

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ УНИВЕРСАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА

И.Б. Есмагамбетов¹, С.В. Алексеева¹, Х.С. Саядян², М.М. Шмаров¹

¹ ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, Россия

² Первый Московский Государственный Медицинский Университет им. Сеченова, Москва, Россия

Резюме. Грипп является сезонным инфекционным заболеванием, широко распространенным по всему земному шару. В России на долю гриппа и других ОРВИ приходится до 90% всей инфекционной патологии. Научно обоснованным методом профилактики гриппа является вакцинация. Однако современные классические вакцины против гриппа не способны индуцировать защиту от всего многообразия штаммов вируса, существенно различающихся по своей антигенной структуре, и таким образом требуют периодического обновления своих ключевых компонентов. Кроме того, существует угроза возникновения пандемии, связанной с появлением совершенно нового в антигеном отношении варианта вируса гриппа А. Попытки улучшить традиционные подходы к вакцинации были сосредоточены в основном на совершенствовании технологий производства вакцин и повышении их иммуногенности. Следовательно, актуальной задачей является создание вакцин, способных индуцировать иммунный ответ широкого спектра против различных штаммов вируса гриппа человека и штаммов вируса гриппа птиц, также способных вызывать заболевания у людей. Протективный эффект универсальных вакцин должен обеспечиваться индукцией комплексного иммунного ответа, базирующегося на выработке кросс-реактивных антител и Т-клеток. Разработка такой универсальной вакцины сможет снять необходимость в периодическом обновлении штаммового состава существующих вакцин и, соответственно, сможет дать возможность производителю вакцин самому вести производственное планирование вне зависимости от эпидемических сезонов. В настоящее время наиболее широко исследуемыми антигенами в качестве ключевых компонентов противогриппозных вакцин являются белки М2, NP а также гемагглютинин вируса гриппа. В данном обзоре суммированы и приведены некоторые данные отечественных и зарубежных исследований по созданию универсальных противогриппозных вакцин.

Ключевые слова: вирус гриппа, универсальная вакцина, гемагглютинин, М2 (ионный канал), нуклеопротеин, иммунный ответ широкого спектра.

CURRENT APPROACHES TO UNIVERSAL VACCINE AGAINST INFLUENZA VIRUS

Esmagambetov I.B.^a, Alekseeva S.V.^a, Sayadyan K.S.^b, Shmarov M.M.^a

^a Gamaleya Research Center of Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russian Federation

^b I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Influenza is a seasonal infectious disease widespread across the globe. In Russia the share of influenza and other acute respiratory viral infections account for up to 90% of all infectious diseases. Scientific and reasonable method of influenza prevention is vaccination. However, traditional current influenza vaccines can't induce protection against

Адрес для переписки:

Есмагамбетов Ильяс Булатович
123098, Москва, ул. Гамалеи, 18, ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии
и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи.
Тел.: 8 (499) 193-30-01 (служебн.). Факс: 8 (499) 193-61-83.
E-mail: dmitrovboy@mail.ru

Contacts:

Ilias B. Esmagambetov
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18,
Gamaleya Research Center of Microbiology and Epidemiology.
Phone: +7 (499) 193-30-01 (office). Fax: +7 (499) 193-61-83.
E-mail: dmitrovboy@mail.ru

Библиографическое описание:

Есмагамбетов И.Б., Алексеева С.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М.
Современные подходы к созданию универсальной вакцины против
вируса гриппа // Инфекция и иммунитет. 2016. Т. 6, № 2. С. 117–132.
doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-117-132

Citation:

Esmagambetov I.B., Alekseeva S.V., Sayadyan K.S., Shmarov M.M. Current
approaches to universal vaccine against influenza virus // Russian Journal
of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2016, vol. 6, no. 2,
pp. 117–132. doi: 10.15789/2220-7619-2016-2-117-132

