

На правах рукописи

ШУКЛИНА Марина Александровна

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

Специальность 1.5.10 – Вирусология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Санкт-Петербург
2025

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный
руководитель:

Цыбалова Людмила Марковна

доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунобиологических технологий ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России

Официальные
оппоненты:

Ленёва Ирина Анатольевна

доктор биологических наук, профессор, заведующая лабораторией экспериментальной вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И.Мечникова

Шмаров Максим Михайлович

доктор биологических наук, руководитель лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи»

Ведущая
организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера»

Защита диссертации состоится 2 декабря 2025 года в 13 часов 00 минут на заседании диссертационного совета ДС 21.1.017.01 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России по адресу: 197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17), Тел.: (812) 499 15 00;

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А.Смородинцева» Минздрава РФ и на сайте <https://www.influenza.spb.ru/>

Автореферат диссертации разослан «__» _____ 2025 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета ДС 21.1.017.01

Кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования:

Попытки решить проблему профилактики гриппа — самой массовой инфекции современности — начались во второй половине 1930-х годов, сразу после открытия его возбудителя. Первые прототипы вакцин были разработаны 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 эффективным средством профилактики и снижения тяжести 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. Эти ограничения требуют не только оптимизации существующих технологий (переход на культуральные вакцины, добавление высокоэффективных адьювантов), но и создания принципиально новых подходов. ВОЗ поставила задачу разработать к 2027 году вакцины, обеспечивающие защиту от тяжелого гриппа минимум на 5 лет, при обязательном формировании стерильного иммунитета ["WHO preferred product characteristics for next generation influenza vaccines", 2017].

Современные подходы включают создание вакцин на основе вирусоподобных частиц, рекомбинантных белков, вирусных векторов, РНК-технологий [CIDRAP Universal Influenza Vaccine Technology Landscape]. Особое внимание уделяется рекомбинантным вакцинам, благодаря их безопасности, скорости производства и возможности

применения среди контингентов с ослабленным иммунитетом (пожилые люди, маленькие дети, пациенты с хроническими заболеваниями).

Перспективным направлением является использование консервативных вирусных белков, обеспечивающих защиту от разных субтипов вируса. 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 [Nguyen & Choi, 2021]. Другой перспективный целевой антиген – 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 [Nishiyama et al. 2025]. Вакцины на основе HA2 способны индуцировать гуморальный и Т-клеточный ответ и обеспечивать защиту от гомологичных и гетерологичных вирусов одной филогенетической группы [Ameghi et al. 2016]. Перспективным направлением также является разработка вакцин на основе нуклеопротеина (NP) [Rak et al. 2023], которые могут обеспечить перекрестную защиту от различных штаммов. 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 исследования:

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. Впервые получены химерные белки на основе флагеллина с включением в разной последовательности целевых антигенов, как в область гипервариабельного домена, так и к С концу. Продемонстрировано 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. 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). Продемонстрирована безопасность и широкий диапазон защиты на различных животных моделях.

Теоретическая и практическая значимость работы. Результаты исследования расширяют понимание механизмов формирования протективного иммунитета при использовании вакцин на основе консервативных пептидов вируса гриппа. Дополнены представления о вкладе в иммунный ответ как врожденного, так и специфического компонентов иммунитета.

Охарактеризованные белки представляют основу для создания универсальной противогриппозной вакцины, с возможностью модификации антигенных вставок.

На основе полученных данных разработана вакцина «Грифлавак» (Flg-NA2-4M2ehs), прошедшая полный цикл доклинических испытаний. Подготовлены документы для клинических исследований, включая протокол КИ и брошюру исследователя.

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.

Степень достоверности и апробация результатов.

Достоверность результатов диссертационного исследования основана на: воспроизводимости экспериментальных данных, применении современных методов исследования, репрезентативном объёме материала, корректной статистической обработкой полученных результатов. Материалы диссертационного исследования были представлены на международных конференциях: The fifth ESWI influenza conference, 2014, Riga; "Trends in influenza research" Saint-Petersburg, 2017; "Universal Influenza Vaccines" 2018, Lausanne, Switzerland; «Молекулярные основы эпидемиологии, диагностики, профилактики и лечения актуальных инфекций» СПб, 2018; "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 диссертации опубликовано 23 печатные работы: 13 научных статей в журналах, входящих в перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 10 тезисов докладов.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном планировании и проведении экспериментов на лабораторных животных, участии в дизайне рекомбинантных белков, проведении всех иммунологических исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов, написании научных статей и их подготовке к публикациям. Плазмиды, кодирующие рекомбинантные белки, были получены в ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН (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, 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.).

Финансовая поддержка. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ №15-14-00043 и 15-14-00043-П («Разработка кандидатной рекомбинантной вакцины, направленной на эпидемические и потенциально пандемические вирусы гриппа, на основе консервативных антигенов гемагглютинина и белка М2»), государственного задания МЗ РФ на тему «Физико-химическая характеристика и оценка безопасности мукозальной рекомбинантной гриппозной вакцины на основе консервативных участков вирусных белков HA и M2» (2021-2023гг), а также субсидий молодым ученым, молодым кандидатам наук вузов, отраслевых и академических

институтов, расположенных на территории Санкт-Петербурга (2017, 2018, 2019, 2020гг)

Объем и структура диссертации: Диссертация состоит из введения; трех глав, обсуждения, заключения и списка литературы. Общий объем диссертации 169 страниц, включая 20 таблиц, 38 рисунков. Список использованной литературы содержит 441 наименование.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные культуры. В работе использовали клеточную культуру MDCK (Madin–Darby canine kidney). Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки и 1% антибиотика (Биолот).

