по созданию вакцин направленных на все подтипы циркулирующих вирусов гриппа и обеспечивающих долговременную защиту пока не достигнута.

В дальнейшем исследовании нуждаются как механизмы иммуногенности консервативных вирусных белков и их фрагментов, так и рекомбинантные белки, сочетающие разные вирусные пептиды. Оптимизация вакцинных конструкций, в том числе вид адъювантов, схема иммунизации – вопросы, имеющие первостепенное значение для создания успешных средств профилактики гриппа

В настоящем исследовании мы концентрируем усилия на исследовании механизмов иммунного ответа на композиционно новые рекомбинантные белки, включающие пептиды вирусных белков (HA, M2 и NP) и флагеллин - перспективный активатор Toll-подобных рецепторов 5 (TLR5), усиливающий врожденный и адаптивный иммунный ответ.

3. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.

3.1. Материалы.

3.1.1. Рекомбинантные белки

Антигены вирусов гриппа, использованные для конструирования рекомбинантных белков:

- M2eh (SLLTEVETPIRNEWECRCNDSSD) – последовательность M2e вирусов гриппа человека типа А (H1N1, H2N2, H3N2);
- M2es (MSLLTEVETPTRSEWECRCSDSSD) – последовательность M2e вируса гриппа A/California/07/2009H1N1pdm;
- M2ek (SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD) – последовательность M2e высоко патогенного вируса гриппа птиц A/Kurgan/5/05 (H5N1);
- HA2
(RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSSEMNKLFETRRLRLREN A) - консенсусный фрагмент второй субъединицы (aa76–130) HA вирусов гриппа филогенетической группы II;
- NP255 DLIFLARSALILRGSVANHS – соответствующий консенсусной последовательности белка NP (aa 255-275) для вирусов гриппа А;
- NP335 SAAFEDLRVLSFIRGY – соответствующий высококонсервативной области белка NP (aa 335-350), гомологичной вирусам гриппа А подтипов H1, H2, H3 и H9.

Рекомбинантные белки, исследуемые в работе:

- Белок Flg-HA2-4M2ehs содержит последовательность бактериального белка флагеллина (*Salmonella typhimurium*), к которой на С-конце присоединен фрагмент второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа А второй филогенетической группы, за которым следуют 4 копии M2e (M2eh-M2es-M2eh-M2es). Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. На N-конце имеется гистидиновый тэг.
- Белок Flg-HA2-4M2ehk, конструкция аналогична предыдущему. Вместо M2es последовательность M2ek (M2eh-M2ek-M2eh-M2ek).
- Белок Flg-4M2ehk-HA2 содержит последовательность бактериального белка флагеллина, к которой на С-конце присоединены 4 копии M2e (M2eh-M2ek-M2eh-M2ek) за которым следует фрагмент второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа А второй филогенетической группы. Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. На N-конце имеется гистидиновый тэг.

- Белок FlgSh-HA2-4M2ehs содержит укороченную последовательность бактериального белка флагеллина, в которой вместо гипервариабельного домена встроены фрагмент второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа А второй филогенетической группы, а к С-концу присоединены 4 копии M2e (M2eh-M2ek-M2eh-M2ek). Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. На N-конце имеется гистидиновый тэг.
- Белок Flg-4M2ehs содержит последовательность бактериального белка флагеллина, к которой на С-конце присоединены 4 копии M2e (M2eh-M2es-M2eh-M2es). Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. На N-конце имеется гистидиновый тэг.
- Белок Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs содержит последовательность бактериального белка флагеллина, к которой на С-конце присоединен фрагмент второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа А второй филогенетической группы, за которым следуют фрагменты белка NP NP335 (aa 335-350), NP255 (aa 255-275), 4 копии M2e (M2eh-M2es-M2eh-M2es). Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. На С- и N-конце имеется гистидиновый тэг.

3.1.2. Синтетические пептиды.

Для оценки иммуногенности рекомбинантных белков были использованы следующие синтетические пептиды, синтезированные НПО «Верта»:

M2eh (G-37) SLLTEVETPIRNEWECRCNDSSD, соответствующий M2e вирусов гриппа человека типа А (H1N1, H2N2, H3N2);

M2ek (G-50) SLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD, соответствующий M2e высоко патогенного вируса гриппа птиц A/Kurgan/5/05 (H5N1).

NP255 DLIFLARSALILRGSVANHS – соответствующий консенсусной последовательности белка NP (aa 255-275) для вирусов гриппа А.

NP335 SAAFEDLRVLSFIRGY – соответствующий высококонсервативной области белка NP (aa 335-350), гомологичной вирусам гриппа А подтипов H1, H2, H3 и H9.

3.1.3. Лабораторные животные.

Мыши

В работе использовались самки мышей линий Balb/c и C57BL/6, массой 16-20 грамм, в возрасте 6-8 недель, полученные из питомников лабораторных животных «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России или «Пушино» РАН Филиал института

Биоорганической Химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова с соответствующими ветеринарными свидетельствами. Все исследования были выполнены в соответствии с Рекомендациями Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14 ноября 2023 г. N33. Эксперименты на животных были одобрены локальным этическим комитетом при ФГБУ «НИИ гриппа имени А.А. Смородинцева» Минздрава России (заседания № 40 04/21, №47 05/21, № 58 08/22).

Хорьки

Исследование проводилось на хорьках (источник получения АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ», Акт о рождении 8.0-30.06/23-1 от 30.06.2023 г.). В табл. 1 представлена характеристика лабораторных животных, использованных в исследовании. Исследование одобрено Биоэтической комиссией № 1.17/24 от 10.04.2024 г.

Таблица 1. Характеристика животных, необходимых для проведения исследования (код исследования № 1.17/24)

Вид животных	Хорьки
Пол животных	Самки
Линия/порода	Аутбредные
Возраст животных	10–11 мес.
Количество животных	15

Распределение животных по группам было проведено методом стратификации по массе тела после серологического исследования крови (отбор серонегативных животных на вирус гриппа А/Н1N1 и А/Н3N2) и вживления температурных датчиков. Перед началом эксперимента все хорьки были чипированы. Каждому отобранному в эксперимент животному был присвоен индивидуальный номер в соответствии с номером чипа.

3.1.4. Вирусы

Для заражения мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, были использованы следующие вирусы гриппа: А/Шанхай/2/2013(Н7N9)-PR8-IDCDC; А/Аичи/2/68 (Н3N2); А/Калифорния/07/09 Н1N1pdm09, А/Курица/Курган/05/05RG (Н5N1), А/Сингапур/1/57 (Н2N2), А/PR/8/34 (Н1N1).

Заражение хорьков проводили эпидемическим штаммом вируса гриппа А/Южная Африка/3626/13 (Н1N1pdm09).

3.1.5. Куриные эмбрионы.

Развивающиеся 10-дневные куриные эмбрионы (РКЭ) были получены из ООО «Синявинская птицефабрика» (Россия) с соответствующим ветеринарным свидетельством.

3.1.6. Клеточные культуры.

В работе использовали клеточную культуру MDCK (Madin–Darby canine kidney). Клетки поддерживались культивированием в среде DMEM (Биолот) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и антибиотика (Биолот).

3.2. Методы.

3.2.1. Биоинформационные методы

Анализ аминокислотных последовательностей, поиск Т и В клеточных эпитопов

Поиск вероятных Т-клеточных эпитопов осуществляли с использованием NetCTLpan1.1 Server [355], и параметров поиска, установленных по умолчанию. Поиск экспериментальных В- и CD4+ Т-клеточных эпитопов, гомологичных участкам HA2, проводили в базе данных Immune Epitope Database [392].

Построение 3Д моделей молекул.

Изображения трехмерной структуры рекомбинантных белков получали в программе UCSF Chimera v.1.9 [283] с использованием сервера Phyre 2.0 [185]. Расчет теоретической молекулярной массы, GRAVY и индекса нестабильности проводили с использованием сервера ProtParam [130].

3.2.2. Вирусологические методы

Определение инфекционной активности вирусов гриппа в куриных эмбрионах (КЭ)

Определение инфекционной активности вирусов гриппа проводили на развивающихся куриных эмбрионах 10-дневного возраста. Готовили десятикратные падающие разведения (10^{-1} – 10^{-13}) вирусосодержащей аллантоисной жидкости. Каждым разведением (в объеме 0,2 мл) заражали по 4 куриных эмбриона (КЭ). КЭ инкубировали при 34°C в течение 3 суток. Наличие вирусов определяли в РГА, инфекционную активность вируса рассчитывали по методу Рида и Менча в соответствии с МУ 3.3.2.1758-03 [441].

Определение летальной мышинной дозы вируса гриппа.

Готовят последовательные 10-кратные разведения вирусосодержащего материала на ФСБ. Каждым разведением интраназально под легким наркозом заражают животных. Используют не менее 4 мышей на одно разведение. Для определения летальной дозы проводят наблюдение в течение 14 суток после заражения, ежедневно учитывая павших

животных. 50% летальную дозу определяют методом Рида и Менча. Титр вируса выражают в lg LD50.

Вирусовыделение из носовых смывов хорьков на культуре клеток MDCK

Культуру клеток MDCK засевали в 96-луночные планшеты в концентрации 2×10^5 кл/мл и через 24 ч контролировали сомкнутость монослоя (95–100%). В 96-луночных планшетах готовили серии разведений образцов (в трех повторах для каждого образца) от 10^{-1} до 10^{-7} на поддерживающей среде (α MEM + 2 мг/мл ТРСК-трипсин + 0,2% альбумин фракция 5 + 1-кратный HEPES). Клетки дважды отмывали промывочной средой (α MEM + 2 мг/мл ТРСК-трипсин) и переносили разведения образцов, затем инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 суток. Наличие вируса определяли в реакции гемагглютинации с использованием 0,75% эритроцитов морской свинки. Расчет вирусного титра проводили по методу Рида и Менча.

3.2.3. Микробиологические методы.

Накопление рекомбинантных белков в культуре E. coli

Штамм-продуцент высевали на чашки Петри с LB агаром с добавлением ампициллина 100 мкг/мл и выращивали в течение ночи при +37°C. Одну колонию пересекали в жидкую среду LB с добавлением ампициллина 100 мкг/мл и выращивали в течение ночи при +37°C и перемешивании на шейкере при 170 об/мин. В жидкую среду LB с ампициллином (100 мкг/мл) вносили ночную культуру и культивировали при +37°C и перемешивании на шейкере при 120 об/мин до оптической плотности OD₆₀₀=0,6. Культуру охлаждали до +28°C, после чего добавляли IPTG до конечной концентрации 1мМ. Экспрессию рекомбинантного белка проводили в течение ночи при температуре +28°C и перемешивании на шейкере при 120 об/мин. Клетки осаждали в течение 20 мин при 7000 об/мин. Осадок ресуспендировали в DPBS и осаждали в течение 20 мин при 7000 об/мин. Клеточный осадок хранили до очистки при -20°C.

Получение раствора неочищенного целевого белка

Биомассу клеток штамма-продуцента размораживали на ледяной бане, затем добавляли раствор стартового буфера (30 мМ фосфат натрия, 300 мМ хлорид натрия, 20 мМ имидазол, pH=7.60) из расчета 10 мл раствора на 1 г влажной биомассы и ресуспендировали биомассу. Далее, добавляли 100 мМ раствор фенилметилсульфонилфторида (ингибитор протеаз) до конечной концентрации 1 мМ. Суспензию обрабатывали ультразвуком на ледяной бане при помощи ультразвукового гомогенизатора MSE в импульсном режиме.

Для удаления клеточного дебриса полученный лизат центрифугировали в течение 1 часа при температуре +4С° с ускорением 13000g. Отбирали супернатант, содержащий целевой белок.

3.2.4. Физико-химические методы.

Хроматографическая очистка белков

Рекомбинантные белки несут на N-конце гистидиновый тэг, что позволяет провести очистку белка от клеточного лизата с помощью металл-аффинной хроматографии на Ni-сорбенте.

Для очистки рекомбинантных белков использовали хроматографическую систему Akta Pure 25M и хроматографическую колонку Superdex 200 Increase 10/300 GL производства GE Healthcare (США). В качестве подвижной фазы использовали фосфатно-солевой буфер (PBS). Хроматография проводилась в холодильном боксе Thermo TSX Series при температуре +6°С. Хроматографическую колонку уравнивали 50 мл буфера PBS на скорости потока 0,75 мл/мин. Далее, 500 мкл исследуемого образца вносили в колонку при помощи инъекторной петли и элюировали 50 мл буфера PBS на скорости потока 0,75 мл/мин.

Определение белка по Лоури

Общий белок определяли по Лоури (модификация Петерсона) в соответствии с инструкцией к тест-системе Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification (TP0300-1KT, Sigma, USA). Измерение оптической плотности проводили, используя микропланшетный ридер Multiscan SkyHigh (Thermo Fisher Scientific, США), при длине волны 750 нм. Полученные значения оптической плотности экспортировали с прибора. Для каждого значения (калибровочные пробы и образцы) вычисляли среднее между значениями повторов, затем вычитали бланк. Построение калибровочной кривой проводили в программном пакете Microsoft Office Excel. По вертикальной оси откладывали оптическую плотность, по горизонтальной оси — содержание белка в мг/мл.

Электрофорез белков в полиакриламидном геле

Электрофоретическое разделение белков в полиакриламидном геле проводили в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия (sodium dodecyl sulfate, SDS) и 2-меркаптоэтанола по стандартной методике (SDS-ПААГ) [207]. Образцы смешивали с 4-кратным буфером Лэммли (конечные концентрации: 25 mM Tris-HCl pH=6.8, 100 mM 2-меркаптоэтанол, 1% SDS, 0,05% бромфеноловый синий, 5% глицерин)

и денатурировали 20 мин при 70°C. Использовали 12% предзалитый гель (Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gel, AnykD, Bio-Rad, #4568126). Параметры ЭФ: 35 мА, 200 В, 1 ч.

Гель окрашивали коллоидным раствором Кумасси G-250 (10% ортофосфорная кислота, 10% сульфат аммония, 0,12% Coomassie Blue, 20% метанол) в течение ночи, а затем отмывали водой.

Расчет содержания белка проводили в программном обеспечении к визуализирующей станции «ChemiDoc MP System» (Bio-Rad, США), на которой получали изображение окрашенного Кумасси ПААГ.

Вестерн-блот

Белки разделяли при помощи электрофореза в полиакриламидном геле и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, USA). Затем мембрану блокировали в 3% растворе БСА (бычий сывороточный альбумин) в течение ночи при комнатной температуре. Белки определяли окрашиванием мембраны мышинными моноклональными антителами к белку М2 вируса гриппа А (14С2, ab5416: Abcam, UK) в разведении 1:16000 и кроличьими поликлональными антителами к флагеллину (ab93713, Abcam, UK) в разведении 1:8000. Мембрану инкубировали 1 час при комнатной температуре с антителами, разведенными в PBS с 0,1% твин 20 (PBS-T) и 3% БСА, затем отмывали в PBS-T. Белок определяли окрашиванием мембраны в течение 1 часа при комнатной температуре козьими анти-мышинными или анти-кроличьими IgG меченными пероксидазой хрена (Abcam, UK) в разведении 1:2000 и последующей инкубацией 5 мин в ТМВ (тетраметилбензидин) Immnublot solution (Invitrogen, USA).

Определение содержания бактериальных эндотоксинов (LAL-тест)

Оценку содержания эндотоксинов в вакцине проводили с помощью ЛАЛ-теста (модификация гель-тромб теста) с использованием ЛАЛ-реактива PYROTELL® (чувствительность 0,03 ЕЭ/мл) и контрольного стандарта эндотоксина (КСЭ) *E. coli*.

В апирогенные пробирки, содержащие по 0,1 мл дозы вакцины и контролей, добавляли по 0,1 мл ЛАЛ-реактива. Сначала добавляли ЛАЛ реактив к отрицательному контролю, затем от меньшей концентрации контрольного стандарта эндотоксина к большему. Содержимое перемешивали на мешалке Vortex в течение 2–3 сек и помещали в термоблок «Термит» при температуре 37±1°C на 60±2 мин. По окончании времени инкубации пробирки доставали по одной из термоблока и плавно переворачивали. За положительный результат принимали твердый гель, который оставался на дне пробирки.

Определение биологической активности флагеллина

Биоактивность флагеллина анализировали с использованием клеточной линии HEK-Blue™hTLR5 (InvivoGen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Клетки HEK-Blue™-hTLR5 или HEK-Blue Null1 высевали с плотностью 450 000 клеток/мл на 96-луночные планшеты. Клетки стимулировали одним из следующих рекомбинантных белков: Flg-HA2-2-4M2ehs; FlgSh-HA2-2-4M2ehs; Flg; FLA-ST (положительный контроль, InvivoGen, США); или ODN2006 (отрицательный контроль, InvivoGen, США). Через 24 часа активность NF-κB-индуцированного SEAP оценивали с помощью QUANTI-Blue™ и измеряли оптическую плотность (ОП) при 655 нм с использованием микропланшетного ридера. Средние значения ОП стимулированных клеток вычитали из средних значений ОП не стимулированных клеток.

3.2.5. Иммунологические и серологические методы.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

Перед постановкой РТГА все сыворотки обрабатывали RDE (Receptor destroying enzyme). Сыворотки смешивали с RDE в соотношении 1:3 и инкубировали 18–20 ч при 37°C. Затем сыворотки прогревали на водяной бане при 56°C в течение 30 мин.

В 96-луночном иммунологическом планшете готовили двукратные разведения сывороток, начиная с 1:10, в объеме 25 мкл. Затем добавляли во все лунки по 25 мкл вируса в дозе 8 ГАЕ. Пробы инкубировали 15 мин, затем во все лунки вносили 50 мкл 0,5% суспензии куриных эритроцитов и инкубировали до полного оседания эритроцитов в контрольных лунках (45–60 мин). Учет реакции проводили визуально по отсутствию/наличию агглютинации эритроцитов.

Титром сыворотки считали ее наибольшее разведение, при котором наблюдается полное торможение агглютинации эритроцитов в результате взаимодействия вируса со специфическими антителами. При расчете СГТ значение титра <10 принимали за 5.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

ИФА проводили общепринятым методом. 96-луночные планшеты с высокой сорбционной способностью (Greiner, Германия) покрывали синтетическими пептидами, в концентрации 5 мкг/мл (в фосфатном буфере, pH 7,2-7,4), инкубировали ночь при 4°C. Планшеты обрабатывали блокирующим буфером (0,01 М ФБР, pH=7,2-7,4 с 5%ЭТС) в течение 1 часа при комнатной температуре, отмывали 3 раза ФБР с твином. В лунки планшет добавляли 100 мкл 2-х кратных разведений сывороток (начиная с 1:400- 1:800) в блокирующем буфере, инкубировали 1 час при комнатной температуре. В качестве конъюгата использовали моноклональные крысиные антимышьи IgG (Invitrogen) в

разведении 1:2000 меченые пероксидазой хрена, моноклональные овечьи антимышьи IgG1 (1:16 000), IgG2a (1:500) (Invitrogen), IgA в разведении 1:4000, козы антихорьковые IgG (Novus Biologicals, США), меченные пероксидазой хрена, в разведении 1:2000. В качестве субстрата использовали ТМБ (BD Bioscience) – инкубация 15 мин. Реакцию останавливали 2Н H₂SO₄. Учет реакции проводили при длине волны 450нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность, по крайней мере, в 2 раза больше, чем среднее значение фона.

Определение С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке мышей

С-реактивный белок определяли в сыворотке крови мышей Balb/c через 24, 48 и 72 ч после интраназальной иммунизации вакциной Грифлавак с помощью тест-системы ИФА (ELISA Kit for C Reactive Protein, SEA821Mu, Cloud-clone Corp.) в соответствии с инструкцией к тест-системе.

Проточная цитометрия

Мультипараметрическую проточную цитометрию выполняли в соответствии с протоколом BD Pharmingen™. Определяли способность исследуемого рекомбинантного белка индуцировать в легких образование специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитов, продуцирующих цитокины. Клетки легких стимулировали 10 мкг пептида M2e (G-37) в течение 6ч или 1мкг вируса гриппа A/Aichi/2/68 (H3N2) в течение 24ч в присутствии костимулирующих антител к CD28 мыши и CD107a-PE/Dazzle™ 594. За 6ч до окончания стимуляции добавляли блокатор клеточного транспорта брефелдин А (1мкг/мл) (BD Bioscience, USA). Клетки отмывали полной средой RPMI-1640, Fc-рецепторы блокировали антителами CD16/CD32 (Mouse BD Fc Block, BD Pharmingen, USA), затем инкубировали с Zombie Aqua (Zombie Aqua Fixable Viability Kit, Biolegend, USA) для выявления живых клеток и окрашивали флуоресцентно-мечеными антителами CD3a-FITC, CD4-PerCP, CD8-APC-Cy7, CD62L-PE-Cy7, CD44-APC (Biolegend, USA) при +2-+8°C в течение 30 минут. Затем клетки пермеабелизировали в соответствии с протоколом тест-системы Cytofix/Cytoperm Plus (BD Bioscience, USA) и окрашивали TNFα-BV421, IFNγ-PE, IL2-BV711 (Biolegend, USA). Для выявления популяций Tfh клетки окрашивали поверхностными антителами к поверхностным маркерам: CD4-PerCPCy5.5, CXCR-5-APC, CD8-APC/Cy7 и CD44-BV510.

Сбор данных (собирали 100,000 живых CD4⁺ лимфоцитов) выполняли на проточном цитометре Cytoflex (Beckman Coulter). Данные анализировали в программном пакете Kaluza версия 2.1 (Beckman Coulter, USA).

Выделение мононуклеаров из цельной крови хорька и их криоконсервация

Выделение мононуклеаров из цельной крови хорьков проводили в соответствии с DiPiazza et al. [97]. Образцы цельной крови собирали в гепаринизированные пробирки (Na-гепарин или Li-гепарин). Цельную кровь разбавляли раствором Хэнкса (HBSS, Биолот) в соотношении 4 части крови, 1 часть HBSS. Разведенную кровь наслаивали на раствор фиколла, плотность 1,077 (Панэко или Биолот). Пробы центрифугировали 20 мин при 800g и 20°C с плавным сбросом скорости. Серологической пипеткой собирали кольцо, переносили в 50-мл центрифужную пробирку и дважды отмывали клетки HBSS, затем 1 раз полной средой RPMI-1640 (Биолот), 10% ЭТС HI (Gibco), 1% пенициллина-стрептомицина (Биолот). Клетки криоконсервировали в ЭТС HI + 10% ДМСО с использованием контейнера для криозамораживания клеток (Thermo Scientific Mr. Frosty) (10°C в час) при –80°C. Через сутки пробы переносили в жидкий азот.

Для восстановления мононуклеаров пробы из жидкого азота переносили на водяную баню при 37°C и инкубировали до оттаивания. Клетки переносили в подготовленные 15-мл центрифужные пробирки с полной средой RPMI-1640, отмывали клетки однократно полной средой RPMI-1640 и подсчитывали количество живых мононуклеаров в суспензии. Клетки доводили до концентрации $2,5 \times 10^5$ в 100 мкл.

ELISPOT

Постановку ELISPOT осуществляли согласно инструкции к набору ELISpot Flex Ferret IFN- γ (HRP) (Mabtech, Швеция). Отмывали планшеты стерильным ФБР. Мембрану блокировали питательной средой в течение 30 мин при комнатной температуре. Опустошали планшет и добавляли 50 мкл/лунка активационного коктейля, а затем 100 мкл клеточной суспензии ($2,5 \times 10^5$ клеток). Клетки стимулировали синтетическим пептидом M2eh в концентрации 5 мкг/мл или моновакциной вируса гриппа A/H3N2 (IVR-227 A/Дарвин/6/2021) в концентрации 5 мкг/мл по гемагглютиниру. К не стимулированной пробе добавляли питательную среду, в качестве положительного контроля использовали стимуляцию PMA+Ionomycin.

Пробы стимулировали 24ч при 37°C 5% CO₂. По окончании инкубации планшеты отмывали PBS. Затем во все лунки вносили детектирующие антитела (MTF19-biotin) в концентрации 0,5 мкг/мл и инкубировали 2 ч при комнатной температуре. После инкубации планшеты отмывали PBS. Затем вносили антитела Streptavidin-HRP в разведении 1/1000 и инкубировали 1 ч при комнатной температуре. После инкубации планшеты отмывали PBS. Во все лунки вносили 100 мкл раствора ТМВ и инкубировали в темноте до появления четких пятен. Реакцию останавливали промыванием лунок

деионизированной водой. Планшеты оставляли до полного высыхания и затем считывали на ELISPOT ридере CTL S6 Ultimate UV Image Analyzer.

3.2.6. *Биологические методы.*

Иммунизация животных

Мышей иммунизировали в соответствии со схемой эксперимента интраназально или подкожно трехкратно с двухнедельным интервалом рекомбинантными белками в дозе 10 мкг/мышь в объеме 20 мкл (и/н) или 100 мкл (п/к). Контрольной группе мышей интраназально вводили ФБР в объеме 50 мкл.

Хорькам вакцину вводили двукратно подкожно или интраназально с интервалом 21 день. Вакцина (1 флакон — 1 доза) разводилась стерильной водой для инъекций в объеме 0,6 мл непосредственно перед введением. Перед иммунизацией животных вводили в кратковременный наркоз путем внутримышечного введения ветеринарных препаратов «Золетил 100» в дозе 1,5 мг/кг (производитель «Вальдефарм», Франция) и «Медитин 0,1%» в дозе 0,1 мг/кг (держатель РУ: ООО «Апиценна», Россия). Хорьков иммунизировали интраназально при помощи одноразового интраназального распылительного устройства на 1 мл. Животным вводили вакцину примерно по 0,25 мл в каждую ноздрю. Подкожное введение группам проводили при помощи стерильных одноразовых шприцов с иглой не менее 21G в область шеи. Объем для каждого пути введения составлял 0,5 мл/животное.

Измерение температуры тела у хорьков

Для регистрации температуры тела животным имплантировали термодатчики модели DST micro-T (Star-Oddi, Исландия) в межлопаточную область за 10 дней до начала исследования. Термодатчики регистрировали температуру тела каждые 60 мин на протяжении всего исследования.

Клиническое наблюдение за хорьками

Клиническое наблюдение за животными проводили в 0-й, 1-й, 3-й, 5-й, 7-й, 9-й, 11-й, 13-й, 15-й, 17-й, 19-й, 21-й, 22-й, 24-й, 26-й, 28-й дни эксперимента и ежедневно в течение 14-ти дней после заражения (42–56 дни) по показателям, представленным в табл. 2.

Таблица 2. Регистрация и оценка показателей при клиническом осмотре хорьков

Регистрируемые показатели	Проявления	Балл
Симптомы со стороны дыхательной системы и желудочно-кишечного тракта	чихание	1
	выделение из носа	1
	диарея	1
Дыхание	норма	0
	нарушение дыхания	1
	тяжелое дыхание	2
Активность	игривый	0
	игривый, но требующий инициации	1
	встревоженный, неигривый	2
	вялый	3
Неврологические симптомы	отсутствуют	0
	легкая атаксия — несогласованные движения	1
	атаксия — жесткая или изогнутая шея	2
	тяжелая атаксия — полный паралич задних конечностей	3

Заражение животных

Для заражения мышей вирус вводили интраназально в дозе 1 LD₅₀ (доза, вызывающая гибель 50% мышей) по 50 мкл/мышь под легким эфирным наркозом. После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными в течение 14 суток. Протективное действие рекомбинантных белков оценивали с помощью следующих параметров: определение динамики падения массы тела мышей после заражения (через день); выживаемость мышей после заражения (ежедневно).

Заражение хорьков проводили на 42-й день исследования, перед заражением каждое животное вводили в кратковременный ингаляционный наркоз препаратом изофлуран с помощью ветеринарного наркозного аппарата Zoomed Minor Vet (ЗooМед, Россия).

Для оценки протективности исследуемой гриппозной вакцины проводили интраназальное заражение хорьков эпидемическим штаммом вируса гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) в дозе 7,3 lg ЭИД₅₀. Заражение проводили методом интраназального введения вирусосодержащего материала в объеме 200 мкл/хорек (по 100 мкл в каждую ноздрю) вируса гриппа А/Хабаровск/53/22 Egg (H3N2) и в объеме 500 мкл/хорек (по 250 мкл в каждую ноздрю) вируса гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09). С момента заражения и в течение последующих 14 дней (с 42-го по 56-й дни исследования) измеряли температуру тела, массу хорьков, оценивали выраженность клинических симптомов гриппозной инфекции.

Получение сывороток крови мышей

Образцы крови получали от 5 мышей каждой группы из хвостовой вены на 28 и 42 день после иммунизации. Для получения сыворотки, кровь инкубировали в течение 30 минут при температуре 37°C. После образования сгустков крови, образцы помещали на поверхность льда и охлаждали в течение 1-го часа с последующим центрифугированием в течение 15 минут при 400g. Сыворотку крови от 5 мышей каждой группы аликвотировали по 30 мкл и замораживали при температуре минус 20°C.

Получение бронхоальвеолярных лаважей (БАЛ) и носовых смывов у мышей

Бронхоальвеолярные лаважи получали от 5 мышей каждой группы на 42 день после иммунизации. БАЛ и носовые смывы у мышей получали после эвтаназии животных. Труп животного фиксировали на операционном столике брюшком кверху. Производили разрез кожи по средней линии от нижней челюсти. Носовые ходы промывали 0,5мл ледяного DPBS через трахею с помощью шприца. В нижнюю часть трахеи в направлении легких вводили катетер на глубину 3-5 мм. Дважды промывали бронхи и легкие 1 мл ледяного DPBS. БАЛ и носовые смывы центрифугировали 15 минут при 1000g, готовили аликвоты и замораживали при температуре -20°C.

Забор крови у хорьков

Для исследования гуморального иммунитета забор крови осуществляли из локтевой вены до начала эксперимента для отбора серонегативных животных, в дни 21 (до второго введения) и 42 (до заражения) и через 2 недели после заражения, в вакуумные пробирки с активатором свертывания с гелем (IMPROVACUTER®). Кровь забирали в объеме, составляющем не более 10% от общего объема циркулирующей крови. Образцы крови центрифугировали для получения сыворотки (центрифуга Z 216, HerneLabortechnik, Германия). Сыворотка была перенесена в пробирки типа эппендорф. Образцы сыворотки хранили при температуре $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$ до исследования.

Для исследования Т-клеточного иммунитета кровь отбирали в стерильные пробирки с литий-гепарином объемом 4 мл на -1-й, 42-й и 56-й дни эксперимента. Выделение МПК и их криоконсервацию проводили в день забора.

Забор носовых смывов у хорьков

У всех животных на 40-й, 45-й и 48-й дни исследования под кратковременным наркозом выполняли забор назальных смывов. Наркотизация животных была проведена внутримышечным введением ветеринарного препарата «Медитин». Для забора назальных смывов хорькам дозатором в один носовой ход вводили 1 мл фосфатно-солевого буфера с антибиотиками. Далее голову хорька наклоняли вертикально над

стерильной чашкой Петри и вытекшую из носового хода жидкость собирали, переносили в стерильные пробирки типа эппендорф. Образцы хранили до исследования при температуре $-70\pm 10^{\circ}\text{C}$.

Забор легких, лимфатических узлов (ЛУ) и селезенки мышей

По 5 мышей из каждой группы умерщвляли путем цервикальной дислокации и производили забор легких, региональных лимфатических узлов (ЛУ) и селезенки. Забор легких осуществляли после перфузии правого желудочка сердца 10-тью мл холодного фосфатного буфера (DPBS).

Получение суспензии клеток легких, ЛУ и селезенки мышей.

Мышиные легкие удаляли асептически, измельчали ножницами и помещали в эппендорф со средой RPMI-1640 содержащей 0.5 мг/мл коллагеназы (Sigma, C2674) и 25 мкг/мл ДНКазы (Sigma, D4263). Затем помещали в термошейкер (45 мин, 37°C), после чего гомогенизировали с использованием инсулинового шприца и иглы 18G и избавлялись от дебриса путем фильтрации через клеточные сита с диаметром пор 70 мкм.

Селезенки и ЛУ помещали в эппендорф со средой RPMI-1640 и перетирали пестиком для гомогенизации и пропускали через шприцевой фильтр с диаметром пор 70 мкм.

Эритроциты лизировали RBC Lysis Buffer (Biolegend) и отмывали клетки полной средой RPMI-1640 с 10% ЭТС, 100 IU/ml пенициллина, 100 mg/ml стрептомицина. Подсчет жизнеспособных клеток проводили в камере Горяева с использованием красителя трипанового синего. Концентрацию клеток доводили до 10^7 кл/мл.

Фенотипирование клеток врожденного иммунитета в легких мышей

Фенотипирование клеток врожденного иммунитета (2×10^6 кл/100мкл) осуществляли при помощи панели флуорохром-конъюгированных антител, включающей CD11b-PE/Cy7, CD11c-PE, MHCII-Alexa488, CD103-PerCP-Cy5.5, CD45-APC/Cy7, CD64-BV421, CD24-BV510 (Biolegend, США). Указанная панель позволяет идентифицировать альвеолярные макрофаги, интерстициальные макрофаги, моноциты, нейтрофилы и две популяции дендритных клеток (CD11b- и CD11b+). Для снижения вероятности неспецифического окрашивания добавляли реагент TrueStain (Biolegend). Активацию клеток врожденного иммунитета оценивали на основании медианной интенсивности флуоресценции (MFI) маркера CD86-BV421. Учет результатов производили при помощи проточного цитометра Cytotflex (Beckman Coulter). Анализ данных проточной цитометрии осуществляли в программном обеспечении Kaluza 2.2 (Beckman Coulter).

Для оценки относительного содержания клеток изучаемых популяций в легких использовали метод гейтирования, предложенный Yu et al. [429]. Тактика гейтирования приведена в приложении 3.

3.2.7. *Статистическая обработка полученных результатов.*

Статистический анализ первичных данных проводили в программных пакетах Microsoft Office Excel 2016 и GraphPad Prism v10.4.1.

Динамику массы тела животных представляли, как среднее арифметическое относительного значения массы тела к массе в день заражения (день 0) в %. Данные ИФА нормализовали путем логарифмирования по основанию 2. Для данных ELISPOT рассчитывали кратности изменения числа спотов и затем логарифмировали по основанию 10.

Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на соответствие закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия анализировали с использованием параметрических или непараметрических методов в зависимости от типа распределения. Для оценки данных с признаками нормального распределения был использован двухфакторный дисперсионный анализ (2W ANOVA), с последующим межгрупповым сравнением с использованием теста Тьюки. Для данных, не подчиняющихся закону нормального распределения, а также полуколичественных данных (баллы) — критерий Краскела-Уоллиса с дальнейшим применением непараметрического метода средних рангов для множественных сравнений в случае обнаружения достоверного влияния исследуемого фактора или критерий Фридмана и критерий Вилкоксона. Для сравнения двух выборок с параметрическими данными использовали критерий Стьюдента (t-тест), для непараметрических — критерий Манна-Уитни. Групповой уровень значимости принимали равным $\alpha = 0,05$. Различия считали достоверными при $p < \alpha$.

4. РЕЗУЛЬТАТЫ

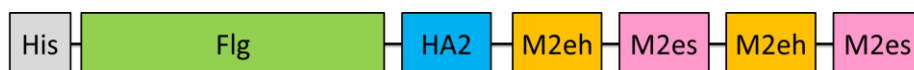
4.1. Дизайн рекомбинантных белков

4.1.1. Рекомбинантные белки

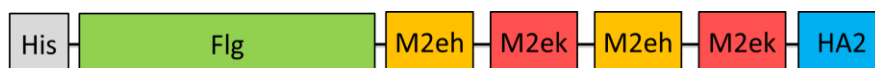
Плазмиды, кодирующие все исследуемые рекомбинантные белки, были сконструированы в ФИЦ Биотехнологии РАН в рамках гранта РНФ и Государственного задания МЗ.

На рисунке 5 представлены блок-схемы всех исследуемых рекомбинантных белков. Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. На N-конце имеется гистидиновый тэг.

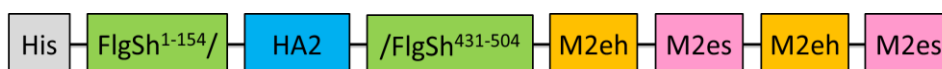
Flg-HA2-4M2ehs



Flg-4M2ehk-HA2



FlgSh-HA2-4M2ehs



Flg-4M2ehs



Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs



Flg



Рисунок 5 – Блок-схемы рекомбинантных белков

Последовательности эктодомена белка M2, входящие в состав рекомбинантных белков представлены в таблице 3. Нижним подчеркиванием выделены аминокислотные замены относительно M2e вирусов гриппа человека.

Таблица 3 Последовательности эктодомена белка M2

Обозначение	Принадлежность	Аминокислотная последовательность
M2eh	Вирусы гриппа человека (H1N1, H2N2, H3N2)	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
M2es	A/California/07/2009H1N1pdm	MSLLTEVETPTRSEWECRCSDSSD
M2ek	H5N1	MSLLTEVETPTRNEWECRCSDSSD

Flg-HA2-4M2ehs

Белок Flg-HA2-4M2ehs содержит последовательность флагеллина, к которой на С-конце присоединен фрагмент второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа А второй филогенетической группы, за которым следуют 4 копии M2e (M2eh-M2es-M2eh-M2es).

Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка Flg-HA2-4M2ehs:

MRGSHNNHHHGS**SAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIA**
NRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQ
AEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNV
QKAYDVKDTAVTTKAYANNGTTLDVSGLDAAIKAAATGGTNGTASVTGGAVKFDADNNKYFV
TIGGFTGADAAKNGDYEYVNVATDGTVTLAAGATKTTMPAGATTKEVQELKDTPAVVSADAK
NALIAGGV DATDANGAELVKMSYTDKNGKTIEGGYALKAGDKYYAADYDEATGAIAKAKTTSY
TAADGTTKTAANQLGGVDGKTEVVITDGKTYNASKAAGHDFKAQPELAEAAAKTTENPLQKI
DAALAQVDALRS DLGAVQNRFNSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQ
AGTSVLAQANQVPQNVLSLLRAGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSE
MNKLFEKTRRLRENA RPRS**SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD****LQGGGSG****SLLTEVETPTRS**
EWECRCSDSSD**GGGSG****SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD****ELGGGSG****SLLTEVETPTRSEWEC**
RCSDSSD**PGNNHHHH**

В этом белке и в ниже представленных белках зеленым цветом выделена последовательность флагеллина, синим – участок HA2 (76-130), розовым - M2eh, оранжевым - M2es, подчеркнуты участки, теоретически узнаваемые TLR5 [346].

Flg-4M2ehk-HA2

Белок Flg-4M2ehk-HA2 содержит последовательность флагеллина, к которой на С-конце присоединены 4 копии M2e (M2eh-M2ek-M2eh-M2ek) за которым следует фрагмент второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа А второй филогенетической группы.

Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка Flg-4M2ehk-HA2:

MRGSHNNHHHGS**SAQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIA**
NRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQ
AEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNV

QKAYDVKDTAVTTKAYANNGTTLDVSGLDAAIKAATGGTNGTASVTGGAVKFDADNNKYFV
TIGGFTGADAAKNGDYEVNVATDGTVTLAAGATKTTMPAGATTKTEVQELKDTPAVVSADAK
NALIAGGV DATDANGAELVKMSYTDKNGKTIEGGYALKAGDKYYAADYDEATGAIAKAKTTSY
TAADGTTKTAANQLGGVDGKTEVVTIDGKTYNASKAAGHDFKAQPELAEAAAKTTENPLQKI
DAALAQVDALRSDLGAVQNRFN SAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQ
AGTSVLAQANQVPQNVLSLLRGSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDLQGGSGSLLTEVETPT
RNEWECRCSDSSDGGGSGSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDELGGGSGSLLTEVETPTRNEW
ECRCSDSSDPGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLT DSEM NKLFEKTRRQL
RENA

Красным цветом выделен участок M2ek.

FlgSh-HA2-4M2ehs

Белок FlgSh-HA2-4M2ehs содержит укороченную последовательность
флагеллина, в которой вместо гипервариабельного домена встроен фрагмент второй
субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа А второй филогенетической группы, а к С-
концу присоединены 4 копии M2e (M2eh-M2ek-M2eh-M2ek).

Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка FlgSh-HA2-
4M2ehs:

MRGSHHHHHHGS AQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIA
NRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDLSIQ
AEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTKLRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQ
HTIDLT DSEM NKLFEKTRRQLRENAKLLQKIDAALAQVDALRSDLGAVQNRFN SAITNLGNT
VNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQAGTSVLAQANQVPQNVLSLLRGSLLTEVET
PIRNEWGCRCNDSSDLQGGGSGSLLTEVETPTRSEWECCRCSDSSDGGGSGSLLTEVETPIRN
EWGCRCNDSSDELGGGSGSLLTEVETPTRSEWECCRCSDSSD

Flg-4M2ehs

Белок Flg-4M2ehs содержит последовательность флагеллина, к которой на С-
конце присоединены 4 копии M2e (M2eh-M2es-M2eh-M2es).

Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка Flg-4M2ehs:

MRGSHHHHHHGS AQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIA
NRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDLSIQ
AEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNV
QKAYDVKDTAVTTKAYANNGTTLDVSGLDAAIKAATGGTNGTASVTGGAVKFDADNNKYFV
TIGGFTGADAAKNGDYEVNVATDGTVTLAAGATKTTMPAGATTKTEVQELKDTPAVVSADAK
NALIAGGV DATDANGAELVKMSYTDKNGKTIEGGYALKAGDKYYAADYDEATGAIAKAKTTSY
TAADGTTKTAANQLGGVDGKTEVVTIDGKTYNASKAAGHDFKAQPELAEAAAKTTENPLQKI
DAALAQVDALRSDLGAVQNRFN SAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQ
AGTSVLAQANQVPQNVLSLLRAGRPRSSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDLQGGGSGSLLTE
VETPTRSEWECCRCSDSSDGGGSGSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDELGGGSGSLLTEVETP
TRSEWECCRCSDSSD

Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs

Белок Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs содержит последовательность флагеллина, к которой на С-конце присоединен фрагмент второй субъединицы HA(76-130) вирусов гриппа А второй филогенетической группы, за которым следуют фрагменты белка NP NP335 (aa 335-350), NP255 (aa 255-275), 4 копии M2e (M2eh-M2es-M2eh-M2es).

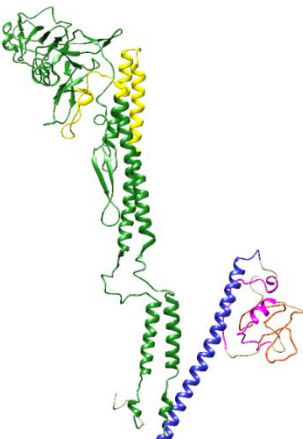
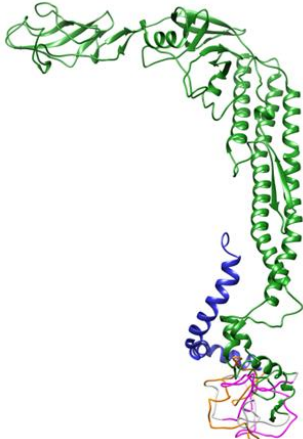
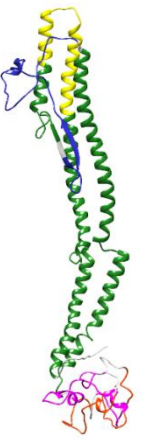
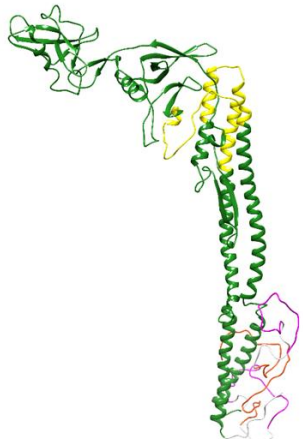
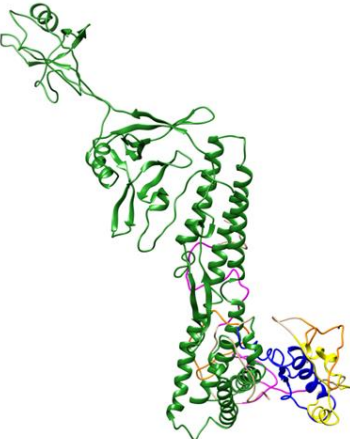
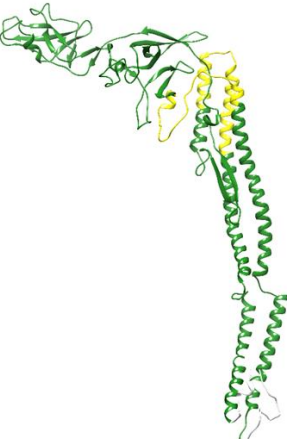
Аминокислотная последовательность рекомбинантного белка Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs:

MRGSHHHHHHGS AQVINTNSLSLLTQNNLNKSQSALGTAIERLSSGLRINSAKDDAAGQAIA
NRFTANIKGLTQASRNANDGISIAQTTEGALNEINNNLQRVRELAVQSANSTNSQSDLDSIQ
AEITQRLNEIDRVSGQTQFNGVKVLAQDNTLTIQVGANDGETIDIDLKQINSQTLGLDSLNV
QKAYDVKDTAVTTKAYANNGTTLDVSGLDAAIKAAATGGTNGTASVTGGAVKFDADNNKYFV
TIGGFTGADAAKNGDYEVNVATDGTVTLAAGATKTTMPAGATTKEVQELKDTPAVVSADAK
NALIAGGV DATDANGAELVKMSYTDKNGKTIEGGYALKAGDKYYAADYDEATGAIAKAKTTSY
TAADGTTKTAANQLGGVDGKTEVVTIDGKTYNASKAAGHDFKAQPELAEAAAKTTENPLQKI
DAALAQVDALRSDLGAVQNRFSAITNLGNTVNNLSEARSRIEDSDYATEVSNMSRAQILQQ
AGTSVLAQANQVPQNVLSLLRAGRIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDS
E MNKLF EKTRRQLRENA RLKK SAAFEDLRVLSFIRGYSRDLKKDLIFLARSALIIRGSVAHKS
SRDPRS SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDLQGGGSG SLLTEVETPTRSEWECCRCSDSSDGGG
SG SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSDELGGGSG SLLTEVETPTRSEWECCRCSDSSDPGHHHHH
H

Трехмерные структуры рекомбинантных белков

С использованием сервера Phyre 2 [185] были рассчитаны теоретические трехмерные структуры рекомбинантных белков. Визуализацию трехмерных структур проводили в программе UCSF Chimera v.1.9 [283]. В таблице 4 приведены рассчитанные трехмерные структуры исследуемых рекомбинантных белков. Зеленым цветом выделена последовательность флагеллина, синим – участок HA2 (76-130), розовым - M2eh, оранжевым - M2es, красным – M2ek. Желтым цветом выделен участок, теоретически узнаваемый TLR5. Для белка Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs желтым цветом обозначены фрагменты белка NP NP335, NP255.

Таблица 4. Теоретически рассчитанные трехмерные структуры рекомбинантных белков

Flg-HA2-4M2ehs	Flg-4M2ehk-HA2	FlgSh-HA2-4M2ehs
		
Flg-4M2ehs	Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs	Flg
		

Сохранение нативной третичной структуры флагеллина наблюдалось для белков Flg-HA2-4M2ehs, Flg-4M2ehk-HA2, Flg-4M2ehs. В структуре белка Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs наблюдаются выраженные изменения третичной структуры по сравнению с флагеллином без вставки антигенов. Нативная альфа-спиральная структура HA2 сохранялась только у белка Flg-HA2-4M2ehs.

Эктодомен белка M2 является неструктурной последовательностью. Во всех исследуемых белках, кроме Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs, M2e последовательности находятся в наружном расположении (не завернуты вовнутрь).

Расчетные теоретические параметры рекомбинантных белков

С использованием сервера ProtParam были рассчитаны теоретические параметры рекомбинантных белков: теоретической молекулярной массы, GRAVY и индекса нестабильности [130]. (табл. 5)

Таблица 5. Теоретические параметры рекомбинантных белков

Название белка	Теоретическая молекулярная масса, кДа	GRAVY	Индекс нестабильности (И)
Flg-HA2-4M2ehs	73,9	-0,548	31,72
Flg-4M2ehk-HA2	72,6	-0,523	29,37
FlgSh-HA2-4M2ehs	45,0	-0,616	43,58
Flg-4M2ehs	66,3	-0,492	31,15
Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs	79,3	-0,520	32,10
Flg	55,4	-0,412	25,49

Значение GRAVY (Grand average of hydropathicity) для белков рассчитывается путем сложения значений гидрофобности [205] каждого аминокислотного остатка и деления на количество остатков в последовательности или длину последовательности. Увеличение положительного балла указывает на большую гидрофобность. Для всех белков значение GRAVY отрицательно, что говорит о гидрофильности данных белков.

Индекс нестабильности (Instability Index) позволяет оценить стабильность белка. Белок, чей индекс нестабильности меньше 40, считается стабильным, а значение выше 40 говорит о том, что белок может быть нестабильным [143]. Из всех исследуемых белков, только для конструкции с укороченным флагеллином (FlgSh-HA2-4M2ehs) индекс нестабильности составил 43,58, что характеризует его как теоретически нестабильный.

Экспериментальные и теоретически предсказанные Т- и В-клеточные эпитопы

С использованием базы данных Immune Epitope Database был выполнен поиск экспериментальных эпитопов в антигенах, входящих в состав рекомбинантных белков.

Последовательность M2e содержит как человеческие, так и мышинные В-клеточные и CD4⁺ Т-клеточные экспериментальные эпитопы (Таб. 6, 7). Красным цветом выделены замены и аминокислотные остатки, не входящие в последовательность.

Таблица 6. В-клеточные эпитопы в последовательности M2eh

Хозяин	IEDB ID	Последовательность
	M2eh	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
hum/mice	59318	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
hum	2233240	SLLTEVETPI
mice	14686	EVETPIRN
	39887	LTEVETPIRNEWG
	141748	SLLTEVETP
	161404	LLTEVETPIR

Таблица 7. CD4+ Т-клеточные эпитопы в последовательности M2eh

Хозяин	IEDB ID	Последовательность
	M2eh	SLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
hum/mice	37850	LLTEVETPI
hum/mice	68383	VETPIRNEW
hum	97518	NEWGCRCNDSSDPLVVA
mice	42596	MSLLTEVETPIRNEWGCRCNDSSD
	59322	SLLTEVETVV
	133698	SLLTEVETPIRNEWG
	136883	SLLTEVETPIRNEWGCRCNGSSD
	744793	TPIRNEWGCRCNDSS
	834890	SLLTEVETPIRNEWGC

Фрагмент HA2 (76–130) представляет собой большую α -спираль второй субъединицы HA, частично доступную с поверхности молекулы. Консенсусные последовательности гемагглютининов вирусов гриппа филогенетической группы II (подтипы H3 и H7) в участке HA2 (76–130) идентичны на 63.6%. С учетом замен аминокислотных остатков на близкие по свойствам гомология составляет 80%. Экспериментальные В- и CD4+ Т-клеточные эпитопы представлены в таблицах 8-9. Кроме того, участок HA2 (76–130) вирусов гриппа второй филогенетической группы содержит потенциальные CD8+ Т-клеточные эпитопы для различных аллелей HLA (Табл. 10).

Таблица 8. В-клеточные эпитопы в последовательности HA2

Хоз.	IEDB ID	Последовательность
	HA2	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSMNKLFETRRLRENA
hum	1179659	VWSYNAELLVAMENQHTIDLADSEM
	2233261	VALENQHTIDLTDS
	2232971	AELLVALENQHTIDLTDSMNKLFETRRL
mice	1056	AELLVALENQHTIDL
	10383	DTKIDLWSYNAELLV
	189065	EMNKLFETRRLRENA
	189120	LVALENQHTIDLTDSMNKLFETRRLRENA
	189148	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQH
	539173	DLWSYNAELLVALENQ

Таблица 9. CD4+ Т-клеточные эпитопы в последовательности HA2

Хоз.	IEDB ID	Последовательность
	HA2	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFKETRRLRENA
hum	13575 22098 31200 31201 50488 62654	ENQHTIDLTDSEMKNLFKETRRLRENAEDMGNGCF GRIQDLEKYVEDTKIDLWS KIDLWSYNAELLVALE KIDLWSYNAELLVALENQHTI QDLEKYVEDTKIDLWS SYNAELLVALENQHTI
mice	1055 1056 2511 9332 12919 24921 62653 422849	AELLVALEN AELLVALENQHTIDL ALENQHTIDLTDSEM DLWSYNAELLVALENQH EKYVEDTKIDLWSYN HTIDLTDSEMKNLFE SYNAELLVAL WSYNAELLVAMENQHTI

Таблица 10. Теоретически-предсказанные CTL эпитопы в последовательности HA2

Хоз.	Аллель/ гаплотип	Последовательность
	HA2	RIQDLEKYVEDTKIDLWSYNAELLVALENQHTIDLTDSEMKNLFKETRRLRENA
hum	HLA-A*01 HLA-A*01 HLA-A*01 HLA-A*01 HLA-A*02 HLA-A*03 HLA-A*24 HLA-A*24 HLA-A*24 HLA-A*24 HLA-A*26 HLA-A*26 HLA-B*08 HLA-B*08 HLA-B*08 HLA-B*08 HLA-B*39 HLA-B*39 HLA-B*40 HLA-B*40 HLA-B*40 HLA-B*58	LTDSEMKNLF DTKIDLWSY TIDLTDSEM YVEDTKIDLW KLFETRRL KLFETRRLR KYVEDTKIDLW LWSYNAELL VALENQHTI SYNAELLVAL DTKIDLWSY HTIDLTDSEM FEKTRRL YNAELLVAL DLWSYNAEL VALENQHTI YNAELLVAL KYVEDTKIDLW ALENQHTIDL VEDTKIDL FEKTRRL YVEDTKIDLW
mice	H-2-Db/d	VALENQHTI

Фрагмент NP335 (аа 335-350) - высоко консервативная область белка NP, гомологичная вирусам гриппа А подтипов H1, H2, H3 и H9. Содержит человеческие CTL-эпитопы, подтвержденные как экспериментально (HLA-A 02, 03, HLA-B 18, 27, 37, 44), так и теоретически (HLA-A 01, 26, HLA-B 15, 40, 58), а также Т-клеточные эпитопы мышей (Табл. 11, 12)

Таблица 11. Т-клеточные эпитопы в последовательности NP335

Хозяин	IEDB ID	Последовательность
	NP335	SAAFEDLRVLSFIRGY
hum/mice	15501	FEDLRVLSF
hum	133	AAFEDLRVLSFIRG
hum	56696	SAAFEDLR
hum	56698	SAAFEDLRVLSFIRG
hum	97180	AFEDLRLLSFIRGTKVS
hum	143308	AFEDLRVLSFIKGTKVLPRG
mice	130335	WMACNSAAFEDLRVSSF

Таблица 12. Теоретически-предзаказанные эпитопы в последовательности NP335

Хозяин	Аллель/гаплотип	Последовательность
	NP335	SAAFEDLRVLSFIRGY
hum	HLA-A*03/26/ B*15 HLA-B*08/39/40	RVLSFIRGY FEDLRVLSF
mice	H-2-Db/d H-2-Db H-2-Db	AAFEDLRVL SAAFEDLRVL AAFEDLRVLSF

Фрагмент NP255 (aa 255-275) - высоко консервативная область с более чем 70% гомологией; консенсусная последовательность для вирусов гриппа А. Содержит множество CTL-эпитопов человека, подтвержденных как экспериментально (HLA-A 02, 03, 11), так и теоретически (HLA-A 24, HLA-B 07, 08, 27), а также Т-клеточные эпитопы мышей (Табл. 13, 14).

Таблица 13. Т-клеточные эпитопы в последовательности NP255

Хозяин	IEDB ID	Последовательность
	NP255	DLIFLARSALILRGVAHKS
hum/mice	4255	ARSALILRGVAHKSCLPACVYGP
hum	16522	FLARSALIL
hum	26100	IFLARSALILRGVAHKSCL
hum/mice	27283	ILRGVAHK
hum	36516	LIFLARSAL
hum/mice	55796	RSALILRGVAHKSCL
hum	97306	FLARSALILRGVAHK
hum	97447	LILRGVAHKSCLPACAY
hum/mice	128638	FLARSALILRGVAHKS
hum	148571	DLIFLARSALILRGS
hum	912137	IFLARSALILRGVA
hum	912144	ILRGVAHKSCLPAC
hum	912619	TFLARSALILRGVA
mice	4254	ARSALILRGVAHK
	9124	DLIFLARSALILRGVAHKSCL
	128520	EIEDLTFLARSALILRG
	129242	LILRGVAHKSCLPACV
	182545	ALILRGVAHKSCLP
	194962	RSALILRGVAHKS
	2265763	EDLIFLARSALILRG

Таблица 14. Теоретически-предзаказанные эпитопы в последовательности NP255

Хозяин	Аллель/гаплотип	Последовательность
	NP255	DLIFLARSALILRGSVAHKS
hum	HLA-A*03	ILRGSVAHK
	HLA-A*24	IFLARSALI
	HLA-B*07	LIFLARSAL
	HLA-B*08	IFLARSAL
	HLA-B*08	ALILRGSV
	HLA-B*27	ARSALILRGSV
mice	H-2-Db	SALILRGSV

4.1.2. Оценка чистоты и подлинности белков, стабильность при хранении

Оценку чистоты рекомбинантных белков проводили с использованием электрофореза в ПААГ. Подлинность белков оценивали в вестерн-блот с использованием моноклональных анти-M2e-антител 14C2 и поликлональных анти-flg антител.

На рисунке 6 представлена электрофореграмма и вестерн-блот рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2ehs и FlgSh-HA2-4M2ehs. Теоретически рассчитанная молекулярная масса белка FlgSh-HA2-4M2ehs составляла 45,0 кДа, что совпадало с его электрофоретической подвижностью. Оба белка распознаются, как анти-M2e, так и анти-flg антителами, что подтверждает их подлинность.

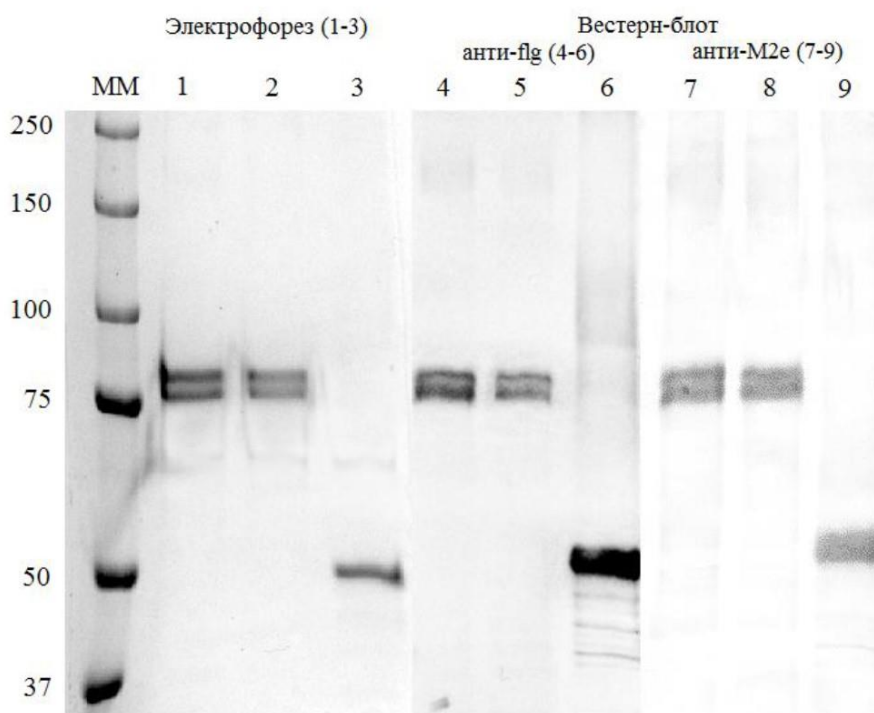


Рисунок 6. Электрофорез в ПААГ (слева) и Вестерн-Блот (справа) рекомбинантных белков на основе флагеллина: Flg-HA2-4M2ehs (дорожки 2, 5, 8), FlgSh-HA2-4M2ehs (дорожки 3, 6, 9).

Теоретически рассчитанная молекулярная масса белков Flg-4M2ehs-HA2 и Flg-HA2-4M2ehs составляла 73,9 кДа, что совпадало с величиной, определенной по их электрофоретической подвижности в ПААГ (рис. 7А). Очищенные белки взаимодействовали в вестерн-блот с моноклональными анти-M2е-антителами 14C2 (рис. 7Б). Оба рекомбинантных белка были достаточно стабильными. Не выявлено признаков деградации белков при их хранении в течение 2 месяцев при 4°C (рис. 7В).

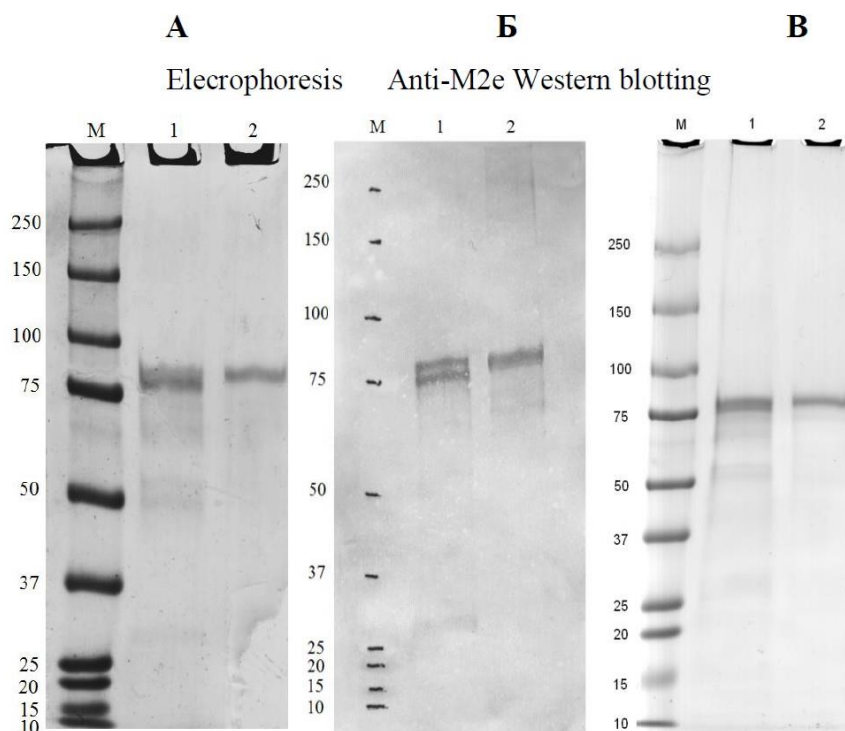


Рисунок 7 - А – Электрофорез в ПААГ рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2ehs и Flg-4M2ehs-HA2. Б – Иммуноблот рекомбинантных белков с анти-M2е моноклональными антителами 14C2. В – Электрофорез в ПААГ рекомбинантных белков Flg-HA2-4M2ehs и Flg-4M2ehs-HA2 через 2 месяца хранения при 4°C. М - маркер молекулярного веса, 1 - Flg-HA2-4M2ehs, 2 – Flg-4M2ehs-HA2.

Электрофореграмма и вестерн-блот для рекомбинантного белка Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs приведена на рисунке 8.

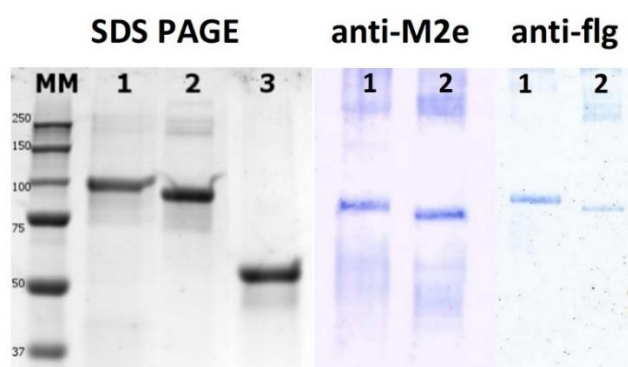


Рисунок 8 - Электрофорез в ПААГ (слева) и вестерн-блот (справа) рекомбинантных белков на основе флагеллина: Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs (дорожка 1), Flg-HA2-4M2ehs (дорожка 2), Flg (дорожка 3).

Для всех белков показано отсутствие посторонних бендов, как на электрофореграмме, так и на вестерн-блот, что говорит об отсутствии посторонних примесей и продуктов развала белков в процессе хранения.

4.1.3. Оценка биологической активности флагеллина в составе рекомбинантных белков

Чтобы продемонстрировать, что рекомбинантные белки на основе полноразмерного и укороченного флагеллина (Flg-HA2-4M2ehs, FlgSh-HA2-4M2ehs) могут индуцировать иммунный ответ через TLR5, была использована клеточная линия HEK-Blue™ hTLR5, экспрессирующая человеческий TLR5. Оценивали уровень NF-κB-индуцированной активности SEAP (рис. 9). Оба слитых белка индуцировали сильный TLR5-опосредованный сигнал в этой клеточной линии. Величина сигнала для всех исследуемых рекомбинантных белков была сопоставима с таковой для положительного контроля TLR5-специфического лиганда recFLA-ST (флагеллин из *S. typhimurium*).

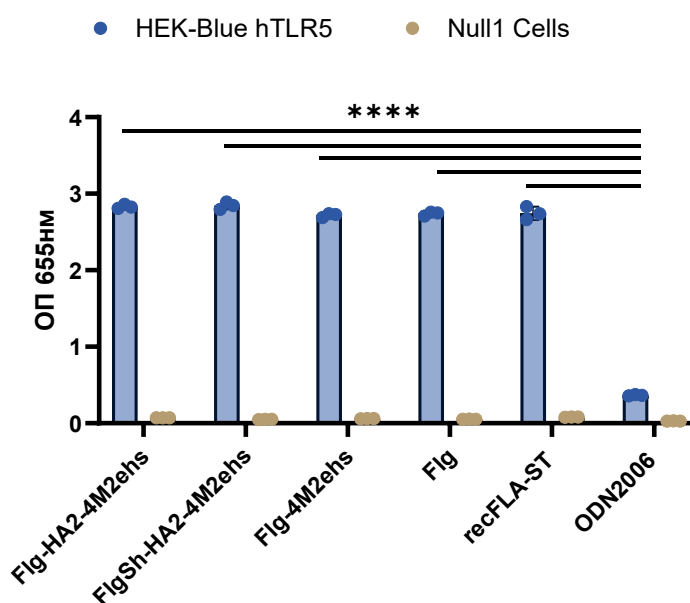


Рисунок 9 – Реакция клеток HEK-Blue™ hTLR5 на рекомбинантные белки. Клетки HEK-Blue™ hTLR5 и HEK-Blue™ Null1 (контроль) инкубировали в среде HEK-Blue™ Detection и стимулировали с помощью 100 нг/мл recFLA-ST (положительный контроль), 100 мкг/мл ODN2006 (отрицательный контроль) и 100 нг/мл рекомбинантных белков. После 24ч инкубации уровни NF-κB-индуцированной SEAP определяли по ОП при 655 нм. Анализ проводили в трех биологических повторах. Статистический анализ проводился с использованием двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (****: $p < 0,0001$).

4.2. Иммуногенность и протективная активность рекомбинантных гриппозных белков.

4.2.1. Расширение спектра иммунного ответа и усиление протективности при сочетании консервативных последовательностей гемагглютинина и М2 белка.

Иммуногенность и кросс-протективность кандидатных белков при подкожном введении мышам

Иммуногенность химерных рекомбинантных белков оценивали на мышах линии Balb/c. Препараты белков вводили трехкратно подкожно с интервалом в две недели в дозе 10мкг/животное, в качестве контрольного препарата выступал рекомбинантный белок флагеллин без вставки (flg), контрольным животным вводили PBS (табл. 15).

Таблица 15. Схема опыта по изучению иммуногенности рекомбинантных белков при подкожном введении

препарат	Дни с начала опыта						
	иммунизация				Заражение (42 день)		6 мес
	I имм. д0	II имм. д14	III имм. д28 + забор крови	забор крови д42	A/H3N2 10LD	A/H7N9 10LD	забор биообразцов (6 мес)
Flg-HA2-4M2ehs	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	от 6 мышей	10 мышей+5 на вирусо- выдел.	10 мышей+5 на вирусо- выдел.	кровь от 6 мышей
FlgSh-HA2-4M2ehs	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	от 6 мышей	10 мышей+5 на вирусо- выдел.	10 мышей+5 на вирусо- выдел.	кровь от 6 мышей
Flg-4M2ehs	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	от 6 мышей	10 мышей+5 на вирусо- выдел.	10 мышей+5 на вирусо- выдел.	кровь от 6 мышей
Flg	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	от 6 мышей	10 мышей+5 на вирусо- выдел.	10 мышей+5 на вирусо- выдел.	кровь от 6 мышей
PBS				кровь от 6 мышей	10 мышей+5 на вирусо- выдел.	10 мышей+5 на вирусо- выдел.	кровь от 6 мышей

Через 2 недели после последней иммунизации проводили забор крови, для оценки специфического гуморального ответа у мышей (рис. 10). Иммунизация белками Flg-HA2-4M2ehs, FlgSh-HA2-4M2ehs, Flg-4M2ehs индуцировала высокие уровни анти-M2e антител в сыворотках (рис. 10А). У животных, которым вводили препарат сравнения Flg анти-M2e IgG были на уровне с контрольными животными. Иммунизация конструкцией

Flg-HA2-4M2ehs демонстрировала сдвиг соотношения подклассов IgG анти-M2e антител в сторону IgG1, по сравнению с другими химерными белками (рис. 10B). Сдвиг в сторону IgG1 характерен для Th2-ответа. Для защиты от вирусной инфекции важную роль играет подкласс IgG2a у мышей (функционально схожий с IgG1 у человека), так как обеспечивает более сильную активацию АЗКЦ и защиту от вирусных инфекций. В то же время избыточный Th2-ответ может приводить к аллергическим реакциям и менее эффективной противовирусной защите [48].

Все рекомбинантные белки индуцировали высокие уровни IgG антител к белку-носителю флагеллину (рис. 10Б). Удаление гипервариабельного домена флагеллина в конструкции FlgSh-HA2-4M2ehs не приводило к значимому снижению ответа к флагеллину.

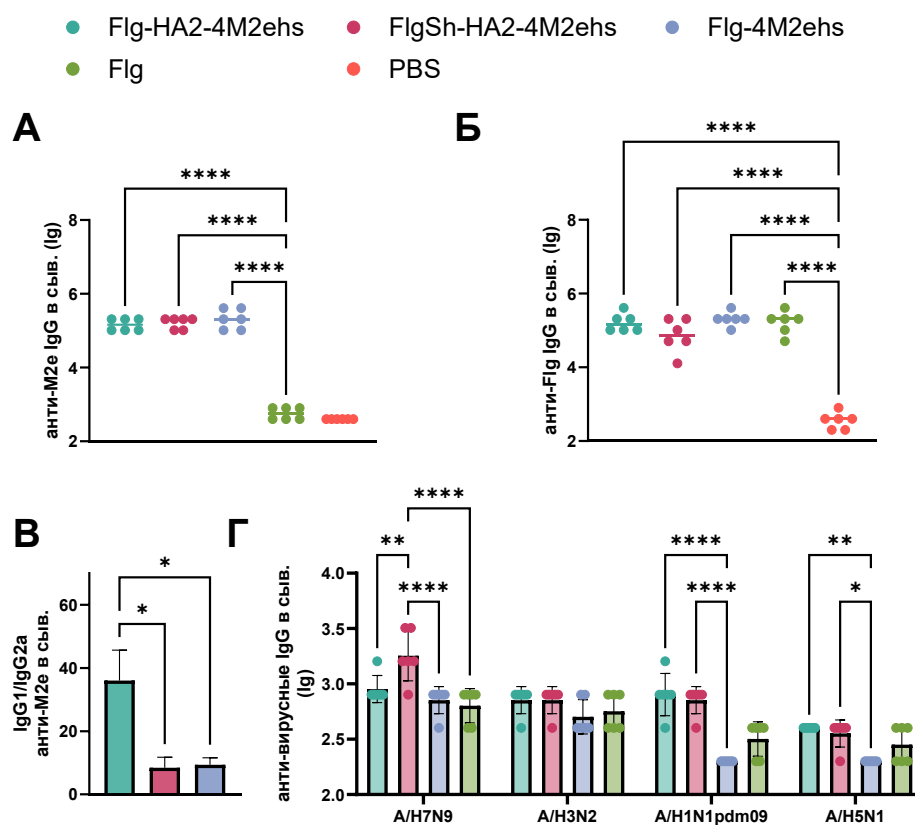


Рисунок 10 – Гуморальный иммунный ответ в сыворотке крови мышей при подкожном введении. Мышей BALB/c (n = 6/группа) иммунизировали трехкратно подкожно 10 мкг рекомбинантными белками. Мышам контрольных групп вводили Flg (10 мкг) и PBS. Через две недели после 3й иммунизации уровни M2e-специфических (A) и Flg-специфических IgG (Б) оценивали в ИФА. В – соотношение M2e-специфических подклассов IgG1/IgG2a. Г - титры сывороточных IgG к вирусам гриппа A/H7N9, A/H3N2, A/H1N1pdm09, A/H5N1. Статистический анализ проводился с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Для белков, содержащих последовательность HA2, было показано, что в результате иммунизации формируются антитела, способные связываться с вирусами различных подтипов, а именно A/H7N9, A/H1N1pdm09, A/H5N1 (рис. 10Г).

На 42-й день исследования мышей подвергали заражению вирусами гриппа A/Аичи/2/68 (H3N2) или A/Шанхай/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC в дозе 10LD50 (рис. 11АБ), а также вирусами A/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09) или A/Курица/Курган/05/05RG (H5N1) в дозе 100MID (рис. 11Г).

Показано, что белок-носитель флагеллин не вызывает неспецифической защиты животных от заражения. Все исследуемые химерные белки продемонстрировали высокие уровни защиты при летальном заражении обоими вирусами (90-100%) (рис. 11АБ). На 6-й день после заражения у 5 мышей каждой группы проводили забор легких для определения репродукции вируса. Снижение вирусной репликации в легких при заражении вирусом гриппа подтипа A/H3N2 показано для белка с укороченным флагеллином FlgSh-HA2-4M2ehs. При заражении вирусом A/H1N1pdm09 к снижению вирусных титров в легких приводила иммунизация химерными белками FlgSh-HA2-4M2ehs и Flg-4M2ehs. А при заражении вирусом гриппа птиц A/H5N1 вирусная нагрузка снижалась при иммунизации Flg-HA2-4M2ehs и Flg-4M2ehs (рис. 11В).

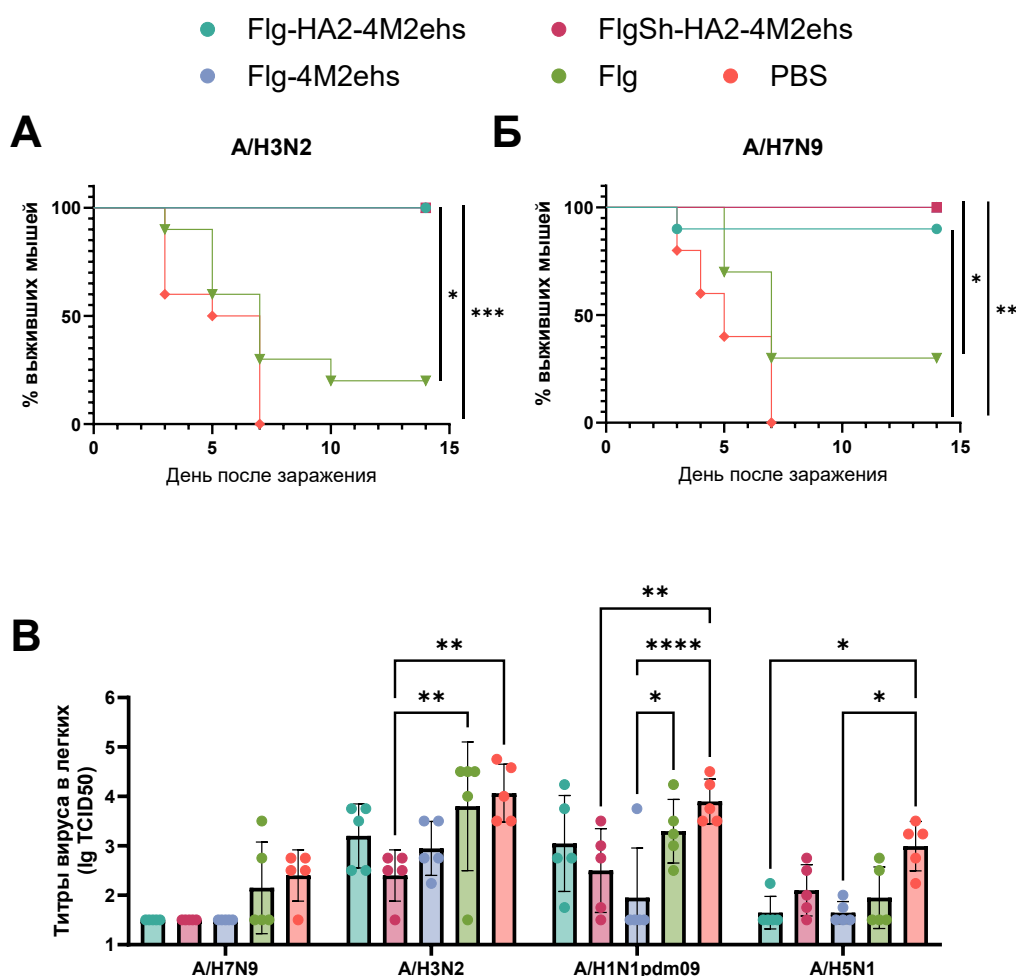


Рисунок 11 – Защитная эффективность при подкожной иммунизации. Через две недели после 3й иммунизации мышей (n=10) подвергали заражению (А) 10LD50 А/Аичи/2/68 (H3N2) или (Б) 10LD50 А/Шанхай/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC. Гибель мышей отслеживались ежедневно в течение 14 дней. В – Репродукция вируса в легких мышей. Мышей (n = 5/группа), иммунизированных рекомбинантными белками заражали: А/Шанхай/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC (10LD50); А/Аичи/2/68(H3N2) (10LD50); А/Калифорния/07/09H1N1pdm09 (100MID); или А/Курица/Курган/05/05RG (H5N1) (100MID). Титры вирусов в легких определяли на 6й день после заражения. Предел обнаружения метода составляет 0,5log TCID50. Статистический анализ проводился с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Статистический анализ данных выживаемости проводился с использованием теста Мантела-Кокса с поправкой на множественные сравнения Бонферрони. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Для того чтобы оценить длительность сохранности анти-M2e антительного ответа, через 6 месяцев после 3-й иммунизации проводили забор крови. Для всех химерных белков показано незначительное снижение анти-M2e IgG в сыворотках (рис. 12А). Уровни сывороточных анти-M2e IgA значительно снижались, но все равно были достоверно выше по сравнению с контрольными группами для всех исследуемых белков (рис. 12Б).

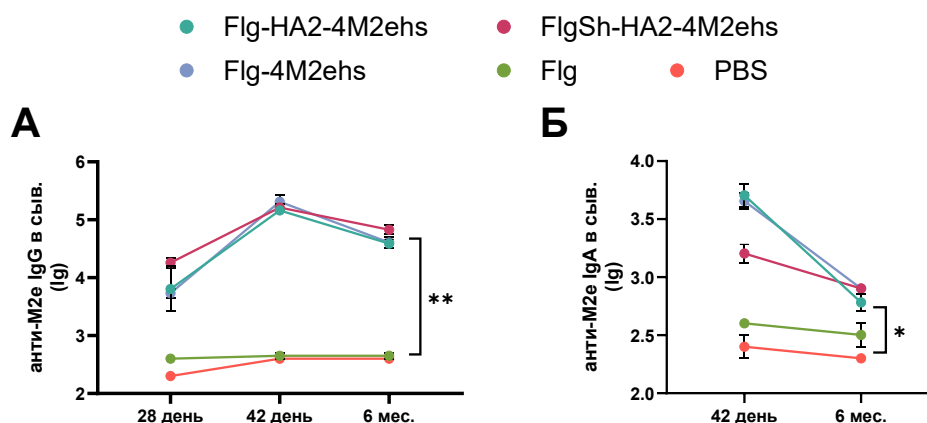


Рисунок 12 – Длительность сохранения M2e-специфических антител в сыворотке. Уровни анти-M2e IgG (А) и IgA (Б) антител в сыворотке крови мышей после 2й иммунизации (28 день), после 3й иммунизации (42 день) и через 6 месяцев. Статистический анализ проводился с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

Иммуногенность и кросс-протективность кандидатных рекомбинантных белков при интраназальном введении мышам

Для оценки иммуногенности и кросс-протективности химерных белков при интраназальном введении, мышей линии Balb/c иммунизировали трехкратно интраназально с интервалом в две недели в дозе 10мкг/животное, в качестве контрольного препарата выступал рекомбинантный белок флагеллин без вставки (flg), контрольным животным вводили PBS (табл. 16).