© Есмагамбетов И.Б. и соавт., 2016

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2016-2-117-132>

various virus strains that differ substantially in terms of their antigenic structure, and thus require periodic updates to its immunogenic components. In addition, there is the risk of a pandemic caused by an entirely new antigen in relation to variants of influenza virus A. Attempts to improve on traditional approaches to vaccination have focused primarily on improving production technologies and to increase immunogenicity of vaccines. Therefore, the urgent task is the creation of vaccines able to induce immune response a broad spectrum against different influenza virus strains and human strains of avian influenza, also can cause disease in humans. Protective effect of universal vaccine should be the induction of integrated immune response, based on the formulation of cross-reactive antibodies and T cells. The development of such universal vaccine could remove the need for periodical strain composition update of existing vaccines and, accordingly, will be able to give the vaccine manufacturer itself, production planning regardless of epidemic seasons. Currently, the most widely studied antigens as key components of flu vaccines are proteins M2 and NP as well as the hemagglutinin of influenza virus. This review summarizes and lists some data of domestic and foreign research on a universal influenza virus vaccine.

Key words: *influenza virus, universal vaccine, haemagglutinin, M2 (ion channel), nucleoprotein, wide range immune response.*

Введение

Грипп является сезонным инфекционным заболеванием, характеризующимся поражением органов дыхания, высокой контагиозностью и смертностью. Грипп широко распространен по всему миру и вызывает сезонные эпидемии, в результате которых ежегодно погибают сотни тысяч людей [51]. В России на долю гриппа и других ОРВИ приходится более 90% случаев всей инфекционной патологии. Передача возбудителя у человека происходит воздушно-капельным путем, входными воротами инфекции являются верхние дыхательные пути, а именно клетки мерцательного эпителия. Распространение вируса происходит чрезвычайно быстро, к группе риска относятся дети, люди пожилого возраста, а также беременные женщины. Летальные исходы чаще всего наблюдаются у детей младше 2 лет и пожилых людей старше 65 (90% всех летальных случаев) [88]. Наиболее эффективной мерой борьбы с гриппом является массовая вакцинопрофилактика населения с помощью разнообразных вакцинных препаратов, протективная активность которых базируется преимущественно на выработке вируснейтрализующих антител к глобулярному домену белка гемагглютинина и белку нейраминидазе.

Традиционные вакцины против гриппа представляют собой живые аттенуированные, инактивированные (цельновирсионные и сплит-вакцины) и субъединичные. Живые аттенуированные вакцины вводят интраназально, тогда как инактивированные и субъединичные парентерально. Начиная с 1970-х гг. производятся трехвалентные вакцины против гриппа, включающие в себя два сезонных штамма вируса гриппа А (H1N1 и H3N2) и сезонный штамм вируса гриппа В. С 2013 г. к производству рекомендованы четырехвалентные

противогриппозные вакцины, включающие обе линии вируса гриппа В (Виктория и Ямагата). Однако современные противогриппозные вакцины не способны обеспечить защиту от широкого спектра различных штаммов вируса гриппа, а также штаммов появляющихся в процессе антигенного дрейфа и антигенного шифта. На сегодняшний день идентифицировано 18 подтипов HA, разделенных по степени антигенного сродства на 2 филогенетические группы (группа 1 — H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11, H12, H13, H16, H17 и H18; группа 2 — H3, H4, H7, H10, H14 и H15), и 11 подтипов NA вируса гриппа А (рис. 1, III обложка) [91, 99]. На данный момент в человеческой популяции циркулируют штаммы вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2 [3, 4]. Однако спорадические вспышки заболеваний у людей были вызваны также штаммами вируса гриппа А птиц подтипов H5N1, H7N7, H7N9 и H10N8 (Centers for Disease Control and Prevention, 2013). В настоящее время случаев передачи вирусов гриппа А птиц от человека к человеку не зарегистрировано [94, 103], но, тем не менее, такая угроза вполне реальна [42].

Попытки улучшить традиционные подходы к вакцинации были сосредоточены в основном на совершенствовании технологий производства вакцин и повышении их иммуногенности, поэтому в настоящее время актуальным является создание «универсальных» вакцин, способных индуцировать иммунный ответ широкого спектра против различных штаммов вируса гриппа А.

Особенности иммунного ответа против вируса гриппа

На первом этапе, при попадании в организм вируса гриппа, происходит его распознавание и включение звена врожденного иммунного

ответа. Врожденный иммунитет направлен на предотвращение проникновения и размножения вируса в клетках эпителия дыхательных путей.