Вирусы. Для заражения мышей, иммунизированных рекомбинантными белками, были использованы следующие вирусы гриппа: А/Шанхай/2/2013(Н7N9)-PR8-IDCDC; А/Аичи/2/68 (H3N2); А/Калифорния/07/09 H1N1pdm09, А/Курица/Курган/05/05RG (H5N1), А/Сингапур/1/57 (H2N2), А/PR/8/34 (H1N1). Заражение хорьков проводили эпидемическим штаммом вируса гриппа А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09).

Лабораторные животные. Исследования 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». Использовали самок мышей линии Balb/c и линии C57bl6 в возрасте 6-8 недель (питомники лабораторных животных «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России или «Пушино» РАН Филиал ИБХ им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова), а также самок хорьков в возрасте 10-11 месяцев (АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»).

Анализ аминокислотных последовательностей, поиск Т и В клеточных эпитопов осуществляли с помощью NetCTLpan1.1 Server и базы данных Immune Epitope Database.

Построение 3Д моделей молекул. Изображения трехмерной структуры рекомбинантных белков получали в программе UCSF Chimera v.1.9 с использованием сервера Phyre 2.0. Расчет

теоретической молекулярной массы, GRAVY и индекса нестабильности проводили на сервере ProtParam.

Определение белка по Лоури. Общий белок определяли по Лоури (модификация Петерсона) тест-системой Total Protein Kit, Micro Lowry, Peterson's Modification (Sigma, USA).

Электрофорез белков в полиакриламидном геле и вестерн-блот. Электрофоретическое разделение белков проводили в денатурирующих условиях в присутствии додецилсульфата натрия и 2-меркаптоэтанола по стандартной методике (SDS-ПААГ). После разделения, белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad, USA). Белки определяли окрашиванием мембраны мышинными моноклональными антителами к белку М2 вируса гриппа А (14С2, Abcam, UK) и кроличьими поликлональными антителами к флагеллину (Abcam, UK).

Иммунизация животных. Для оценки иммуногенности рекомбинантных белков, мышей линий С57/В16 или Balb/с иммунизировали трехкратно с интервалом 2 недели интраназально в дозе 10мкг/20мкл или подкожно в дозе 10мкг/100мкл. Хорькам вакцину вводили интраназально или подкожно в дозе 10мкг/500мкл. Животные контрольной группы получали PBS в эквивалентном объеме.

Заражение и оценка репродукции вирусов в легких животных. Животных заражали интраназально под наркозом. После заражения проводили ежедневное наблюдение за животными в течение 14 суток.

Репродуктивную активность штаммов в легких и носовых смывах определяли титрованием в культуре клеток MDCK. Наличие вируса определяли в реакции гемагглютинации. Расчет ТИД50 проводили по методу Рида и Менча и выражали в logТИД50/мл.

Проточная цитометрия. Суспензию клеток легкого получали путем обработки измельченной ткани ферментами коллагеназа (Sigma, Германия) 0.5 мг/мл и ДНКазы I (Sigma, Германия) 10 мг/мл. Селезенки гомогенизировали с использованием пестиковых гомогенизаторов. Эритроциты лизировали реагентом RBC Lysis Buffer (Biolegend, США). Для окрашивания использовали $1 \cdot 10^6$ клеток.

Для выявления Т-лимфоцитов, специфичных к антигенам вируса гриппа, клетки легких или селезенок рассеивали в плоскодонные планшеты в среде RPMI-1640, содержащей 10% фетальной телячьей

сыворотки (Биолот) ($1 \cdot 10^6$ кл/100 мкл). Для стимуляции использовали синтетические пептиды соответствующие последовательности M2e, вирус гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2). При стимуляции, клетки инкубировали в присутствии блокатора клеточного транспорта брэфельдина А (BD, США) при 37° С и 5% CO₂. После стимуляции клетки окрашивали флуорохром-конъюгированными антителами CD8-APC-Cy7, CD4-PerCP, CD44- APC, CD62L- PE-Cy7, CD103-BV785, CD69-BV605, IFN γ -PE, TNF α -BV421, IL2-BV605. Внутриклеточное окрашивание цитокинов проводили с использованием коммерческого набора реагентов Cytofix/Cytoperm (BD, США).

Иммуноферментный анализ (ИФА). ИФА проводили общепринятым методом с использованием 96-луночных планшетов высокой сорбции (Greiner, Германия). В качестве твердой фазы сорбировали синтетические пептиды (5 мкг/мл), а также очищенные вирусы (1 мкг/мл). Использовали поликлональные овечьи антимышинные IgG, IgG1, IgG2a, IgA (Abcam, Великобритания), козы антихорьковые IgG (Novus Biologicals, США) меченые пероксидазой хрена. В качестве субстрата применяли ТМБ (тетраметилбензидин) (Biolegend). После инкубации в течение 15 мин реакцию учитывали при длине волны 450 нм. За титр принимали наибольшее разведение сыворотки, которое дает оптическую плотность, по крайней мере в 2 раза больше, чем бланк.

Статистический анализ данных. Статистическую обработку результатов проводили в программе GraphPad Prizm v.9.4. Сравнение нескольких групп между собой выполняли при помощи однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с последующим попарным сравнением групп при помощи критерия Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Дизайн рекомбинантных белков.