Таблица 16. Схема опыта по изучению иммуногенности рекомбинантных белков при интраназальном введении

препарат	Дни с начала опыта							
	иммунизация				Заражение (42 день)			
	I имм. д0	II имм. д14	III имм. д28	забор крови, БАЛ д42	A/H3N2 10LD	A/H7N9 10LD	A/H2N2 10LD	A/H5N1 10LD
Flg-HA2-4M2ehs	и/н 10 мкг	и/н 10 мкг	и/н 10 мкг	от 6 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей
FlgSh-HA2-4M2ehs	и/н 10 мкг	и/н 10 мкг	и/н 10 мкг	от 6 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей
Flg-4M2ehs	и/н 10 мкг	и/н 10 мкг	и/н 10 мкг	от 6 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей
Flg	и/н 10 мкг	и/н 10 мкг	и/н 10 мкг	от 6 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей
PBS				кровь от 6 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей

Через 2 недели после последней иммунизации оценивали уровни антиген-специфических антител в сыворотках (рис. 13). Интраназальная иммунизация белками Flg-HA2-4M2ehs, FlgSh-HA2-4M2ehs, Flg-4M2ehs индуцировала высокие уровни анти-M2e антител в сыворотках мышей (рис. 13А), однако при иммунизации химерным белком с укороченным флагеллином титры анти-M2e IgG были значимо ниже, чем для конструкций с полноразмерным белком. Аналогичное снижение было также показано и в отношении антительного ответа к белку-носителю – флагеллину (рис. 13Б).

Формирование сывороточных вирус-специфических антител было показано для белков Flg-HA2-4M2ehs, FlgSh-HA2-4M2ehs в отношении вирусов подтипа A/H7N9 и A/H2N2 и только для Flg-HA2-4M2ehs в отношении вируса A/H1N1pdm09. В отношении вируса гриппа подтипа A/H5N1 и A/H3N2 приростов специфических антител выявлено не было.

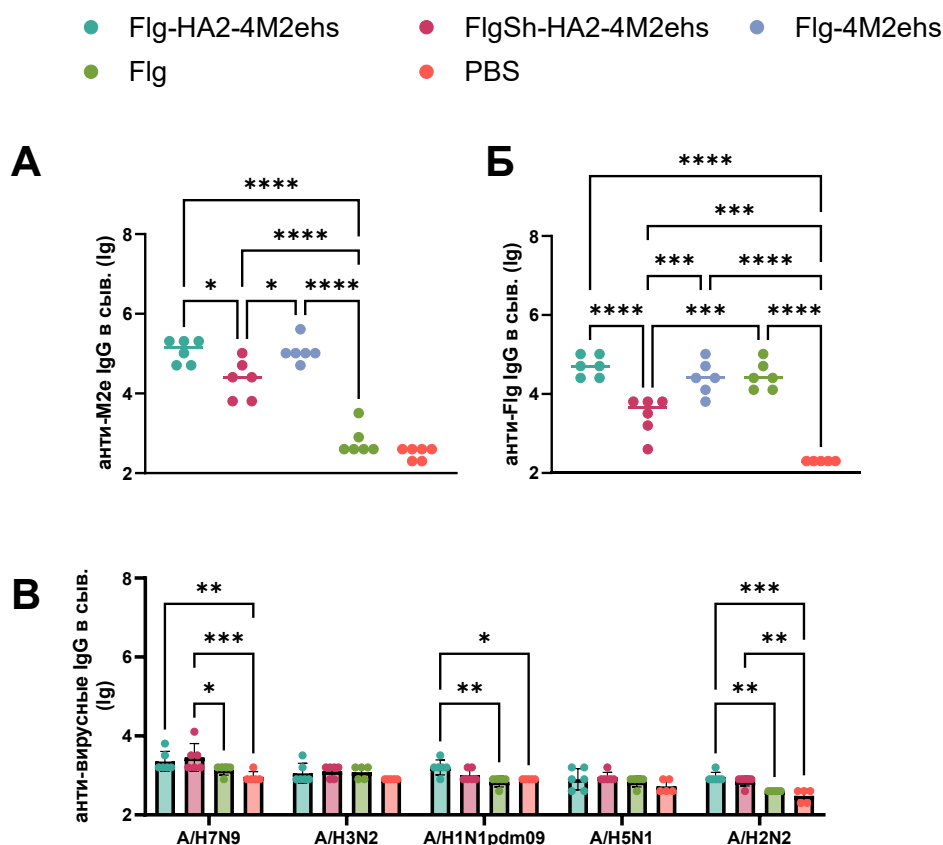


Рисунок 13 – Гуморальный иммунный ответ в сыворотке крови после интраназальной иммунизации. Мышей BALB/c (n = 6/группа) иммунизировали интраназально 10 мкг рекомбинантными белками в дни 0, 14, 28. Мышам контрольных групп вводили Flg (10 мкг) и PBS. Через две недели после 3й иммунизации уровни M2e-специфических (А) и Flg-специфических IgG (Б) оценивали в ИФА. В - титры сывороточных IgG к вирусам гриппа A/H7N9, A/H3N2, A/H1N1pdm09, A/H5N1 и A/H2N2. Статистический анализ проводился с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Индукцию местного M2e-специфического гуморального ответа оценивали в БАЛ и носовых смывах через две недели после 3-й иммунизации рекомбинантными белками (рис. 14). Иммунизация всеми химерными белками приводила к формированию анти-M2e IgG и IgA в БАЛ по сравнению с контрольной группой (рис. 14АБ). Вместе с тем, для химерного белка Flg-HA2-4M2ehs титры IgA в среднем были выше. Иммунизация рекомбинантным белком Flg-4M2ehs вызывала достоверный прирост анти-M2e IgA в носовых смывах, для белка Flg-HA2-4M2ehs отмечалась тенденция к формированию местных IgA (рис. 14В). Показано формирование вирус-специфических IgA в носовых ходах при иммунизации рекомбинантными белками Flg-HA2-4M2ehs и FlgSh-HA2-4M2ehs (рис. 14Г).

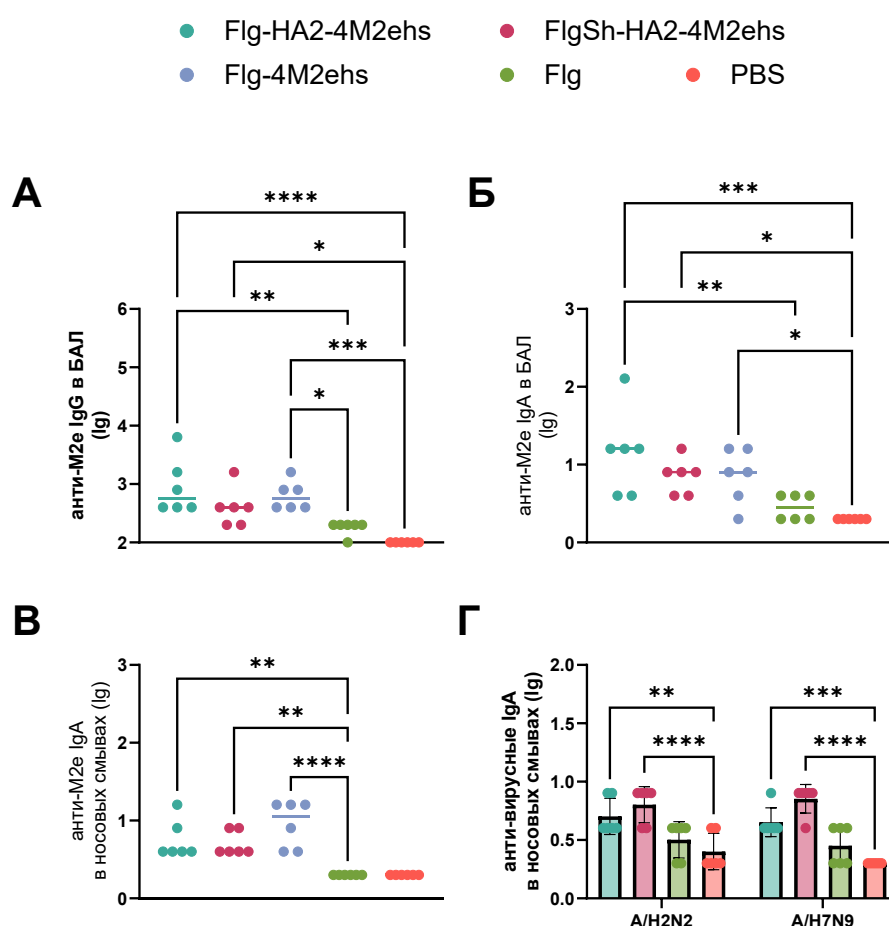


Рисунок 14 – Местный гуморальный иммунный ответ в БАЛ и носовых смывах. Мышей BALB/c ($n = 6/\text{группа}$) иммунизировали трехкратно интраназально 10 мкг рекомбинантными белками. Мышам контрольных групп вводили Flg (10 мкг) и PBS. Через две недели после 3й иммунизации уровни M2e-специфических IgG (А) и IgA (Б) оценивали в БАЛ и носовых смывах (В), а также вирус-специфические IgA в носовых смывах. Статистический анализ проводился с использованием однофакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

На 42-й день исследования мышей подвергали заражению вирусами гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2), А/Шанхай/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC, А/Сингапур/1/57 (H2N2), А/Курица/Курган/05/05RG (H5N1) в дозе 10LD50 (рис. 15).

Иммунизация химерным белком Flg-HA2-4M2ehs приводила к полной (90-100%) защите животных от всех подтипов. Белок без вставки последовательности HA2 – Flg-4M2ehs значительно хуже защищал мышей от вируса гриппа подтипа А/H2N2 (60%) (рис. 15В). В отношении других подтипов уровень защиты при иммунизации Flg-4M2ehs составил 70-80%.

Таким образом сочетание в одной конструкции антигенов M2e и HA2 приводило к усилению иммуногенности и защиты, как при гомологичном, так и при гетерологичном заражении.

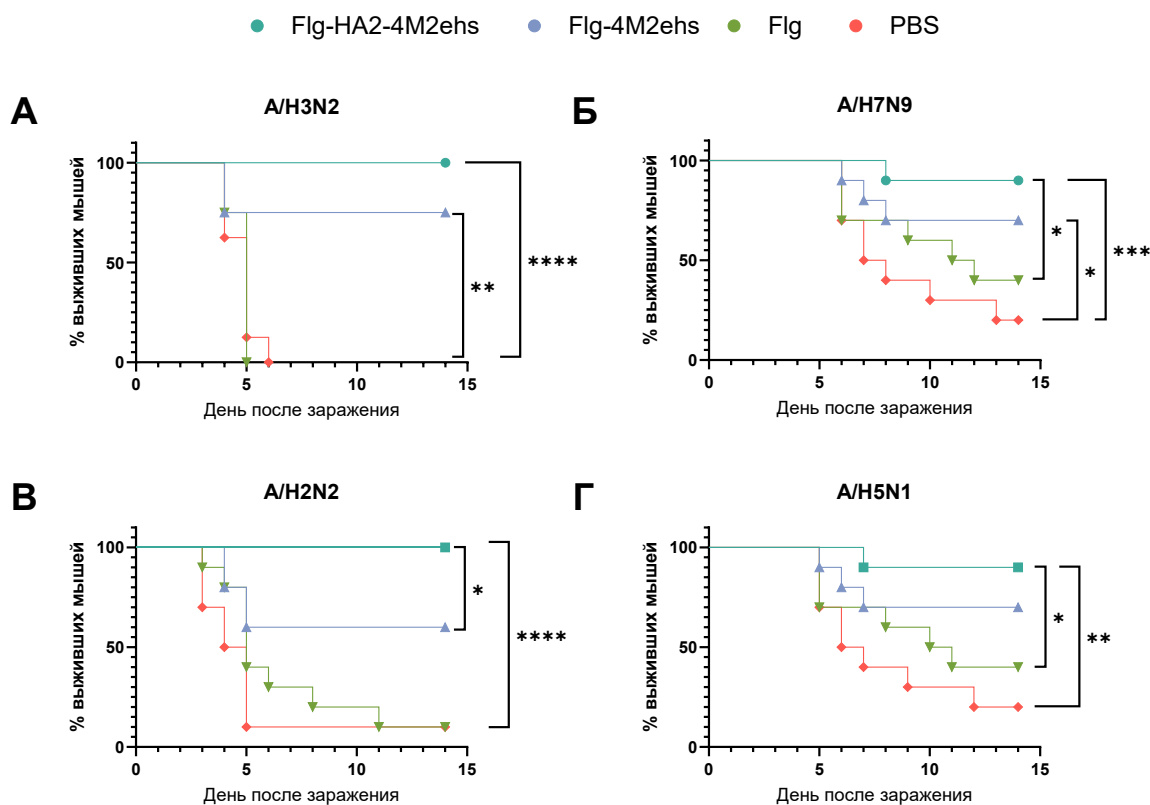


Рисунок 15 – Защитная эффективность при интраназальной иммунизации. Через две недели после 3й иммунизации мышей (n=10) подвергали заражению в дозе 10LD50 вирусами: (А) А/Аичи/2/68 (H3N2), (Б) А/Шанхай/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC, (В) А/Сингапур/1/57 (H2N2), (Г) А/Курица/Курган/05/05RG (H5N1). Гибель мышей отслеживались ежедневно в течение 14 дней. Статистический анализ проводился с использованием теста Мантела-Кокса с поправкой на множественные сравнения Бонферрони. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

4.2.2. Взаимосвязь иммуногенности рекомбинантного белка с порядком присоединения антигенов.

Были сконструированы два рекомбинантных белка, чтобы оценить влияние последовательности присоединения антигенов на иммуногенность и протективность белка.

Белок Flg-4M2ehk-HA2 содержал флагеллин из *Salmonella typhimurium* (Flg), к С-концу которого были последовательно присоединены четыре копии пептида M2e (две копии консенсусной последовательности M2e вирусов гриппа человека А (M2eh) и две M2e вируса гриппа птиц А/Н5N1 (M2ek)) и консенсусный фрагмент второй субъединицы (76–130) НА вирусов гриппа II филогенетической группы. Во втором белке (Flg-HA2-4M2ehk) к флагеллину был сначала присоединен HA2-фрагмент, а затем четыре копии пептида M2e.

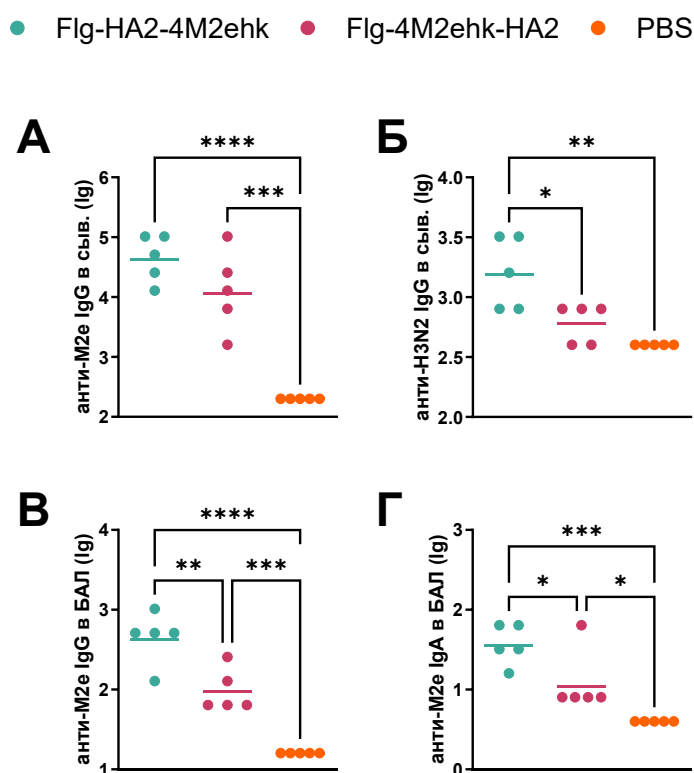


Рисунок 16 – Гуморальный иммунный ответ в сыворотке крови. Мышей BALB/c ($n = 5$ /группа) иммунизировали интраназально 10 мкг соответствующих рекомбинантных белков в дни 0, 14, 28. Мышам контрольных групп вводили PBS. Через две недели после 3й иммунизации уровни M2e-специфических IgG (А) оценивали в ИФА. Б – титры IgG в сыворотке к вирусу гриппа А/Н3N2; титры анти-M2e IgG (В) и IgA (Г) в БАЛ. Статистический анализ проводился с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Иммуногенность гибридных белков Flg-HA2-4M2ehk и Flg-4M2ehk-HA2 оценивали на мышах Balb/c, иммунизированных трехкратно, интраназально в дозе 10мкг/животное. На 14-й день после третьей иммунизации в сыворотках и БАЛ пяти мышей каждой группы определяли анти-M2e- и анти-A/H3N2 специфические IgG. Обе конструкции индуцировали высокие уровни сывороточных анти-M2e IgG (Рис. 16А), однако при иммунизации Flg-HA2-4M2ehk титры были выше. Уровень антивирусных IgG к А/Аичи/2/68 (H3N2) был значимо выше (рис. 16Б) у мышей, также иммунизированных Flg-HA2-4M2e ($p = 0,0145$).

Для оценки IgA- и IgG-специфического ответа на мукозальных поверхностях определяли титры M2e-специфических IgA и IgG в БАЛ пяти мышей каждой группы через 14 дней после третьей иммунизации. Как показано на рисунке 16ВГ, интраназальная иммунизация гибридным белком Flg-HA2-4M2ehk стимулировала более высокие уровни IgG и IgA анти-M2e в БАЛ, чем белок Flg-4M2ehk-HA2 ($p=0,0029$ и $0,0417$ соответственно). Эти результаты показывают, что гибридный белок с концевым положением M2e-пептидов (Flg-HA2-4M2ehk) был более иммуногенным, чем белок с внутренней локализацией этих пептидов (Flg-4M2ehk-HA2).

Для сравнения протективных свойств гибридных белков мышей (по восемь в каждой группе), иммунизированных белками Flg-HA2-4M2ehk и Flg-4M2ehk-HA2, заражали вирусом гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) в дозе 5LD50 через 14 дней после третьей иммунизации. В качестве контроля в опыте по летальному заражению использовали мышей, которым интраназально вводили PBS. В течение 14 дней после заражения ежедневно оценивали динамику массы тела и выживаемость. Из рис. 17А видно, что у мышей, иммунизированных Flg-HA2-4M2ehk, максимальная потеря массы тела составила 13% на 4-й день после заражения, а у мышей, иммунизированных гибридным белком Flg-4M2e-HA2, – 20% на 8-й день после заражения. Максимальная потеря массы тела у контрольных животных, также отмеченная на 8-й день, составила 28%. Полученные данные свидетельствуют о более легком течении инфекции у мышей, получавших гибридный белок Flg-HA2-4M2ehk. Иммунизация гибридным белком Flg-HA2-4M2ehk обеспечивала полную защиту (рис. 17Б) от летального заражения (выживаемость 100%), тогда как выживаемость мышей, получавших Flg-4M2ehk-HA2, составила 87.5%, а контрольных животных – 12.5% (статистически значимое отличие опытных групп от контрольных, $p = 0.0021$ и $p = 0.0198$ соответственно). Для определения титров вируса в легких через 2 недели после последней иммунизации мышей опытных и контрольной групп (по три особи каждой группы) интраназально заражали вирусами гриппа А/PR/8/34 (H1N1), А/Аичи/2/68 (H3N2) и А/Курган/05/05

(H5N1) в дозе 5LD50. На 6-й день после заражения производили забор легких для определения репродукции вируса. Иммунизация белком Flg-HA2-4M2ehk приводила к снижению вирусных титров в отношении всех трех вирусов ($p=0,0274$, $p=0,0420$ и $p=0,0443$ соответственно) (рис. 17B). Гибридный белок Flg-4M2ehk-HA2 приводил к менее выраженному снижению репродукции вирусов в легких (достоверных различий с контролем выявлено не было).

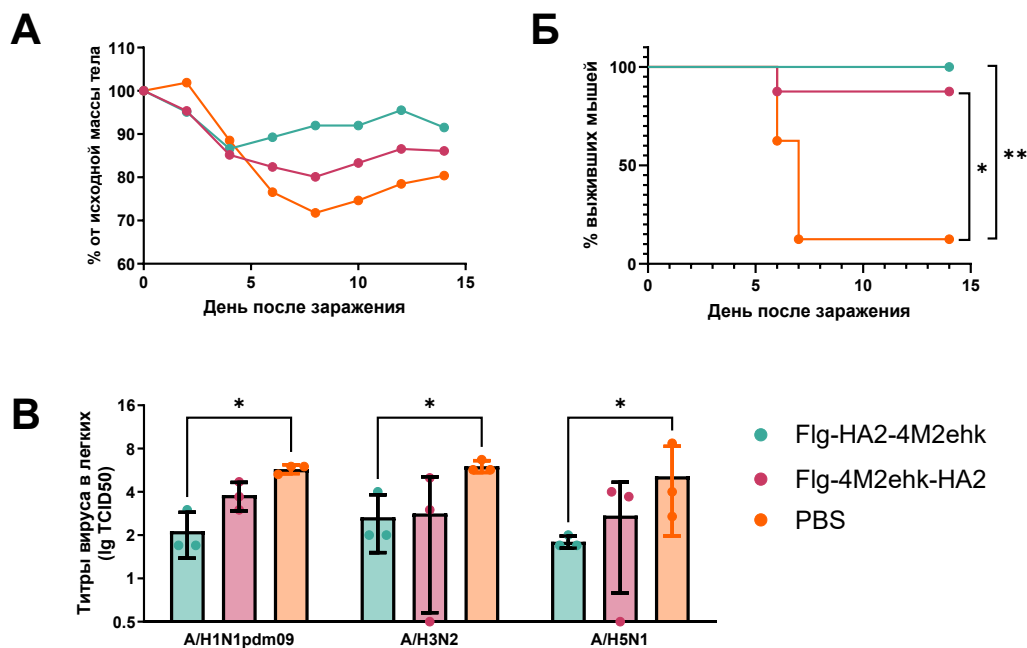


Рисунок 17 – Защитная эффективность при интраназальной иммунизации. Через две недели после 3й иммунизации мышей ($n=8$) подвергали заражению 5LD50 A/Аичи/2/68 (H3N2). Динамику массы тела (А) и гибели мышей (Б) наблюдали ежедневно в течение 14 дней. В – репродукция вируса гриппа в легких мышей. Через 2 недели после третьей иммунизации мышей ($n=3$) интраназально заражали вирусами гриппа A/Аичи/2/68 (H3N2), A/PR/8/34 (H1N1) и A/Курган/5/05 (H5N1) в дозе 5LD50. Вирусные титры определяли на 6-й день после заражения. Результаты представлены в lg TCID50. Нижний предел определения – 0.5 lg TCID50. Статистический анализ данных выживаемости проводился с использованием теста Мантела-Кокса с поправкой на множественные сравнения Бонферрони. Статистический анализ данных вирусывыделения проводился с использованием двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p<0,05$ (*: $p<0,05$, ***: $p<0,001$).

4.2.3. Инсерция CTL-эпитопов нуклеопротеина для повышения иммуногенности и протективной эффективности рекомбинантного белка против вируса гриппа А

С целью расширения спектра защитного эффекта был сконструирован рекомбинантный белок Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs в котором между консенсусной последовательностью HA2 и четырьмя тандемными копиями M2e были встроены 2 CTL

эпитопа белка NP (NP335, NP255). В качестве препарата сравнения выступал кандидатный рекомбинантный белок Flg-HA2-4M2ehs. Мышей линии BALB/c и C57b16 иммунизировали рекомбинантными белками подкожно трехкратно с интервалом в 2 недели (таб. 17, 18).

Таблица 17. Схема эксперимента на мышах линии BALB/c

препарат	Дни с начала опыта						
	иммунизация			Забор ЛУ и селезенки д35	забор крови, БАЛ д42	Заражение (42 день)	
	I имм. д0	II имм. д14	III имм. д28			A/H3N2 10LD	A/H1N1pdm09 10LD
Flg-HA2-4M2ehs	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	от 5 мышей	от 6 мышей	10 мышей	10 мышей
Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	от 5 мышей	от 6 мышей	10 мышей	10 мышей
PBS				от 5 мышей	кровь от 6 мышей	10 мышей	10 мышей

Таблица 18. Схема эксперимента на мышах линии C57b16

препарат	Дни с начала опыта			
	иммунизация			Забор селезенки д42
	I имм. д0	II имм. д14	III имм. д28	
Flg-HA2-4M2ehs	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	от 5 мышей
Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	п/к 10 мкг	от 5 мышей
PBS				от 5 мышей

Через 2 недели после последней иммунизации оценивали уровни M2e-специфических IgG или IgA в сыворотке методом ИФА. Иммунизация белком содержащим эпитопы NP приводила к значительному снижению уровней антител к M2e по сравнению с рекомбинантным белком Flg-HA2-4M2ehs ($p=0,0018$ и $p=0,0375$ соответственно) (рис. 18АБ). Вместе с тем наблюдался сдвиг соотношения IgG2a/IgG1 в сторону IgG2a у мышей, иммунизированных Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs (рис. 18В).

Иммунизация Flg-HA2-4M2ehs вызывала значительно более высокие титры вирусспецифических IgG в сыворотке крови, чем Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs (рис. 18Г). Возможно, что включение эпитопов NP повлияло на третичную структуру рекомбинантного белка, что отразилось на способности антител связываться с цельным вирусом.

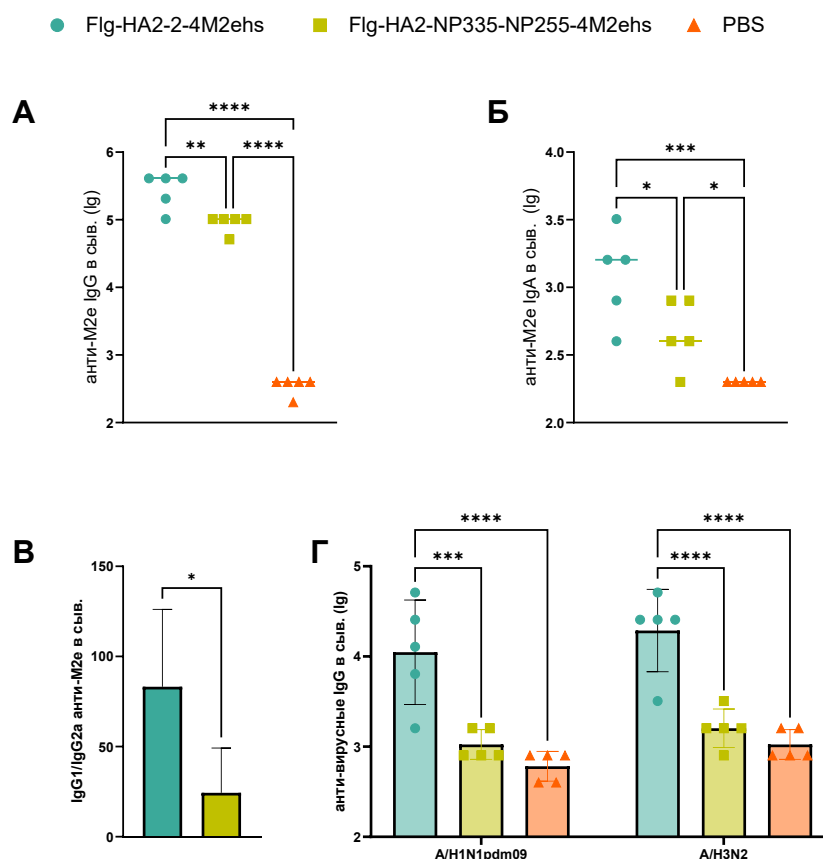


Рисунок 18 – Гуморальный иммунный ответ в сыворотке крови. Мышей BALB/c ($n = 5/\text{группа}$) иммунизировали подкожно 10 мкг рекомбинантными белками в дни 0, 14, 28. Мышам контрольных групп вводили PBS. Через две недели после 3й иммунизации уровни M2e-специфических IgG (А) и IgA (Б) оценивали в ИФА. В – соотношение M2e-специфических подклассов IgG1/IgG2a. Г - титры сывороточных IgG к вирусам гриппа A/H3N2 и A/H1N1pdm09. Статистический анализ проводился с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

На 7-й день после третьей иммунизации у мышей линии Balb/C оценивали способность двух рекомбинантных белков стимулировать формирование Tfh-клеток ($\text{CD4}+\text{CD44}+\text{CXCR5}+$) в лимфатических узлах и селезенке. Процентное содержание Tfh-клеток в лимфатических узлах не изменилось по сравнению с контрольными мышами (рис. 19А). Однако в селезенке мышей на 7-й день после третьей иммунизации любым из белков было обнаружено значительное увеличение числа Tfh (рис. 19Б).

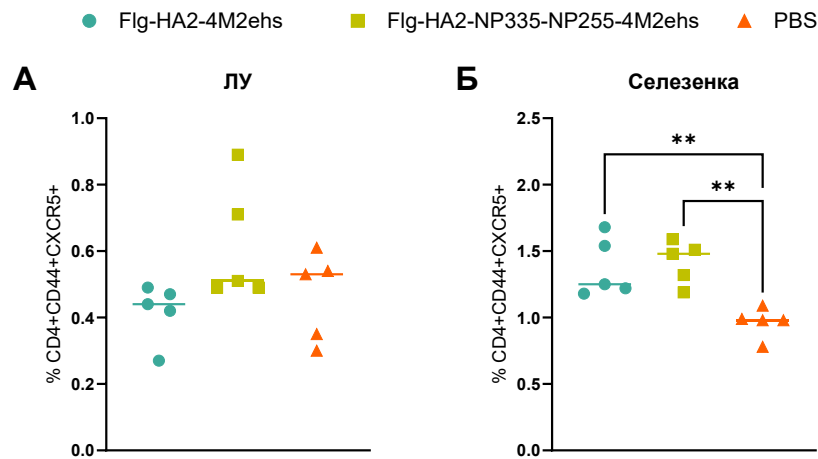


Рисунок 19 – Популяции CD4+CD44+CXCR5+ Tfh-клеток в лимфатических узлах (А) и селезенке (В) мышей Balb/C на 7-й день после третьей иммунизации Flg-HA2-2-4M2ehs или Flg-HA2-2-NP335-NP255-4M2ehs. Статистический анализ проводился с использованием однофакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (**: $p < 0,01$).

Для оценки антиген специфического Т-клеточного ответа после подкожной иммунизации рекомбинантными белками Flg-HA2-4M2ehs и Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs через 2 недели после последней иммунизации проводили забор селезенок у 5ти мышей каждой группы. Стимуляцию спленоцитов проводили пептидом M2e (M2eh), вирусом гриппа A/H3N2 и пулом пептидов NP (NP335 + NP255). Оценивали процентное содержание M2e-, H3N2- и NP-специфических CD4+ и CD8+ эффекторных Т-клеток памяти (Tem, CD44+/CD62L-), продукцию внутриклеточных цитокинов (IL-2, TNF α и IFN- γ) и экспрессию CD107a.

При иммунизации обоими белками не было обнаружено выраженного M2e-специфического CD8 Tem ответа, но введение Flg-HA2-4M2ehs приводило к появлению значительного количества M2e-специфических CD4 Tem (рис. 20 АБ). Рекомбинантный белок Flg-HA2-4M2ehs стимулировал появление M2e-специфичных CD8+ Tem, продуцирующих TNF- α (рис. 20Г), и CD4+ Tem, продуцирующих IL-2 а также двойных продуцентов IL-2+IFN- γ (рис. 20Б). В отношении белка Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs не было выявлено M2e-специфичных CD4+ или CD8+ Tem (Рис. 21). В селезенках мышей, иммунизированных белком Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs, наблюдались NP-специфические IFN- γ -продуцирующие CD8+ Tem (рис. 21Г).

Стимуляция M2e

■ Flg-HA2-4M2ehs ■ Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs ■ PBS

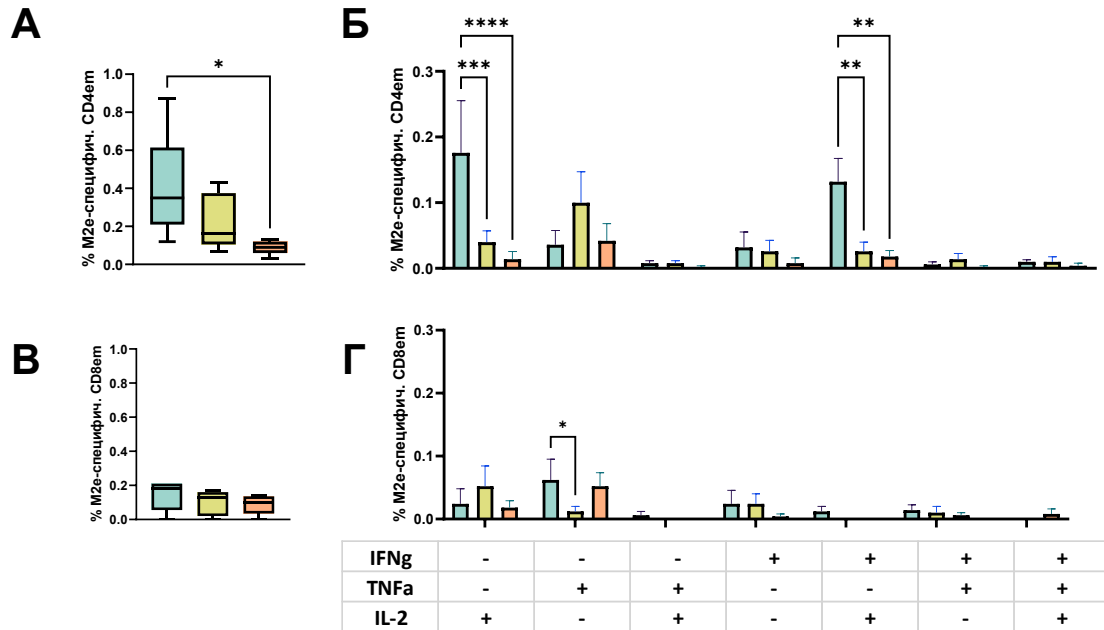


Рисунок 20 – M2e-специфический CD4⁺ (А, Б) и CD8⁺ (В, Г) Тем ответ в селезенках иммунизированных мышей C57bl6 через 2 недели после 3й иммунизации рекомбинантными белками подкожно. Общий процент цитокин-продуцирующих Тем (А, В) и процент Тем, продуцирующих любую комбинацию IFNγ, IL-2 или TNFα (Б, Г). Статистический анализ проводили с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Стимуляция NP

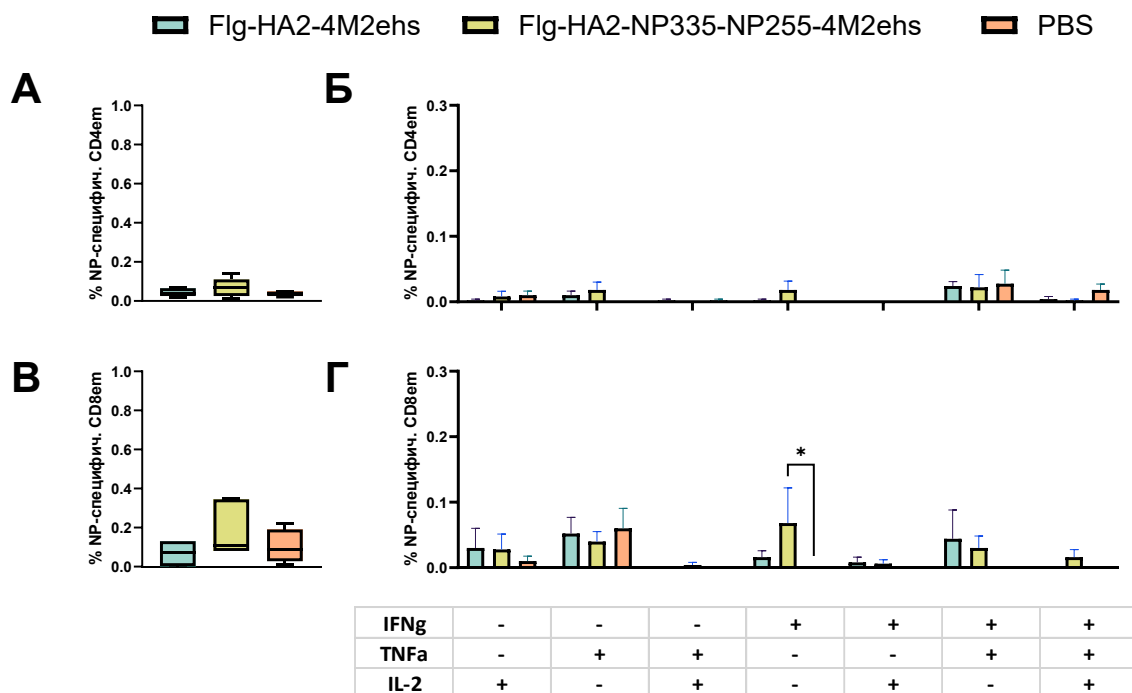


Рисунок 21 – NP-специфический CD4⁺ (А, Б) и CD8⁺ (В, Г) Тем ответ в селезенках иммунизированных мышей C57bl6 через 2 недели после 3й иммунизации рекомбинантными белками подкожно. Общий процент цитокин-продуцирующих Тем (А, В) и процент Тем, продуцирующих любую комбинацию IFN γ , IL-2 или TNF α (Б, Г). Статистический анализ проводили с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$).

У мышей, иммунизированных Flg-HA2-4M2ehs или Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs, наблюдалось значительное увеличение популяции вирус-специфических CD4⁺Тем и CD8⁺Тем монопродуцентов IFN- γ по сравнению с контрольной группой (рис. 22ВГ). По количеству вирус специфических Тем между двумя белками существенных различий не обнаружено.

Для обоих белков показано формирование в селезенке вирус-специфических CD8⁺ эффекторных Т-клеток памяти, экспрессирующих CD107a, маркер дегрануляции (рис. 22Д). Одновременная экспрессия CD107a в сочетании с экспрессией IFN- γ наблюдалась в CD4⁺ и CD8⁺ Тем в случае Flg-HA2-4M2ehs и только в CD8⁺ Тем после иммунизации Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs (рис. 22Е).

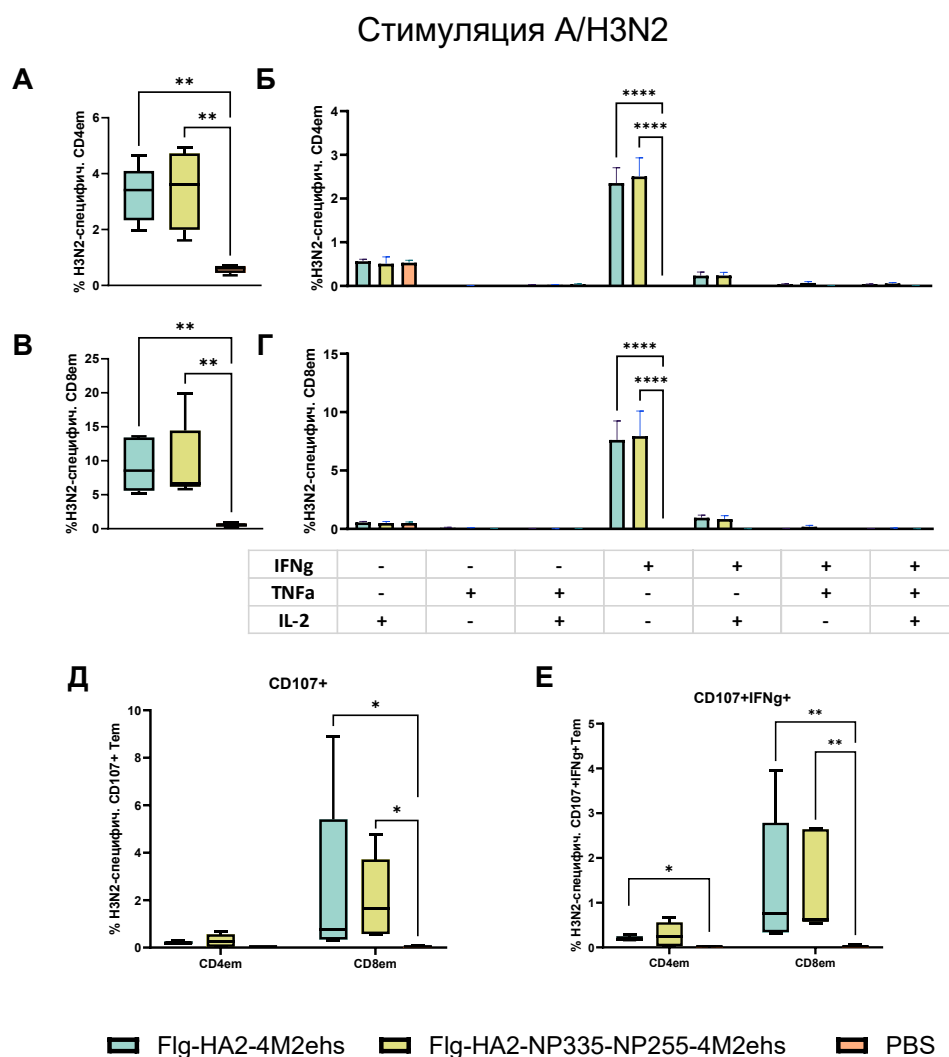


Рисунок 22 – Антиген-специфический CD4⁺ (А, Б) и CD8⁺ (В, Г) Тем ответ к вирусу A/H3N2 в селезенках иммунизированных мышей C57b16 через 2 недели после 3й иммунизации рекомбинантными белками подкожно. Общий процент цитокин-продуцирующих Тем (А, В) и процент Тем, продуцирующих любую комбинацию IFN γ , IL-2 или TNF α (Б, Г). Вирус-специфические CD4⁺ и CD8⁺ эффекторные клетки памяти, экспрессирующие маркер дегрануляции CD107 (В) и одновременно CD107+IFN γ ⁺ (Г). Статистический анализ проводили с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Через две недели после 3й иммунизации мышей Balb/c интраназально заражали адаптированными к мышам вирусами гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) и А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09). Динамику массы тела и выживаемость отслеживали в течение 14 дней. Иммунизация обоими рекомбинантными белками обеспечила полную защиту (выживаемость мышей составила 90-100%) (рис. 23). В группах, иммунизированных рекомбинантными белками, максимальная потеря веса составила 12-15%, и животные начали восстанавливаться на 7-8 день после заражения любым из вирусов. У мышей, иммунизированных Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs, потеря веса была больше, чем у Flg-

HA2-4M2ehs при инфекции А/Калифорния/07/09 (рис. 23А). Контрольные животные демонстрировали более выраженную потерю массы тела (20-22 %) после заражения в обоих случаях.