Первичное распознавание вируса гриппа в инфицированных клетках происходит благодаря паттерн-распознающим рецепторам. Рецептор TLR7 распознает одноцепочечную вирусную РНК, рецепторы TLR3 и RIG-I распознают двуцепочечную вирусную РНК, получающуюся в процессе репликации. Сигнальные каскады, включающиеся после активации рецепторов, стимулируют синтез провоспалительных цитокинов и интерферонов первого типа [35, 59]. Интерфероны первого типа обладают сильной противовирусной активностью благодаря ингибированию синтеза белка в инфицированных клетках и ограничивают репликацию вируса. Интерфероны первого типа также индуцируют экспрессию генов ISGs, продукты которых способны ингибировать репликацию вируса [33, 39]. Кроме того, интерфероны первого типа стимулируют дендритные клетки, что в свою очередь усиливает презентацию гриппозных антигенов CD4⁺ и CD8⁺ Т-лимфоцитам, что способствует запуску адаптивного иммунного ответа. Белок M2 (ионный канал) активирует рецептор NLRP3, который обеспечивает превращение про-IL-1 β в IL-1 β , который участвует в стимулировании клеток Th17 и пролиферации CD4⁺ Т-лимфоцитов [6, 41].

В процессе инфекции клеток альвеол, активируются альвеолярные макрофаги, которые выполняют функцию фагоцитоза инфицированных гриппом клеток [50]. Кроме того, активированные макрофаги начинают продуцировать TNF α , что также направлено на ограничение распространения вируса [46, 57].

При гриппозной инфекции большое значение имеют конвенциональные дендритные клетки, расположенные под слоем эпителиальных клеток, над базальной мембраной верхних дыхательных путей. Они способны опсонизировать вирионы вируса гриппа и апоптотические тела инфицированных клеток. После поглощения вируса, дендритные клетки мигрируют в регионарные лимфоузлы, где они презентуют гриппозные антигены наивным Т-клеткам, активируя их [26].

Натуральные киллеры являются важным компонентом врожденного иммунитета при гриппе. Есть данные о способности натуральных киллеров распознавать инфицированные гриппом клетки через рецепторы NKp44 и NKp46, связывающие гемагглютинин. Также, по некоторым данным, натуральные кил-

леры стимулируют клеточный иммунный ответ, регулируют созревание эозинофилов и защищают эпителий дыхательных путей [71].

Адаптивный иммунный ответ

Адаптивная иммунная система формирует вторую линию защиты в процессе гриппозной инфекции, и представлена как гуморальным, так и клеточным звеном.

Особую роль при гриппе играют вируснейтрализующие антитела к гемагглютинину, вырабатываемые в основном на его глобулярный домен и препятствующие его контакту с клеточными рецепторами. Кроме того, благодаря Fc-фрагменту они способствуют фагоцитозу вириона и стимуляции антителозависимой клеточной цитотоксичности. Гемагглютинин локализуется на поверхности вириона вируса гриппа в виде тримера и является его мажорным белком. Каждый мономер состоит из 2 цепей — HA1 и HA2, соединенных дисульфидными связями. Глобулярную часть HA образует преимущественно цепью HA1 и включает рецептор-связывающий домен RGD (receptor-binding domain), являющийся главной мишенью вируснейтрализующих антител. Аминокислотная последовательность HA имеет около 80% гомологии между различными штаммами внутри одного подтипа и 40–70% гомологии между штаммами, относящимися к разным подтипам. Кроме того, аминокислотная последовательность RGD-домена наиболее подвержена мутациям в процессе антигенного дрейфа. Известны следующие вируснейтрализующие антитела блокирующие RGD-домен: FE17 [14], S139/1 [102], CH65 [97], C05 [18].

В отличие от глобулярной, стволовая часть HA является высококонсервативной среди различных подтипов вируса гриппа А, антитела к ней не способны блокировать связывание вируса с сиаловыми кислотами на поверхности клеток, но они способны препятствовать конформационным изменениям структуры HA, необходимым для проникновения вируса внутрь клетки.