На рисунке 1 представлены блок-схемы всех исследуемых рекомбинантных белков. Все фрагменты отделены друг от друга глицин-богатыми линкерами. На N-конце имеется гистидиновый тэг. В качестве белка-носителя был использован бактериальный белок флагеллин (*Salmonella typhimurium*). В качестве целевых антигенов были использованы: эктодомен белка M2 (M2eh - M2e вирусов гриппа человека типа А (H1N1, H2N2, H3N2); M2es - M2e вируса гриппа

А/Калифорния/07/2009H1N1pdm; M2ek - M2e высоко патогенного вируса гриппа птиц А/Курган/5/05 (H5N1); HA2 - консенсусный фрагмент второй субъединицы (aa76–130) HA вирусом гриппа II филогенетической группы; NP255 - консенсус белка NP (aa 255-275) для вирусов гриппа А; NP335 - высококонсервативная область белка NP (aa 335-350), гомологичная вирусам гриппа А подтипов H1, H2, H3 и H9.

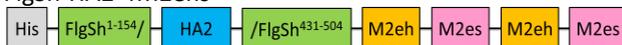
Flg-HA2-4M2ehs



Flg-4M2ehk-HA2



FlgSh-HA2-4M2ehs



Flg-4M2ehs



Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs

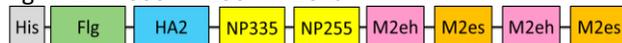
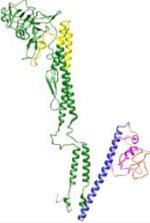
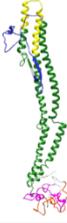
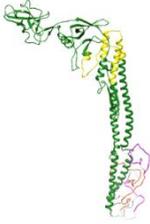
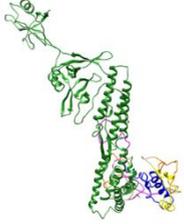
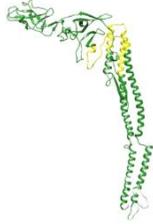


Рисунок 1. Блок-схемы рекомбинантных белков

В таблице 1 приведены рассчитанные трехмерные структуры исследуемых рекомбинантных белков (расчет структур на сервере Phyre 2, визуализация в UCSF Chimera v.1.9.) 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. Сохранение нативной третичной структуры флагеллина наблюдалось для белков Flg-HA2-4M2ehs, Flg-4M2ehk-HA2, Flg-4M2ehs. В структуре белка Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs наблюдались выраженные изменения третичной структуры по сравнению с флагеллином без вставки антигенов. Нативная альфа-спиральная структура HA2 сохранялась только у белка Flg-HA2-4M2ehs.

Таблица 1. Теоретически рассчитанные трехмерные структуры рекомбинантных белков

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

Иммуногенность и кросс-протективность кандидатных белков при подкожном введении мышам.

Мышей линии Balb/c иммунизировали 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. Иммунизация белками Flg-HA2-4M2ehs, FlgSh-HA2-4M2ehs, Flg-4M2ehs индуцировала высокие уровни анти-M2e антител в сыворотках (рис. 2А). Через 2 недели после 3й иммунизации животных заражали вирусами гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) или А/Шанхай/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC в дозе 10LD50. Все исследуемые химерные белки продемонстрировали высокие уровни защиты при летальном заражении обоими вирусами (90-100%) (рис. 2БВ). Белок-носитель флагеллин не вызывал неспецифической защиты.

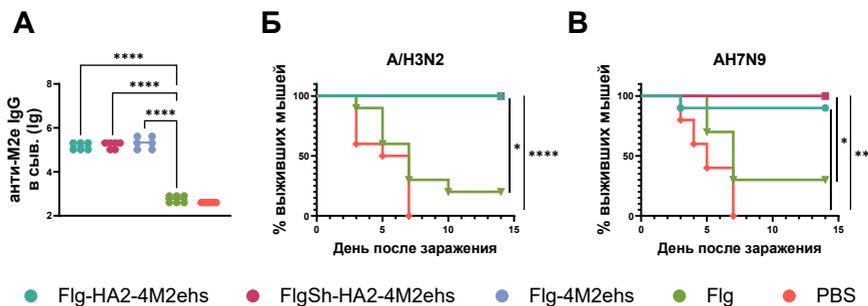


Рисунок 2. Уровни M2e-специфических IgG в сыворотках мышей после 3й иммунизации (А) (двухфакторный ANOVA с поправкой Тьюки, ****: $p < 0,0001$); Кривые Каплана-Майера, отражающие долю (%) выживших животных после заражения А/Аичи/2/68 (H3N2) (Б) или А/Шанхай/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC (В) в дозе 10LD50 (тест Мантела-Кокса с поправкой Бонферрони, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ****: $p < 0,0001$).

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

Интраназальная иммунизация белками Flg-HA2-4M2ehs, FlgSh-HA2-4M2ehs, Flg-4M2ehs индуцировала высокие уровни анти-M2e антител в сыворотках мышей (рис. 3А), однако при иммунизации химерным белком с укороченным флагеллином титры анти-M2e IgG были значимо ниже, чем для конструкций с полноразмерным белком. Иммунизация всеми химерными белками приводила к формированию анти-M2e IgG и IgA в БАЛ (рис. 3Б). Существенное образование вирус-специфических IgA наблюдалось в носовых смывах только при иммунизации рекомбинантными белками Flg-HA2-4M2ehs и FlgSh-HA2-4M2ehs (рис. 3В).