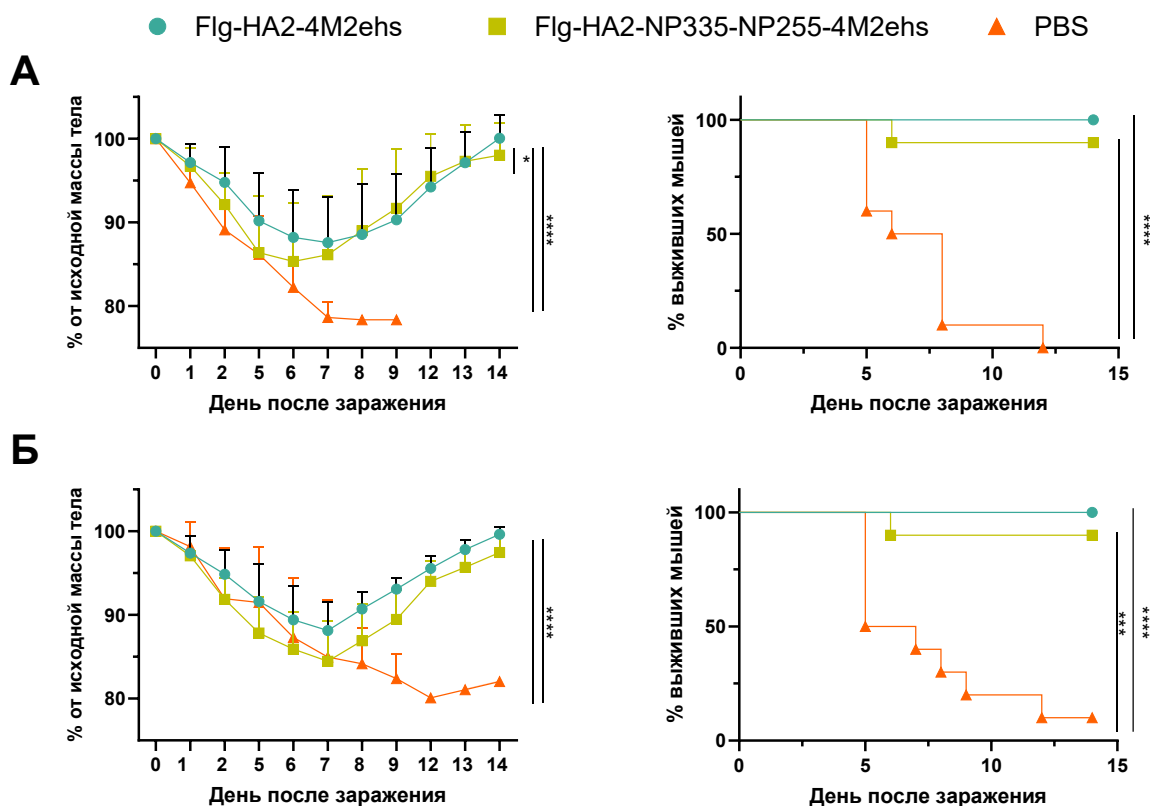


Рисунок 23 – Протективная эффективность иммунизации. Мышей линии Balb/c (n = 10/группа) иммунизировали трехкратно подкожно рекомбинантными белками Flg-HA2-4M2ehs и Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs в дозе 10мкг. Через две недели после 3й иммунизации мышей заражали в дозе 10 LD50 вируса (А) А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09) или (Б) А/Аичи/2/68 (H3N2). Динамику массы тела (слева) и выживаемость (справа) отслеживали ежедневно в течение 14 дней. Статистический анализ проводился с использованием теста Мантела-Кокса с поправкой на множественные сравнения Бонферрони. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

4.2.4. Усиление M2e-специфического серологического ответа у иммунизированных мышей после гриппозной инфекции

Для того чтобы оценить влияние последующей гриппозной инфекции на характер серологического ответа у мышей, иммунизированных кандидатным вакцинным белком Flg-HA2-4M2ehs, мышей на 14 день после 3й иммунизации заражали сублетальной дозой (MID100) вируса гриппа A/Aichi/2/68. Кровь у мышей забирали до заражения и на 14-й день после заражения и оценивали динамику изменения уровня M2e-специфических IgG, IgA, подклассов IgG и титры антител в РТГА (Рис. 24).

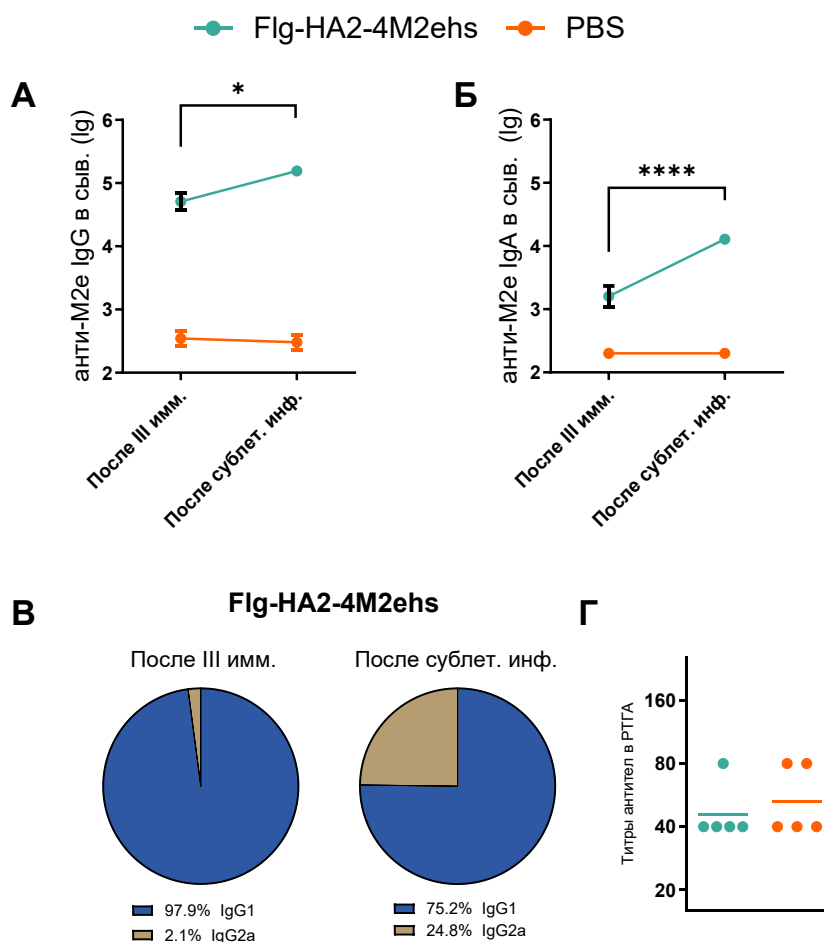


Рисунок 24 - Титры антител в сыворотке мышей после 3й иммунизации и после сублетальной инфекции. Мышей BALB/c (n = 5/группа) иммунизировали интраназально 10 мкг рекомбинантным белком Flg-HA2-4M2ehs в дни 0, 14, 28. Мышам контрольных групп вводили PBS. Через две недели после 3й иммунизации мышам заражали А/Аичи/2/68 в дозе MID100. А – средние значения титров (log2) анти-M2e IgG в сыворотке мышей после 3й иммунизации и после сублетальной инфекции. Б - средние значения титров анти-M2e IgA в сыворотке мышей после 3й иммунизации и после сублетальной инфекции. В – соотношение подклассов IgG после 3й иммунизации и после сублетальной инфекции. Г – Титры антител к А/Аичи/2/68 в РТГА после сублетальной инфекции.

Сублетальная инфекция стимулировала значительное увеличение титров M2e-специфических IgG ($p=0,0138$) и IgA ($p=0,0006$) (Рис. 24АБ). Наличие M2e-специфических антител у животных не оказало влияния на формирование геммагглютинирующих антител. Так, титры антител в РТГА достоверно не отличались у мышей опытной и контрольной групп (Рис. 24Г). Кроме того, у иммунизированных животных происходили изменения в соотношении подклассов IgG в сторону IgG2a. Если после иммунизации рекомбинантным белком Flg-HA2-4M2ehs доля M2e-специфических IgG2a составляла всего 2,1%, то после сублетальной инфекции произошел сдвиг в

сторону увеличения доли этого подкласса до 24,8% (Рис. 24В). В течение 14 дней после сублетального заражения потеря массы тела у мышей обеих групп была менее 10%.

4.2.5. Усиление гетерологичной защиты при комбинированной вакцинации мышей кандидатным вакцинным белком и ИГВ

Эффективность кандидатного вакцинного белка Flg-NA2-4M2ehs оценивали при сочетанной вакцинации с ИГВ. Для этого мышей трехкратно интраназально иммунизировали Flg-NA2-4M2ehs в дозе 10мкг/животное и параллельно прививали ИГВ (группа Flg-NA2-4M2ehs +ИГВ), группой сравнения выступали животные, получавшие только ИГВ (таб. 19).

Таблица 19. Схема эксперимента для оценки праймирующего эффекта вакцинного белка Flg-NA2-4M2ehs

препарат	Дни с начала опыта							
	иммунизация				Заражение (42 день)			
	I имм. д0	II имм. д14	III имм. д28 + забор крови	забор крови, БАЛ д42	A/H1N1pdm09 10LD50	A/H1N1pdm09 50LD50	A/H5N1 5LD50	Наблюдение 14 дней
Flg-NA2-4M2ehs +ИГВ	Flg-NA2-4M2ehs и/н, 10мкг/мышь	Flg-NA2-4M2ehs и/н + ИГВ в/м	Flg-NA2-4M2ehs и/н + ИГВ в/м	5 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей	1.гибель 2.масса
ИГВ (трехвалентная)	-	ИГВ, в/м	ИГВ, в/м	5 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей	
ФБР				5 мышей	10 мышей	10 мышей	10 мышей	

Через 2 недели после последней иммунизации оценивали уровни антиген-специфических антител в сыворотках и БАЛ. Показано формирование M2e-специфических IgG и IgA у мышей, привитых Flg-NA2-4M2ehs + ИГВ в сыворотке (рис. 25АБ) и БАЛ (рис. 26). В обеих группах показана индукция вирус-специфических антител, распознающих вирусы гриппа подтипов A/H1N1pdm09, A/H5N1, в то время как Flg-NA2-4M2ehs+ИГВ привитые мыши также продемонстрировали значимый уровень A/H3N2-специфических IgG в сыворотке (рис. 25В). Уровни НА-антител к вирусу A/H1N1pdm09 в обеих группах были сопоставимы (рис. 25Г).

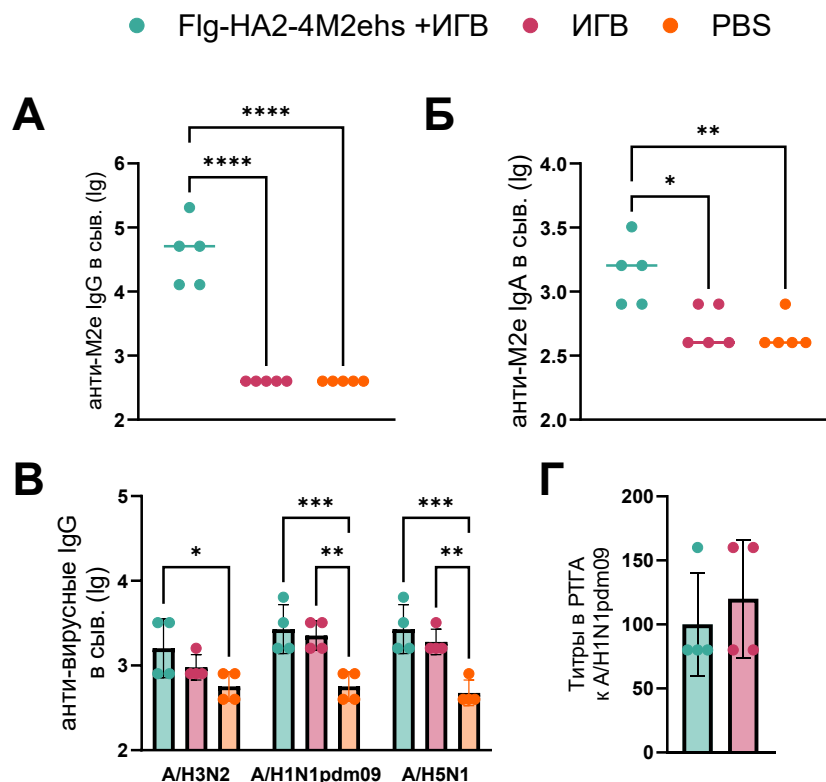


Рисунок 25 – Гуморальный иммунный ответ в сыворотке крови. Через две недели после 3й иммунизации уровни M2e-специфических IgG (А) и IgA (Б) оценивали в ИФА. В – титры сывороточных IgG к вирусам гриппа A/H3N2, A/H1N1pdm09, A/H5N1. Г – титры в РТГА к вирусу A/H1N1pdm09 после заражения A/California/07/09 H1N1pdm09 в дозе 10 LD50. Статистический анализ проводился с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

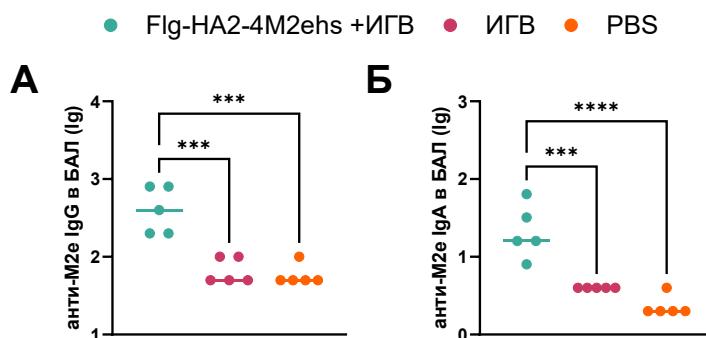


Рисунок 26 – Местный гуморальный иммунный ответ в БАЛ. Через две недели после 3й иммунизации уровни M2e-специфических IgG (А) и IgA (Б) оценивали в ИФА. Статистический анализ проводился с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Усиление протективности при комбинированной иммунизации исследовали при заражении гомологичным и гетерогичным штаммом вируса гриппа. При заражении мышей вирусом A/California/07/09 (H1N1pdm09) в дозе 10LD50 обе схемы вакцинации обеспечивали защиту животных (90-100%) (рис. 27Б). Максимальная потеря массы у животных, привитых только ИГВ была выше (16%), чем при Flg-HA2-4M2ehs+ИГВ (12%) (рис.27А).

Однако при заражении тем же штаммом в дозе 50LD50, только комбинированная вакцинация смогла обеспечить 100% защиту животных от гибели. Защитный эффект ИГВ составил лишь 60% (рис.27Г). Максимальная потеря массы тела также была выше в группе ИГВ (23% и 18% соответственно) (рис. 27В).

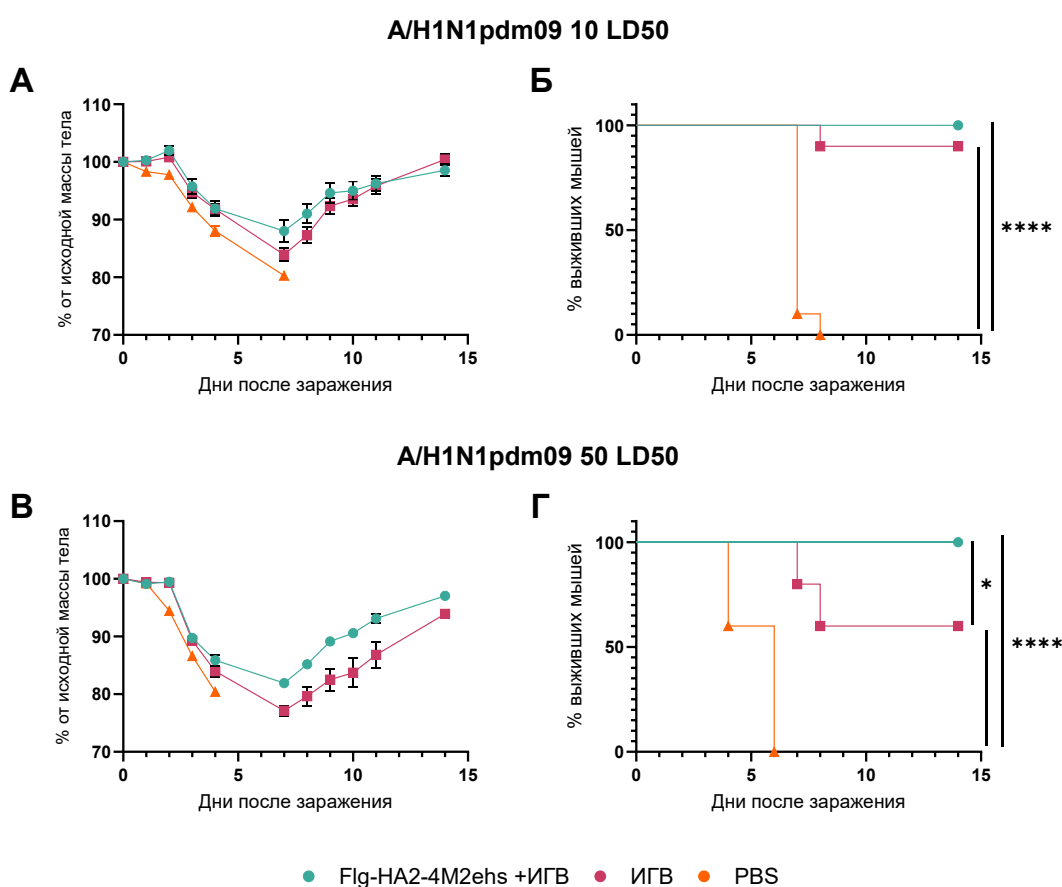


Рисунок 27 – Протективная эффективность иммунизации при комбинированной вакцинации. Через две недели после последней иммунизации мышей заражали в дозе 10LD50 (А, Б) или (В, Г) 50LD50 вируса A/California/07/09 (H1N1pdm09). Динамику массы тела (слева) и выживаемость (справа) отслеживали ежедневно в течение 14 дней. Статистический анализ проводился с использованием теста Мантела-Кокса с поправкой на множественные сравнения Бонферрони. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Полная защита животных от заражения высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/Курган/05/05 H5N1 в дозе 5LD50 была обеспечена только сочетанием Flg-HA2-4M2ehs + ИГВ, защита мышей привитых ИГВ составила 70% (рис. 28Б). Мыши привитые

комбинированно демонстрировали отсутствие потери массы тела после заражения (менее 1%) (рис. 28А).

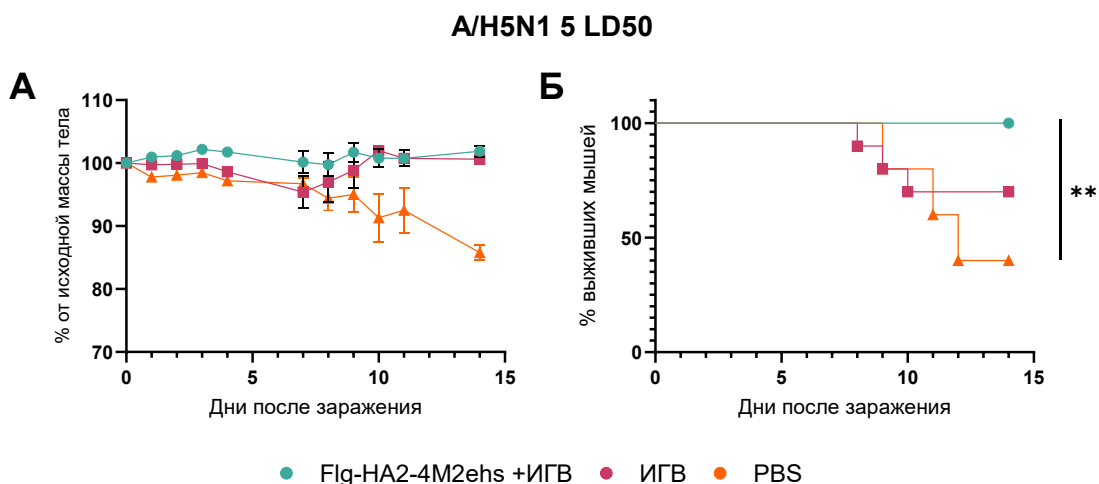


Рисунок 28 – Протективная эффективность иммунизации при комбинированной вакцинации. Через две недели после последней иммунизации мышей заражали в дозе 5LD50 вируса А/Курган/05/05 H5N1. Динамику массы тела (А) и выживаемость (Б) отслеживали ежедневно в течение 14 дней. Статистический анализ проводился с использованием теста Мантела-Кокса с поправкой на множественные сравнения Бонферрони. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Таким образом сочетанная иммунизация животных кандидатным вакцинным белком и ИГВ обеспечивала полную защиту животных при гомологичном и гетерологичном заражении, в том числе от высокодозного заражения пандемическим вирусом A/H1N1pdm09.

4.2.6. Активация врожденного иммунитета рекомбинантным белком Flg-HA2-4M2ehs

Для изучения динамики популяционного состава клеток врожденного иммунитета лабораторных мышей линии C57Bl/6, иммунизированных интраназально белком Flg-HA2-4M2ehs в дозе 10 мкг/мышь, подвергали эвтаназии через 12, 24 и 48 ч после иммунизации и проводили забор легких. Контрольной группе мышей интраназально вводили 20 мкл PBS и также подвергали эвтаназии через 12, 24 и 48 ч после введения. В суспензии клеток легких фенотипировали популяции нейтрофилов, моноцитов, альвеолярных макрофагов, интерстициальных макрофагов и дендритных клеток двух типов (ДК1 CD11b- и ДК2 CD11b+). Тактика гейтирования популяций клеток врожденного иммунитета представлена в приложении 1.

Результаты оценки относительного содержания основных популяций клеток врожденного иммунитета в разные сроки после иммунизации представлены на рис. 29А.

По сравнению с контрольной группой у мышей, иммунизированных Flg-HA2-4M2ehs, наблюдалось значительное увеличение содержания нейтрофилов на всех исследуемых сроках после введения препарата. Наиболее выраженные различия были отмечены через 12 часов после иммунизации, после чего относительное содержание нейтрофилов в легких постепенно снижалось, что говорит о нормальной ранней реакции организма на введение вакцины. Нейтрофилы способствуют переключению на Th1-ответ, а также участвуют в формировании герминативных центров в лимфоузлах, усиливая выработку антител [298]. Уровень моноцитов, напротив, был самым высоким в группе иммунизированных животных через 48 часов. Это говорит, как об общей активации врожденного иммунитета, так и может свидетельствовать о развитии адаптивного иммунитета, так как моноциты дифференцируются в антигенпрезентирующие клетки (АПК), способствуя активации Т-лимфоцитов [170]. В группе, иммунизированной Flg-HA2-4M2ehs, выявлено снижение доли дендритных клеток (CD11b- и CD11b+), что может быть связано с миграцией ДК в дренирующие лимфоузлы для презентации антигена Т-клеткам [23]. Наиболее выраженные различия отмечены через 12 ч после иммунизации.

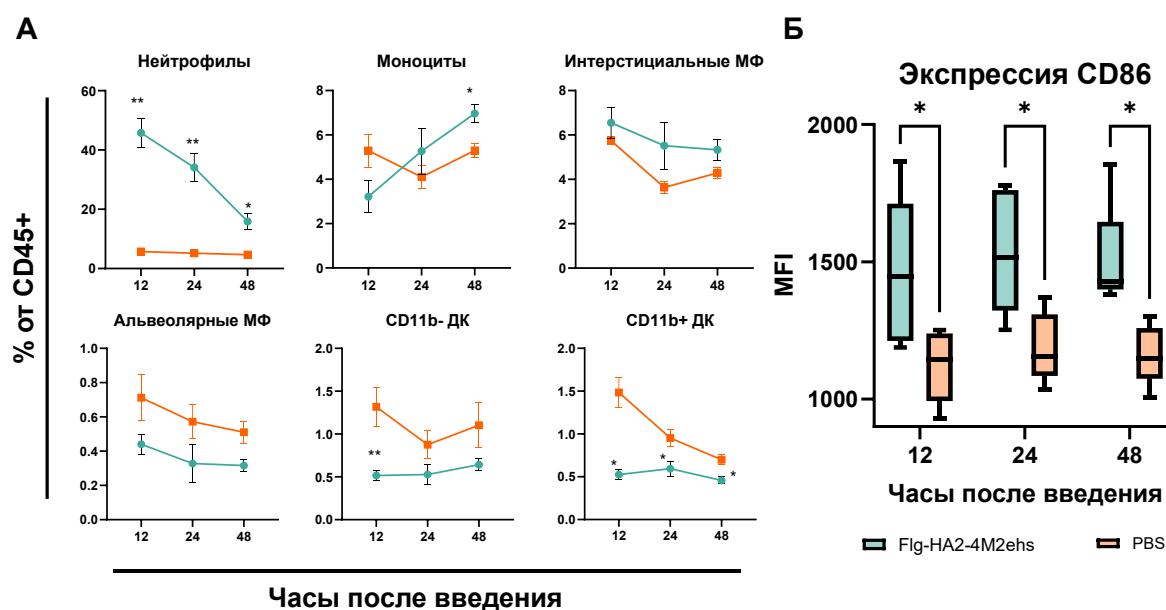


Рисунок 29 – Активация факторов врожденного иммунитета в легких мышей на ранних сроках (12, 24, 48 часов) после интраназальной иммунизации химерным белком Flg-HA2-4M2ehs. (А) Динамика относительного состава основных популяций клеток врожденного иммунитета в легких мышей. Представлена доля различных популяций клеток от общего числа CD45+ Т-лимфоцитов. (Б) Динамика экспрессии маркера CD86 в легких мышей. Представлены значения медианной интенсивности флуоресценции (MFI). Статистический анализ проводили с использованием двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Холм-Сидака. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

Изменение популяционного состава клеток врожденного иммунитета в легких в ответ на введение белка Flg-HA2-4M2ehs сопровождалось значительным повышением уровня экспрессии активационного маркера CD86 в клетках легкого (CD45+) во все исследуемые сроки. Результаты анализа медианной интенсивности флуоресценции (MFI) CD86 представлены на рис. 29Б. Уже через 12 часов после введения препарата у иммунизированных животных наблюдалось повышение уровня экспрессии CD86 по сравнению с контрольной группой ($p=0,049$). В более поздние сроки различия сохранялись, и выраженных изменений в уровне CD86 по сравнению со значениями, полученными через 12 часов после иммунизации, не наблюдалось.

4.2.7. Определение С-реактивного белка (СРБ) в сыворотке крови мышей после введения кандидатного вакцинного белка Flg-HA2-4M2ehs

Бактериальный белок флагеллин (белок-носитель в конструкции Flg-HA2-4M2ehs) активирует толл-подобный рецептор (TLR) 5 типа. Есть данные, что избыточная активация TLR5 стимулирует высвобождение С-реактивного белка (СРБ) - главного маркера острой фазы воспаления у человека [3] и вакцины на основе флагеллина имеют риск вызывать системные побочные реакции [363, 374].

Исследование динамики СРБ в сыворотке крови мышей Balb/c после однократной интраназальной иммунизации кандидатным вакцинным белком Flg-HA2-4M2ehs проводили с помощью ИФА тест-системы. Кровь у мышей забирали через 24, 48 и 72 часа после иммунизации. Результаты представлены на рисунке 30. Содержание СРБ у мышей контрольной группы на всех сроках исследования (24, 48 и 72 часа) находилось в пределах нормы и составило в среднем $52,3 \pm 0,4$ нг/мл. У мышей, иммунизированных препаратом белка в дозе 5 мкг, наблюдалось незначительное повышение содержания СРБ через 24ч после введения ($75,5 \pm 11,5$ нг/мл). Иммунизация мышей в дозе 10мкг также приводила к увеличению содержания СРБ через 24 часа после введения ($118,6 \pm 23,0$ нг/мл, $p=0,0953$ по отношению к контрольной группе), которое достоверно снижалось до значений, полученных у мышей контрольной группы, через 48 часов после введения ($p=0,0296$). Через 72 часа после введения исследуемой вакцины уровни СРБ у мышей опытных и контрольной групп не отличались.

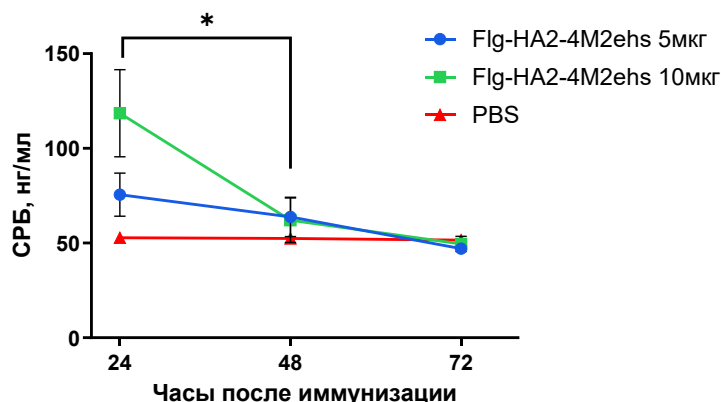


Рисунок 30 – Динамика СРБ (нг/мл) в сыворотке крови мышей (n=5) после однократной иммунизации рекомбинантным белком Flg-HA2-4M2ehs. Представлены средние значения и стандартная ошибка среднего. Статистический анализ проводился с использованием двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$).

4.3. Исследование безопасности и специфической активности кандидатной вакцины на хорьках при интраназальном и подкожном введении

На основе рекомбинантного белка Flg-HA2-4M2ehs была разработана вакцина Грифлавак. Гриппозная рекомбинантная лиофилизированная вакцина широкого спектра действия против вирусов гриппа А человека (Грифлавак) является оригинальным отечественным препаратом, который создан с использованием генно-инженерных технологий. Проведенные токсикологические исследования (острая и хроническая токсичность, аллергенность, пирогенность, иммунотоксичность, репродуктивная токсичность) показали, что вакцина является безопасной для лабораторных животных при интраназальном и парентеральном введении.

В рамках доклинических исследований на хорьках была использована серия вакцины 010424 (характеристика серии представлена в табл. 20). Дизайн исследования на хорьках приведен в приложении 4.

Таблица 20 — Характеристика вакцины Грифлавак, серия 010424

Лекарственная форма	лиофилизат для интраназального введения
Описание	белая аморфная масса, гигроскопична
Состав:	
активный компонент	рекомбинантный белок Flg-HA2-4M2ehs 10,14 мкг/доза
вспомогательные компоненты	реополиглюкин 0,5%, KH_2PO_4 10 mM, $\text{K}_2\text{H}_2\text{PO}_4$ 10 mM, NaCl 150 mM
Условия хранения	в защищенном от света месте при температуре от +2°C до +8°C
Исследуемая Вакцина серии 010424 произведена 04.2024 г.	

До начала исследования сыворотки хорьков проверяли в РТГА на наличие антител к вирусам гриппа А/Н3N2 и А/Н1N1. Скрининг проводили у 25 животных, в исследование были отобраны 15 хорьков, серонегативных к вирусу гриппа А/Н1N1pdm09, и, в дальнейшем, для оценки защитных свойств вакцины заражали их вирусом гриппа А/Южная Африка/3026/13 (Н1N1pdm09).

4.3.1. Безопасность кандидатной вакцины у хорьков

Масса тела животных до начала эксперимента статистически значимо не различалась между группами. На протяжении всего периода наблюдения с 0-го по 42-й дни эксперимента у животных наблюдался физиологический положительный прирост массы тела. На протяжении всего периода введения до заражения у животных всех групп не регистрировали симптомов со стороны дыхательной системы и ЖКТ. Различий по показателям между опытной и контрольной группами не выявлено. Хорькам опытных и контрольных групп были установлены термодатчики, которые регистрировали температуру тела животных каждые 30 мин на протяжении всего исследования. В период иммунизации не было выявлено статистически значимых отличий между экспериментальными группами.

4.3.2. Формирование антиген-специфических антител у хорьков при интраназальном и подкожном введении кандидатной вакцины

Хорьков иммунизировали двукратно интраназально и подкожно с интервалом в 21 день. Через 21 день после 2й иммунизации хорьков опытных и контрольной групп заражали вирусом А/Южная Африка/3026/13 (Н1N1pdm09) в дозе 7,3 lg ЭИД₅₀. Отбор образцов крови проводили на дни исследования 0, 21, 42 и 56.

При интраназальном введении вакцины Грифлавак было выявлено достоверное нарастание титров сывороточных анти-М2е IgG в ИФА на 42-й день исследования (после второй иммунизации) (рис. 31). При подкожном введении вакцины Грифлавак было выявлено нарастание титров сывороточных анти-М2е IgG в процессе иммунизации, достоверно отличное от дня 0, а также от титров антител хорьков контрольной группы на 56-й день исследования (через 2 недели после заражения вирусом гриппа А/Н1N1pdm09) (рис. 31). У хорьков контрольной группы существенных изменений титров анти-М2е антител не наблюдалось, в том числе, после заражения вирусом гриппа А/Н1N1pdm09.

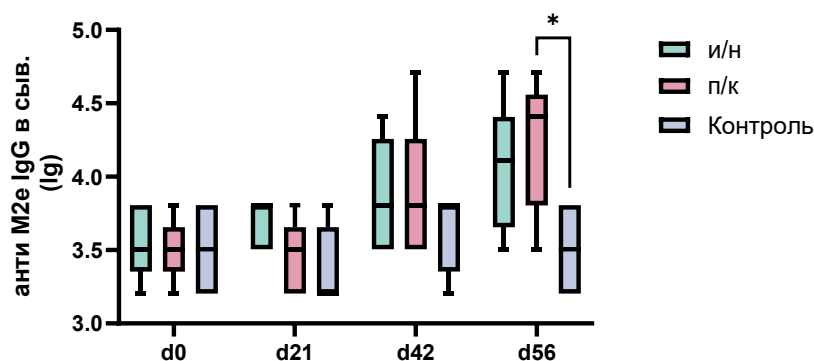


Рисунок 31 – Титры анти-M2e IgG (lg) в сыворотках хорьков при интраназальной и подкожной иммунизации вакциной Грифлавак. Статистический анализ проводился с использованием двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

У хорьков опытных групп, иммунизированных интраназально или подкожно, в отличие от животных контрольной группы происходило также формирование антител к белку-носителю флагеллину (рис. 32).

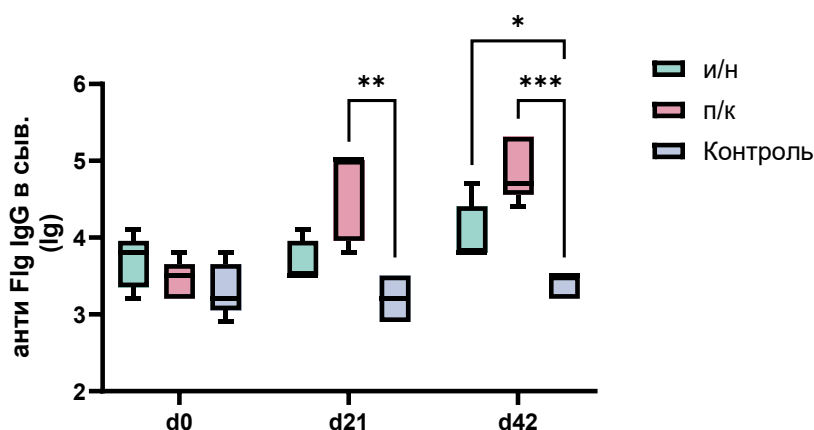


Рисунок 32 – Титры анти-Flg IgG (lg) в сыворотках хорьков при иммунизации вакциной Грифлавак. Статистический анализ проводился с использованием двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

При интраназальной иммунизации тестируемой вакциной отмечалось достоверное увеличение титров анти-H3N2 IgG в ИФА через 2 недели после заражения вирусом гриппа A/H1N1pdm09, а также достоверное возрастание антивирусных сывороточных IgG по сравнению с днем 0 и 21, а также с хорьками контрольной группы (рис. 33).

При подкожном введении вакцины формирование H3N2-специфических IgG наблюдалось как после иммунизации (21-й и 42-й дни исследования), так и после заражения (56-й день исследования) (рис. 33). У хорьков контрольной группы на

протяжении всего исследования (0–56-е дни) существенных изменений уровня анти-Н3N2 антител не наблюдалось

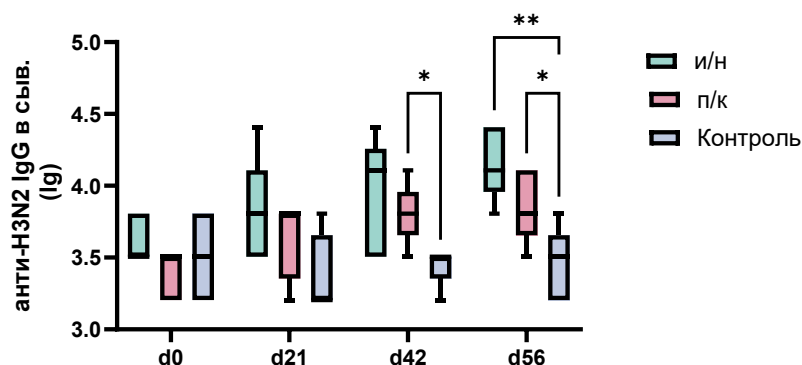


Рисунок 33 – Титры анти-Н3N2 IgG (lg) в сыворотках хорьков при интраназальной и подкожной иммунизации вакциной Грифлавак. Статистический анализ проводился с использованием двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

В отношении сывороточных анти-Н1N1 IgG у хорьков в процессе интраназальной иммунизации вакциной Грифлавак существенных изменений не отмечено, но через 2 недели после заражения вирусом гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) у хорьков опытной группы отмечался прирост титров анти-Н1N1 антител в ИФА (рис. 34).

Показан достоверный прирост Н1N1-специфических IgG в сыворотках хорьков при подкожном введении вакцины Грифлавак на 42-й и 56-й дни исследования. Уровни антивирусных антител в ИФА в сыворотках крови контрольных животных существенно не изменялись, в том числе и после заражения вирусом гриппа А/Н1N1pdm09.