Обнаружены антитела специфичные к эпитомам стволовой части гемагглютинина, реагирующие с подтипами филогенетической группы 1 — CR6261 [17], с подтипами филогенетической группы 2 — CR8020 [18], с подтипами обеих групп — FI6 [15]. Введение хорькам сыворотки, содержащей антитела CR6261, обеспечивает защиту от летальной инфекции, а также снижает размножение вируса в легких при последующем заражении их вирусом гриппа птиц H5N1 [17, 24, 89]. Так же было показано,

что введение сыворотки, содержащей антитела FI6, способно защищать хорьков от летальной дозы вируса гриппа [15].

Кроме того, протективными свойствами обладают антитела против нейраминидазы. Они лишены вируснейтрализующей активности, но способны блокировать ферментативную активность нейраминидазы, что ограничивает распространение вируса. Антитела против нейраминидазы также стимулируют антителозависимую цитотоксичность. Кроме того, было показано, что антитела к нейраминидазе способны защищать мышей от вируса гриппа H5N1 [74].

Еще одним поверхностным белком, стимулирующим выработку антител, является белок M2 (ионный канал), в частности его эктодомен M2e. Данный белок является высоко консервативным среди различных штаммов вируса гриппа А [44]. Но из-за его малого количества на вирусной частице анти-M2 антитела вырабатываются в низком титре. Ионный канал M2 является трансмембранным белком, состоящим из 4-х идентичных субъединиц, соединенных дисульфидными связями [38]. Данный белок выполняет функцию ионного канала и необходим для высвобождения вирусного генома в процессе проникновения вируса [37, 86]. Существуют данные, показывающие, что антитела против эктодомена белка M2 способны ограничивать размножение вируса и образование вирусных бляшек (*in vitro*) в монослое клеток [93], а также индуцировать защиту против различных подтипов вируса внутри группы А [77]. Были идентифицированы антитела к M2e (Ab1-10), перекрестно реагирующие с сезонными, пандемическим (H1N1), а также высокопатогенными птичьими (H5N1) штаммами вируса гриппа [70]. Антитела против белка M2 не являются вируснейтрализующими, однако они способны обеспечивать антителозависимую клеточную цитотоксичность [19, 48] и таким образом играют важную роль в иммунном ответе против вируса гриппа.

Еще одним белком вируса гриппа А, стимулирующим образование антител, является белок NP [12, 52]. Кроме того, согласно литературным данным, антигенные изменения в последовательности NP являются очень редкими среди различных штаммов вируса гриппа А [76, 81]. Антитела к белку NP обеспечивают антителозависимую клеточную цитотоксичность [47], однако в процессе натуральной инфекции белок NP стимулирует в основном клеточный иммунный ответ.

При первичной инфекции индуцируется выработка антител изотипов IgA, IgG и IgM,

при вторичной инфекции выработки антител IgM не обнаруживается [23, 46]. Антитела IgM обладают не только вируснейтрализующей активностью, но также способны активировать систему комплемента [23, 46]. Секреторные иммуноглобулины А защищают слизистые дыхательных путей, где находятся входные ворота гриппозной инфекции и являются показателями недавнего инфицирования [72]. Кроме того, антитела sIgA защищают от инфицирования клетки дыхательных путей [61, 69]. Иммуноглобулины класса G обеспечивают наиболее длительную защиту против гриппа [65]. При развитии иммунного ответа у матери, ее антитела способны защищать новорожденного при условии соответствия штаммов [40, 62, 105].

Во время инфекционного процесса, вызванного вирусом гриппа, происходит индукция как CD4⁺, и так CD8⁺ Т-лимфоцитов. CD8⁺ Т-клетки распознают эпитопы в составе молекул МНС I на поверхности антигенпрезентирующих клеток, активируются и становятся способными убивать инфицированные вирусом клетки, и таким образом играют огромную роль при элиминации вируса гриппа из организма. CD8⁺ Т-клетки способны обеспечивать гетеросубтипический иммунный ответ в отсутствие антител благодаря своей способности распознавать высококонсервативные эпитопы белков вируса гриппа, таких как NP, M1, PB1 [7, 29, 53, 98].