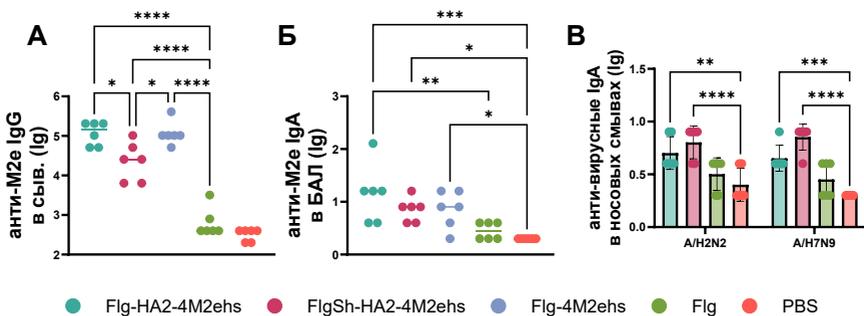


Рисунок 3. Уровни M2e-специфических IgG в сыворотках (А), IgA в БАЛ (Б) и вирус-специфических IgA в носовых смывах (В) после 3й иммунизации (двухфакторный ANOVA с поправкой Тьюки, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Через 2 недели после последней иммунизации 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. 4). Иммунизация химерным белком Flg-HA2-4M2ehs приводила к 90-100% защите животных от всех подтипов. Защитный эффект белка без вставки последовательности HA2 (Flg-4M2ehs) был значительно ниже при заражении вирусом гриппа подтипа А/Н2N2 (60%) (рис. 4В). 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.

Показано, что иммунизация Flg-HA2-4M2ehs индуцирует активацию клеток врожденного иммунитета, а именно увеличение относительного содержания нейтрофилов, моноцитов и интерстициальных макрофагов на фоне снижения уровня дендритных клеток, а также усиление экспрессии маркера CD86.

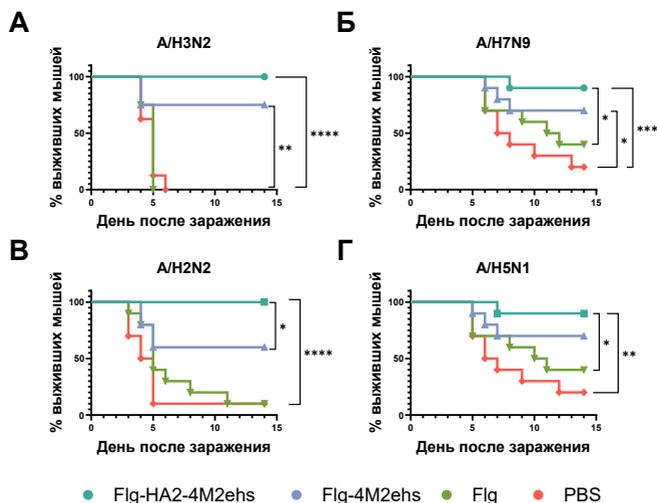


Рисунок 4. Кривые Каплана-Майера, отражающие долю (%) выживших животных после заражения в дозе 10LD50 вирусами: (А) А/Аичи/2/68 (H3N2), (Б) А/Шанхай/2/2013(H7N9)-PR8-IDCDC, (В) А/Сингапур/1/57 (H2N2), (Г) А/Курица/Курган/05/05RG (H5N1) (тест Мантела-Кокса с поправкой Бонферрони, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Взаимосвязь иммуногенности рекомбинантного белка с порядком присоединения антигенов.

Влияние последовательности присоединения антигенов на иммуногенность и протективность оценивали на двух белках: Flg-4M2ehk-NA2, в котором к С-концу флагеллина были последовательно присоединены четыре копии пептида M2e, затем NA2-фрагмент, и Flg-NA2-4M2ehk, где к флагеллину был сначала присоединен NA2-фрагмент, а затем 4M2e.

После трехкратной, интраназальной иммунизации обе конструкции индуцировали высокие уровни сывороточных анти-M2e IgG (Рис. 5А), однако титры были выше при иммунизации Flg-NA2-4M2ehk. Уровень антивирусных IgG к А/Аичи/2/68 (H3N2) был также значимо выше (рис. 5В) у мышей, иммунизированных Flg-NA2-4M2e. Иммунизация гибридным белком Flg-NA2-4M2ehk стимулировала и более высокие уровни анти-M2e IgA в БАЛ, чем белок Flg-4M2ehk-NA2 (рис 5Б). Таким образом, гибридный белок с концевым положением

M2e-пептидов оказался более иммуногенным, чем белок с внутренней локализацией этих пептидов.

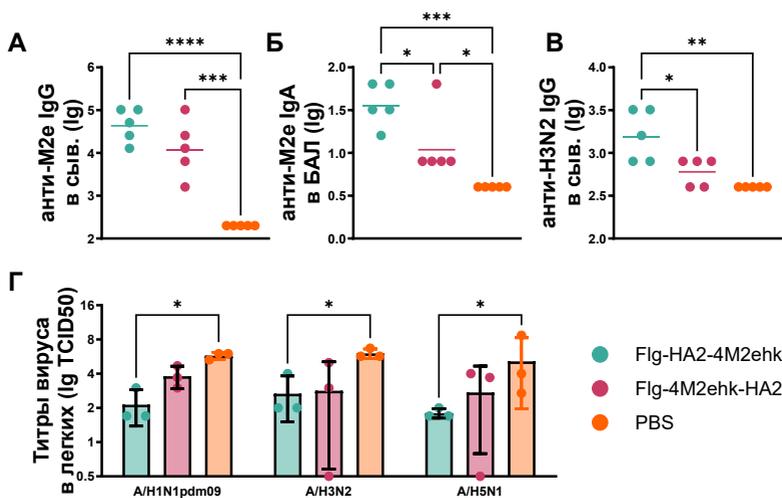


Рисунок 5. Уровни M2e-специфических IgG в сыворотках (А), IgA в БАЛ (Б) и вирус-специфических IgG в сыворотках (В) после 3й иммунизации. Уровень репликации вирусов А/Аичи/2/68 (H3N2), А/PR/8/34 (H1N1) и А/Курган/5/05 (H5N1) на 6е сутки после заражения в дозе 5LD50 (Г) (двухфакторный ANOVA с поправкой Тьюки, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