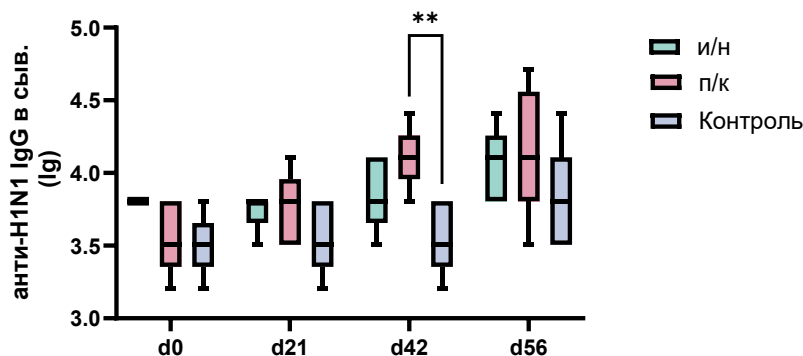


Рисунок 34 – Титры анти-Н1N1 IgG (lg) в сыворотках хорьков при интраназальной и подкожной иммунизации вакциной Грифлавак. Статистический анализ проводился с использованием двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

Титры в РТГА к вирусу гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) в сыворотках хорьков опытных и контрольной групп до заражения составляли < 10 . Через

2 недели после заражения у хорьков обеих групп определялись протективные титры анти-НА антител в РТГА (средний титр 2560 ± 306). Это свидетельствует о том, что процесс заражения обеих групп хорьков инфекционной дозой вируса (7,3 lg ЭИД50) А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) прошел успешно. Все группы хорьков перенесли гриппозную инфекцию, закончившуюся формированием протективного иммунитета.

4.3.3. Антиген-специфический Т-клеточный ответ у хорьков при интраназальном и подкожном введении кандидатной вакцины

Специфический Т-клеточный ответ оценивали методом ELISPOT по способности Т-клеток продуцировать IFN- γ при стимуляции мононуклеаров периферической крови (МПК) хорьков моновакциной подтипа А/Н3N2. На 42-й день исследования достоверных различий в приростах числа спотов обнаружено не было. Однако через 2 недели после заражения вирусом гриппа А/Н1N1pdm09 (56-й день исследования) был показан достоверный прирост спотов в обеих опытных группах по отношению к контрольной группе (рис. 35Б). Также был показан достоверный прирост абсолютного числа спотов при подкожном введении на 56-й день исследования по сравнению с контрольной группой (рис. 35А).

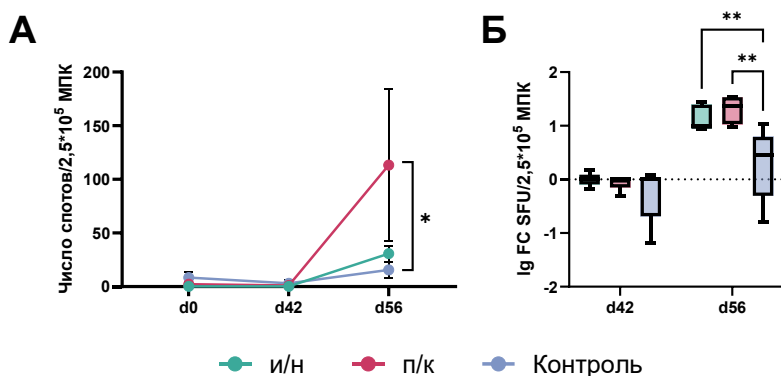


Рисунок 35 — H3N2-специфический Т-клеточный ответ в МПК хорьков после иммунизации и заражения. А - число спотов/2,5 $\times 10^5$ кл при стимуляции МПК хорьков моновакциной А/Н3N2, Б - нормализованные данные кратности изменений числа спотов (lg FC SFU/2,5 $\times 10^5$ МПК) относительно 0-го дня исследования. Стимуляция МПК хорьков моновакциной А/Н3N2. Статистический анализ проводился с использованием двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

4.3.4. Исследование защитного действия кандидатной вакцины на хорьках при заражении вирусом гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09)

На 42-й день исследования хорьков опытных и контрольной групп заражали вирусом А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) в дозе 7,3 lg ЭИД₅₀. Подъем температуры у хорьков опытных и контрольной групп отмечался с 44-го по 48-й день после заражения (рис. 36А). Результаты оценки AUC delta T (рис. 36Б) показывают, что этот показатель был выше у хорьков, иммунизированных вакциной интраназально, чем у животных, иммунизированных подкожно, и контрольной группы.

Также был проведен анализ массива первичных данных с расчетом общей продолжительности лихорадочного периода, в котором средняя температура в каждой группе животных (в каждый день наблюдения) превышала критическое значение 39,1°C (порог выбран по результатам анализа степени варьирования параметра в контрольной группе). У хорьков, иммунизированных подкожно, зарегистрировано достоверное снижение продолжительности периода повышенной температуры с 42-го по 56-й дни исследования в сравнении с контрольной группой (рис. 36В). Также зарегистрировано незначительное снижение лихорадочного периода на 44-й день эксперимента в группе животных, получавших вакцину интраназально, относительно контрольной группы (11,5 и 13,4 ч соответственно).

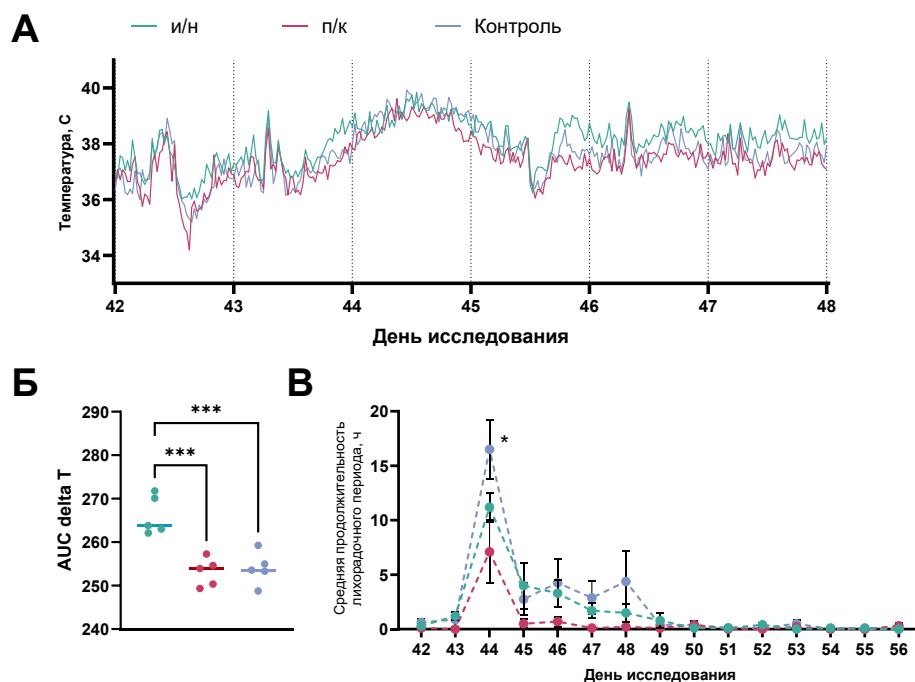


Рисунок 36 – Температура тела хорьков после заражения. А - изменение температуры тела в течение фазы заражения вирусом гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) в дозе 7,3 lg ЭИД₅₀. Несколько резких понижений температуры являются результатом введения наркоза на день 0 (заражение), 3-и и 5-е сутки после заражения (взятие носовых смывов). Б - AUC delta T относительно базовой температуры для каждого хорька в течение фазы заражения. В – средняя продолжительность лихорадочного периода в период наблюдения после заражения. Статистический анализ проводился с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$).

Динамика массы тела хорьков, иммунизированных вакциной Грифлавак интраназально или подкожно, после заражения вирусом гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) в дозе 7,3 lg ЭИД₅₀ представлена на рис. 37А. Полученные результаты демонстрируют, что у хорьков, иммунизированных интраназально вакциной Грифлавак, снижение массы тела было значительно меньше (5%), чем у хорьков, иммунизированных подкожно, и у животных контрольной группы (снижение массы тела до 9%).

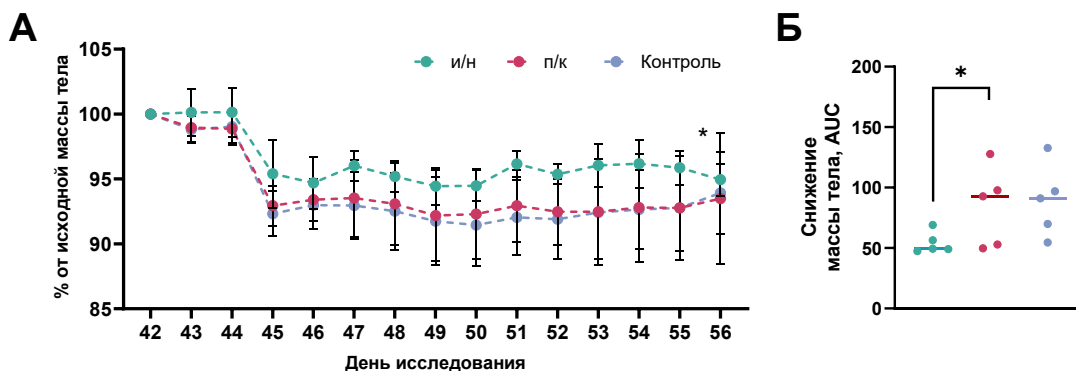


Рисунок 37 — Динамика массы тела (А) и AUC (Б) хорьков, иммунизированных интраназально и подкожно вакциной Грифлавак после заражения вирусом гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) в дозе 7,3 lg ЭИД₅₀. Статистический анализ проводился с использованием одно- или двухфакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$).

Уровень репродукции вируса А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) в носовых смывах хорьков оценивали на 3-й (45-й день исследования) и 5-й (48-й день исследования) дни после заражения. На 3-й день после заражения наиболее высокие значения титров вируса гриппа А/H1N1pdm09 в носовых смывах были выявлены у хорьков контрольной группы (рис. 38), которые достоверно отличались от соответствующих значений у хорьков, иммунизированных подкожно. На 5-е сутки после заражения титры вирусов у хорьков опытных групп были заметно ниже, чем у хорьков контрольной группы. Так, снижение титров вируса почти на 3 логарифма наблюдалось в группе хорьков, интраназально иммунизированных тестируемой вакциной. У хорьков, подкожно иммунизированных вакциной Грифлавак, титр вируса также значительно снизился и составил $1,15 \pm 0,37$ lg ТЦД₅₀/100 мкл.

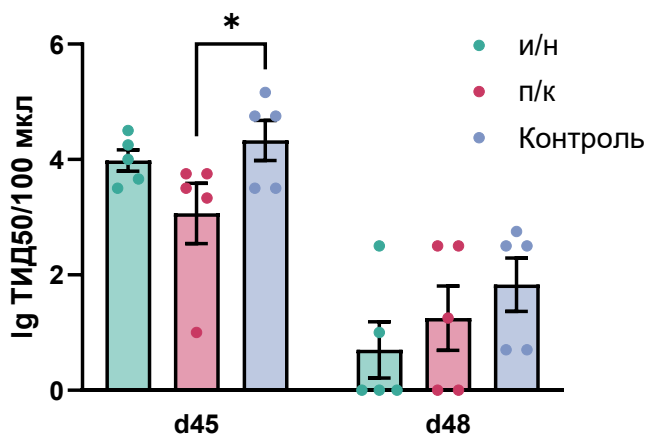


Рисунок 38. Вирусовыделение из носовых смывов хорьков на 3-и (d45) и 5-е (d48) сутки после заражения вирусом гриппа А/H1N1pdm09. Статистический анализ проводился с использованием однофакторного ANOVA с последующим тестом множественных сравнений Тьюки. Данные считались статистически значимыми при $p < 0,05$ (*: $p < 0,05$).

5. ОБСУЖДЕНИЕ

Создание мультиантигенных вакцин, направленных на защиту от широкого спектра вирусов гриппа, представляет собой перспективное направление в обеспечении защиты от этой инфекции. В качестве традиционных мишеней для вакцин перекрёстного действия выступают консервативные белки вируса, включая стеблевую область гемагглютиниона (НА2) и внеклеточный домен М2 (М2е). Минимальной изменчивостью обладает также внутренний белок нуклеопротеин (NP), который характеризуется высокой степенью консервативности среди различных подтипов вируса гриппа. Благодаря этим свойствам NP рассматривается в качестве ключевого антигена для разработки вакцин, способных обеспечить защиту против широкого спектра штаммов вируса [409, 22, 218].

Нами были сконструированы и исследованы несколько вариантов рекомбинантных белков, включающих консервативные фрагменты вирусов гриппа А, генетически слитых с белком жгутиков *Salmonella typhimurium*. Многочисленные исследования подтвердили перекрёстно-защитные свойства вакцин на основе М2е [395, 160, 396, 89]. Хотя антитела к М2е не предотвращают инфицирование вирусом гриппа, они способствуют уничтожению заражённых клеток посредством комплемент-зависимого цитолиза, антителозависимой клеточной цитотоксичности и/или антителозависимого фагоцитоза [103, 190, 220]. Кроме того, формируется М2е-специфический CD4⁺ Т-клеточный ответ [220]. Эффективность полипептидов, соответствующих фрагментам НА2 (аа 76-130 или аа 24-184), в качестве антигенных мишеней также была подтверждена в рамках различных вакцинных платформ [63, 398, 81, 173]. Включение НА2 в наши конструкции было направлено на расширение спектра мишеней для иммунной системы [399, 173]. Антитела к НА2 реализуют защиту через несколько механизмов. Антитела, направленные против эпитопов длинной α -спирали, ингибируют рН-зависимые конформационные изменения НА в эндосомах [102, 399, 183], предотвращая слияние мембран и выход вирусного генома. Широко нейтрализующие антитела могут также блокировать процессинг НА, создавая стерические препятствия для взаимодействия с протеазами хозяина, либо опосредовать цитотоксичность через Fc-Fc γ R [193, 94]. Не нейтрализующие антитела, индуцированные НА2, способствуют антителозависимой клеточной цитотоксичности (АЗКЦ) и активации CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток, что ассоциировано с перекрёстной защитой от вирусов гриппа [207, 177, 227, 63, 398]

Целевые вирусные белки были генетически интегрированы с флагеллином, который рассматривается в качестве перспективной платформы для разработки рекомбинантных вакцин на основе слабо иммуногенных антигенов вирусных и бактериальных патогенов [160, 87]. Физическое соединение флагеллина с целевыми антигенами обеспечивает эффективную презентацию антигена антиген-презентирующими клетками, снижает требуемую дозу антигена и исключает необходимость в дополнительных потенциально токсичных адъювантах. Адъювантный эффект флагеллина обусловлен его способностью связываться с TLR5 на CD11c+ антиген-презентирующих клетках, что объясняет усиление иммуногенности слитых с флагеллином антигенов и стимуляцию CD4+ Т-зависимого гуморального ответа [87, 77, 155, 26]. Способность флагеллина выступать одновременно в качестве платформы и адъюванта была продемонстрирована на различных моделях инфекционных заболеваний, включая грипп [382, 63, 398, 395, 72, 160, 434, 433, 119, 231].

Все сконструированные нами белки характеризовались высокой степенью чистоты, достаточной стабильностью при хранении. Флагеллин в составе рекомбинантных белков, включая вариант с удалённым гипервариабельным доменом, сохраняет свою биологическую активность в качестве лиганда TLR5.

Созданная нами конструкция Flg-4M2ehs содержит четыре копии M2e: две соответствуют консенсусной последовательности вирусов гриппа А человека, а две другие – вирусу A(H1N1)pdm09. Эти последовательности различаются четырьмя аминокислотами, включая ключевую 11-ю позицию, критическую для связывания антител [66].

Белки Flg-HA2-4M2ehs и FlgSh-HA2-4M2ehs содержат те же последовательности M2e и фрагмент HA2 (aa 76-130), но различаются длиной белка-носителя флагеллина. В конструкции FlgSh-HA2-4M2ehs удалён гипервариабельный домен. В данных конструкциях использован консенсусный HA2 II филогенетической группы, включающий штаммы A/H3N2 и A/H7N9. Выбор HA2 группы II обусловлен его эпидемиологической значимостью: вирус A/H3N2 циркулирует в человеческой популяции с 1968 года, вызывая практически ежегодные эпидемии, а вирус A/H7N9 с 2013 года стал причиной пяти эпизоотий в Китае [439] и рассматривается как потенциальный источник пандемических штаммов.

При подкожном введении мышам все конструкции индуцировали высокие уровни анти-M2e антител в сыворотке. Уровни IgG к белку-носителю также были значительными, причём удаление гипервариабельного домена флагеллина не приводило к их снижению. Для белков, содержащих последовательность HA2, было показано

формирование вирус-специфических IgG к вирусам A/H7N9, A/H1N1pdm09 и A/H5N1. При заражении животных летальными дозами вирусов гриппа подтипов A/H3N2 и A/H7N9 все конструкции демонстрировали высокие уровни защиты (90-100%). После подкожной иммунизации высокие уровни M2e-специфических IgG в сыворотках сохранялись в течение как минимум 6 месяцев. Уровни анти-M2e IgA через полгода значительно снижались, но оставались достоверно выше, чем у контрольных животных.

Сравнительный анализ иммуногенных свойств и защитной активности трёх вариантов рекомбинантных конструкций при подкожном введении мышам выявил следующие закономерности. Включение HA2 (aa 76-130) в конструкцию рекомбинантного белка приводит к индукции антивирусных IgG в дополнение к анти-M2e антителам. Оба химерных белка (Flg-HA2-4M2ehs и FlgSh-HA2-4M2ehs) демонстрировали перекрёстную реактивность и индуцировали антитела против вирусов из разных филогенетических групп. При заражении как гомологичными, так и гетерологичными штаммами, включая высокопатогенный вирус птиц A/H5N1, полную защиту животных обеспечивал рекомбинантный белок, содержащий дополнительную последовательность HA2 (Flg-HA2-4M2ehs). Конструкция, несущая только M2e, обеспечивала 60-80% защиту.

Однако для защиты от гриппа критически важен местный иммунный ответ, включающий формирование секреторных IgA [276] и тканерезидентных Т-клеток памяти [286, 219]. Интраназальная иммунизация M2e-содержащими вакцинами обеспечивает более выраженную защиту по сравнению с парентеральным введением [80], при этом мукозальный IgA играет ключевую роль в перекрёстной защите [152, 338] и снижении передачи вируса [296].

Выполненные нами исследования иммуногенности и защитной эффективности рекомбинантных белков при интраназальном введении мышам показали, что все белки индуцировали высокие уровни системных анти-M2e IgG в сыворотке. Однако для белка с укороченным флагеллином (FlgSh-HA2-4M2ehs) было зафиксировано достоверное снижение как M2e-специфических, так и флагеллин-специфических антител по сравнению с конструкциями, содержащими полноразмерный флагеллин. Иммунизация белками с полноразмерным флагеллином индуцировала M2e-специфические IgG и IgA в бронхоальвеолярных лаважах, в носовых смывах. Конструкции, включающие последовательность HA2, также индуцировали формирование вирус-специфических IgA в носовых смывах. Таким образом, интраназальная иммунизация рекомбинантными белками обеспечивала как системный, так и местный гуморальный иммунный ответ к целевым антигенам.

Нами было показано влияние порядка присоединения антигенов к белку-носителю на иммуногенность рекомбинантного белка. Выявлены различия в уровнях продукции антител двумя гибридными белками. Белок с концевым положением M2e (Flg-NA2-4M2e) обладал более высокой иммуногенностью, чем белок с концевым положением фрагмента NA2 (Flg-4M2e-NA2). Интраназальная иммунизация белком Flg-4M2e-NA2 не индуцировала формирование вирус-специфических системных антител и приводила к значимо более низким уровням местных анти-M2e IgG и IgA.

При заражении вирусами гриппа различных подтипов только белок с концевым расположением M2e (Flg-NA2-4M2e) обеспечивал снижение вирусной репликации в лёгких мышей. При летальном заражении гомологичным вирусом подтипа A/H3N2 обе конструкции обеспечивали защиту животных, однако потеря массы у животных, привитых Flg-4M2e-NA2, была более выраженной, что свидетельствует о более тяжёлом течении инфекции. Основываясь на теоретически построенных моделях 3D белков, можно предположить, что различия в иммуногенности вероятно, связаны с конформационными изменениями третичной структуры белка Flg-4M2e-NA2, в том числе с частичным экранированием фрагмента M2e [330, 7].

С целью усиления специфической активности и расширения спектра действия нами был сконструирован рекомбинантный белок с включением двух CTL-эпитопов нуклеопротеина вируса гриппа. Основным механизмом иммунного ответа на NP является активация CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов за счёт презентации Т-клеточных эпитопов в комплексе с МНС-I. CD8⁺ Т-лимфоциты уничтожают инфицированные вирусом клетки, ингибируют высвобождение вирионов, контролируют репликацию вируса, уменьшают выраженность симптомов гриппа и обеспечивают перекрёстную защиту от гетерологичных штаммов вируса [113, 139, 286, 204, 239, 329, 400]. Наночастицы NP/M2e вызывают выраженный NP-специфический Т-клеточный ответ и M2e-специфический гуморальный ответ, повышая выживаемость мышей BALB/c при летальном заражении [329]. Вакцинация рекомбинантным белком 3M2e-3NA2-NP индуцирует сильный антиген-специфический антительный ответ, активирует цитотоксические Т-лимфоциты и обеспечивает полную защиту от гомологичных и гетерологичных вирусов гриппа у мышей [239].

Настоящее исследование показало, что включение в конструкцию двух Т-клеточных эпитопов NP (NP255-275 и NP335-350) приводит к снижению уровней M2e- и вирус-специфических IgG, при этом происходит сдвиг соотношения IgG2a/IgG1 в сторону IgG2a, которые более эффективны в антителозависимой клеточной цитотоксичности по сравнению с IgG1.

Гриппозная инфекция индуцирует сильный долгосрочный защитный антительный ответ и формирование антиген-специфических Tfh, тогда как большинство гриппозных вакцин не обладают такой способностью [192]. Фолликулярные Th-клетки (Tfh) играют ключевую роль в формировании эффективного гуморального ответа, обеспечивающего защиту от широкого спектра патогенов [191, 96, 311]. Они локализуются в фолликулах вторичных лимфоидных органов и опосредуют созревание аффинных В-клеточных иммуноглобулинов, рекомбинацию переключения классов, а также генерацию долгоживущих плазматических клеток и В-клеток памяти [303, 75, 8, 324]. Во время естественной инфекции антигены вируса презентуются CD4⁺ Т-клеткам в течение 7 дней [178, 29], в то время как после иммунизации инактивированной вакциной этот процесс ограничивается 3 днями [420]. Кратковременность презентации антигенов и отсутствие выраженного воспалительного ответа могут объяснять слабую индукцию Tfh и гуморального иммунитета при использовании инактивированных вакцин по сравнению с естественной инфекцией. Однако повторные иммунизации способны усилить развитие антиген-специфических Tfh и продлить гуморальный иммунитет [28, 360].

Выполненный нами сравнительный анализ Т-клеток памяти в селезёнках мышей после подкожной иммунизации Flg-HA2-4M2ehs или Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs показал, что включение пептидов NP в белок Flg-HA2-4M2ehs приводит к ослаблению Т-клеточного ответа на M2e и индукции NP-пептид-специфичных CD8⁺IFN- γ ⁺ клеток. При этом вирус-специфический ответ был сходным для обоих белков и характеризовался образованием CD4⁺ и CD8⁺ Тем-клеток, монопродуцентов IFN- γ .

Однако, если после иммунизации белком Flg-HA2-4M2ehs выявлялись только CD8⁺CD107a⁺ и CD8⁺CD107a⁺IFN- γ ⁺ клетки, то иммунизация Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs индуцировала формирование как CD8⁺, так и CD4⁺ Тем-клеток, демонстрирующих цитотоксический потенциал (маркер дегрануляции CD107a⁺). Также наблюдалась экспрессия CD107a⁺ в сочетании с синтезом IFN- γ , что свидетельствует о полифункциональности этих Т-клеток и коррелирует с более лёгким течением болезни и защитой от летальной гриппозной инфекции [328, 206].

Таким образом, включение двух CD8⁺ эпитопов белка NP в конструкцию Flg-HA2-4M2ehs существенно влияет на иммунный ответ к антигенам M2e и HA2, что может быть связано с изменением третичной структуры белка и, как следствие, модуляцией силы антиген-специфического гуморального ответа. Кроме того, для Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs был зафиксирован сдвиг соотношения IgG2a/IgG1 в сторону IgG2a.

Несмотря на различия в индуцируемом иммунном ответе, оба рекомбинантных белка обеспечивали практически полную защиту мышей (90-100% выживаемости) от вирусов подтипов A/H1N1pdm09 и A/H3N2 при летальном заражении (10 LD50).

Следует отметить, что последовательности NP335 и NP255 содержат преимущественно эпитопы, релевантные для человека, что может объяснять отсутствие выраженного Т-клеточного ответа к NP при иммунизации мышей. Для оценки потенциальной эффективности этих эпитопов у людей требуются дальнейшие исследования с использованием трансгенных мышей.

При моделировании сублетальной гриппозной инфекции у мышей, иммунизированных рекомбинантным белком Flg-NA2-4M2ehs, наблюдался прирост M2e-специфических IgG и IgA в сыворотке, а также сдвиг соотношения подклассов IgG в сторону IgG2a. Этот эффект мы считаем благоприятным, поскольку сбалансированное соотношение антиген-специфических подклассов IgG способствует более полной защите при последующем инфицировании. Мышиные подклассы IgG2a/c обладают выраженными эффекторными функциями и преимущественно участвуют в антителозависимой клеточной цитотоксичности благодаря их способности связываться со всеми тремя типами Fc-рецепторов (FcγRI, FcγRII, FcγRIV) [270]. Хотя было показано, что защита мышей, иммунизированных конструкциями на основе M2e, коррелирует с высоким уровнем IgG2a [78,253]. В то же время, высокий уровень M2e-специфических IgG1 может компенсировать их относительно низкую способность активировать эффекторные клетки [87]. Доказано, что макрофаги способны фагоцитировать инфицированные вирусом гриппа клетки [120,271]. Фагоцитоз IgG1-опсонизированных клеток макрофагами зависит от FcγRII [147], при этом альвеолярные макрофаги играют ключевую роль в защите от гриппа в случае наличия анти-M2e IgG1 [103].

Нами была исследована эффективность кандидатного вакцинного белка Flg-NA2-4M2ehs при комбинированной иммунизации мышей с инактивированной гриппозной вакциной (ИГВ). При заражении животных пандемическим вирусом A/California/07/09 (H1N1pdm09) в дозе 10 LD50 оба варианта иммунизации (ИГВ и комбинированная Flg-NA2-4M2ehs + ИГВ) обеспечивали полную защиту животных от гибели. Однако при заражении высокой дозой того же штамма (50 LD50) только комбинированная вакцинация обеспечивала 100% защиту, тогда как эффективность ИГВ составила 70%. Кроме того, сочетанная иммунизация обеспечивала полную защиту животных при заражении высокопатогенным вирусом гриппа птиц A/Курица/Курган/RG/05/05 (H5N1).

Показана активация факторов врождённого иммунитета при иммунизации рекомбинантным белком Flg-HA2-4M2ehs. На всех исследуемых сроках после введения отмечалась экспрессия маркера CD86 на CD45+ клетках лёгких мышей, что свидетельствует об активации антиген-презентирующих клеток (АПК) и их способности стимулировать Т-лимфоциты [248]. Наблюдалось повышение содержания моноцитов в лёгочной ткани, что отражает активацию врождённого иммунитета и может свидетельствовать о развитии адаптивного иммунного ответа, поскольку моноциты дифференцируются в антиген-презентирующие клетки, способствуя активации Т-лимфоцитов [170]. Снижение доли дендритных клеток (CD11b- и CD11b+) может быть связано с их миграцией в дренирующие лимфоузлы для презентации антигена Т-клеткам [23]. В дальнейших исследованиях эту гипотезу можно проверить путём анализа уровня ДК в лимфоузлах или экспрессии маркера CCR7.

Также следует учитывать, что активированные ДК могут снижать экспрессию классических маркеров (например, CD11c, МНС-II), что делает их "невидимыми" при проточной цитометрии [339]. Повышение содержания нейтрофилов в лёгочной ткани мышей после введения рекомбинантной вакцины может отражать несколько иммунологических процессов: раннюю реакцию врождённого иммунитета (нейтрофилы первыми мигрируют в ткань в ответ на введение вакцины, особенно содержащей TLR-активирующие адъюванты); влияние на адаптивный иммунный ответ (нейтрофилы способствуют переключению на Th1-ответ через секрецию IFN- γ и IL-12, что критично для защиты от внутриклеточных патогенов); участие в формировании герминативных центров в лимфоузлах, усиливающее выработку антител [298]. Пик нейтрофильной инфильтрации обычно наблюдается через 6-24 часа после введения, с последующим снижением.

Вакцины на основе флагеллина могут вызывать системные побочные реакции [363, 374], включая повышение уровня С-реактивного белка (СРБ). При воспалении синтез СРБ увеличивается уже через 6 часов, а его концентрация в крови возрастает в 10-100 раз в течение 24-48 часов. Наиболее высокие уровни СРБ наблюдаются при бактериальной инфекции. У мышей базальный уровень СРБ в норме низкий (2-5 мкг/мл) [99], а при воспалении увеличивается незначительно (острофазовую реакцию у мышей в основном опосредует сывороточный амилоидный белок SAP). СРБ функционирует не только как маркер воспаления, но и как сенсор патогенов и активатор врождённого иммунного ответа [99]. Он способствует созреванию дендритных клеток, усиливает презентацию антигена и гуморальный ответ [365, 435]. Через 24 часа после интраназального введения мышам кандидатного вакцинного белка Flg-HA2-4M2ehs мы

наблюдали повышение уровня СРБ в сыворотке, превышающее фоновое в 2 раза, которое возвращалось к исходным значениям через 48 часов после иммунизации.

Хорьки являются "золотым стандартом" для доклинических испытаний вакцин и терапевтических средств против гриппа, поскольку они восприимчивы к инфекции человеческими и зоонозными вирусами гриппа (типов А и В) без необходимости адаптации вируса к хозяину [171, 56, 31, 364]. Гриппозная инфекция у хорьков воспроизводит основные клинические проявления заболевания у человека, включая лихорадку, выделения из носа, кашель, желудочно-кишечные осложнения, сывороточные аномалии, неврологические нарушения, потерю веса и/или анорексию, лимфопению, гиперцитокинемию и летаргию [364, 34, 240, 32, 111]. Выраженность этих симптомов может значительно варьировать в зависимости от штамма вируса, дозы и пути заражения, а также других факторов [34]. Высокая восприимчивость хорьков к гриппозной инфекции обусловлена сходством в физиологии дыхательных путей, где преобладание рецепторов α -2,6-связанной сиаловой кислоты в верхних дыхательных путях аналогично таковому у людей [267, 179, 384, 151].

Безопасность и специфическую активность вакцины "Грифлавак", действующим началом которой был изученный нами белок Flg-NA2-4M2ehs, оценивали на хорьках при введении в дозе 10 мкг интраназально или подкожно с последующим заражением эпидемическим вирусом гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) в дозе 7,3 lg ЭИД₅₀. На протяжении всего периода наблюдения общее состояние и поведение хорьков после интраназальной или подкожной иммунизации соответствовали норме. Не отмечалось различий по клиническим показателям, динамике массы и температуры тела между опытными и контрольной группами после первого и второго введения вакцины, что свидетельствует о хорошем профиле безопасности исследуемого препарата.

Вакцина "Грифлавак" при двукратном подкожном или интраназальном введении стимулировала образование M2e-специфических IgG-антител к линейным эпитопам эктодомена M2e, выявляемых в сыворотке крови хорьков. Заражение вирусом А/H1N1pdm09 иммунизированных хорьков вызывало дополнительный прирост титров анти-M2e IgG в отличие от контрольных животных.

Вакцина также индуцировала образование антивирусных не нейтрализующих IgG к консервативному фрагменту второй субъединицы НА вирусов гриппа 1-й и 2-й филогенетической группы, уровень которых увеличивался после заражения. Имеются данные, что иммунизация хорьков рекомбинантными НА (головной домен Н9/Н8/Н5 и вторая субъединица Н1N1) вызывала образование не нейтрализующих анти-НА2 IgG, которые защищали хорьков от заражения вирусом гриппа А/H1N1 даже при низком

уровне нейтрализующих антител [259]. Эти данные согласуются с исследованиями на других моделях млекопитающих и людях, которые предполагают, что функциональная активность антител, связанная с Fc-рецепторами (антителозависимая клеточная цитотоксичность, комплемент-зависимая клеточная цитотоксичность), играет важную роль в защите, опосредованной HA2 [174]. Кроме того, исследования на людях показывают, что антитела к стеблевой части HA могут сохраняться в течение многих лет [215].

Эффективная универсальная вакцина против гриппа, вероятно, должна индуцировать не только антительный ответ к консервативным вирусным антигенам, но и формирование вирус-специфического Т-клеточного ответа, который является основным медиатором перекрёстной защиты между различными подтипами вирусов гриппа А. Быстрая индукция клеток, секретирующих IFN- γ , у хорьков, ранее инфицированных вирусом гриппа A/H1N1, но не у наивных животных, свидетельствует о формировании Т-клеток памяти [138].

IFN- γ играет ключевую роль в развитии как врождённого, так и адаптивного иммунного ответа [352, 275] и является важным маркером адаптивного иммунитета. Этот цитокин продуцируется CD4⁺ Th1-клетками, большинством CD8⁺ Т-лимфоцитов и NK-клетками, внося существенный вклад в противовирусный иммунитет против гриппа как у человека, так и у хорьков [406], и способен ограничивать вирусную инфекцию [254]. Исследования на хорьках показали, что оценка Т-клеточного ответа по синтезу IFN- γ позволяет более точно определить уровень защиты, индуцированной вакциной [275, 319]. Полученные нами данные подтверждают эти факты и демонстрируют, что вакцина "Грифлавак" стимулировала синтез IFN- γ после стимуляции клеток крови вирусом A/H3N2 как при интраназальном, так и при подкожном введении, что свидетельствует о формировании специфического Т-клеточного ответа.

Защитное действие вакцины "Грифлавак" исследовали после заражения хорьков вирусом гриппа A/H1N1pdm09. Оценивали динамику массы и температуры тела, клинические проявления инфекции (чихание, выделения из носа, нарушение дыхания, активность), а также репродукцию вируса в верхних дыхательных путях. Масса и температура тела являются наиболее объективными и часто регистрируемыми параметрами для оценки заболеваемости хорьков гриппом [33].

Хорьков заражали вирусом гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) в высокой дозе (7,3lg ЭИД₅₀). Повышение температуры у животных опытных и контрольных групп отмечалось с 3-го по 6-й день после заражения, но у

иммунизированных хорьков продолжительность периода повышенной температуры была короче по сравнению с контрольными животными. Хорьки, иммунизированные интраназально, теряли массу тела значительно меньше (до 5%), чем при подкожной иммунизации и в контроле (до 9%). В носовых смывах хорьков на 5-е сутки после заражения вирус выявлялся у отдельных иммунизированных животных в отличие от тотального выделения у животных контрольной группы.

Вакцина "Грифлавак" демонстрирует выраженную иммуногенность у лабораторных животных (мышей и хорьков), стимулируя выработку сывороточных и мукозальных антиген-специфических антител; антиген-специфических моно- и полифункциональных Т-клеток памяти в периферических лимфоидных органах (как при интраназальном, так и при парентеральном введении). Препарат обладает широким спектром защитного действия против вирусов гриппа А человека и птиц, что подтверждается результатами комплексных доклинических исследований.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования

Результаты проведённого исследования подтверждают перспективность создания универсальной гриппозной вакцины на основе рекомбинантных белков, включающих флагеллин и консервативные вирусные пептиды. Полученные данные обосновывают необходимость дальнейшего изучения иммуногенности конструкций, содержащих фрагменты нуклеопротеина, на релевантных животных моделях. Особое внимание следует уделить оценке перекрёстной защиты против различных штаммов вируса гриппа и длительности иммунного ответа.

Дальнейшего исследования заслуживает клеточная мукозальная реакция на введение вакцинных рекомбинантных белков и биологическая роль изменения клеточного ландшафта в выраженности и длительности местного иммунного ответа.

Бесспорно, что для окончательной оценки эффективности кандидатной вакцины, содержащей в качестве действующего начала рекомбинантный белок Flg-HA2-4M2ehs, необходимо проведение клинических исследований и изучение эффективности разных схем иммунизации, включая прайм-буст иммунизацию.

6. ВЫВОДЫ

- 1) Полученные конструкции рекомбинантных белков, включающие фрагмент второй субъединицы НА, эктодомен белка М2, консервативные фрагменты белка NP генетически слитые с последовательностью флагеллина, по подлинности, молекулярным массам соответствовали теоретически предсказанным и обладали достаточной стабильностью. Флагеллин в составе конструкций сохранял свою биологическую активность.
- 2) Структура рекомбинантного белка влияет на иммуногенность. Наибольшей иммуногенностью обладали белки, слитые с полноразмерным флагеллином и с концевым расположением эктодомена белка М2.
- 3) Наиболее перспективным с точки зрения специфического гуморального и Т-клеточного ответа оказался рекомбинантный белок Flg-NA2-4M2ehs.
- 4) Как парентеральный, так и интраназальный способ введения кандидатного вакцинного белка Flg-NA2-4M2ehs обеспечивал защиту животных от летального заражения гомологичными и гетерологичными штаммами вируса гриппа А человека и птиц А (H3N2, H1N1pdm09, H7N9, H5N1, H2N2).
- 5) Интраназальный способ введения приводил также к формированию местного специфического иммунитета и сокращение периода репродукции вируса в легких.
- 6) Сочетанная вакцинация животных ИГВ и кандидатным вакцинным белком усиливала защиту и обеспечивала выживаемость при высокодозном заражении пандемическим штаммом А/H1N1pdm09 (50LD50), а также при заражении высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/H5N1 (5LD50).
- 7) Показана безопасность кандидатной вакцины в доклинических испытаниях на хорьках. Двукратная вакцинация приводила к формированию специфического гуморального и Т-клеточного ответа у животных, а также снижению клинических проявлений инфекции после заражения.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

AAV - Adenovirus-associated virus, аденоассоциированный вирус

ADCP - Антителозависимый клеточный фагоцитоз

ANOVA - Analysis of variance, дисперсионный анализ

AUC - area under the curve, площадь под кривой

CCL2 - C-C motif ligand 2, цитокин, относится к группе CC-хемокинов

CDC - complement-dependent cellular cytotoxicity, комплемент-зависимая цитотоксичность

c-di-AMP - бис-(3',5')-циклический димерный аденозинмонофосфат

COBRA - Computationally Optimized Broadly Cross-Reactive Antigen

COVID-19 - COronaVirus Disease 2019, коронавирусная инфекция 2019 года

CTL - цитотоксические Т-лимфоциты

DPBS - Dulbecco's phosphate-buffered saline, Фосфатно-солевой буферный раствор Дульбекко

ELISPOT – Enzyme-Linked ImmunoSpot

GRAVY - Grand average of hydropathicity

HA – гемагглютинин

HBc - коровый антиген вируса гепатита В

HBSS - Hanks' Balanced Salt Solution, раствор Хэнкса

IFN γ – гамма-интерферон

ЛАН - длинная альфа-спираль

LAL - Limulus Amebocyte Lysate, Лизат амебоцитов Limulus

LD50 – 50% летальная доза

LPCs - lamina propria cells, клетки lamina propria

MDCK - Madin-Darby canine kidney, Клетки почек собаки Мадина-Дарби

MFI - медианная интенсивность флуоресценции

MHC - major histocompatibility complex, главный комплекс гистосовместимости

MID – мышьяная инфекционная доза

NA – нейраминидаза

NK - естественные киллеры

NLRC4 - cytosolic NOD-like receptor (NLR) protein 4

NLS – сигнал ядерной локализации

NP – нуклеопротеин

OVA - chicken ovalbumin, основной белок яичного белка

PAMPs - Pathogen-Associated Molecular Patterns

PCV2 - porcine circovirus 2, цирковирус свиней 2

PRR - pattern recognition receptors, паттерн-распознающие рецепторы

RdRp - Вирусная РНК-зависимая РНК-полимераза

RFA - physical radiofrequency adjuvant, физический радиочастотный адъювант

RIG-I – Retinoic acid-inducible gene I-like receptors, RIG-I-подобные рецепторы

SARS-CoV-2 - Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2

ssRNA – single strain RNA, однонитевая РНК

TCID50 - 50% Tissue Culture Infectious Dose, 50% тканевая инфекционная доза

TLR - Toll-like receptors, толл-подобные рецепторы

TMB – тетраметилбензидин

Trm – тканерезидентные Т-клетки памяти

aa – amino acid, аминокислота

АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность

АПК – антиген презентующие клетки

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ВПЧ – вирусоподобные частицы

вРНП - вирусные рибонуклеопротеины

ГТФ – гуанозинтрифосфат

ДК – дендритные клетки

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖГВ – живая гриппозная вакцина

ИГВ – инактивированная гриппозная вакцина

ИФА – иммуноферментный анализ

КИ – клиническое исследование

ЛУ – лимфатический узел

МЛД50 – 50% мышьяная летальная доза

МПК – моноклеары периферической крови

МФ – макрофаги

ОП – оптическая плотность

ПААГ – полиакриламидный гель

РКЭ – развивающиеся куриные эмбрионы

РНК – рибонуклеиновая кислота

РНП – рибонуклеопротеин

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

СГТ – среднее геометрическое титра

СРБ - С-реактивный белок

ЭИД50 – 50% эмбриональная инфекционная доза

ЭТС HI – термоинактивированная эмбриональная телячья сыворотка

8. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Abreu, M. T. (2010). Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function. *Nature reviews immunology*, 10(2), 131-144.
2. Afzal, H., Murtaza, A., & Cheng, L. T. (2025). Structural engineering of flagellin as vaccine adjuvant: quest for the minimal domain of flagellin for TLR5 activation. *Molecular Biology Reports*, 52(1), 104.
3. Ahmed, M. S., Jadhav, A. B., Hassan, A., & Meng, Q. H. (2012). Acute phase reactants as novel predictors of cardiovascular disease. *International Scholarly Research Notices*, 2012(1), 953461.
4. Akarsu, H., Burmeister, W. P., Petosa, C., Petit, I., Müller, C. W., Ruigrok, R. W., & Baudin, F. (2003). Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). *The EMBO journal*, 22(18), 4646-4655.
5. Akira, S. (2011). Innate immunity and adjuvants. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 366(1579), 2748-2755.
6. Akira, S., Takeda, K., & Kaisho, T. (2001). Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature immunology*, 2(8), 675-680.
7. Alharbi, N., Skwarczynski, M., & Toth, I. (2022). The influence of component structural arrangement on peptide vaccine immunogenicity. *Biotechnology Advances*, 60, 108029.
8. Aljurayyan, A., Puksuriwong, S., Ahmed, M., Sharma, R., Krishnan, M., Sood, S., ... & Zhang, Q. (2018). Activation and induction of antigen-specific T follicular helper cells play a critical role in live-attenuated influenza vaccine-induced human mucosal anti-influenza antibody response. *Journal of virology*, 92(11), 10-1128.
9. Allen, J. D., Jang, H., DiNapoli, J., Kleanthous, H., & Ross, T. M. (2019). Elicitation of protective antibodies against 20 years of future H3N2 cocirculating influenza virus variants in ferrets preimmune to historical H3N2 influenza viruses. *Journal of virology*, 93(3), 10-1128.
10. Allen, J. D., Owino, S. O., Carter, D. M., Crevar, C. J., Reese, V. A., Fox, C. B., ... & Ross, T. M. (2017). Broadened immunity and protective responses with emulsion-adjuvanted H5 COBRA-VLP vaccines. *Vaccine*, 35(38), 5209-5216.
11. Ameghi, A., Pilehvar-Soltanahmadi, Y., Baradaran, B., Barzegar, A., Taghizadeh, M., Zarghami, N., & Aghaiypour, K. (2016). Protective immunity against homologous and heterologous influenza virus lethal challenge by immunization with new recombinant chimeric HA2-M2e fusion protein in balb/c mice. *Viral immunology*, 29(4), 228-234.
12. Amorim, M. J., & Digard, P. (2006). Influenza A virus and the cell nucleus. *Vaccine*, 24(44-46), 6651-6655.