Активация CD4⁺ Т лимфоцитов происходит в процессе презентации им антигена в составе комплекса с молекулами МНС II класса антигенпрезентирующими клетками. Большинство этих клеток в дальнейшем становятся Т-хелперами, но некоторые проявляют цитолитическую активность в отношении инфицированных клеток [84]. Вирусспецифичные CD4⁺ Т-клетки играют важную роль при индукции выработки антител и CD8⁺ Т-клеток памяти.

Механизмы защиты вируса гриппа от воздействия иммунной системы

Давление популяционного иммунитета, а также высокая скорость мутационных изменений в геноме вируса гриппа приводят к появлению новых штаммов, отличающихся по своей антигенной структуре. Такие штаммы гриппа либо частично, либо вообще не подвергаются воздействию со стороны сформированного как клеточного, так и гуморального иммунного ответа. Кроме того, некоторые белки вируса гриппа способны блокировать определенные звенья иммунного ответа.

Существует два основных механизма генетической изменчивости вируса гриппа — антигенный шифт и антигенный дрейф. Антигенный дрейф характеризуется изменением антигенной структуры вируса, происходящей в результате мутации в антигенных детерминантах. Это связано с тем, что во время репликации вирусная полимераз делает случайные ошибки, результатом которых является появление новых антигенных вариантов вируса, нечувствительных к сформированному на прежний штамм специфическому иммунному ответу. Мутации в областях связывания со специфическими антителами подвергаются положительной селекции [83]. Было найдено 5 сайтов в глобулярном домене гемагглютинина, изменения в которых приводят к изменению его антигенной структуры. Антигенный дрейф характерен как для вируса гриппа А, так и для вируса гриппа В. Более существенные антигенные изменения происходят в процессе антигенного шифта, обусловленного сегментированной структурой вирусной РНК. В основе механизма антигенного шифта лежит реассортация сегментов РНК разных штаммов вируса гриппа А, которая может происходить при совместном инфицировании двумя и более вирусами. При репликации геномов различных штаммов сегменты РНК могут смешиваться в любых сочетаниях, поэтому новые вирионы содержат разные наборы генов, заимствованные от каждого из исходных вирусов (рис. 2, III обложка).

Изменения антигенной структуры в процессе антигенного шифта, как правило, имеют большее значение для гемагглютинина, меньшее — для нейраминидазы. Таким образом, через нерегулярные интервалы времени появляются пандемические варианты вирусов гриппа А с новыми антигенными и биологическими свойствами, которые вызывают тяжелые заболевания и гибель людей [27].

Неструктурный белок 1 вируса гриппа способен связываться с вирусной РНК и блокировать ее распознавание Toll-подобными рецепторами и рецептором RIG-1 и, тем самым, подавлять индукцию выработки интерферонов первого типа [25, 31]. Кроме того, неструктурный белок 1 связывает белок TRIM25, что также ингибирует активацию рецептора RIG-1. Также неструктурный белок 1 связывает РНК-зависимую протеинкиназу и блокирует ее функции [25, 87]. В норме РНК-зависимая протеинкиназа активируется при детекции двухцепочечной вирусной РНК и блокирует синтез вирусных белков на стадии трансляции [64].

Существуют данные, показывающие роль нуклеопротеина вируса гриппа как активатора белка P58IPK, являющегося ингибитором РНК-зависимой протеинкиназы [79].

Белок М2 вируса гриппа способен ингибировать синтез клеточных белков, стимулировать апоптоз и тем самым облегчать высвобождение новых вирусных частиц [30].

Белок PB1-F2 также способен индуцировать апоптоз [13]. Белки PB2 и PB1-F2 ингибируют продукцию интерферонов первого типа посредством связывания митохондриального противовирусного сигнального белка (MAVS) [28].

Новые подходы к разработке универсальных противогриппозных вакцин

Современные подходы к усовершенствованию производства противогриппозных вакцин, а также способа их введения в организм были сконцентрированы в основном на препаратах, содержащих в качестве ключевого иммуногена гемагглютинин вируса гриппа. Иммунный ответ, индуцируемый на гемагглютинин, является хорошо изученным и способным обеспечивать защиту против вируса гриппа, однако в настоящее время наиболее перспективным является направление в разработке новых вакцин на основе консервативных антигенов вируса. Разработка такой универсальной вакцины сможет снять необходимость в ежегодном обновлении штаммового состава существующих вакцин и, соответственно, сможет дать возможность производителю вакцин самому вести производственное планирование вне зависимости от эпидемических сезонов. В настоящее время наиболее широко исследуемыми антигенами в качестве ключевых компонентов противогриппозных вакцин являются белки М2, NP а также стволовой домен гемагглютинина.