Через две недели после 3й иммунизации мышей заражали вирусами А/Аичи/2/68 (H3N2), А/PR/8/34 (H1N1) и А/Курган/5/05 (H5N1) в дозе 5LD50 и на 6е сутки после заражения определяли титры вируса в легких (рис. 5Г). Иммунизация белком Flg-HA2-4M2ehk приводила к снижению вирусных титров в отношении всех трех вирусов. Гибридный белок Flg-4M2ehk-HA2 приводил к менее выраженному снижению репродукции вирусов в легких, достоверные различия с контролем заражения (PBS) отсутствовали.

Инсерция СТЛ-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 4M2е были встроены 2 фрагмента белка NP (NP335, NP255). В качестве препарата сравнения выступал белок Flg-HA2-4M2ehs. Мышей линии Balb/c и C57bl6 иммунизировали рекомбинантными белками подкожно трехкратно с интервалом в 2 недели.

Иммунизация белком, содержащим эпитопы NP, приводила к значительному снижению уровней анти-M2е антител, и отсутствию вирус-специфических IgG по сравнению с рекомбинантным белком Flg-HA2-4M2ehs (рис. 6).

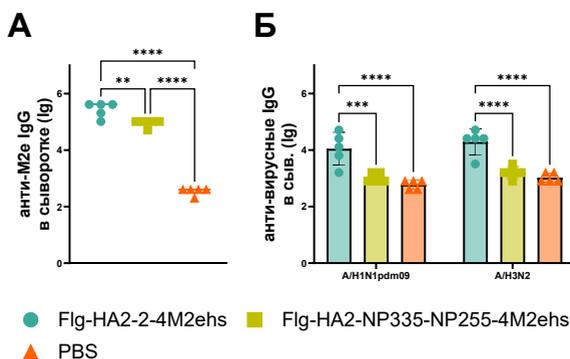


Рисунок 6. Уровни M2е-специфических IgG (А), вирус-специфических IgG в сыворотках (Б) после 3й иммунизации (двухфакторный ANOVA с поправкой Тьюки, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

В селезенках мышей C57bl6 белок Flg-HA2-4M2ehs стимулировал появление M2е-специфичных CD4⁺ Tem, продуцирующих IL-2, а также двойных продуцентов IL-2+IFN- γ + (рис. 7А). При иммунизации белком Flg-HA2-NP335-NP255-4M2ehs, появлялись NP-специфические IFN- γ -продуцирующие CD8⁺ Tem (рис. 7Б). Иммунизация как одним, так и другим рекомбинантным белком, приводила к значительному увеличению популяции вирус-специфических CD4⁺Tem и CD8⁺Tem монопродуцентов IFN- γ по сравнению с контрольной группой (рис. 7ВГ).

Вместе с тем, защитный эффект обеих конструкций был сопоставим (90-100%) при заражении пандемическим штаммом

А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09) или А/Аичи/2/68 (H3N2) в дозе 10LD50.

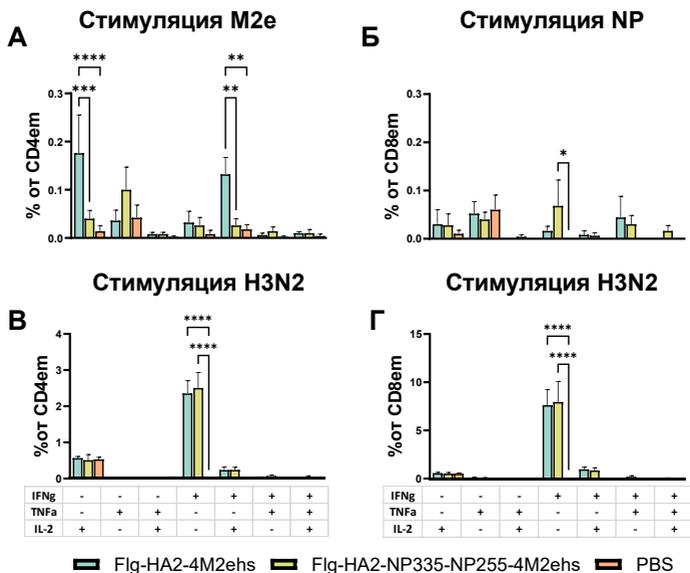


Рисунок 7. M2e-специфический CD4+ (А), NP-специфический CD8+ (Б) и вирус-специфический CD4+ и CD8+ Тем ответ в селезенках (двухфакторный ANOVA с поправкой Тьюки, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$, ****: $p < 0,0001$).

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

Эффективность кандидатного вакцинного белка Flg-HA2-4M2ehs оценивали при сочетанной вакцинации с ИГВ. Для этого мышей трехкратно интраназально иммунизировали Flg-HA2-4M2ehs в дозе 10мкг/животное и параллельно прививали ИГВ (группа Flg-HA2-4M2ehs+ИГВ). Группой сравнения были животные, получавшие только ИГВ.