13. Ananworanich, J., Lee, I. T., Ens, D., Carmona, L., Schaefer, K., Avanesov, A., ... & Paris, R. (2024). Safety and immunogenicity of mRNA-1010, an investigational seasonal influenza vaccine, in healthy adults: final results from a phase 1/2 randomized trial. *The Journal of Infectious Diseases*, jiae329.
14. Antrobus, R. D., Coughlan, L., Berthoud, T. K., Dicks, M. D., Hill, A. V., Lambe, T., & Gilbert, S. C. (2014). Clinical assessment of a novel recombinant simian adenovirus ChAdOx1 as a vectored vaccine expressing conserved Influenza A antigens. *Molecular therapy*, 22(3), 668-674.
15. Antrobus, R. D., Lillie, P. J., Berthoud, T. K., Spencer, A. J., McLaren, J. E., Ladell, K., ... & Gilbert, S. C. (2012). AT cell-inducing influenza vaccine for the elderly: safety and immunogenicity of MVA-NP+ M1 in adults aged over 50 years. *PloS one*, 7(10), e48322.
16. Arevalo, C. P., Bolton, M. J., Le Sage, V., Ye, N., Furey, C., Muramatsu, H., ... & Hensley, S. E. (2022). A multivalent nucleoside-modified mRNA vaccine against all known influenza virus subtypes. *Science*, 378(6622), 899-904.
17. Arunkumar, G. A., McMahon, M., Pavot, V., Aramouni, M., Ioannou, A., Lambe, T., ... & Krammer, F. (2019). Vaccination with viral vectors expressing NP, M1 and chimeric hemagglutinin induces broad protection against influenza virus challenge in mice. *Vaccine*, 37(37), 5567-5577.
18. Assarsson, E., Bui, H. H., Sidney, J., Zhang, Q., Glenn, J., Oseroff, C., ... & Sette, A. (2008). Immunomic analysis of the repertoire of T-cell specificities for influenza A virus in humans. *Journal of virology*, 82(24), 12241-12251.
19. Atsmon, J., Caraco, Y., Ziv-Sefer, S., Shaikevich, D., Abramov, E., Volokhov, I., ... & Ben-Yedidia, T. (2014). Priming by a novel universal influenza vaccine (Multimeric-001)—A gateway for improving immune response in the elderly population. *Vaccine*, 32(44), 5816-5823.
20. Atsmon, J., Kate-Ilovitz, E., Shaikevich, D., Singer, Y., Volokhov, I., Haim, K. Y., & Ben-Yedidia, T. (2012). Safety and immunogenicity of multimeric-001—a novel universal influenza vaccine. *Journal of clinical immunology*, 32, 595-603.
21. Azzeh, M., Flick, R., & Hobom, G. (2001). Functional analysis of the influenza A virus cRNA promoter and construction of an ambisense transcription system. *Virology*, 289(2), 400-410.
22. Babar, M. M. (2015). Protein sequence conservation and stable molecular evolution reveals influenza virus nucleoprotein as a universal druggable target. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 200-210.

23. Banchereau, J., & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392(6673), 245-252.
24. Bancroft, C. T., & Parslow, T. G. (2002). Evidence for segment-nonspecific packaging of the influenza A virus genome. *Journal of virology*, 76(14), 7133-7139.
25. Bargieri, D. Y., Rosa, D. S., Braga, C. J., Carvalho, B. O., Costa, F. T., Espíndola, N. M., ... & Rodrigues, M. M. (2008). New malaria vaccine candidates based on the Plasmodium vivax Merozoite Surface Protein-1 and the TLR-5 agonist Salmonella Typhimurium FlcC flagellin. *Vaccine*, 26(48), 6132-6142.
26. Bates, J. T., Honko, A. N., Graff, A. H., Kock, N. D., & Mizel, S. B. (2008). Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice. *Mechanisms of ageing and development*, 129(5), 271-281.
27. Baudin, F., Petit, I., Weissenhorn, W., & Ruigrok, R. W. (2001). In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. *Virology*, 281(1), 102-108.
28. Baumjohann, D., Preite, S., Reboldi, A., Ronchi, F., Ansel, K. M., Lanzavecchia, A., & Sallusto, F. (2013). Persistent antigen and germinal center B cells sustain T follicular helper cell responses and phenotype. *Immunity*, 38(3), 596-605.
29. Bautista, B. L., Devarajan, P., McKinstry, K. K., Strutt, T. M., Vong, A. M., Jones, M. C., ... & Swain, S. L. (2016). Short-lived antigen recognition but not viral infection at a defined checkpoint programs effector CD4 T cells to become protective memory. *The Journal of Immunology*, 197(10), 3936-3949.
30. Beale, R., Wise, H., Stuart, A., Ravenhill, B. J., Digard, P., & Randow, F. (2014). A LC3-interacting motif in the influenza A virus M2 protein is required to subvert autophagy and maintain virion stability. *Cell host & microbe*, 15(2), 239-247.
31. Beigel J.H. Influenza // Crit Care Med. –2008. – No. 36(9):2660-2666. doi: 10.1097/CCM.0b013e318180b039.
32. Belser, J. A., Barclay, W., Barr, I., Fouchier, R. A., Matsuyama, R., Nishiura, H., ... & Yen, H. L. (2018). Ferrets as models for influenza virus transmission studies and pandemic risk assessments. *Emerging infectious diseases*, 24(6), 965.
33. Belser, J. A., Eckert, A. M., Huynh, T., Gary, J. M., Ritter, J. M., Tumpey, T. M., & Maines, T. R. (2020). A guide for the use of the ferret model for influenza virus infection. *The American journal of pathology*, 190(1), 11-24.
34. Belser, J. A., Eckert, A. M., Tumpey, T. M., & Maines, T. R. (2016). Complexities in ferret influenza virus pathogenesis and transmission models. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(3), 733-744.

35. Beningo, K. A., & Wang, Y. L. (2002). Fc-receptor-mediated phagocytosis is regulated by mechanical properties of the target. *Journal of cell science*, 115(4), 849-856.
36. Berkhoff, E. G. M., Geelhoed-Mieras, M. M., Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Rimmelzwaan, G. F. (2007). Assessment of the extent of variation in influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes by using virus-specific CD8⁺ T-cell clones. *Journal of General Virology*, 88(2), 530-535.
37. Bernstein, D. I., Guptill, J., Naficy, A., Nachbagauer, R., Berlanda-Scorza, F., Feser, J., ... & Krammer, F. (2020). Immunogenicity of chimeric haemagglutinin-based, universal influenza virus vaccine candidates: interim results of a randomised, placebo-controlled, phase 1 clinical trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(1), 80-91.
38. Berthoud, T. K., Hamill, M., Lillie, P. J., Hwenda, L., Collins, K. A., Ewer, K. J., ... & Gilbert, S. C. (2011). Potent CD8⁺ T-cell immunogenicity in humans of a novel heterosubtypic influenza A vaccine, MVA– NP⁺ M1. *Clinical infectious diseases*, 52(1), 1-7.
39. Bessa, J., Schmitz, N., Hinton, H. J., Schwarz, K., Jegerlehner, A., & Bachmann, M. F. (2008). Efficient induction of mucosal and systemic immune responses by virus-like particles administered intranasally: implications for vaccine design. *European journal of immunology*, 38(1), 114-126.
40. Bhatt, S., Holmes, E. C., & Pybus, O. G. (2011). The genomic rate of molecular adaptation of the human influenza A virus. *Molecular biology and evolution*, 28(9), 2443-2451.
41. Bliss, C. M., Nachbagauer, R., Mariottini, C., Cuevas, F., Feser, J., Naficy, A., ... & Coughlan, L. (2024). A chimeric haemagglutinin-based universal influenza virus vaccine boosts human cellular immune responses directed towards the conserved haemagglutinin stalk domain and the viral nucleoprotein. *EBioMedicine*, 104.
42. Bodewes, R., Geelhoed-Mieras, M. M., Wrammert, J., Ahmed, R., Wilson, P. C., Fouchier, R. A., ... & Rimmelzwaan, G. F. (2013). In vitro assessment of the immunological significance of a human monoclonal antibody directed to the influenza a virus nucleoprotein. *Clinical and Vaccine Immunology*, 20(8), 1333-1337.
43. Bommakanti, G., Citron, M. P., Hepler, R. W., Callahan, C., Heidecker, G. J., Najar, T. A., ... & Varadarajan, R. (2010). Design of an HA2-based Escherichia coli expressed influenza immunogen that protects mice from pathogenic challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(31), 13701-13706.
44. Boon, A. C. M., de Mutsert, G., Graus, Y. M. F., Fouchier, R. A. M., Sintnicolaas, K., Osterhaus, A. D. M. E., & Rimmelzwaan, G. F. (2002). Sequence variation in a newly identified HLA-B35-restricted epitope in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology*, 76(5), 2567-2572.

45. Boulo, S., Akarsu, H., Ruigrok, R. W., & Baudin, F. (2007). Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus research*, 124(1-2), 12-21.
46. Bouloy, M., Morgan, M. A., Shatkin, A. J., & Krug, R. M. (1979). Cap and internal nucleotides of reovirus mRNA primers are incorporated into influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Journal of virology*, 32(3), 895-904.
47. Bouloy, M., Plotch, S. J., & Krug, R. M. (1980). Both the 7-methyl and the 2'-O-methyl groups in the cap of mRNA strongly influence its ability to act as primer for influenza virus RNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(7), 3952-3956.
48. Bournazos, S., Gupta, A., & Ravetch, J. V. (2020). The role of IgG Fc receptors in antibody-dependent enhancement. *Nature Reviews Immunology*, 20(10), 633-643.
49. Bouvier, N. M., & Palese, P. (2008). The biology of influenza viruses. *Vaccine*, 26, D49-D53.
50. Broecker, F., Liu, S. T., Suntronwong, N., Sun, W., Bailey, M. J., Nachbagauer, R., ... & Palese, P. (2019). A mosaic hemagglutinin-based influenza virus vaccine candidate protects mice from challenge with divergent H3N2 strains. *npj Vaccines*, 4(1), 31.
51. Bullard, B. L., & Weaver, E. A. (2021). Strategies targeting hemagglutinin as a universal influenza vaccine. *Vaccines*, 9(3), 257.
52. Burdelya, L. G., Krivokrysenko, V. I., Tallant, T. C., Strom, E., Gleiberman, A. S., Gupta, D., ... & Gudkov, A. V. (2008). An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models. *Science*, 320(5873), 226-230.
53. Burleigh, L. M., Calder, L. J., Skehel, J. J., & Steinhauer, D. A. (2005). Influenza A viruses with mutations in the M1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. *Journal of virology*, 79(2), 1262-1270.
54. Butler, C., Ellis, C., Folegatti, P. M., Swayze, H., Allen, J., Bussey, L., ... & Invictus Investigators. (2021). Efficacy and safety of a modified vaccinia Ankara-NP+ M1 vaccine combined with QIV in people aged 65 and older: a randomised controlled clinical trial (INVICTUS). *Vaccines*, 9(8), 851.
55. Carragher, D. M., Kaminski, D. A., Moquin, A., Hartson, L., & Randall, T. D. (2008). A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus. *The Journal of Immunology*, 181(6), 4168-4176.
56. Carrat, F., Vergu, E., Ferguson, N. M., Lemaître, M., Cauchemez, S., Leach, S., & Valleron, A. J. (2008). Time lines of infection and disease in human influenza: a review of volunteer challenge studies. *American journal of epidemiology*, 167(7), 775-785.
57. Carter, D. M., Darby, C. A., Johnson, S. K., Carlock, M. A., Kirchenbaum, G. A., Allen, J. D., ... & Ross, T. M. (2017). Elicitation of protective antibodies against a broad panel of

- H1N1 viruses in ferrets preimmune to historical H1N1 influenza viruses. *Journal of virology*, 91(24), 10-1128.
58. Carter, D. M., Darby, C. A., Lefoley, B. C., Crevar, C. J., Alefantis, T., Oomen, R., ... & Ross, T. M. (2016). Design and characterization of a computationally optimized broadly reactive hemagglutinin vaccine for H1N1 influenza viruses. *Journal of virology*, 90(9), 4720-4734.
 59. Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. (2015, October). The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more. In *Seminars in cell & developmental biology* (Vol. 46, pp. 91-103). Academic Press.
 60. Chen, B. J., Leser, G. P., Jackson, D., & Lamb, R. A. (2008). The influenza virus M2 protein cytoplasmic tail interacts with the M1 protein and influences virus assembly at the site of virus budding. *Journal of virology*, 82(20), 10059-10070.
 61. Chen, J., Wharton, S. A., Weissenhorn, W., Calder, L. J., Hughson, F. M., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (1995). A soluble domain of the membrane-anchoring chain of influenza virus hemagglutinin (HA2) folds in *Escherichia coli* into the low-pH-induced conformation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(26), 12205-12209.
 62. Chen, L., Zanker, D., Xiao, K., Wu, C., Zou, Q., & Chen, W. (2014). Immunodominant CD4⁺ T-cell responses to influenza A virus in healthy individuals focus on matrix 1 and nucleoprotein. *Journal of virology*, 88(20), 11760-11773.
 63. Chen, S., Zheng, D., Li, C., Zhang, W., Xu, W., Liu, X., ... & Chen, Z. (2015). Protection against multiple subtypes of influenza viruses by virus-like particle vaccines based on a hemagglutinin conserved epitope. *BioMed research international*, 2015(1), 901817.
 64. Chen, Z., Li, Y., & Krug, R. M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targetspoly (A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *The EMBO journal*.
 65. Chiu, T. W., Peng, C. J., Chen, M. C., Hsu, M. H., Liang, Y. H., Chiu, C. H., ... & Lee, Y. C. (2020). Constructing conjugate vaccine against *Salmonella Typhimurium* using lipid-A free lipopolysaccharide. *Journal of Biomedical Science*, 27, 1-14.
 66. Cho, K. J., Schepens, B., Seok, J. H., Kim, S., Roose, K., Lee, J. H., ... & Kim, K. H. (2015). Structure of the extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus in complex with a protective monoclonal antibody. *Journal of virology*, 89(7), 3700-3711.
 67. Christensen, S. R., Toulmin, S. A., Griesman, T., Lamerato, L. E., Petrie, J. G., Martin, E. T., ... & Hensley, S. E. (2019). Assessing the protective potential of H1N1 influenza virus hemagglutinin head and stalk antibodies in humans. *Journal of virology*, 93(8), 10-1128.

68. Chuekwon, K., Chu, C. Y., & Cheng, L. T. (2022). N-terminus of flagellin enhances vaccine efficacy against *Actinobacillus pleuropneumoniae*. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 279.
69. Chung, Y. C., Cheng, L. T., Chu, C. Y., Afzal, H., & Doan, T. D. (2024). Flagellin Enhances the Immunogenicity of *Pasteurella multocida* Lipoprotein E Subunit Vaccine. *Avian Diseases*, 68(3), 183-191.
70. Cookenham, T., Lanzer, K. G., Gage, E., Lorenzo, E. C., Carter, D., Coler, R. N., ... & Blackman, M. A. (2020). Vaccination of aged mice with adjuvanted recombinant influenza nucleoprotein enhances protective immunity. *Vaccine*, 38(33), 5256-5267.
71. Corbett, K. S., Moin, S. M., Yassine, H. M., Cagigi, A., Kanekiyo, M., Boyoglu-Barnum, S., ... & Boyington, J. C. (2019). Design of nanoparticulate group 2 influenza virus hemagglutinin stem antigens that activate unmutated ancestor B cell receptors of broadly neutralizing antibody lineages. *MBio*, 10(1), 10-1128.
72. Corti, D., Suguitan, A. L., Pinna, D., Silacci, C., Fernandez-Rodriguez, B. M., Vanzetta, F., ... & Lanzavecchia, A. (2010). Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *The Journal of clinical investigation*, 120(5), 1663-1673.
73. Cox, R. (2013). Correlates of protection to influenza virus, where do we go from here?. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 9(2), 405-408.
74. Crevar, C. J., Carter, D. M., Lee, K. Y., & Ross, T. M. (2015). Cocktail of H5N1 COBRA HA vaccines elicit protective antibodies against H5N1 viruses from multiple clades. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 11(3), 572-583.
75. Crotty, S. (2019). T follicular helper cell biology: a decade of discovery and diseases. *Immunity*, 50(5), 1132-1148.
76. Crow, M., Deng, T., Addley, M., & Brownlee, G. G. (2004). Mutational analysis of the influenza virus cRNA promoter and identification of nucleotides critical for replication. *Journal of virology*, 78(12), 6263-6270.
77. Cuadros, C., Lopez-Hernandez, F. J., Dominguez, A. L., McClelland, M., & Lustgarten, J. (2004). Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. *Infection and immunity*, 72(5), 2810-2816.
78. Cunningham, A. F., Khan, M., Ball, J., Toellner, K. M., Serre, K., Mohr, E., & MacLennan, I. C. (2004). Responses to the soluble flagellar protein FliC are Th2, while those to FliC on *Salmonella* are Th1. *European journal of immunology*, 34(11), 2986-2995.

79. De Boer, G. F., Back, W., & Osterhaus, A. D. M. E. (1990). An ELISA for detection of antibodies against influenza A nucleoprotein in humans and various animal species. *Archives of virology*, 115, 47-61.
80. De Filette, M., Fiers, W., Martens, W., Birkett, A., Ramne, A., Löwenadler, B., ... & Saelens, X. (2006). Improved design and intranasal delivery of an M2e-based human influenza A vaccine. *Vaccine*, 24(44-46), 6597-6601.
81. De Filette, M., Martens, W., Roose, K., Deroo, T., Vervalle, F., Bentahir, M., ... & Saelens, X. (2008). An influenza A vaccine based on tetrameric ectodomain of matrix protein 2. *Journal of Biological Chemistry*, 283(17), 11382-11387.
82. de Vries, R. D., & Rimmelzwaan, G. F. (2016). Viral vector-based influenza vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 12(11), 2881-2901.
83. de Vries, R. D., Altenburg, A. F., & Rimmelzwaan, G. F. (2015). Universal influenza vaccines, science fiction or soon reality?. *Expert review of vaccines*, 14(10), 1299-1301.
84. Deere, J. D., Chang, W. W., Castillo, L. D., Schmidt, K. A., Kieu, H. T., Renzette, N., ... & Sparger, E. E. (2016). Utilizing a TLR5-adjuvanted cytomegalovirus as a lentiviral vaccine in the nonhuman primate model for AIDS. *PloS one*, 11(5), e0155629.
85. Del Campo, J., Bouley, J., Chevandier, M., Rousset, C., Haller, M., Indalecio, A., ... & Nicolas, F. (2021). OVX836 heptameric nucleoprotein vaccine generates lung tissue-resident memory CD8⁺ T-cells for cross-protection against influenza. *Frontiers in immunology*, 12, 678483.
86. Del Campo, J., Pizzorno, A., Djebali, S., Bouley, J., Haller, M., Pérez-Vargas, J., ... & Hill, F. (2019). OVX836 a recombinant nucleoprotein vaccine inducing cellular responses and protective efficacy against multiple influenza A subtypes. *NPJ vaccines*, 4(1), 4.
87. Delaney, K. N., Phipps, J. P., Johnson, J. B., & Mizel, S. B. (2010). A recombinant flagellin-poxvirus fusion protein vaccine elicits complement-dependent protection against respiratory challenge with vaccinia virus in mice. *Viral immunology*, 23(2), 201-210.
88. Demminger, D. E., Walz, L., Dietert, K., Hoffmann, H., Planz, O., Gruber, A. D., ... & Wolff, T. (2020). Adeno-associated virus-vectored influenza vaccine elicits neutralizing and Fcγ receptor-activating antibodies. *EMBO molecular medicine*, 12(5), e10938.
89. Deng, L., Mohan, T., Chang, T. Z., Gonzalez, G. X., Wang, Y., Kwon, Y. M., ... & Wang, B. Z. (2018). Double-layered protein nanoparticles induce broad protection against divergent influenza A viruses. *Nature communications*, 9(1), 359.
90. Deng, T., Vreede, F. T., & Brownlee, G. G. (2006). Different de novo initiation strategies are used by influenza virus RNA polymerase on its cRNA and viral RNA promoters during viral RNA replication. *Journal of virology*, 80(5), 2337-2348.

91. Dhar, R., Chanock, R. M., & Lai, C. J. (1980). Nonviral oligonucleotides at the 5' terminus of cytoplasmic influenza viral mRNA deduced from cloned complete genomic sequences. *Cell*, 21(2), 495-500.
92. Dicks, M. D., Spencer, A. J., Edwards, N. J., Wadell, G., Bojang, K., Gilbert, S. C., ... & Cottingham, M. G. (2012). A novel chimpanzee adenovirus vector with low human seroprevalence: improved systems for vector derivation and comparative immunogenicity. *PloS one*, 7(7), e40385.
93. Diefenbacher, M., Tan, T. J., Bauer, D. L., Stadtmueller, B. M., Wu, N. C., & Brooke, C. B. (2022). Interactions between influenza A virus nucleoprotein and gene segment untranslated regions facilitate selective modulation of viral gene expression. *Journal of virology*, 96(10), e00205-22.
94. DiLillo, D. J., Palese, P., Wilson, P. C., & Ravetch, J. V. (2016). Broadly neutralizing anti-influenza antibodies require Fc receptor engagement for in vivo protection. *The Journal of clinical investigation*, 126(2), 605-610.
95. DiLillo, D. J., Tan, G. S., Palese, P., & Ravetch, J. V. (2014). Broadly neutralizing hemagglutinin stalk-specific antibodies require FcγR interactions for protection against influenza virus in vivo. *Nature medicine*, 20(2), 143-151.
96. DiPiazza, A. T., Fan, S., Rattan, A., DeDiego, M. L., Chaves, F., Neumann, G., ... & Sant, A. J. (2019). A novel vaccine strategy to overcome poor immunogenicity of avian influenza vaccines through mobilization of memory CD4 T cells established by seasonal influenza. *The Journal of Immunology*, 203(6), 1502-1508.
97. DiPiazza, A.T., Richards, K. A., Liu, W. C., Albrecht, R. A., & Sant, A. J. Analyses of cellular immune responses in ferrets following influenza virus infection. *Methods // Mol Biol.* – 2018. – 1836:513-530. doi: 10.1007/978-1-4939-8678-1_24.
98. Doan, T. D., Wang, H. Y., Ke, G. M., & Cheng, L. T. (2020). N-terminus of flagellin fused to an antigen improves vaccine efficacy against *pasteurella multocida* infection in chickens. *Vaccines*, 8(2), 283.
99. Du Clos, T. W., & Mold, C. (2011). Pentraxins (CRP, SAP) in the process of complement activation and clearance of apoptotic bodies through Fcγ receptors. *Current opinion in organ transplantation*, 16(1), 15-20.
100. Duan, T., Du, Y., Xing, C., Wang, H. Y., & Wang, R. F. (2022). Toll-like receptor signaling and its role in cell-mediated immunity. *Frontiers in Immunology*, 13, 812774.
101. Eggink, D., Goff, P. H., & Palese, P. (2014). Guiding the immune response against influenza virus hemagglutinin toward the conserved stalk domain by hyperglycosylation of the globular head domain. *Journal of virology*, 88(1), 699-704.

102. Ekiert, D. C., Friesen, R. H., Bhabha, G., Kwaks, T., Jongeneelen, M., Yu, W., ... & Goudsmit, J. (2011). A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science*, 333(6044), 843-850.
103. El Bakkouri, K., Descamps, F., De Filette, M., Smet, A., Festjens, E., Birkett, A., ... & Saelens, X. (2011). Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *The Journal of Immunology*, 186(2), 1022-1031.
104. Eldi, P., Chaudhri, G., Nutt, S. L., Newsome, T. P., & Karupiah, G. (2019). Viral replicative capacity, antigen availability via hematogenous spread, and high TFH: TFR ratios drive induction of potent neutralizing antibody responses. *Journal of Virology*, 93(6), 10-1128.
105. Eliasson, D. G., Omokanye, A., Schön, K., Wenzel, U. A., Bernasconi, V., Bemark, M., ... & Lycke, N. (2018). M2e-tetramer-specific memory CD4 T cells are broadly protective against influenza infection. *Mucosal immunology*, 11(1), 273-289.
106. Ellebedy, A. H., & Webby, R. J. (2009). Influenza vaccines. *Vaccine*, 27, D65-D68.
107. Elliott, S. T., Keaton, A. A., Chu, J. D., Reed, C. C., Garman, B., Patel, A., ... & Weiner, D. B. (2018). A synthetic micro-consensus DNA vaccine generates comprehensive influenza A H3N2 immunity and protects mice against lethal challenge by multiple H3N2 viruses. *Human gene therapy*, 29(9), 1044-1055.
108. Elton, D., Amorim, M. J., Medcalf, L., & Digard, P. (2005). 'Genome gating'; polarized intranuclear trafficking of influenza virus RNPs. *Biology letters*, 1(2), 113-117.
109. Enami, M., Sharma, G., Benham, C., & Palese, P. (1991). An influenza virus containing nine different RNA segments. *Virology*, 185(1), 291-298.
110. Engelhardt, O. G., Smith, M., & Fodor, E. (2005). Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. *Journal of virology*, 79(9), 5812-5818.
111. Enkirch, T., & Von Messling, V. (2015). Ferret models of viral pathogenesis. *Virology*, 479, 259-270.
112. Epstein, S. L. (2006). Prior H1N1 influenza infection and susceptibility of Cleveland Family Study participants during the H2N2 pandemic of 1957: an experiment of nature. *The Journal of infectious diseases*, 193(1), 49-53.
113. Epstein, S. L., & Price, G. E. (2010). Cross-protective immunity to influenza A viruses. *Expert review of vaccines*, 9(11), 1325-1341.
114. Epstein, S. L., Kong, W. P., Misplon, J. A., Lo, C. Y., Tumpey, T. M., Xu, L., & Nabel, G. J. (2005). Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine*, 23(46-47), 5404-5410.

115. Erbeling, E. J., Post, D. J., Stemmy, E. J., Roberts, P. C., Augustine, A. D., Ferguson, S., ... & Fauci, A. S. (2018). A universal influenza vaccine: the strategic plan for the National Institute of Allergy and Infectious Diseases. *The Journal of infectious diseases*, 218(3), 347-354.
116. Ermler, M. E., Kirkpatrick, E., Sun, W., Hai, R., Amanat, F., Chromikova, V., ... & Krammer, F. (2017). Chimeric hemagglutinin constructs induce broad protection against influenza B virus challenge in the mouse model. *Journal of virology*, 91(12), 10-1128.
117. Faham, A., & Altin, J. G. (2010). Antigen-containing liposomes engrafted with flagellin-related peptides are effective vaccines that can induce potent antitumor immunity and immunotherapeutic effect. *The Journal of Immunology*, 185(3), 1744-1754.
118. Fan, J., Liang, X., Horton, M. S., Perry, H. C., Citron, M. P., Heidecker, G. J., ... & Shiver, J. W. (2004). Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine*, 22(23-24), 2993-3003.
119. Farshidi, N., Ghaedi, T., Hassaniyazad, M., Eftekhari, E., Gouklani, H., Farshidi, H., ... & Ahmadi, K. (2022). Preparation and pre-clinical evaluation of flagellin-adjuvanted NOM vaccine candidate formulated with Spike protein against SARS-CoV-2 in mouse model. *Microbial Pathogenesis*, 171, 105736
120. Feng, J., Zhang, M., Mozdzanowska, K., Zharikova, D., Hoff, H., Wunner, W., ... & Gerhard, W. (2006). Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virology journal*, 3, 1-13.
121. Fields, B. N. (2013). *Fields Virology*, ; Knipe, DM, Howley, PM, Eds.
122. Flick, R., Neumann, G., Hoffmann, E., Neumeier, E., & Hobom, G. (1996). Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *Rna*, 2(10), 1046-1057.
123. Flynn, J. A., Weber, T., Cejas, P. J., Cox, K. S., Touch, S., Austin, L. A., ... & Zhang, L. (2022). Characterization of humoral and cell-mediated immunity induced by mRNA vaccines expressing influenza hemagglutinin stem and nucleoprotein in mice and nonhuman primates. *Vaccine*, 40(32), 4412-4423.
124. Fodor, E., Pritlove, D. C., & Brownlee, G. G. (1994). The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. *Journal of virology*, 68(6), 4092-4096.
125. Francis, J. N., Bunce, C. J., Horlock, C., Watson, J. M., Warrington, S. J., Georges, B., & Brown, C. B. (2015). A novel peptide-based pan-influenza A vaccine: a double blind, randomised clinical trial of immunogenicity and safety. *Vaccine*, 33(2), 396-402.
126. Freyn, A. W., da Silva, J. R., Rosado, V. C., Bliss, C. M., Pine, M., Mui, B. L., ... & Nachbagauer, R. (2020). A multi-targeting, nucleoside-modified mRNA influenza virus vaccine provides broad protection in mice. *Molecular Therapy*, 28(7), 1569-1584.

127. Fujii, K., Fujii, Y., Noda, T., Muramoto, Y., Watanabe, T., Takada, A., ... & Kawaoka, Y. (2005). Importance of both the coding and the segment-specific noncoding regions of the influenza A virus NS segment for its efficient incorporation into virions. *Journal of virology*, 79(6), 3766-3774.
128. Fujii, Y., Goto, H., Watanabe, T., Yoshida, T., & Kawaoka, Y. (2003). Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(4), 2002-2007.
129. Fujimoto, Y., Tomioka, Y., Takakuwa, H., Uechi, G. I., Yabuta, T., Ozaki, K., ... & Ono, E. (2016). Cross-protective potential of anti-nucleoprotein human monoclonal antibodies against lethal influenza A virus infection. *Journal of General Virology*, 97(9), 2104-2116.
130. Gasteiger E., Hoogland C., Gattiker A., Duvaud S., Wilkins M.R., Appel R.D., Bairoch A.; Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server; (In) John M. Walker (ed): The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press (2005). pp. 571-607
131. Gewirtz, A. T., Navas, T. A., Lyons, S., Godowski, P. J., & Madara, J. L. (2001). Cutting edge: bacterial flagellin activates basolaterally expressed TLR5 to induce epithelial proinflammatory gene expression. *The Journal of Immunology*, 167(4), 1882-1885.
132. Gilbert, P. B., Fong, Y., Juraska, M., Carpp, L. N., Monto, A. S., Martin, E. T., & Petrie, J. G. (2019). HAI and NAI titer correlates of inactivated and live attenuated influenza vaccine efficacy. *BMC infectious diseases*, 19, 1-12.
133. Giles, B. M., & Ross, T. M. (2011). A computationally optimized broadly reactive antigen (COBRA) based H5N1 VLP vaccine elicits broadly reactive antibodies in mice and ferrets. *Vaccine*, 29(16), 3043-3054.
134. Giles, B. M., Bissel, S. J., DeAlmeida, D. R., Wiley, C. A., & Ross, T. M. (2012). Antibody breadth and protective efficacy are increased by vaccination with computationally optimized hemagglutinin but not with polyvalent hemagglutinin-based H5N1 virus-like particle vaccines. *Clinical and Vaccine Immunology*, 19(2), 128-139.
135. Giles, B. M., Crevar, C. J., Carter, D. M., Bissel, S. J., Schultz-Cherry, S., Wiley, C. A., & Ross, T. M. (2012). A computationally optimized hemagglutinin virus-like particle vaccine elicits broadly reactive antibodies that protect nonhuman primates from H5N1 infection. *The Journal of infectious diseases*, 205(10), 1562-1570.
136. Gong, X., Yin, H., Shi, Y., Guan, S., He, X., Yang, L., ... & Shan, Y. (2016). Conserved stem fragment from H3 influenza hemagglutinin elicits cross-clade neutralizing antibodies through stalk-targeted blocking of conformational change during membrane fusion. *Immunology Letters*, 172, 11-20.

137. González-Stegmaier, R., Aguirre, A., Cárcamo, C., Aguila-Torres, P., & Villarroel-Espíndola, F. (2023). Recombinant Domain of Flagellin Promotes In Vitro a Chemotactic Inflammatory Profile in Human Immune Cells Independently of a Dendritic Cell Phenotype. *Molecules*, 28(5), 2394.
138. Gooch, K. E., Marriott, A. C., Ryan, K. A., Yeates, P., Slack, G. S., Brown, P. J., ... & Carroll, M. W. (2019). Heterosubtypic cross-protection correlates with cross-reactive interferon-gamma-secreting lymphocytes in the ferret model of influenza. *Scientific reports*, 9(1), 2617.
139. Grant, E., Wu, C., Chan, K. F., Eckle, S., Bharadwaj, M., Zou, Q. M., ... & Chen, W. (2013). Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immunodominant CD8⁺ T-cell responses. *Immunology and cell biology*, 91(2), 184-194.
140. Graves, P. N., Schulman, J. L., Young, J. F., & Palese, P. (1983). Preparation of influenza virus subviral particles lacking the HA1 subunit of hemagglutinin: unmasking of cross-reactive HA2 determinants. *Virology*, 126(1), 106-116.
141. Guo, J., Chen, X., Guo, Y., Liu, M., Li, P., Tao, Y., ... & Sun, F. (2024). Real-world effectiveness of seasonal influenza vaccination and age as effect modifier: A systematic review, meta-analysis and meta-regression of test-negative design studies. *Vaccine*.
142. Guo, L., Zheng, M., Ding, Y., Li, D., Yang, Z., Wang, H., ... & Chen, Z. (2010). Protection against multiple influenza A virus subtypes by intranasal administration of recombinant nucleoprotein. *Archives of virology*, 155, 1765-1775.
143. Guruprasad, K., Reddy, B. B., & Pandit, M. W. (1990). Correlation between stability of a protein and its dipeptide composition: a novel approach for predicting in vivo stability of a protein from its primary sequence. *Protein Engineering, Design and Selection*, 4(2), 155-161.
144. Hagen, M., Chung, T. D., Butcher, J. A., & Krystal, M. (1994). Recombinant influenza virus polymerase: requirement of both 5' and 3' viral ends for endonuclease activity. *Journal of virology*, 68(3), 1509-1515.
145. Hajam, I. A., Dar, P. A., ChandraSekar, S., Nanda, R. K., Kishore, S., Bhanuprakash, V., & Ganesh, K. (2013). Co-administration of flagellin augments immune responses to inactivated foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigen. *Research in veterinary science*, 95(3), 936-941.
146. Hayward, A. C., Wang, L., Goonetilleke, N., Frigaszy, E. B., Bermingham, A., Copas, A., ... & McMichael, A. J. (2015). Natural T cell-mediated protection against seasonal and pandemic influenza. Results of the flu watch cohort study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 191(12), 1422-1431.

147. Hazenbos, W. L., Gessner, J. E., Hofhuis, F. M., Kuipers, H., Meyer, D., Heijnen, I. A., ... & Verbeek, J. S. (1996). Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in FcγRIII (CD16) deficient mice. *Immunity*, 5(2), 181-188.
148. He, W., Chen, C. J., Mullarkey, C. E., Hamilton, J. R., Wong, C. K., Leon, P. E., ... & Tan, G. S. (2017). Alveolar macrophages are critical for broadly-reactive antibody-mediated protection against influenza A virus in mice. *Nature communications*, 8(1), 846.
149. Heinen, P. P., Rijsewijk, F. A., de Boer-Luijze, E. A., & Bianchi, A. T. (2002). Vaccination of pigs with a DNA construct expressing an influenza virus M2–nucleoprotein fusion protein exacerbates disease after challenge with influenza A virus. *Journal of General Virology*, 83(8), 1851-1859.
150. Helft, J., Manicassamy, B., Guermonprez, P., Hashimoto, D., Silvin, A., Agudo, J., ... & Merad, M. (2012). Cross-presenting CD103+ dendritic cells are protected from influenza virus infection. *The Journal of clinical investigation*, 122(11), 4037-4047.
151. Hemmink, J. D., Whittaker, C. J., & Shelton, H. A. (2018). Animal models in influenza research. In *Influenza Virus: Methods and Protocols* (pp. 401-430). New York, NY: Springer New York.
152. Hervé, P. L., Raliou, M., Bourdieu, C., Dubuquoy, C., Petit-Camurdan, A., Bertho, N., ... & Riffault, S. (2014). A novel subnucleocapsid nanoplatform for mucosal vaccination against influenza virus that targets the ectodomain of matrix protein 2. *Journal of virology*, 88(1), 325-338.
153. Holsinger, L. J., & Alams, R. (1991). Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology*, 183(1), 32-43.
154. Honko, A. N., & Mizel, S. B. (2005). Effects of flagellin on innate and adaptive immunity. *Immunologic research*, 33, 83-101.
155. Honko, A. N., Sriranganathan, N., Lees, C. J., & Mizel, S. B. (2006). Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infection and immunity*, 74(2), 1113-1120.
156. Hu, Y., Sneyd, H., Dekant, R., & Wang, J. (2017). Influenza A virus nucleoprotein: a highly conserved multi-functional viral protein as a hot antiviral drug target. *Current topics in medicinal chemistry*, 17(20), 2271-2285.
157. Huang, Q., Sivaramakrishna, R. P., Ludwig, K., Korte, T., Böttcher, C., & Herrmann, A. (2003). Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1614(1), 3-13.