Кандидатные универсальные вакцины на основе гемагглютинина

Как было сказано выше при естественной инфекции антитела против гемагглютинина вырабатываются в основном на его глобулярный домен, который является весьма переменным, однако существуют стратегии с совместным использованием аминокислотных последовательностей нескольких различных подтипов гемагглютинина для индукции гетеросубтипического иммунного ответа. Schwartzman L.M. с соавт. продемонстрировал

иммуногенность и протективность препарата вирусоподобных частиц, состоящих из белка М1 от вируса гриппа А/New York/312/2001 (H1N1) и HA различных штаммов вируса гриппа А [78]. Всего было сконструировано 4 вирусоподобные частицы, несущие HA от штаммов вируса гриппа А/South Carolina/1/1918 (H1N1), А/pintail/Ohio/339/1987 (H3N8), А/mallard/Maryland/802/2007 (H5N1) и А/Environment/Maryland/261/2006 (H7N3). Было показано, что двукратная интраназальная иммунизация препаратом, содержащим 6 мкг смеси из полученных VLP (по 1,5 мкг каждой частицы), защищает мышей от последующего заражения вирусами гриппа подтипов H1N1 1918 года, H2N1 1957 года, H5N1, H6N1, H7N9, H7N1, H10N1 и H11N1 в дозе 10ЛД₅₀ на животное. Причем в экспериментах с вирусами подтипов H1N1, H2N1, H7N9, H7N1, H10N1 и H11N1 защита составила 100%, а с вирусами подтипов H5N1 и H6N1 — 90 и 80% соответственно [78]. Кроме того существуют данные об индукции гетеросубтипического иммунного ответа в организме мышей при иммунизации рекомбинантными аденовирусами, экспрессирующими гены HA вирусов гриппа А/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) и А/Duck/Novosibirsk/56/2005 (H5N1), Ad-HA5-1 и Ad-HA5-2 соответственно [4]. Экспериментально показано, что антитела в сыворотке мышей, иммунизированных Ad-HA5-1, способны связывать HA вируса гриппа подтипа H5N2 и наоборот антитела мышей, иммунизированных Ad-HA5-2, способны связывать HA от вируса подтипа H5N1. Мыши, иммунизированные как Ad-HA5-1, так и Ad-HA5-2 были на 100% защищены от заражения 50ЛД₅₀ гомологичного штамма вируса гриппа А/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) [4]. При изучение протективной активности Ad-HA5-2 против гетерологичных штаммов вируса гриппа А, была продемонстрирована 100%-ная защита против 10ЛД₅₀ вируса гриппа А/USSR/90/77 (H1N1), тогда как против вируса гриппа А/Aichi/2/68 (H3N2) защитного эффекта не наблюдалось. Данное явление объясняется тем, что подтипы H1N1 и H5N2, в отличии от H3N2 находятся в одной филогенетической группе (рис. 1, III обложка). Таким образом, хотя HA является весьма вариабельным между различными штаммами вируса гриппа, подход с использованием его полноразмерной последовательности для создания универсальной противогриппозной вакцины также заслуживает внимания.