При заражении мышей вирусом А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09) в дозе 10LD50 обе схемы вакцинации обеспечивали защиту животных (90-100%) (рис. 8А). 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.8Б). Полная защита животных от заражения

высокопатогенным вирусом гриппа птиц А/Курган/05/05 H5N1 в дозе 5LD50 была также обеспечена только сочетанием Flg-NA2-4M2ehs+ИГВ, защита мышей, привитых ИГВ составила 70% (рис. 8В).

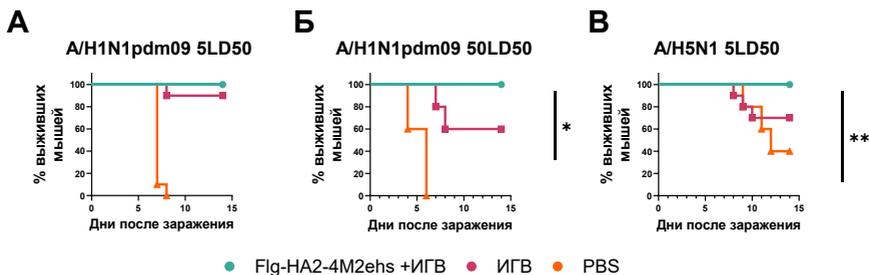


Рисунок 8. Кривые Каплана-Майера, отражающие долю (%) выживших животных после заражения вирусами А/Калифорния/07/09 (H1N1pdm09) в дозе 5LD50 (А) и 50LD50 (Б), А/Курица/Курган/05/05RG (H5N1) (В) (тест Мантела-Кокса с поправкой Бонферрони, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

Специфическая активность кандидатной вакцины на хорьках при интраназальном и подкожном введении.

На основе рекомбинантного белка Flg-NA2-4M2ehs была разработана вакцина «Грифлавак».

Хорьков иммунизировали двукратно интраназально или подкожно с интервалом в 21 день. Через 21 день после 2й иммунизации хорьков опытных и контрольной групп заражали вирусом А/Южная Африка/3626/13 (H1N1pdm09) в дозе 7,3 lg ЭИД50. Отбор образцов крови проводили на дни исследования 0, 21, 42 и 56.

Как при интраназальном, так и при подкожном введении вакцины было показано нарастание M2e-специфических, а также вирус-специфических IgG в сыворотках крови хорьков (Рис. 9АБ). В ELISPOT при стимуляции мононуклеаров периферической крови хорьков моновакциной подтипа А/H3N2 через 2 недели после заражения вирусом гриппа А/H1N1pdm09 был показан достоверный прирост количества спотов в обеих опытных группах по отношению к контрольной группе (Рис. 9В).

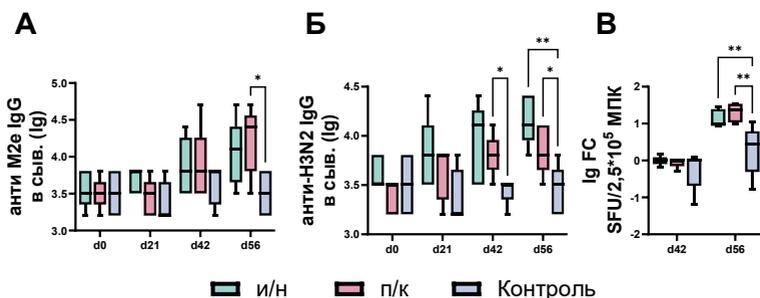


Рисунок 9. Уровни M2e-специфических IgG (А), вирус-специфических IgG в сыворотках хорьков (Б). Нормализованные данные кратности изменений числа спотов ($\lg FC SFU/2,5 \cdot 10^5$ МПК) относительно 0-го дня исследования (В). (двухфакторный ANOVA с поправкой Тьюки, *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$).

На фоне заражения вирусом гриппа A/H1N1pdm09 зарегистрированы положительные эффекты вакцинации, такие как достоверное сокращение периода повышенной температуры (подкожная иммунизация); меньшее снижение массы тела (интраназальная иммунизация) (рис 10А, 10Б); снижение уровня репродукции вируса в носовых смывах на 3-й день после заражения (рис 10В).

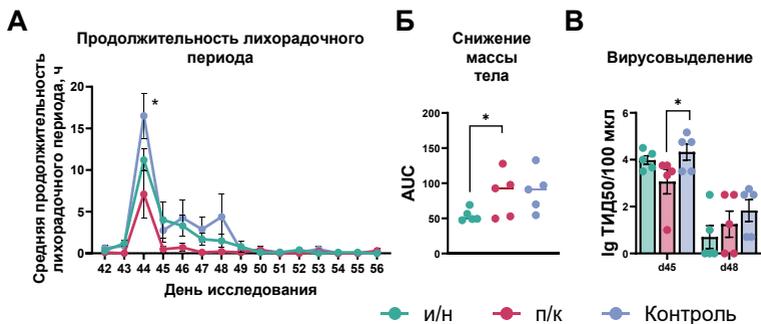


Рисунок 10. Средняя продолжительность лихорадочного периода в период наблюдения после заражения (А). Снижение массы тела (AUC) хорьков (Б). Вирусыведение из носовых смывов хорьков на 3-и (d45) и 5-е (d48) сутки после заражения вирусом гриппа A/H1N1pdm09 (В) (одно- или двухфакторный ANOVA с поправкой Тьюки, *: $p < 0,05$)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Настоящая работа посвящена изучению иммуногенности и протективных свойств рекомбинантных белков, содержащих консервативные участки гемагглютиниона, белков М2 и NP - вируса гриппа А. В качестве носителя для антигенов был выбран белок жгутиков бактерий *Salmonella typhimurium* - флагеллин, являющийся лигандом TLR5. Были сконструированы ряд белковых конструкций с включением 4-х копий эктодомена белка М2 и фрагмента НА2 в гипервариабельный домен флагеллина, а также с присоединением НА2, М2е и CTL эпитопов белка NP к С концу флагеллина в разной последовательности.