158. Huleatt, J. W., Foellmer, H. G., Hewitt, D., Tang, J., Desai, P., Price, A., ... & McDonald, W. F. (2007). A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *The Journal of infectious diseases*, 195(11), 1607-1617.
159. Huleatt, J. W., Jacobs, A. R., Tang, J., Desai, P., Kopp, E. B., Huang, Y., ... & Powell, T. J. (2007). Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine*, 25(4), 763-775.
160. Huleatt, J. W., Nakaar, V., Desai, P., Huang, Y., Hewitt, D., Jacobs, A., ... & Powell, T. J. (2008). Potent immunogenicity and efficacy of a universal influenza vaccine candidate comprising a recombinant fusion protein linking influenza M2e to the TLR5 ligand flagellin. *Vaccine*, 26(2), 201-214.
161. Hutchinson, E. C., Curran, M. D., Read, E. K., Gog, J. R., & Digard, P. (2008). Mutational analysis of cis-acting RNA signals in segment 7 of influenza A virus. *Journal of virology*, 82(23), 11869-11879.
162. Ibanez, L. I., Roose, K., De Filette, M., Schotsaert, M., De Sloovere, J., Roels, S., ... & Saelens, X. (2013). M2e-displaying virus-like particles with associated RNA promote T helper 1 type adaptive immunity against influenza A. *PloS one*, 8(3), e59081.
163. Ichinohe, T., Pang, I. K., & Iwasaki, A. (2010). Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nature immunology*, 11(5), 404-410.
164. Impagliazzo, A., Milder, F., Kuipers, H., Wagner, M. V., Zhu, X., Hoffman, R. M., ... & Radošević, K. (2015). A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science*, 349(6254), 1301-1306.
165. Isakova-Sivak, I., Korenkov, D., Smolonogina, T., Kotomina, T., Donina, S., Matyushenko, V., ... & Rudenko, L. (2018). Broadly protective anti-hemagglutinin stalk antibodies induced by live attenuated influenza vaccine expressing chimeric hemagglutinin. *Virology*, 518, 313-323.
166. Isakova-Sivak, I., Korenkov, D., Smolonogina, T., Tretiak, T., Donina, S., Rekstin, A., ... & Rudenko, L. (2017). Comparative studies of infectivity, immunogenicity and cross-protective efficacy of live attenuated influenza vaccines containing nucleoprotein from cold-adapted or wild-type influenza virus in a mouse model. *Virology*, 500, 209-217.
167. Isakova-Sivak, I., Matyushenko, V., Kotomina, T., Kiseleva, I., Krutikova, E., Donina, S., ... & Rudenko, L. (2019). Sequential immunization with universal live attenuated influenza vaccine candidates protects ferrets against a high-dose heterologous virus challenge. *Vaccines*, 7(3), 61.
168. Iwasaki, A., & Medzhitov, R. (2004). Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nature immunology*, 5(10), 987-995.

169. Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Noda, T., Kiso, M., Maeda, J., Watanabe, S., ... & Kawaoka, Y. (2006). The cytoplasmic tail of the influenza A virus M2 protein plays a role in viral assembly. *Journal of virology*, 80(11), 5233-5240.
170. Jakubzick, C. V., Randolph, G. J., & Henson, P. M. (2017). Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. *Nature Reviews Immunology*, 17(6), 349-362.
171. James G. , Fox R., Marini P. Biology and Diseases of the Ferret, Third Edition, John Wiley & Sons, Inc. – 2014. – P. 852.
172. Jang, Y. H., & Seong, B. L. (2019). The quest for a truly universal influenza vaccine. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 9, 344.
173. Janulíková, J., Staneková, Z., Mucha, V., Kostolanský, F., & Varečková, E. (2012). Two distinct regions of HA2 glycopolypeptide of influenza virus hemagglutinin elicit cross-protective immunity against influenza. *Acta Virologica*, 56(3), 169-176.
174. Jegaskanda, S. (2018). The potential role of Fc-receptor functions in the development of a universal influenza vaccine. *Vaccines*, 6(2), 27.
175. Jegaskanda, S., Amarasena, T. H., Laurie, K. L., Tan, H. X., Butler, J., Parsons, M. S., ... & Kent, S. J. (2013). Standard trivalent influenza virus protein vaccination does not prime antibody-dependent cellular cytotoxicity in macaques. *Journal of virology*, 87(24), 13706-13718.
176. Jegaskanda, S., Co, M. D. T., Cruz, J., Subbarao, K., Ennis, F. A., & Terajima, M. (2017). Induction of H7N9-cross-reactive antibody-dependent cellular cytotoxicity antibodies by human seasonal influenza A viruses that are directed toward the nucleoprotein. *The Journal of infectious diseases*, 215(5), 818-823.
177. Jegaskanda, S., Job, E. R., Kramski, M., Laurie, K., Isitman, G., de Rose, R., ... & Kent, S. J. (2013). Cross-reactive influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity antibodies in the absence of neutralizing antibodies. *The Journal of Immunology*, 190(4), 1837-1848.
178. Jelley-Gibbs, D. M., Brown, D. M., Dibble, J. P., Haynes, L., Eaton, S. M., & Swain, S. L. (2005). Unexpected prolonged presentation of influenza antigens promotes CD4 T cell memory generation. *Journal of Experimental Medicine*, 202(5), 697-706.
179. Johnson-Delaney, C. A., & Orosz, S. E. (2011). Ferret respiratory system: clinical anatomy, physiology, and disease. *Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice*, 14(2), 357-367.
180. Joshi, L. R., Knudsen, D., Piñeyro, P., Dhakal, S., Renukaradhya, G. J., & Diel, D. G. (2021). Protective efficacy of an orf virus-vector encoding the hemagglutinin and the nucleoprotein of influenza A virus in swine. *Frontiers in Immunology*, 12, 747574.

181. Jung, H. E., & Lee, H. K. (2020). Host protective immune responses against influenza A virus infection. *Viruses*, 12(5), 504.
182. Juno, J. A., Van Bockel, D., Kent, S. J., Kelleher, A. D., Zaunders, J. J., & Munier, C. M. L. (2017). Cytotoxic CD4 T cells—friend or foe during viral infection?. *Frontiers in immunology*, 8, 19.
183. Kallewaard, N. L., Corti, D., Collins, P. J., Neu, U., McAuliffe, J. M., Benjamin, E., ... & Skehel, J. J. (2016). Structure and function analysis of an antibody recognizing all influenza A subtypes. *Cell*, 166(3), 596-608.
184. Karam, M. R. A., Oloomi, M., Mahdavi, M., Habibi, M., & Bouzari, S. (2013). Vaccination with recombinant FimH fused with flagellin enhances cellular and humoral immunity against urinary tract infection in mice. *Vaccine*, 31(8), 1210-1216.
185. Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*. 2015 Jun;10(6):845-58
186. Khim, K., Bang, Y. J., Puth, S., Choi, Y., Lee, Y. S., Jeong, K., ... & Rhee, J. H. (2021). Deimmunization of flagellin for repeated administration as a vaccine adjuvant. *npj Vaccines*, 6(1), 116.
187. Knossow, M., & Skehel, J. J. (2006). Variation and infectivity neutralization in influenza. *Immunology*, 119(1), 1-7.
188. Kobayashi, K. S., & Van Den Elsen, P. J. (2012). NLRC5: a key regulator of MHC class I-dependent immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 12(12), 813-820.
189. Kolpe, A., Schepens, B., Fiers, W., & Saelens, X. (2017). M2-based influenza vaccines: recent advances and clinical potential. *Expert review of vaccines*, 16(2), 123-136.
190. Kolpe, A., Schepens, B., Fiers, W., & Saelens, X. (2017). M2-based influenza vaccines: recent advances and clinical potential. *Expert review of vaccines*, 16(2), 123-136.
191. Koutsakos, M., Nguyen, T. H., & Kedzierska, K. (2019). With a little help from T follicular helper friends: humoral immunity to influenza vaccination. *The Journal of Immunology*, 202(2), 360-367.
192. Krammer, F. (2019). The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nature Reviews Immunology*, 19(6), 383-397.
193. Krammer, F., & Palese, P. (2013). Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Current opinion in virology*, 3(5), 521-530.
194. Krammer, F., García-Sastre, A., & Palese, P. (2018). Is it possible to develop a “universal” influenza virus vaccine? Potential target antigens and critical aspects for a universal influenza vaccine. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 10(7), a028845.

195. Krammer, F., Hai, R., Yondola, M., Tan, G. S., Leyva-Grado, V. H., Ryder, A. B., ... & Albrecht, R. A. (2014). Assessment of influenza virus hemagglutinin stalk-based immunity in ferrets. *Journal of virology*, 88(6), 3432-3442.
196. Krammer, F., Weir, J. P., Engelhardt, O., Katz, J. M., & Cox, R. J. (2020). Meeting report and review: Immunological assays and correlates of protection for next-generation influenza vaccines. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 14(2), 237-243.
197. Kreijtz, J. H., Wiersma, L. C., De Gruyter, H. L., Vogelzang-van Trierum, S. E., van Amerongen, G., Stittelaar, K. J., ... & Rimmelzwaan, G. F. (2015). A single immunization with modified vaccinia virus ankara-based influenza virus H7 vaccine affords protection in the Influenza A (H7N9) pneumonia ferret model. *The Journal of infectious diseases*, 211(5), 791-800.
198. Krischuns, T., Lukarska, M., Naffakh, N., & Cusack, S. (2021). Influenza virus RNA-dependent RNA polymerase and the host transcriptional apparatus. *Annual Review of Biochemistry*, 90(1), 321-348.
199. Krug, R. M., Broni, B. A., & Bouloy, M. (1979). Are the 5' ends of influenza viral mRNAs synthesized in vivo donated by host mRNAs?. *Cell*, 18(2), 329-334.
200. Kumagai, Y., Takeuchi, O., Kato, H., Kumar, H., Matsui, K., Morii, E., ... & Akira, S. (2007). Alveolar macrophages are the primary interferon- α producer in pulmonary infection with RNA viruses. *Immunity*, 27(2), 240-252.
201. Kumar, A., Hazlett, L. D., & Yu, F. S. X. (2008). Flagellin suppresses the inflammatory response and enhances bacterial clearance in a murine model of *Pseudomonas aeruginosa* keratitis. *Infection and immunity*, 76(1), 89-96.
202. Kumar, H., Kawai, T., & Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *International reviews of immunology*, 30(1), 16-34.
203. Kumar, S., Sunagar, R., & Gosselin, E. (2019). Bacterial protein toll-like-receptor agonists: a novel perspective on vaccine adjuvants. *Frontiers in immunology*, 10, 1144.
204. Kwak, C., Nguyen, Q. T., Kim, J., Kim, T. H., & Poo, H. (2020). Influenza chimeric protein (3M2e-3HA2-NP) adjuvanted with PGA/Alum confers cross-protection against heterologous influenza a viruses. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 31(2), 304.
205. Kyte, J., & Doolittle, R. F. (1982). A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1), 105-132.
206. L'Huillier, A. G., Ferreira, V. H., Hirzel, C., Nellimarla, S., Ku, T., Natori, Y., ... & Kumar, D. (2020). T-cell responses following natural influenza infection or vaccination in solid organ transplant recipients. *Scientific reports*, 10(1), 10104.

207. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680–685.
208. Lai, S., Qin, Y., Cowling, B. J., Ren, X., Wardrop, N. A., Gilbert, M., ... & Yu, H. (2016). Global epidemiology of avian influenza A H5N1 virus infection in humans, 1997–2015: a systematic review of individual case data. *The Lancet infectious diseases*, 16(7), e108-e118.
209. Lamb, R. A., & Lai, C. J. (1981). Conservation of the influenza virus membrane protein (M1) amino acid sequence and an open reading frame of RNA segment 7 encoding a second protein (M2) in H1N1 and H3N2 strains. *Virology*, 112(2), 746-751.
210. LaMere, M. W., Lam, H. T., Moquin, A., Haynes, L., Lund, F. E., Randall, T. D., & Kaminski, D. A. (2011). Contributions of antinucleoprotein IgG to heterosubtypic immunity against influenza virus. *The Journal of Immunology*, 186(7), 4331-4339.
211. Layton, S. L., Kapczynski, D. R., Higgins, S., Higgins, J., Wolfenden, A. D., Liljebjelke, K. A., ... & Cole, K. (2009). Vaccination of chickens with recombinant Salmonella expressing M2e and CD154 epitopes increases protection and decreases viral shedding after low pathogenic avian influenza challenge. *Poultry Science*, 88(11), 2244-2252.
212. Le, T., Sun, C., Chang, J., Zhang, G., & Yin, X. (2022). mRNA vaccine development for emerging animal and zoonotic diseases. *Viruses*, 14(2), 401.
213. Lee, I. T., Nachbagauer, R., Ensz, D., Schwartz, H., Carmona, L., Schaefer, K., ... & Paris, R. (2023). Safety and immunogenicity of a phase 1/2 randomized clinical trial of a quadrivalent, mRNA-based seasonal influenza vaccine (mRNA-1010) in healthy adults: interim analysis. *Nature communications*, 14(1), 3631.
214. Lee, J. S., Chowdhury, M. Y., Moon, H. J., Choi, Y. K., Talactac, M. R., Kim, J. H., ... & Kim, C. J. (2013). The highly conserved HA2 protein of the influenza A virus induces a cross protective immune response. *Journal of Virological Methods*, 194(1-2), 280-288.
215. Lee, J., Paparoditis, P., Horton, A. P., Frühwirth, A., McDaniel, J. R., Jung, J., ... & Georgiou, G. (2019). Persistent antibody clonotypes dominate the serum response to influenza over multiple years and repeated vaccinations. *Cell host & microbe*, 25(3), 367-376.
216. Lee, S. E., Hong, S. H., Verma, V., Lee, Y. S., Duong, T. M. N., Jeong, K., ... & Rhee, J. H. (2016). Flagellin is a strong vaginal adjuvant of a therapeutic vaccine for genital cancer. *Oncoimmunology*, 5(2), e1081328.
217. Lee, S. E., Kim, S. Y., Jeong, B. C., Kim, Y. R., Bae, S. J., Ahn, O. S., ... & Rhee, J. H. (2006). A bacterial flagellin, *Vibrio vulnificus* FlaB, has a strong mucosal adjuvant activity to induce protective immunity. *Infection and immunity*, 74(1), 694-702.

218. Lee, S. Y., Kang, J. O., & Chang, J. (2019). Nucleoprotein vaccine induces cross-protective cytotoxic T lymphocytes against both lineages of influenza B virus. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 8(1), 54-63.
219. Lee, S., Yeung, K. K., & Watts, T. H. (2024). Tissue-resident memory T cells in protective immunity to influenza virus. *Current Opinion in Virology*, 65, 101397.
220. Lee, Y. N., Kim, M. C., Lee, Y. T., Kim, Y. J., & Kang, S. M. (2015). Mechanisms of cross-protection by influenza virus M2-based vaccines. *Immune network*, 15(5), 213-221.
221. Leroux-Roels, I., Willems, P., Waerlop, G., Janssens, Y., Tourneur, J., De Boever, F., ... & Le Vert, A. (2023). Immunogenicity, safety, and preliminary efficacy evaluation of OVX836, a nucleoprotein-based universal influenza A vaccine candidate: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2a trial. *The Lancet Infectious Diseases*, 23(12), 1360-1369.
222. Li, M. L., Rao, P., & Krug, R. M. (2001). The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. *The EMBO journal*.
223. Li, W., Yang, J., Zhang, E., Zhong, M., Xiao, Y., Yu, J., ... & Yan, H. (2016). Activation of NLRC4 downregulates TLR5-mediated antibody immune responses against flagellin. *Cellular & molecular immunology*, 13(4), 514-523.
224. Li, Y., & Chen, X. (2023). CpG 1018 Is an Effective Adjuvant for Influenza Nucleoprotein. *Vaccines*, 11(3), 649.
225. Li, Y., Li, Z., Zhao, Y., & Chen, X. (2021). Potentiation of recombinant NP and M1-induced cellular immune responses and protection by physical radiofrequency adjuvant. *Vaccines*, 9(12), 1382.
226. Liang, Y., Hong, Y., & Parslow, T. G. (2005). cis-Acting packaging signals in the influenza virus PB1, PB2, and PA genomic RNA segments. *Journal of virology*, 79(16), 10348-10355.
227. Liao, H. Y., Wang, S. C., Ko, Y. A., Lin, K. I., Ma, C., Cheng, T. J. R., & Wong, C. H. (2020). Chimeric hemagglutinin vaccine elicits broadly protective CD4 and CD8 T cell responses against multiple influenza strains and subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(30), 17757-17763.
228. Liebowitz, D., Gottlieb, K., Kolhatkar, N. S., Garg, S. J., Asher, J. M., Nazareno, J., ... & Tucker, S. N. (2020). Efficacy, immunogenicity, and safety of an oral influenza vaccine: a placebo-controlled and active-controlled phase 2 human challenge study. *The Lancet Infectious Diseases*, 20(4), 435-444.

229. Lillie, P. J., Berthoud, T. K., Powell, T. J., Lambe, T., Mullarkey, C., Spencer, A. J., ... & Gilbert, S. C. (2012). Preliminary assessment of the efficacy of a t-cell-based influenza vaccine, MVA-NP+ M1, in humans. *Clinical infectious diseases*, 55(1), 19-25.
230. Lin, S. C., Lin, Y. F., Chong, P., & Wu, S. C. (2012). Broader neutralizing antibodies against H5N1 viruses using prime-boost immunization of hyperglycosylated hemagglutinin DNA and virus-like particles. *PloS one*, 7(6), e39075.
231. Liu, G., Tarbet, B., Song, L., Reiserova, L., Weaver, B., Chen, Y., ... & Tussey, L. (2011). Immunogenicity and efficacy of flagellin-fused vaccine candidates targeting 2009 pandemic H1N1 influenza in mice. *PloS one*, 6(6), e20928
232. Liu, W. C., Nachbagauer, R., Stadlbauer, D., Strohmeier, S., Solórzano, A., Berlanda-Scorza, F., ... & Albrecht, R. A. (2021). Chimeric hemagglutinin-based live-attenuated vaccines confer durable protective immunity against influenza A viruses in a preclinical ferret model. *Vaccines*, 9(1), 40.
233. Liu, X., Liu, Y., Zhang, Y., Zhang, F., & Du, E. (2020). Incorporation of a truncated form of flagellin (TFlg) into porcine circovirus type 2 virus-like particles enhances immune responses in mice. *BMC veterinary research*, 16, 1-10.
234. Lo, C. Y., Wu, Z., Mislton, J. A., Price, G. E., Pappas, C., Kong, W. P., ... & Epstein, S. L. (2008). Comparison of vaccines for induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus: cold-adapted vaccine versus DNA prime-adenovirus boost strategies. *Vaccine*, 26(17), 2062-2072.
235. Lockner, J. W., Eubanks, L. M., Choi, J. L., Lively, J. M., Schlosburg, J. E., Collins, K. C., ... & Janda, K. D. (2015). Flagellin as carrier and adjuvant in cocaine vaccine development. *Molecular pharmaceuticals*, 12(2), 653-662.
236. Loucaides, E. M., von Kirchbach, J. C., Foeglein, Á., Sharps, J., Fodor, E., & Digard, P. (2009). Nuclear dynamics of influenza A virus ribonucleoproteins revealed by live-cell imaging studies. *Virology*, 394(1), 154-163.
237. Lowell, G. H., Ziv, S., Bruzil, S., Babecoff, R., & Ben-Yedidia, T. (2017). Back to the future: Immunization with M-001 prior to trivalent influenza vaccine in 2011/12 enhanced protective immune responses against 2014/15 epidemic strain. *Vaccine*, 35(5), 713-715.
238. Lu, Y., Welsh, J. P., & Swartz, J. R. (2014). Production and stabilization of the trimeric influenza hemagglutinin stem domain for potentially broadly protective influenza vaccines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(1), 125-130.
239. Ma, Y., Wang, Y., Dong, C., Gonzalez, G. X., Song, Y., Zhu, W., ... & Wang, B. Z. (2022). Influenza NP core and HA or M2e shell double-layered protein nanoparticles induce

- broad protection against divergent influenza A viruses. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 40, 102479.
240. Maher, J. A., & DeStefano, J. (2004). The ferret: an animal model to study influenza virus. *Lab animal*, 33(9), 50-53.
 241. Margine, I., Krammer, F., Hai, R., Heaton, N. S., Tan, G. S., Andrews, S. A., ... & Palese, P. (2013). Hemagglutinin stalk-based universal vaccine constructs protect against group 2 influenza A viruses. *Journal of virology*, 87(19), 10435-10446.
 242. McMahon, M., Asthagiri Arunkumar, G., Liu, W. C., Stadlbauer, D., Albrecht, R. A., Pavot, V., ... & Krammer, F. (2019). Vaccination with viral vectors expressing chimeric hemagglutinin, NP and M1 antigens protects ferrets against influenza virus challenge. *Frontiers in immunology*, 10, 2005.
 243. McMahon, M., O'Dell, G., Tan, J., Sárközy, A., Vadovics, M., Carreño, J. M., ... & Pardi, N. (2022). Assessment of a quadrivalent nucleoside-modified mRNA vaccine that protects against group 2 influenza viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 119(45), e2206333119.
 244. Means, T. K., Hayashi, F., Smith, K. D., Aderem, A., & Luster, A. D. (2003). The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 170(10), 5165-5175.
 245. Mett, V., Komarova, E. A., Greene, K., Beshpalov, I., Brackett, C., Gillard, B., ... & Gudkov, A. V. (2018). Mobilan: a recombinant adenovirus carrying Toll-like receptor 5 self-activating cassette for cancer immunotherapy. *Oncogene*, 37(4), 439-449.
 246. Mettelman, R. C., Souquette, A., Van de Velde, L. A., Vegesana, K., Allen, E. K., Kackos, C. M. (2023). Baseline innate and T cell populations are correlates of protection against symptomatic influenza virus infection independent of serology. *Nature immunology*, 24(9), 1511-1526.
 247. Mezhenskaya, D., Isakova-Sivak, I., & Rudenko, L. (2019). M2e-based universal influenza vaccines: a historical overview and new approaches to development. *Journal of biomedical science*, 26(1), 76.
 248. Misharin, A. V., Morales-Nebreda, L., Mutlu, G. M., Budinger, G. S., & Perlman, H. (2013). Flow cytometric analysis of macrophages and dendritic cell subsets in the mouse lung. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 49(4), 503-510.
 249. Miyoshi-Akiyama, T., Yamashiro, T., Mai, L. Q., Narahara, K., Miyamoto, A., Shinagawa, S., ... & Kirikae, T. (2012). Discrimination of influenza A subtype by antibodies recognizing host-specific amino acids in the viral nucleoprotein. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 6(6), 434-441.

250. Mohn, K. G. I., Smith, I., Sjursen, H., & Cox, R. J. (2018). Immune responses after live attenuated influenza vaccination. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 14(3), 571-578.
251. Morens, D. M., Taubenberger, J. K., & Fauci, A. S. (2008). Predominant role of bacterial pneumonia as a cause of death in pandemic influenza: implications for pandemic influenza preparedness. *The Journal of infectious diseases*, 198(7), 962-970.
252. Moyle, P. M., & Toth, I. (2013). Modern subunit vaccines: development, components, and research opportunities. *ChemMedChem*, 8(3), 360-376.
253. Mozdzanowska, K., Zharikova, D., Cudic, M., Otvos, L., & Gerhard, W. (2007). Roles of adjuvant and route of vaccination in antibody response and protection engendered by a synthetic matrix protein 2-based influenza A virus vaccine in the mouse. *Virology journal*, 4, 1-14.
254. Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M., & Aguet, M. (1994). Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science*, 264(5167), 1918-1921.
255. Muramoto, Y., Takada, A., Fujii, K., Noda, T., Iwatsuki-Horimoto, K., Watanabe, S., ... & Kawaoka, Y. (2006). Hierarchy among viral RNA (vRNA) segments in their role in vRNA incorporation into influenza A virions. *Journal of virology*, 80(5), 2318-2325.
256. Murtaza, A., Afzal, H., Doan, T. D., Ke, G. M., & Cheng, L. T. (2022). Flagellin Improves the Immune Response of an Infectious Bursal Disease Virus (IBDV) Subunit Vaccine. *Vaccines*, 10(11), 1780.
257. Nachbagauer, R., Feser, J., Naficy, A., Bernstein, D. I., Guptill, J., Walter, E. B., ... & Krammer, F. (2021). A chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccine approach induces broad and long-lasting immunity in a randomized, placebo-controlled phase I trial. *Nature medicine*, 27(1), 106-114.
258. Nachbagauer, R., Krammer, F., & Albrecht, R. A. (2018). A live-attenuated prime, inactivated boost vaccination strategy with chimeric hemagglutinin-based universal influenza virus vaccines provides protection in ferrets: a confirmatory study. *Vaccines*, 6(3), 47.
259. Nachbagauer, R., Liu, W. C., Choi, A., Wohlbold, T. J., Atlas, T., Rajendran, M., ... & Krammer, F. (2017). A universal influenza virus vaccine candidate confers protection against pandemic H1N1 infection in preclinical ferret studies. *npj Vaccines*, 2(1), 26.
260. Narasaraju, T., Ng, H. H., Phoon, M. C., & Chow, V. T. (2010). MCP-1 antibody treatment enhances damage and impedes repair of the alveolar epithelium in influenza pneumonitis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 42(6), 732-743.
261. Nath Neerukonda, S., Vassell, R., & Weiss, C. D. (2020). Neutralizing antibodies targeting the conserved stem region of influenza hemagglutinin. *Vaccines*, 8(3), 382.

262. Nayak, D. P., Balogun, R. A., Yamada, H., Zhou, Z. H., & Barman, S. (2009). Influenza virus morphogenesis and budding. *Virus research*, 143(2), 147-161.
263. Nayak, D. P., Hui, E. K. W., & Barman, S. (2004). Assembly and budding of influenza virus. *Virus research*, 106(2), 147-165.
264. Neirynck, S., Deroo, T., Saelens, X., Vanlandschoot, P., Jou, W. M., & Fiers, W. (1999). A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nature medicine*, 5(10), 1157-1163.
265. Nempont, C., Cayet, D., Rumbo, M., Bompard, C., Villeret, V., & Sirard, J. C. (2008). Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *The Journal of Immunology*, 181(3), 2036-2043.
266. Ng, P. S., Böhm, R., Hartley-Tassell, L. E., Steen, J. A., Wang, H., Lukowski, S. W., ... & Jennings, M. P. (2014). Ferrets exclusively synthesize Neu5Ac and express naturally humanized influenza A virus receptors. *Nature communications*, 5(1), 5750.
267. Ng, P. S., Böhm, R., Hartley-Tassell, L. E., Steen, J. A., Wang, H., Lukowski, S. W., ... & Jennings, M. P. (2014). Ferrets exclusively synthesize Neu5Ac and express naturally humanized influenza A virus receptors. *Nature communications*, 5(1), 5750.
268. Ng, S., Nachbagauer, R., Balmaseda, A., Stadlbauer, D., Ojeda, S., Patel, M., ... & Gordon, A. (2019). Novel correlates of protection against pandemic H1N1 influenza A virus infection. *Nature medicine*, 25(6), 962-967.
269. Nguyen, Q. T., & Choi, Y. K. (2021). Targeting antigens for universal influenza vaccine development. *Viruses*, 13(6), 973.
270. Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2005). Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding. *Science*, 310(5753), 1510-1512.
271. Nimmerjahn, F., & Ravetch, J. V. (2006). Fcγ receptors: old friends and new family members. *Immunity*, 24(1), 19-28.
272. Nishiyama, A., Nogimori, T., Masuta, Y., Matsuura, T., Kase, T., Kondo, K., ... & Yamamoto, T. (2025). Cross-Reactive Fc-Mediated Antibody Responses to Influenza HA Stem Region in Human Sera Following Seasonal Vaccination. *Vaccines*, 13(2), 140.
273. Nobusawa, E., Aoyama, T., Kato, H., Suzuki, Y., Tateno, Y., & Nakajima, K. (1991). Comparison of complete amino acid sequences and receptor-binding properties among 13 serotypes of hemagglutinins of influenza A viruses. *Virology*, 182(2), 475-485.
274. Nuñez, I. A., & Ross, T. M. (2020). Human COBRA 2 vaccine contains two major epitopes that are responsible for eliciting neutralizing antibody responses against heterologous clades of viruses. *Vaccine*, 38(4), 830-839.

275. Ochi, A., Danesh, A., Seneviratne, C., Banner, D., Devries, M. E., Rowe, T., ... & Kelvin, D. J. (2008). Cloning, expression and immunoassay detection of ferret IFN- γ . *Developmental & Comparative Immunology*, 32(8), 890-897.
276. Oh, J. E., Song, E., Moriyama, M., Wong, P., Zhang, S., Jiang, R., ... & Iwasaki, A. (2021). Intranasal priming induces local lung-resident B cell populations that secrete protective mucosal antiviral IgA. *Science immunology*, 6(66), eabj5129
277. Ortega, J., Martín-Benito, J., Zürcher, T., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L., & Ortín, J. (2000). Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *Journal of virology*, 74(1), 156-163.
278. Palese, P., Tobita, K., Ueda, M., & Compans, R. W. (1974). Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology*, 61(2), 397-410.
279. Park, J. K., Han, A., Czajkowski, L., Reed, S., Athota, R., Bristol, T., ... & Memoli, M. J. (2018). Evaluation of preexisting anti-hemagglutinin stalk antibody as a correlate of protection in a healthy volunteer challenge with influenza A/H1N1pdm virus. *MBio*, 9(1), 10-1128.
280. Parks, G. D., & Lamb, R. A. (1993). Role of NH2-terminal positively charged residues in establishing membrane protein topology. *Journal of Biological Chemistry*, 268(25), 19101-19109.
281. Pei, C., Dong, H., Teng, Z., Wei, S., Zhang, Y., Yin, S., ... & Guo, H. (2023). Self-Assembling Nanovaccine Fused with Flagellin Enhances Protective Effect against Foot- and Mouth Disease Virus. *Vaccines*, 11(11), 1675.
282. Peiris, J. M. (2009). Avian influenza viruses in humans. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 28(1), 161-73.
283. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera - a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605-12.
284. Pinto, L. H., & Lamb, R. A. (2006). The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 8997-9000.
285. Pinto, L. H., Holsinger, L. J., & Lamb, R. A. (1992). Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *cell*, 69(3), 517-528.
286. Pizzolla, A., Nguyen, T. H., Smith, J. M., Brooks, A. G., Kedzierska, K., Heath, W. R., ... & Wakim, L. M. (2017). Resident memory CD8⁺ T cells in the upper respiratory tract prevent pulmonary influenza virus infection. *Science immunology*, 2(12), eaam6970

287. Pleguezuelos, O., Dille, J., de Groen, S., Oftung, F., Niesters, H. G., Islam, M. A., ... & Hak, E. (2020). Immunogenicity, safety, and efficacy of a standalone universal influenza vaccine, FLU-v, in healthy adults: A randomized clinical trial. *Annals of Internal Medicine*, 172(7), 453-462.
288. Pleguezuelos, O., James, E., Fernandez, A., Lopes, V., Rosas, L. A., Cervantes-Medina, A., ... & Memoli, M. J. (2020). Efficacy of FLU-v, a broad-spectrum influenza vaccine, in a randomized phase IIb human influenza challenge study. *NPJ vaccines*, 5(1), 22.
289. Pleguezuelos, O., Robinson, S., Fernández, A., Stoloff, G. A., Mann, A., Gilbert, A., ... & Caparrós-Wanderley, W. (2015). A synthetic influenza virus vaccine induces a cellular immune response that correlates with reduction in symptomatology and virus shedding in a randomized phase Ib live-virus challenge in humans. *Clinical and Vaccine Immunology*, 22(7), 828-835.
290. Pleguezuelos, O., Robinson, S., Stoloff, G. A., & Caparrós-Wanderley, W. (2012). Synthetic Influenza vaccine (FLU-v) stimulates cell mediated immunity in a double-blind, randomised, placebo-controlled Phase I trial. *Vaccine*, 30(31), 4655-4660.
291. Plotch, S. J., Bouloy, M., & Krug, R. M. (1979). Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1618-1622.
292. Poon, L. L., Fodor, E., & Brownlee, G. G. (2000). Polyuridylated mRNA synthesized by a recombinant influenza virus is defective in nuclear export. *Journal of virology*, 74(1), 418-427.
293. Poon, L. L., Leung, Y. H., Nicholls, J. M., Perera, P. Y., Lichy, J. H., Yamamoto, M., ... & Perera, L. P. (2009). Vaccinia virus-based multivalent H5N1 avian influenza vaccines adjuvanted with IL-15 confer sterile cross-clade protection in mice. *The Journal of Immunology*, 182(5), 3063-3071.
294. Poon, L. L., Pritlove, D. C., Fodor, E., & Brownlee, G. G. (1999). Direct evidence that the poly (A) tail of influenza A virus mRNA is synthesized by reiterative copying of a U track in the virion RNA template. *Journal of virology*, 73(4), 3473-3476.
295. Portela, A., & Digard, P. (2002). The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *Journal of general virology*, 83(4), 723-734.
296. Price, G. E., Lo, C. Y., Mispelon, J. A., & Epstein, S. L. (2014). Mucosal immunization with a candidate universal influenza vaccine reduces virus transmission in a mouse model. *Journal of virology*, 88(11), 6019-6030.

297. Prokudina, E. N., Semenova, N., Chumakov, V., & Stitz, L. (2008). An antigenic epitope of influenza virus nucleoprotein (NP) associated with polymeric forms of NP. *Virology Journal*, 5, 1-5.
298. Puga, I., Cols, M., Barra, C. M., He, B., Cassis, L., Gentile, M., ... & Cerutti, A. (2012). B cell–helper neutrophils stimulate the diversification and production of immunoglobulin in the marginal zone of the spleen. *Nature immunology*, 13(2), 170-180.
299. Puth, S., Hong, S. H., Park, M. J., Lee, H. H., Lee, Y. S., Jeong, K., ... & Lee, S. E. (2017). Mucosal immunization with a flagellin-adjuvanted Hgp44 vaccine enhances protective immune responses in a murine *Porphyromonas gingivalis* infection model. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 13(12), 2794-2803.
300. Qian, F., Yin, J., Li, M., Guo, A., Li, T., Zhou, L., ... & Xu, H. (2016). Intranasal immunization with a peptide conjugated to Salmonella flagellin induces both systemic and mucosal peptide-specific antibody responses in mice. *Microbiology and immunology*, 60(7), 497-500.
301. Quach, H. Q., & Kennedy, R. B. (2022). Enhancing Immunogenicity of influenza vaccine in the elderly through intradermal vaccination: A literature analysis. *Viruses*, 14(11), 2438.
302. Rak, A., Isakova-Sivak, I., & Rudenko, L. (2023). Nucleoprotein as a promising antigen for broadly protective influenza vaccines. *Vaccines*, 11(12), 1747.
303. Ramiscal, R. R., & Vinuesa, C. G. (2013). T-cell subsets in the germinal center. *Immunological reviews*, 252(1), 146-155.
304. Ramos, E. L., Mitcham, J. L., Koller, T. D., Bonavia, A., Usner, D. W., Balaratnam, G., ... & Swiderek, K. M. (2015). Efficacy and safety of treatment with an anti-m2e monoclonal antibody in experimental human influenza. *The Journal of infectious diseases*, 211(7), 1038-1044.
305. Ramos, H. C., Rumbo, M., & Sirard, J. C. (2004). Bacterial flagellins: mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends in microbiology*, 12(11), 509-517.
306. Rao, S. S., Kong, W. P., Wei, C. J., Van Hoeven, N., Gorres, J. P., Nason, M., ... & Nabel, G. J. (2010). Comparative efficacy of hemagglutinin, nucleoprotein, and matrix 2 protein gene-based vaccination against H5N1 influenza in mouse and ferret. *PloS one*, 5(3), e9812.
307. Reed, S. G., Orr, M. T., & Fox, C. B. (2013). Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature medicine*, 19(12), 1597-1608.
308. Reguera, J., Cusack, S., & Kolakofsky, D. (2014). Segmented negative strand RNA virus nucleoprotein structure. *Current opinion in virology*, 5, 7-15.

309. Reneer, Z. B., Jamieson, P. J., Skarlpuka, A. L., Huang, Y., & Ross, T. M. (2020). Computationally optimized broadly reactive H2 HA influenza vaccines elicited broadly cross-reactive antibodies and protected mice from viral challenges. *Journal of virology*, 95(2), 10-1128.
310. Rhee, J. H., Khim, K., Puth, S., Choi, Y., & Lee, S. E. (2023). Deimmunization of flagellin adjuvant for clinical application. *Current Opinion in Virology*, 60, 101330.
311. Richards, K. A., Shannon, I., Treanor, J. J., Yang, H., Nayak, J. L., & Sant, A. J. (2020). Evidence that blunted CD4 T-cell responses underlie deficient protective antibody responses to influenza vaccines in repeatedly vaccinated human subjects. *The Journal of infectious diseases*, 222(2), 273-277.
312. Rimmelzwaan, G. F., Boon, A. C. M., Voeten, J. T. M., Berkhoff, E. G. M., Fouchier, R. A. M., & Osterhaus, A. D. M. E. (2004). Sequence variation in the influenza A virus nucleoprotein associated with escape from cytotoxic T lymphocytes. *Virus research*, 103(1-2), 97-100.
313. Rimmelzwaan, G. F., Kreijtz, J. H., Bodewes, R., Fouchier, R. A., & Osterhaus, A. D. (2009). Influenza virus CTL epitopes, remarkably conserved and remarkably variable. *Vaccine*, 27(45), 6363-6365.
314. Robertson, J. S., Schubert, M. A. N. F. R. E. D., & Lazzarini, R. A. (1981). Polyadenylation sites for influenza virus mRNA. *Journal of virology*, 38(1), 157-163.
315. Ross, T. M., DiNapoli, J., Giel-Moloney, M., Bloom, C. E., Bertran, K., Balzli, C., ... & Kleanthous, H. (2019). A computationally designed H5 antigen shows immunological breadth of coverage and protects against drifting avian strains. *Vaccine*, 37(17), 2369-2376.
316. Rossman, J. S., Jing, X., Leser, G. P., & Lamb, R. A. (2010). Influenza virus M2 protein mediates ESCRT-independent membrane scission. *Cell*, 142(6), 902-913.
317. Rumbo, M., Carnoy, C., & Sirard, J. C. (2017). Flagellins as adjuvants of vaccines. In *Immunopotentiators in Modern Vaccines* (pp. 129-147). Academic Press.
318. Russell, C. A., Fouchier, R. A., Ghaswalla, P., Park, Y., Vicic, N., Ananworanich, J., ... & Rudin, D. (2024). Seasonal influenza vaccine performance and the potential benefits of mRNA vaccines. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 20(1), 2336357.
319. Ryan, K. A., Slack, G. S., Marriott, A. C., Kane, J. A., Whittaker, C. J., Silman, N. J., ... & Gooch, K. E. (2018). Cellular immune response to human influenza viruses differs between H1N1 and H3N2 subtypes in the ferret lung. *PloS one*, 13(9), e0202675.
320. Ryder, A. B., Nachbagauer, R., Buonocore, L., Palese, P., Krammer, F., & Rose, J. K. (2016). Vaccination with vesicular stomatitis virus-vectored chimeric hemagglutinins protects mice against divergent influenza virus challenge strains. *Journal of virology*, 90(5), 2544-2550.

321. Saelens, X. (2019). The role of matrix protein 2 ectodomain in the development of universal influenza vaccines. *The Journal of infectious diseases*, 219(Supplement_1), S68-S74.
322. Samatey, F. A., Imada, K., Nagashima, S., Vonderviszt, F., Kumasaka, T., Yamamoto, M., & Namba, K. (2001). Structure of the bacterial flagellar protofilament and implications for a switch for supercoiling. *Nature*, 410(6826), 331-337.
323. Sanchez, M. V., Ebensen, T., Schulze, K., Cargnelutti, D., Blazejewska, P., Scodeller, E. A., & Guzmán, C. A. (2014). Intranasal delivery of influenza rNP adjuvanted with c-di-AMP induces strong humoral and cellular immune responses and provides protection against virus challenge. *PloS one*, 9(8), e104824.
324. Sánchez-Vargas, L. A., Kounlavouth, S., Smith, M. L., Anderson, K. B., Srikiatkachorn, A., Ellison, D. W., ... & Rothman, A. L. (2019). Longitudinal analysis of memory B and T cell responses to dengue virus in a 5-year prospective cohort study in Thailand. *Frontiers in immunology*, 10, 1359.
325. Šantak, M., & Matic, Z. (2022). The role of nucleoprotein in immunity to human negative-stranded RNA viruses—not just another brick in the viral nucleocapsid. *Viruses*, 14(3), 521.
326. Sautto, G. A., Kirchenbaum, G. A., Abreu, R. B., Ecker, J. W., Pierce, S. R., Kleanthous, H., & Ross, T. M. (2020). A computationally optimized broadly reactive antigen subtype-specific influenza vaccine strategy elicits unique potent broadly neutralizing antibodies against hemagglutinin. *The Journal of Immunology*, 204(2), 375-385.
327. Sautto, G. A., Kirchenbaum, G. A., Ecker, J. W., Bebin-Blackwell, A. G., Pierce, S. R., & Ross, T. M. (2018). Elicitation of broadly protective antibodies following infection with influenza viruses expressing H1N1 computationally optimized broadly reactive hemagglutinin antigens. *Immunohorizons*, 2(7), 226-237.
328. Savic, M., Dembinski, J. L., Laake, I., Hungnes, O., Cox, R., Oftung, F., ... & Mjaaland, S. (2017). Distinct T and NK cell populations may serve as immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza A (H1N1) virus infection during pregnancy. *PLoS One*, 12(11), e0188055.
329. Sayedahmed, E. E., Elshafie, N. O., Dos Santos, A. P., Jagannath, C., Sambhara, S., & Mittal, S. K. (2024). Development of NP-Based universal vaccine for Influenza A Viruses. *Vaccines*, 12(2), 157.
330. Scheiblhofer, S., Laimer, J., Machado, Y., Weiss, R., & Thalhamer, J. (2017). Influence of protein fold stability on immunogenicity and its implications for vaccine design. *Expert review of vaccines*, 16(5), 479-489.

331. Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T., & Simons, K. (1999). Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 274(4), 2038-2044.
332. Schotsaert, M., Ysenbaert, T., Neyt, K., Ibañez, L. I., Bogaert, P., Schepens, B., ... & Saelens, X. (2013). Natural and long-lasting cellular immune responses against influenza in the M2e-immune host. *Mucosal immunology*, 6(2), 276-287.
333. Schotsaert, M., Ysenbaert, T., Smet, A., Schepens, B., Vanderschaeghe, D., Stegalkina, S., ... & Saelens, X. (2016). Long-lasting cross-protection against influenza A by neuraminidase and M2e-based immunization strategies. *Scientific reports*, 6(1), 24402.
334. Schroeder, C., Heider, H., Möncke-Buchner, E., & Lin, T. I. (2005). The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *European Biophysics Journal*, 34, 52-66.
335. Scorza, F. B., Tsvetnitsky, V., & Donnelly, J. J. (2016). Universal influenza vaccines: Shifting to better vaccines. *Vaccine*, 34(26), 2926-2933.
336. Sedova, E. S., Scherbinin, D. N., Lysenko, A. A., Alekseeva, S. V., Artemova, E. A., & Shmarov, M. M. (2019). Non-neutralizing antibodies directed at conservative influenza antigens. *Acta Naturae (англоязычная версия)*, 11(4 (43)), 22-32.
337. Shapiro, G. I., Gurney Jr, T., & Krug, R. M. (1987). Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. *Journal of virology*, 61(3), 764-773.
338. Shim, B. S., Choi, Y. K., Yun, C. H., Lee, E. G., Jeon, Y. S., Park, S. M., ... & Song, M. K. (2011). Sublingual immunization with M2-based vaccine induces broad protective immunity against influenza. *PloS one*, 6(11), e27953.
339. Singh-Jasuja, H., Thiolat, A., Ribon, M., Boissier, M. C., Bessis, N., Rammensee, H. G., & Decker, P. (2013). The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. *Immunobiology*, 218(1), 28-39.
340. Sipo, I., Knauf, M., Fechner, H., Poller, W., Planz, O., Kurth, R., & Norley, S. (2011). Vaccine protection against lethal homologous and heterologous challenge using recombinant AAV vectors expressing codon-optimized genes from pandemic swine origin influenza virus (SOIV). *Vaccine*, 29(8), 1690-1699.
341. Skarlupka, A. L., Bebin-Blackwell, A. G., Sumner, S. F., & Ross, T. M. (2021). Universal influenza virus neuraminidase vaccine elicits protective immune responses against human seasonal and pre-pandemic strains. *Journal of virology*, 95(17), 10-1128.
342. Skarlupka, A. L., Owino, S. O., Suzuki-Williams, L. P., Crevar, C. J., Carter, D. M., & Ross, T. M. (2019). Computationally optimized broadly reactive vaccine based upon swine

- H1N1 influenza hemagglutinin sequences protects against both swine and human isolated viruses. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 15(9), 2013-2029.
343. Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annual review of biochemistry*, 69(1), 531-569.
 344. Skountzou, I., del Pilar Martin, M., Wang, B., Ye, L., Koutsonanos, D., Weldon, W., ... & Compans, R. W. (2010). Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. *Vaccine*, 28(24), 4103-4112.
 345. Slepishkin, V. A., Katz, J. M., Black, R. A., Gamble, W. C., Rota, P. A., & Cox, N. J. (1995). Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine*, 13(15), 1399-1402.
 346. Smith K.D., Andersen-Nissen E., Hayashi F., Strobe K., Bergman M.A., Barrett S.L., Cookson B.T., Aderem A. Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature Immunology*. 2003 Dec;4(12). pp. 1247-53.
 347. Smith, G. L., & Hay, A. J. (1982). Replication of the influenza virus genome. *Virology*, 118(1), 96-108.
 348. Smith, K. D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M. A., Barrett, S. L. R., ... & Aderem, A. (2003). Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nature immunology*, 4(12), 1247-1253.
 349. Soghoian, D. Z., & Streeck, H. (2010). Cytolytic CD4⁺ T cells in viral immunity. *Expert review of vaccines*, 9(12), 1453-1463.
 350. Song, J. M., Wang, B. Z., Park, K. M., Van Rooijen, N., Quan, F. S., Kim, M. C., ... & Kang, S. M. (2011). Influenza virus-like particles containing M2 induce broadly cross protective immunity. *PloS one*, 6(1), e14538.
 351. Song, L., Nakaar, V., Kavita, U., Price, A., Huleatt, J., Tang, J., ... & Tussey, L. (2008). Efficacious recombinant influenza vaccines produced by high yield bacterial expression: a solution to global pandemic and seasonal needs. *PloS one*, 3(5), e2257.
 352. Sridhar, S., Begom, S., Bermingham, A., Ziegler, T., Roberts, K. L., Barclay, W. S., ... & Lalvani, A. (2012). Predominance of heterosubtypic IFN- γ -only-secreting effector memory T cells in pandemic H1N1 naive adults. *European journal of immunology*, 42(11), 2913-2924.
 353. Stauffer, S., Feng, Y., Nebioglu, F., Heilig, R., Picotti, P., & Helenius, A. (2014). Stepwise priming by acidic pH and a high K⁺ concentration is required for efficient uncoating of influenza A virus cores after penetration. *Journal of virology*, 88(22), 13029-13046.

354. Steel, J., Lowen, A. C., Wang, T. T., Yondola, M., Gao, Q., Haye, K., ... & Palese, P. (2010). Influenza virus vaccine based on the conserved hemagglutinin stalk domain. *MBio*, 1(1), 10-1128.
355. Stranzl T., Larsen M.V., Lundegaard C., Nielsen M. // Immunogenetics. 2010. V. 62. № 6. 3. 357-368.
356. Sun, H., Hu, W., Yan, Y., Zhang, Z., Chen, Y., Yao, X., ... & Wang, G. (2021). Using PAMPs and DAMPs as adjuvants in cancer vaccines. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 17(12), 5546-5557.
357. Swalley, S. E., Baker, B. M., Calder, L. J., Harrison, S. C., Skehel, J. J., & Wiley, D. C. (2004). Full-length influenza hemagglutinin HA2 refolds into the trimeric low-pH-induced conformation. *Biochemistry*, 43(19), 5902-5911.
358. Swayze, H., Allen, J., Folegatti, P., Yu, L. M., Gilbert, S., Hill, A., ... & Butler, C. C. (2019). A phase IIb study to determine the safety and efficacy of candidate INfluenza Vaccine MVA-NP+ M1 in combination with licensed Ina CTivated infl Uenza vaccine in adult S aged 65 years and above (INVICTUS): A study protocol. *F1000Research*, 8.
359. Talbot, H. K., Rock, M. T., Johnson, C., Tussey, L., Kavita, U., Shanker, A., ... & Taylor, D. N. (2010). Immunopotential of trivalent influenza vaccine when given with VAX102, a recombinant influenza M2e vaccine fused to the TLR5 ligand flagellin. *PLoS One*, 5(12), e14442.
360. Tam, H. H., Melo, M. B., Kang, M., Pelet, J. M., Ruda, V. M., Foley, M. H., ... & Irvine, D. J. (2016). Sustained antigen availability during germinal center initiation enhances antibody responses to vaccination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(43), E6639-E6648.
361. Tan, P. T., Heiny, A. T., Miotto, O., Salmon, J., Marques Jr, E. T., Lemonnier, F., & August, J. T. (2010). Conservation and diversity of influenza A H1N1 HLA-restricted T cell epitope candidates for epitope-based vaccines. *PloS one*, 5(1), e8754.
362. Tang, Y. S., Xu, S., Chen, Y. W., Wang, J. H., & Shaw, P. C. (2021). Crystal structures of influenza nucleoprotein complexed with nucleic acid provide insights into the mechanism of RNA interaction. *Nucleic acids research*, 49(7), 4144-4154.
363. Taylor, D. N., Treanor, J. J., Sheldon, E. A., Johnson, C., Umlauf, S., Song, L., ... & Shaw, A. (2012). Development of VAX128, a recombinant hemagglutinin (HA) influenza-flagellin fusion vaccine with improved safety and immune response. *Vaccine*, 30(39), 5761-5769.
364. Thangavel, R. R., & Bouvier, N. M. (2014). Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology. *Journal of immunological methods*, 410, 60-79.

365. Thomas-Rudolph, D., Du Clos, T. W., Snapper, C. M., & Mold, C. (2007). C-reactive protein enhances immunity to *Streptococcus pneumoniae* by targeting uptake to FcγR on dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 178(11), 7283-7291.
366. Thrane, S., Aves, K. L., Uddbäck, I. E. M., Janitzek, C. M., Han, J., Yang, Y. R., ... & Sander, A. F. (2020). A vaccine displaying a trimeric influenza-A HA stem protein on capsid-like particles elicits potent and long-lasting protection in mice. *Vaccines*, 8(3), 389.
367. Tite, J. P., Hughes-Jenkins, C., O'Callaghan, D., Dougan, G., Russell, S. M., Gao, X. M., & Liew, F. Y. (1990). Anti-viral immunity induced by recombinant nucleoprotein of influenza A virus. II. Protection from influenza infection and mechanism of protection. *Immunology*, 71(2), 202.
368. Townsend, A. R. M., McMichael, A. J., Carter, N. P., Huddleston, J. A., & Brownlee, G. G. (1984). Cytotoxic T cell recognition of the influenza nucleoprotein and hemagglutinin expressed in transfected mouse L cells. *Cell*, 39(1), 13-25.
369. Townsend, A. R. M., Rothbard, J., Gotch, F. M., Bahadur, G., Wraith, D., & McMichael, A. J. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell*, 44(6), 959-968.
370. Treanor, J. J., Tierney, E. L., Zebedee, S. L., Lamb, R. A., & Murphy, B. R. (1990). Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *Journal of virology*, 64(3), 1375-1377.
371. Truong, T. N., & Cheng, L. T. (2022). Development of a subunit vaccine against duck hepatitis A virus serotype 3. *Vaccines*, 10(4), 523.
372. Turley, C. B., Rupp, R. E., Johnson, C., Taylor, D. N., Wolfson, J., Tussey, L., ... & Shaw, A. (2011). Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2. 4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*, 29(32), 5145-5152.
373. Turrell, L., Lyall, J. W., Tiley, L. S., Fodor, E., & Vreede, F. T. (2013). The role and assembly mechanism of nucleoprotein in influenza A virus ribonucleoprotein complexes. *Nature communications*, 4(1), 1591.
374. Tussey, L., Strout, C., Davis, M., Johnson, C., Lucksinger, G., Umlauf, S., ... & White, C. J. (2016, January). Phase 1 safety and immunogenicity study of a quadrivalent seasonal flu vaccine comprising recombinant hemagglutinin-flagellin fusion proteins. In *Open forum infectious diseases* (Vol. 3, No. 1, p. ofw015). Oxford University Press.
375. Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felgner, P. L., Dwarki, V. J., ... & Liu, M. A. (1993). Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*, 259(5102), 1745-1749.

376. Ulmer, J. B., Fu, T. M., Deck, R. R., Friedman, A., Guan, L., DeWitt, C., ... & Caulfield, M. J. (1998). Protective CD4⁺ and CD8⁺ T cells against influenza virus induced by vaccination with nucleoprotein DNA. *Journal of virology*, 72(7), 5648-5653.
377. Universal Influenza Vaccine Technology Landscape [Электронный ресурс]. URL: <https://ivr.cidrap.umn.edu/universal-influenza-vaccine-technology-landscape> (дата обращения: 10.02.2025)
378. Valkenburg, S. A., Mallajosyula, V. V. A., Li, O. T., Chin, A. W., Carnell, G., Temperton, N., ... & Poon, L. L. (2016). Stalking influenza by vaccination with pre-fusion headless HA mini-stem. *Scientific reports*, 6(1), 22666.
379. Van de Sandt, C. E., Kreijtz, J. H., & Rimmelzwaan, G. F. (2012). Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses*, 4(9), 1438-1476.
380. Van den Hoecke, S., Ehrhardt, K., Kolpe, A., El Bakkouri, K., Deng, L., Grootaert, H., ... & Saelens, X. (2017). Hierarchical and redundant roles of activating FcγRs in protection against influenza disease by M2e-specific IgG1 and IgG2a antibodies. *Journal of virology*, 91(7), 10-1128.
381. Van der Lubbe, J. E., Verspuij, J. W., Huizingh, J., Schmit-Tillemans, S. P., Tolboom, J. T., Dekking, L. E., ... & Kuipers, H. (2018). Mini-HA is superior to full length hemagglutinin immunization in inducing stem-specific antibodies and protection against group 1 influenza virus challenges in mice. *Frontiers in Immunology*, 9, 2350.
382. van Doorn, E., Liu, H., Ben-Yedidia, T., Hassin, S., Visontai, I., Norley, S., ... & Hak, E. (2017). Evaluating the immunogenicity and safety of a BiondVax-developed universal influenza vaccine (Multimeric-001) either as a standalone vaccine or as a primer to H5N1 influenza vaccine: Phase IIb study protocol. *Medicine*, 96(11), e6339.
383. van Doorn, E., Pleguezuelos, O., Liu, H., Fernandez, A., Bannister, R., Stoloff, G., ... & Hak, E. (2017). Evaluation of the immunogenicity and safety of different doses and formulations of a broad spectrum influenza vaccine (FLU-v) developed by SEEK: study protocol for a single-center, randomized, double-blind and placebo-controlled clinical phase IIb trial. *BMC infectious diseases*, 17, 1-9.
384. van Riel, D., Munster, V. J., de Wit, E., Rimmelzwaan, G. F., Fouchier, R. A., Osterhaus, A. D., & Kuiken, T. (2007). Human and avian influenza viruses target different cells in the lower respiratory tract of humans and other mammals. *The American journal of pathology*, 171(4), 1215-1223.
385. van Wyke, K. L., Hinshaw, V. S., Bean Jr, W. J., & Webster, R. G. (1980). Antigenic variation of influenza A virus nucleoprotein detected with monoclonal antibodies. *Journal of Virology*, 35(1), 24-30.

386. Vanderven, H. A., Ana-Sosa-Batiz, F., Jegaskanda, S., Rockman, S., Laurie, K., Barr, I., ... & Kent, S. J. (2016). What lies beneath: antibody dependent natural killer cell activation by antibodies to internal influenza virus proteins. *EBioMedicine*, 8, 277-290.
387. Vatzia, E., Feest, K., McNee, A., Manjegowda, T., Carr, B. V., Paudyal, B., ... & Tchilian, E. (2023). Immunization with matrix-, nucleoprotein and neuraminidase protects against H3N2 influenza challenge in pH1N1 pre-exposed pigs. *npj Vaccines*, 8(1), 19.
388. Vemula, S. V., Ahi, Y. S., Swaim, A. M., Katz, J. M., Donis, R., Sambhara, S., & Mittal, S. K. (2013). Broadly protective adenovirus-based multivalent vaccines against highly pathogenic avian influenza viruses for pandemic preparedness. *PloS one*, 8(4), e62496.
389. Verma, S. K., Mahajan, P., Singh, N. K., Gupta, A., Aggarwal, R., Rappuoli, R., & Johri, A. K. (2023). New-age vaccine adjuvants, their development, and future perspective. *Frontiers in immunology*, 14, 1043109.
390. Vijayan, A., Rumbo, M., Carnoy, C., & Sirard, J. C. (2018). Compartmentalized antimicrobial defenses in response to flagellin. *Trends in microbiology*, 26(5), 423-435.
391. Vijay-Kumar, M., & Gewirtz, A. T. (2009). Flagellin: key target of mucosal innate immunity. *Mucosal immunology*, 2(3), 197-205.
392. Vita R., Zarebski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. // *Nucleic Acids Res.* 2010. V. 38. № Database. P. D854-D862.
393. Voeten, J. T. M., Bestebroer, T. M., Nieuwkoop, N. J., Fouchier, R. A. M., Osterhaus, A. D. M. E., & Rimmelzwaan, G. F. (2000). Antigenic drift in the influenza A virus (H3N2) nucleoprotein and escape from recognition by cytotoxic T lymphocytes. *Journal of virology*, 74(15), 6800-6807.
394. Waltz, E. (2022). China And India approve nasal covid vaccines. *Nature*, 609, 450.
395. Wang, L., Hess, A., Chang, T. Z., Wang, Y. C., Champion, J. A., Compans, R. W., & Wang, B. Z. (2014). Nanoclusters self-assembled from conformation-stabilized influenza M2e as broadly cross-protective influenza vaccines. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 10(2), 473-482.
396. Wang, L., Wang, Y. C., Feng, H., Ahmed, T., Compans, R. W., & Wang, B. Z. (2013). Virus-Like Particles Containing the Tetrameric Ectodomain of Influenza Matrix Protein 2 and Flagellin Induce Heterosubtypic Protection in Mice. *BioMed research international*, 2013(1), 686549.
397. Wang, M., Jiang, S., & Wang, Y. (2016). Recent advances in the production of recombinant subunit vaccines in *Pichia pastoris*. *Bioengineered*, 7(3), 155-165.
398. Wang, T. T., Tan, G. S., Hai, R., Pica, N., Ngai, L., Ekiert, D. C., ... & Palese, P. (2010). Vaccination with a synthetic peptide from the influenza virus hemagglutinin provides

- protection against distinct viral subtypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(44), 18979-18984.
399. Wang, T. T., Tan, G. S., Hai, R., Pica, N., Petersen, E., Moran, T. M., & Palese, P. (2010). Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS pathogens*, 6(2), e1000796.
 400. Wang, Y., Dong, C., Ma, Y., Zhu, W., Gill, H. S., Denning, T. L., ... & Wang, B. Z. (2023). Monophosphoryl lipid A-adjuvanted nucleoprotein-neuraminidase nanoparticles improve immune protection against divergent influenza viruses. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 47, 102614.
 401. Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y., & Kawaoka, Y. (2003). Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes. *Journal of virology*, 77(19), 10575-10583.
 402. Watkins, H. C., Rappazzo, C. G., Higgins, J. S., Sun, X., Brock, N., Chau, A., ... & Putnam, D. (2017). Safe recombinant outer membrane vesicles that display M2e elicit heterologous influenza protection. *Molecular Therapy*, 25(4), 989-1002.
 403. Weaver, E. A., Rubrum, A. M., Webby, R. J., & Barry, M. A. (2011). Protection against divergent influenza H1N1 virus by a centralized influenza hemagglutinin. *PloS one*, 6(3), e18314.
 404. Webby, R. J., & Weaver, E. A. (2015). Centralized consensus hemagglutinin genes induce protective immunity against H1, H3 and H5 influenza viruses. *PloS one*, 10(10), e0140702.
 405. Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M., & Kawaoka, Y. (1992). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological reviews*, 56(1), 152-179.
 406. Whitmire, J. K., Tan, J. T., & Whitton, J. L. (2005). Interferon- γ acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *Journal of Experimental Medicine*, 201(7), 1053-1059.
 407. Widge, A. T., Hofstetter, A. R., Houser, K. V., Awan, S. F., Chen, G. L., Burgos Florez, M. C., ... & VRC 321 study team. (2023). An influenza hemagglutinin stem nanoparticle vaccine induces cross-group 1 neutralizing antibodies in healthy adults. *Science translational medicine*, 15(692), eade4790.
 408. Wilkinson, T. M., Li, C. K., Chui, C. S., Huang, A. K., Perkins, M., Liebner, J. C., ... & Xu, X. N. (2012). Preexisting influenza-specific CD4+ T cells correlate with disease protection against influenza challenge in humans. *Nature medicine*, 18(2), 274-280.
 409. Wille, M., & Holmes, E. C. (2020). The ecology and evolution of influenza viruses. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 10(7), a038489.

410. Wise, H. M., Hutchinson, E. C., Jagger, B. W., Stuart, A. D., Kang, Z. H., Robb, N., ... & Digard, P. (2012). Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. *PLoS pathogens*, 8(11), e1002998.
411. Withanage, K., De Coster, I., Cools, N., Viviani, S., Tourneur, J., Chevandier, M., ... & Van Damme, P. (2022). Phase 1 randomized, placebo-controlled, dose-escalating study to evaluate OVX836, a nucleoprotein-based influenza vaccine: intramuscular results. *The Journal of Infectious Diseases*, 226(1), 119-127.
412. Wohlbold, T. J., Nachbagauer, R., Margine, I., Tan, G. S., Hirsh, A., & Krammer, F. (2015). Vaccination with soluble headless hemagglutinin protects mice from challenge with divergent influenza viruses. *Vaccine*, 33(29), 3314-3321.
413. Wong, T. M., Allen, J. D., Bebin-Blackwell, A. G., Carter, D. M., Alefantis, T., DiNapoli, J., ... & Ross, T. M. (2017). Computationally optimized broadly reactive hemagglutinin elicits hemagglutination inhibition antibodies against a panel of H3N2 influenza virus cocirculating variants. *Journal of virology*, 91(24), 10-1128.
414. World Health Organization. (2017). WHO preferred product characteristics for next generation influenza vaccines.
415. World Health Organization. (2019). Global influenza strategy 2019-2030.
416. World Health Organization. (2020). Global vaccine action plan: monitoring, evaluation and accountability. Secretariat annual report 2020. World Health Organization.
417. Wraith, D. C., & Askonas, B. A. (1985). Induction of influenza A virus cross-reactive cytotoxic T cells by a nucleoprotein/haemagglutinin preparation. *Journal of general virology*, 66(6), 1327-1331.
418. Wraith, D. C., Vessey, A. E., & Askonas, B. A. (1987). Purified influenza virus nucleoprotein protects mice from lethal infection. *Journal of General Virology*, 68(2), 433-440.
419. Wu, C., Zanker, D., Valkenburg, S., Tan, B., Kedzierska, K., Zou, Q. M., ... & Chen, W. (2011). Systematic identification of immunodominant CD8+ T-cell responses to influenza A virus in HLA-A2 individuals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(22), 9178-9183.
420. Xia, J., Kuang, Y., Liang, J., Jones, M., & Swain, S. L. (2020). Influenza vaccine-induced CD4 effectors require antigen recognition at an effector checkpoint to generate CD4 lung memory and antibody production. *The Journal of Immunology*, 205(8), 2077-2090.
421. Xiao, Y., Liu, F., Yang, J., Zhong, M., Zhang, E., Li, Y., ... & Yan, H. (2015). Over-activation of TLR5 signaling by high-dose flagellin induces liver injury in mice. *Cellular & molecular immunology*, 12(6), 729-742.

422. Yan, Y., Yao, D., & Li, X. (2021). Immunological mechanism and clinical application of PAMP adjuvants. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, 16(1), 30-43.
423. Yang, J., Zhong, M., Zhang, Y., Zhang, E., Sun, Y., Cao, Y., ... & Yan, H. (2013). Antigen replacement of domains D2 and D3 in flagellin promotes mucosal IgA production and attenuates flagellin-induced inflammatory response after intranasal immunization. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 9(5), 1084-1092.
424. Yassine, H. M., Boyington, J. C., McTamney, P. M., Wei, C. J., Kanekiyo, M., Kong, W. P., ... & Graham, B. S. (2015). Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. *Nature medicine*, 21(9), 1065-1070.
425. Ye, Q., Krug, R. M., & Tao, Y. J. (2006). The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature*, 444(7122), 1078-1082.
426. Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., & Namba, K. (2003). Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 424(6949), 643-650.
427. Yonekura, K., Maki-Yonekura, S., & Namba, K. (2005). Building the atomic model for the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy and image analysis. *Structure*, 13(3), 407-412.
428. Yoon, S. W., Webby, R. J., & Webster, R. G. (2014). Evolution and ecology of influenza A viruses. *Influenza pathogenesis and control-volume I*, 359-375.
429. Yu, Y. R. A., O'Koren, E. G., Hotten, D. F., Kan, M. J., Kopin, D., Nelson, E. R., ... & Gunn, M. D. (2016). A protocol for the comprehensive flow cytometric analysis of immune cells in normal and inflamed murine non-lymphoid tissues. *PloS one*, 11(3), e0150606.
430. Zebedee, S. L., & Lamb, R. A. (1988). Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. *Journal of virology*, 62(8), 2762-2772.
431. Zhang, J., Pekosz, A., & Lamb, R. A. (2000). Influenza virus assembly and lipid raft microdomains: a role for the cytoplasmic tails of the spike glycoproteins. *Journal of virology*, 74(10), 4634-4644.
432. Zhang, X., Liu, M., Liu, C., Du, J., Shi, W., Sun, E., ... & Zhang, Y. (2011). Vaccination with different M2e epitope densities confers partial protection against H5N1 influenza A virus challenge in chickens. *Intervirology*, 54(5), 290-299.
433. Zhao, B., Yang, J., He, B., Li, X., Yan, H., Liu, S., ... & Yan, H. (2021). A safe and effective mucosal RSV vaccine in mice consisting of RSV phosphoprotein and flagellin variant. *Cell Reports*, 36(3)

434. Zhao, Y., Li, Z., Voyer, J., Li, Y., & Chen, X. (2022). Flagellin/virus-like particle hybrid platform with high immunogenicity, safety, and versatility for vaccine development. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 14(19), 21872-21885
435. Zhao, Y., Li, Z., Zhu, X., Cao, Y., & Chen, X. (2020). Improving immunogenicity and safety of flagellin as vaccine carrier by high-density display on virus-like particle surface. *Biomaterials*, 249, 120030.
436. Zheng, M., Liu, F., Shen, Y., Wang, S., Xu, W., Fang, F., ... & Chen, Z. (2015). Cross-protection against influenza virus infection by intranasal administration of nucleoprotein-based vaccine with compound 48/80 adjuvant. *Human vaccines & immunotherapeutics*, 11(2), 397-406.
437. Zheng, M., Luo, J., & Chen, Z. (2014). Development of universal influenza vaccines based on influenza virus M and NP genes. *Infection*, 42, 251-262.
438. Zhong, W., Reed, C., Blair, P. J., Katz, J. M., Hancock, K., Influenza Serology Working Group, ... & Whaley, M. (2014). Serum antibody response to matrix protein 2 following natural infection with 2009 pandemic influenza A (H1N1) virus in humans. *The Journal of infectious diseases*, 209(7), 986-994.
439. Zhou, L., Ren, R., Yang, L., Bao, C., Wu, J., Wang, D., ... & Ni, D. (2017). Sudden increase in human infection with avian influenza A (H7N9) virus in China, September–December 2016. *Western Pacific surveillance and response journal: WPSAR*, 8(1), 6.
440. Всемирная организация здравоохранения. Информационные бюллетени/ Грипп (сезонный) [Электронный ресурс]. URL: [https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal)) (дата обращения: 12.02.2025)
441. Методические указания МУ 3.3.2.1758-03 «Методы определения показателей качества иммунобиологических препаратов для профилактики и диагностики гриппа». – 2003. – 33 с.

9. ПРИЛОЖЕНИЯ

9.1. Приложение 1

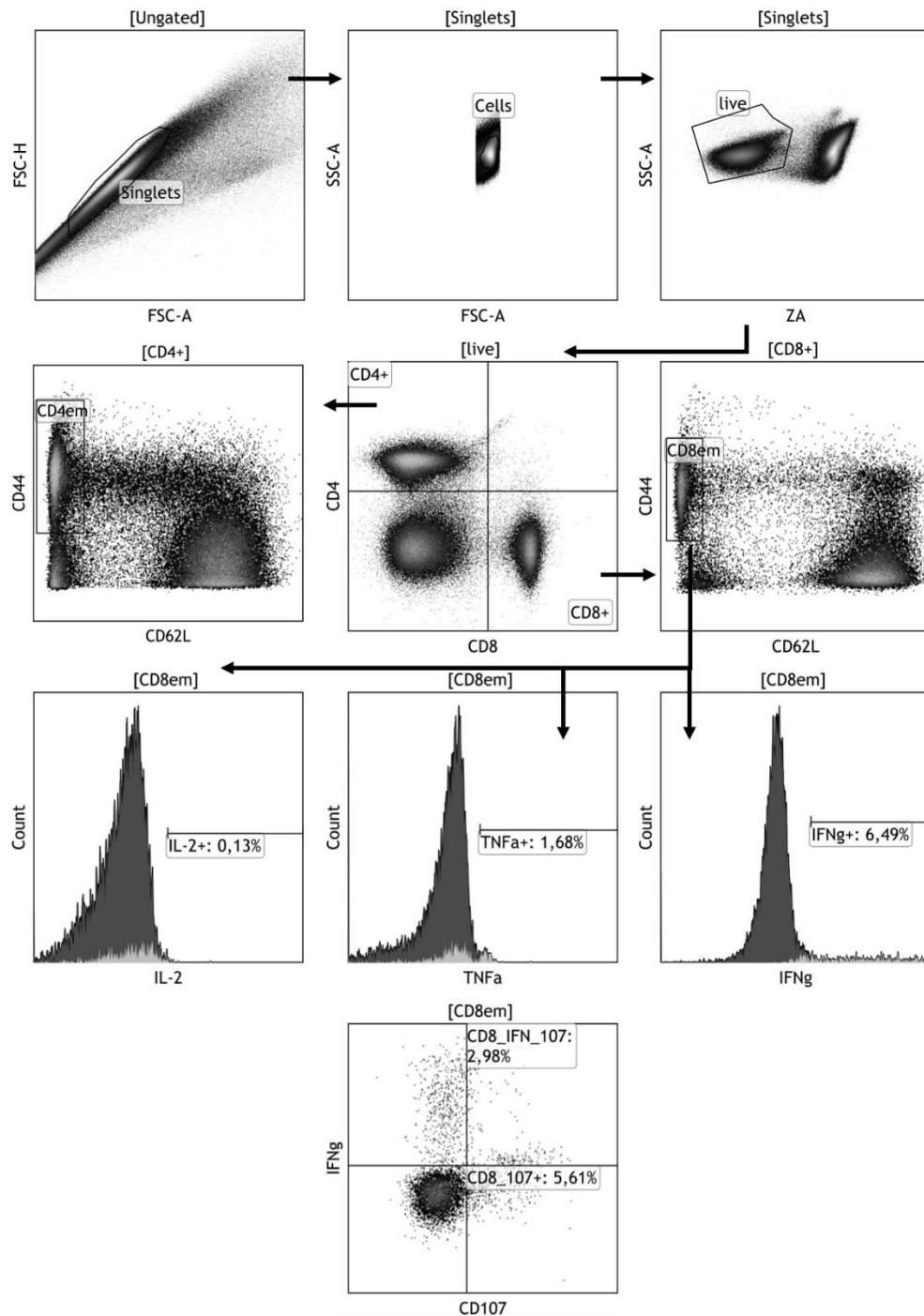


Рисунок П1 - Тактика гейтирования эффекторных Т-клеток памяти.

9.2. Приложение 2

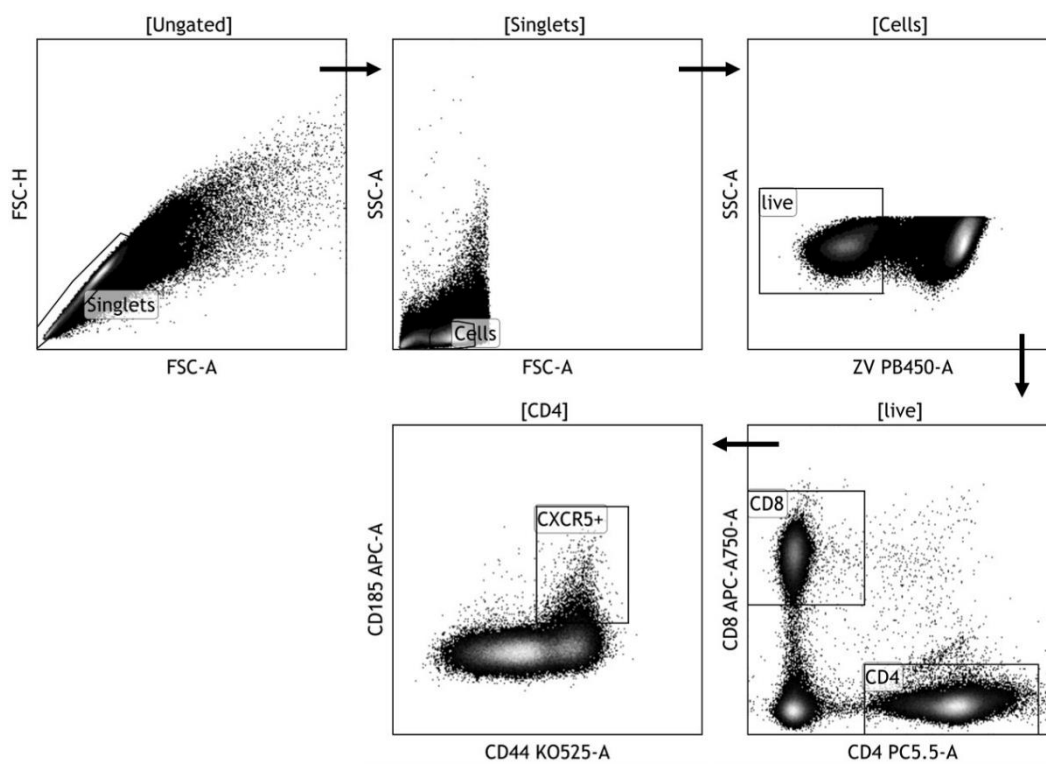


Рисунок П2 - Тактика гейтирования CXCR5+ Т-фолликулярных хелперов.

9.3. Приложение 3

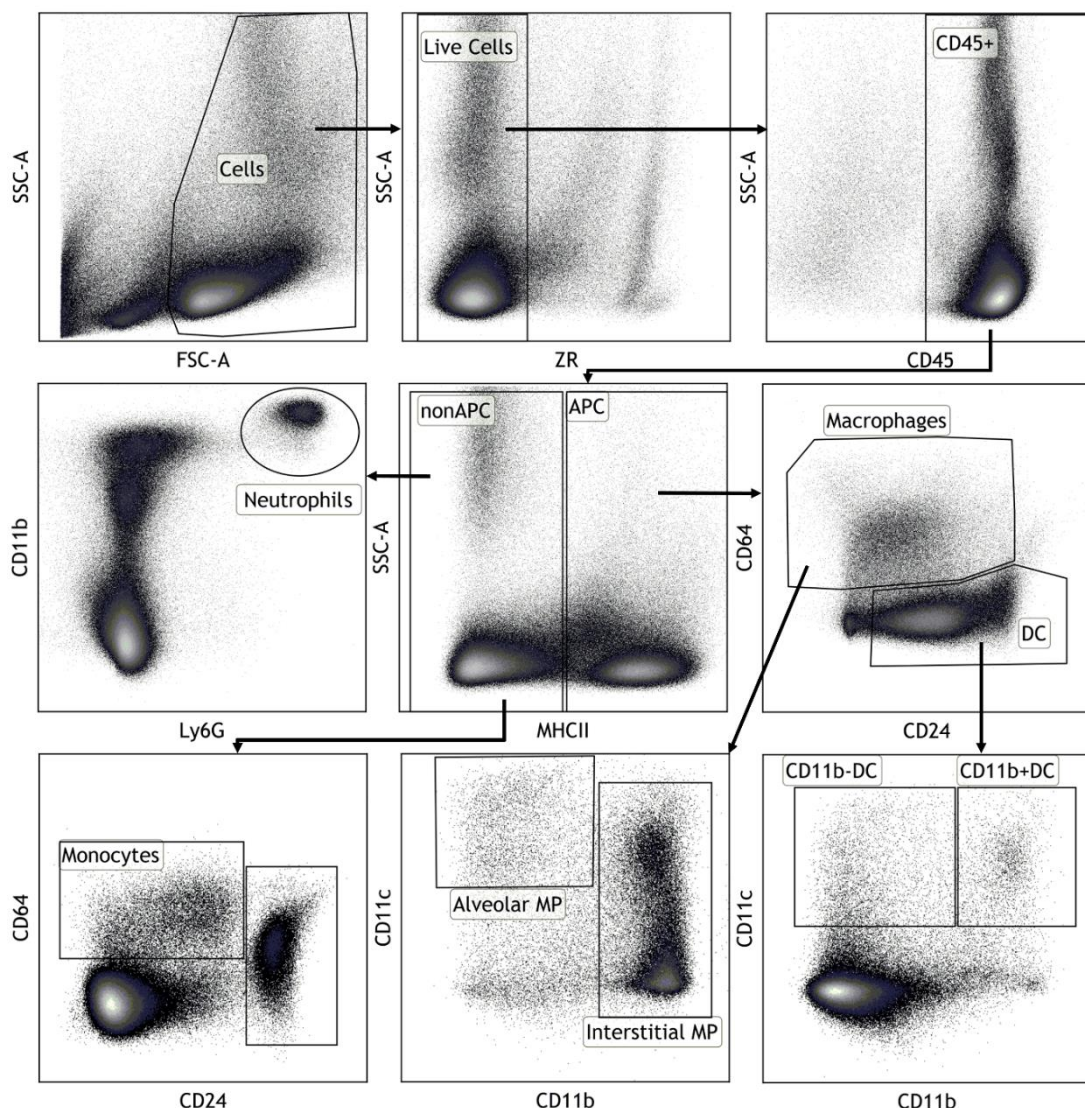


Рисунок ПЗ – Схема последовательного гейтирования при оценке основных клеточных популяций врожденного иммунитета в легких. После отсека дублетов по FSC-A/FSC-H (не показано на рисунке) и выделения популяции живых одиночных клеток на основании характеристик светорассеяния (FSC-A/SSC-A -Cells) и связывания красителя Zombie Red (Live cells) иммуноциты гейтировали по наличию маркера CD45 (CD45+). При дальнейшем анализе выделяли следующие клеточные популяции: нейтрофилы - SSChiCD45+Ly6G+ (Neutrophils); моноциты - MHCII-CD64+CD24+ (Monocytes); Альвеолярные макрофаги - MHCII+CD64+ CD11c+CD11b- (Alveolar MP); Интерстициальные макрофаги - MHCII+CD64+CD11b+ CD11c+/- (Interstitial MP); ДК1 – CD45+CD11c+CD11b-MHCII+CD64-CD24+ (CD11b- DC) и ДК2 – CD45+CD11c+CD11b+MHCII+CD64-CD24+ (CD11b+ DC). Прочие условные обозначения: nonAPC - не АПК; APC - АПК; DC - ДК; MP- макрофаги.

9.4. Приложение 4

Таблица П1. Дизайн исследования специфической активности вакцины Грифлавак (серия 010424) на хорьках

№ группы	Препарат	Кол-во животных	Дни с начала опыта								Забор крови после заражения (56-й день исследования)
			Иммунизация					Заражение вирусом A/H1N1pdm09 (на 42-й день после иммунизации)		Забор носовых смывов (45-й и 48-й день)	
			Забор крови до начала исследования	Иммунизация (0 день)	Иммунизация (21 день)	Забор носовых смывов (40 день)	Забор крови (21-й и 42-й дни)	Штамм вируса гриппа (сезонный)	Наблюдение (в течение 14 дней после заражения)		
1	Вакцина Грифлавак, серия 010424	5	–1-й день исследования	и/н, 10 мкг/0,5 мл	и/н, 10 мкг/0,5 мл	антитела в носовых смывах	21-й (антитела) и 42-й день исследования (антитела и ELISPOT)	A/H1N1pdm09 5 хорьков	1. оценка массы тела и температуры, клинические признаки инфекции 2. вирусовыделение из смывов на 3-и и 5-е сутки после заражения	вирусовыделение в носовых смывах	кровь на антитела и ELISPOT
2	Вакцина Грифлавак, серия 010424	5	–1-й день исследования	п/к, 10 мкг/0,5 мл	п/к, 10 мкг/0,5 мл	антитела в носовых смывах	21-й (антитела) и 42-й день исследования (антитела и ELISPOT)	A/H1N1pdm09 5 хорьков		вирусовыделение в носовых смывах	кровь на антитела и ELISPOT
3	Контрольная группа	5	–1-й день исследования	0,5 мл	0,5 мл	антитела в носовых смывах	21-й (антитела) и 42-й день исследования (антитела и ELISPOT)	A/H1N1pdm09 5 хорьков		вирусовыделение в носовых смывах	кровь на антитела и ELISPOT