Кандидатные вакцины на основе стволовой части гемагглютинаина

Относительно недавнее направление в разработке универсальной противогриппозной вакцины — направление, базирующееся на получение кросс-реактивных антител к стволовой части гемагглютинаина. Стволовая часть HA состоит из альфа-спирали, которая является весьма консервативной среди всех подтипов вируса гриппа и выполняет ключевую роль при слиянии с клеточной мембраной в процессе проникновения вируса. При натуральной инфекции антитела к этому участку вырабатываются в очень низких титрах, тем не менее попытки создания вакцин на его основе являются достаточно перспективными. Impagliazzo А. и коллеги показали, что стабилизированная тримеризованная стволовая часть гемагглютинаина, сконструированная на основе аминокислотной последовательности вируса гриппа А подтипа H1, способна индуцировать выработку кросс-реактивных антител, не уступающих по своим вируснейтрализующим свойствам антителам, выработанным к полноразмерной форме гемагглютинаина [43]. Иммунизация мышей таким мини-HA способна обеспечивать полную защиту мышей против гомологичного и гетерологичного подтипов вируса гриппа А, и, в частности, стимулировать антителозависимую клеточную цитотоксичность. В экспериментах на нечеловеческих приматах данный иммуноген показал способность индуцировать выработку кросс-реактивных антител к различным вирусам гриппа А группы 1, обеспечивающим антителозависимую клеточную цитотоксичность, а также существенно снизить подъем температуры у животных после введения сублетальной дозы вируса гриппа и кроме того обеспечивать нейтрализацию вируса гриппа H5N1. Кроме того, недавно появились данные об иммуногенности и протективности наночастиц HA-SS-*np* [100]. Данные наночастицы, сконструированные на основе стволовых регионов гемагглютинаина штаммов А/New Caledonia/20/1999 (H1N1) и А/South Carolina/1/1918 (H1N1), а также белка ферритина от *Helicobacter pylori*, способны индуцировать выработку антител, реагирующих с гемагглютинаинами подтипов H1, H2, H5 и H9 группы 1 и подтипов H3 и H7 группы 2, в организме мышей и хорьков. При изучении протективной активности наночастицы HA-SS-*np* оказались способны защищать хорьков и мышей от летальной

дозы вируса гриппа А гетерологичного подтипа H5N1 [100]. Li R. с соавт. получил кандидатную рекомбинантную вакцину pgsA-CTA1sM2HA2/L.casei на основе бактерии *Lactobacillus casei*, экспрессирующей гены белков sM2 (консенсусный между вируса гриппа А подтипов H1N1, H5N1 и H9N2 белок M2, лишенный трансмембранного домена), фрагмента стволовой части HA (15–137 а.к.) от вируса гриппа А/EM/Korea/W149/06 (H5N1) и субъединицы холерного токсина А1 [56]. Препарат продемонстрировал способность индуцировать гуморальный (в том числе мукозальный) и клеточный иммунный ответ у мышей при пероральном и интраназальном введении и, кроме того, индуцировать защиту против 10ЛД₅₀ вирусов гриппа А/EM/Korea/W149/06 (H5N1), А/Aquatic bird/Korea/W81/2005 (H5N2), А/Puerto Rico/8/34 (H1N1), А/Chicken/Korea/116/2004 (H9N2) и А/Philippines/2/08 (H3N2) в течении более чем 7 месяцев после иммунизации. Следует отметить, что интраназальное введение индуцировало более высокие уровни защиты по сравнению с пероральным введением [56].

Таким образом, использование стволовой части HA для индукции гетеросубтипического иммунного ответа против гриппа показывает хорошие результаты на мышах и нечеловеческих приматах, являясь весьма обнадеживающим. Основной проблемой для создания универсальной вакцины на базе консервативных регионов HA является индукция высоких титров антител и протективного эффекта у человека.

Кандидатные вакцины на основе M2e

Ионный канал M2 является трансмембранным белком, состоящим из 4-х идентичных субъединиц, соединенных дисульфидными связями [38]. Данный белок выполняет функцию ионного канала и необходим для высвобождения вирусного генома в процессе проникновения вируса [37, 86]. Из экспрессируемого в ходе инфекции в цитоплазме клетки белка M2 лишь небольшое количество его копий включается в состав вновь формирующихся вирусных частиц. M2 включает в себя:

- эктодомен (M2e), состоящий из первых 24 N-концевых аминокислот;
- трансмембранный домен (с 25 по 46 аминокислоту), образующий ионный канал [37, 94];
- цитоплазматическую амфифильную цепь (с 47 по 61 аминокислоту), необходимую для отсоединения вириона от цитоплазматической мембраны при выходе собранной вирусной частицы из клетки [44];

– С-концевой хвост (с 62 по 98 аминокислоту), необходимый для соединения с белком M1 и формирования структуры [77].