На мышинной модели показана иммуногенность и защитная эффективность всех исследуемых конструкций, как при интраназальном, так и подкожном введении. Оптимальными характеристиками обладал белок Flg-НА2-4М2ehs, интраназальный способ введения которого дополнительно вызывал формирование секреторных IgA антител и эффективнее снижал вирусную нагрузку в легких инфицированных животных. Иммунизация кандидатным белком Flg-НА2-4М2ehs вызывала формирование кросс-реактивных антител, способных связываться как с гомологичным, так и с гетерологичными штаммами вируса гриппа А, а также индуцировала активацию клеток врожденного иммунитета (моноцитов, нейтрофилов, интерстициальных макрофагов).

Комбинированная иммунизация животных препаратом на основе белка Flg-НА2-4М2ehs и ИГВ приводила к усилению защиты животных от гомологичного штамма вируса гриппа в высокой дозе (50LD50), а также к выраженной защите от высокопатогенного вируса птичьего гриппа А/Н5N1 и снижению тяжести течения инфекции (снижение вирусной нагрузки в легких). На основе данного белка была разработана кандидатная вакцина «Грифлавак».

Безопасность и специфическая активность вакцины «Грифлавак» показана на хорьках при интраназальном и подкожном способах введения. Вакцина «Грифлавак» при двукратном введении индуцировала, как М2е-специфический, так и вирус-специфический IgG ответ в сыворотках крови хорьков, а также стимулировала синтез IFN- γ после стимуляции клеток крови вирусом А/Н3N2, что свидетельствует о формировании специфического Т-клеточного

ответа. После заражения хорьков вирусом гриппа A/H1N1pdm09 у иммунизированных хорьков симптомы вирусной инфекции (продолжительность периода повышенной температуры, потеря массы тела, репродукция вируса в верхних дыхательных путях) были значительно менее выраженными по сравнению с контрольными животными.

Вакцина «Грифлавак» продемонстрировала выраженную иммуногенность у лабораторных животных (мышей и хорьков), стимулируя выработку сывороточных и мукозальных антиген-специфических антител; антиген-специфических моно- и полифункциональных эффекторных Т-клеток памяти в периферических лимфоидных органах (как при интраназальном, так и при подкожном 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 консервативные вирусные пептиды и флагеллин. Полученные данные обосновывают необходимость дальнейшего изучения иммуногенности конструкций, содержащих фрагменты нуклеопротеина, на релевантных животных моделях. Особое внимание следует уделить оценке 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. Требуется дальнейшего исследования вопрос праймирующего эффекта рекомбинантных вакцин или их сочетанного действия с традиционными сезонными вакцинами.

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 M2.

3. Наиболее перспективным с точки зрения специфического гуморального и Т-клеточного ответа оказался рекомбинантный белок Flg-HA2-4M2ehs.

4. Как парентеральный, так и интраназальный способ введения кандидатного вакцинного белка Flg-HA2-4M2ehs 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 сокращению 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.

СПИСОК СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Shuklina, M., Stepanova, L., Ozhereleva, O., Kovaleva, A., Vidyayeva, I., Korotkov, A., & Tsybalova, L. (2024). Inserting CTL Epitopes of the Viral Nucleoprotein to Improve Immunogenicity and Protective Efficacy of Recombinant Protein against Influenza A Virus. *Biology*, 13(10), 801.

2. Stepanova, L. A., Shuklina, M. A., Vasiliev, K. A., Kovaleva, A. A., Vidyayeva, I. G., Zabrodsкая, Y. A., ... & Tsybalova, L. M. (2022). Flagellin-Fused Protein Targeting M2e and HA2 Induces Innate and T-Cell Responses in Mice of Different Genetic Lines. *Vaccines*, 10(12), 2098.
 3. Шуклина М. А., Степанова Л. А., Ковалева А. А., Коротков А. В., Шалджян А. А., Зайцева М. В., ... & Цыбалова Л. М. (2020). Интраназальная иммунизация рекомбинантным белком на основе M2e-пептида и фрагмента второй субъединицы гемагглютинаина вирусов гриппа А индуцирует кросс-протективный гуморальный и Т-клеточный ответ у мышей. *Медицинская иммунология*, 22(2), 357-370.
 4. Цыбалова Л. М., Степанова Л. А., Шуклина М. А., Коротков А. В., Зайцева М. В., Грищенко В. И., & Котляров Р. Ю. (2019). Особенности иммунного ответа на гриппозную инфекцию у животных, вакцинированных универсальной вакциной. *Инфекция и иммунитет*, 9(3-4).
 5. Tsybalova L. M., Stepanova L. A., Shuklina M. A., Mardanova E. S., Kotlyarov R. Y., Potapchuk M. V., ... & Ravin N. V. (2018). Combination of M2e peptide with stalk HA epitopes of influenza A virus enhances protective properties of recombinant vaccine. *PLoS One*, 13(8), e0201429.
- Q1**
6. Stepanova L. A., Kotlyarov R. Y., Shuklina M. A., Blochina E. A., Sergeeva M. V., Potapchuk M. V., ... & Tsybalova L. M. (2018). Influence of the Linking Order of Fragments of HA2 and M2e of the influenza A Virus to Flagellin on the Properties of Recombinant Proteins. *Acta Naturae* (англоязычная версия), 10(1 (36)).
 7. Stepanova L. A., Mardanova E. S., Shuklina M. A., Blokhina E. A., Kotlyarov R. Y., Potapchuk M. V., ... & Ravin N. V. (2018). Flagellin-fused protein targeting M2e and HA2 induces potent humoral and T-cell responses and protects mice against various influenza viruses A subtypes. *Journal of biomedical science*, 25(1), 33. **Q1**
 8. Цыбалова Л. М., Степанова Л. А., Шуклина, М. А., Петров С. В., Ковалёва А. А., Потапчук М. В., ... & Егоров В. В. (2018). Кросс-протективные свойства противогриппозной вакцины на основе рекомбинантного белка НВс4М2е. *Вопросы вирусологии*, 63(2).
 9. Степанова Л. А., Шуклина М. А., Блохина Е. А., Котляров Р. Ю., Ковалева А. А., Равин Н. В., Цыбалова Л. М. (2018). Эффективность кросс-протективной рекомбинантной противогриппозной вакцины,

включающей консервативные эпитопы вирусных белков М2 и гемагглютинаина. *Журнал инфектологии*, 9(4), 43-52.

10. Цыбалова Л. М., Степанова Л. А., Котляров Р. Ю., Блохина Е. А., Шуклина М. А., Марданова Е. С., ... & Равин Н. В. (2017). Усиление эффективности кандидатной вакцины против гриппа сочетанием консервативных последовательностей гемагглютинаина и М2 белка. *Эпидемиология и вакцинопрофилактика*, 16(3 (94)).

11. Stepanova L. A., Sergeeva M. V., Shuklina M. A., Shaldzhyan A. A., Potapchuk M. V., Korotkov A. V., & Tsybalova L. M. (2016). A Fusion protein based on the second subunit of Hemagglutinin of influenza a/H2N2 viruses provides cross immunity. *Acta Naturae* (англоязычная версия), 8(2 (29)).

12. Tsybalova, L. M., Stepanova, L. A., Kuprianov, V. V., Blokhina, E. A., Potapchuk, M. V., Korotkov, A. V., Kasyanenko M. A. (Shuklina M.A.), Kiselev, O. I. (2015). Development of a candidate influenza vaccine based on virus-like particles displaying influenza M2e peptide into the immunodominant region of hepatitis B core antigen: Broad protective efficacy of particles carrying four copies of M2e. *Vaccine*, 33(29), 3398-3406.

13. Stepanova L. A., Kotlyarov R. Y., Kovaleva A. A., Potapchuk M. V., Korotkov A. V., Sergeeva M. V., Kasyanenko M.A. (Shuklina M.A.) ... & Skryabin K. G. (2015). Protection against multiple influenza A virus strains induced by candidate recombinant vaccine based on heterologous M2e peptides linked to flagellin. *PLoS One*, 10(3), e0119520. **Q1**

Список сокращений

AUC – площадь под кривой (area under curve)

CTL – цитотоксические Т-клетки (Cytotoxic T cell)

M2eh - M2e вирусов гриппа человека типа А (H1N1, H2N2, H3N2)

M2es - M2e вируса гриппа А/Калифорния/07/2009H1N1pdm

M2ek - M2e высокопатогенного вируса гриппа птиц А/Курган/5/05 (H5N1)

TLR5 – Toll-like receptor 5

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

ДК – дендритные клетки

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

ТМБ - тетраметилбензидин

Благодарности

Автор выражает искреннюю и глубокую благодарность своему научному руководителю, д.м.н. Цыбаловой Людмиле Марковне, за бесценный вклад в работу: формулировку актуальной научной проблемы, неизменную мотивацию, внимание и всестороннюю поддержку на всех этапах исследования.

Особая признательность адресована заведующей лабораторией векторных вакцин ФГБУ «НИИ Гриппа им. А.А. Смородинцева» к.м.н. Стуковой Марине Анатольевне и заведующему лабораторией иммунобиологических технологий Клотченко Сергею Анатольевичу за создание условий для работы и консультативную помощь. Автор благодарен коллегам — Потапчук Марине Валентиновне, к.б.н. Сергеевой Марии Валерьевне, к.м.н. Шурыгиной Анне-Полине Сергеевне, к.б.н. Романовской-Романько Екатерине Андреевне, к.б.н. Васильеву Кириллу Александровичу, Короткову Александру Владимировичу — за практическую и консультативную помощь, оказанную в ходе выполнения диссертационного исследования.

Отдельные слова благодарности автор выражает к.б.н. Степановой Людмиле Алексеевне за всестороннюю помощь, передачу уникального профессионального опыта и искреннюю поддержку.

Автор выражает благодарность коллегам из лаборатории систем молекулярного клонирования Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук под руководством д.б.н. Равина Николая Викторовича конструирование плазмид кодирующих все исследуемые рекомбинантные белки, а также коллегам из лаборатории безопасности лекарственных средств ФГБУ «НИИ Гриппа им. А.А. Смородинцева» под руководством д.б.н. Сивака Константина Владимировича.

Автор признателен рецензентам — д.б.н. Кривицкой Вере Зорьевне и д.м.н. Саватеевой-Любимовой Татьяне Николаевне — за внимательное прочтение рукописи и ценные рекомендации, которые были учтены при доработке диссертации.