Эктодомен белка M2 вируса гриппа (M2e) является наиболее широко исследованным антигеном в попытках создания универсальных противогриппозных вакцин, что связано с его высокой консервативностью среди различных штаммов вируса гриппа, а также его поверхностной локализацией. Согласно литературным данным, антитела против эктодомена белка M2 способны ограничивать размножение вируса и образование вирусных бляшек (*in vitro*) в монослое клеток [83]. Были идентифицированы антитела к M2e (Ab1-10), перекрестно реагирующие с сезонными, пандемическим (H1N1), а также высокопатогенными птичьими (H5N1) штаммами вируса гриппа [70]. Антитела против белка M2 не являются вируснейтрализующими, однако они способны обеспечивать антителозависимую клеточную цитотоксичность [19, 48] и способны защищать мышей от различных подтипов вируса гриппа [22, 66, 90]. Существуют данные о наличии в эктодоме белка M2 Т-клеточных эпитопов, гомологичных для 99% штаммов вируса гриппа А [58].

В процессе натуральной инфекции антиген M2 является относительно слабо иммуногенным. Первые данные о протективных свойствах антител против белка M2 были продемонстрированы еще в 1995 г. при иммунизации мышей белком M2, полученным в бакуловирусной системе, и последующего их заражения летальной дозой вирусов подтипов H1N1 и H3N2 [82]. Для повышения иммуногенности кандидатных вакцин на основе белка M2 были применены различные модификации, такие как добавление адъювантов и лигандов Toll-подобных рецепторов для стимуляции иммунной системы, а также экспрессия M2 в составе VLP или липосомных частицах.

Марданова Е.С. с соавт. продемонстрировала иммуногенность и протективность химерного белка, состоящего из 4 аминокислотных последовательностей M2e (2 последовательности M2e консенсусные между человеческими штамма вируса гриппа А и 2 последовательности M2e от штамма А/Chicken/Kurgan/05/2005), соединенных с аминокислотной последовательностью белка флагелина от *Salmonella typhimurium* [60]. Данная химерная конструкция была получена при помощи экспрессии плазмидного вектора в растении *Nicotiana benthamiana*. Трехкратная иммунизация мышей 10 мкг полученного препарата индуцирует выработку M2e-специфичных антител и обес-

печивает 75%-ную защиту против 5ЛД₅₀ вируса гриппа А/Chicken/Kurgan/05/2005 (H5N1), 50%-ную защиту против 10ЛД₅₀ вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) и 100%-ную защиту против 5ЛД₅₀ вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) [60]. Имеются данные о том, что кандидатная универсальная вакцина на основе химерных норовирусных частиц, модифицированных консенсусным птичьим M2e (M2e-PP), способна индуцировать выработку значимых титров IgG у кур при подкожном введении в сочетании с масляным адъювантом [16]. Важно отметить, что у птиц, иммунизированных интраназально, на конъюнктиву и микроспреем, значимого титра специфических антител детектировано не было. Кроме того, трехкратное подкожное введение птицам M2e-PP, способно индуцировать защиту против вирусов гриппа птиц подтипов H5N2, H7N2 и H6N2 [20]. Обнадеживающие данные были получены Равиным Н.В. и коллегами при использовании в качестве кандидатной противогриппозной вакцины рекомбинантной частицы на основе ядерного белка вируса гепатита В и птичьего M2e (HВс-M2e) [2]. Двух- или трехкратная иммунизация мышей препаратом, состоящим из частиц M2E-HВс, обеспечивает их 100% защиту от летальной гриппозной инфекции, кроме того специфичные к M2e антитела способны подавлять репродукцию вирусов гриппа А/Duck/Potsdam/4024/26 (H5N2) и А/Hon Kong/1073/99 (H9N2) при пассивной иммунизации мышей [2]. Leung H.-C. с соавт. продемонстрировали способность пептида, представляющего собой M2e-тетрамер от вируса гриппа А H5N1 (H5N1-M2e), индуцировать защиту у мышей как против гомологичного подтипа H5N1, так и против гетерологичных подтипов H1N1 и H7N9 [55]. В частности в последней работе было показано, что иммунизация H5N1-M2e в сочетании с адъювантом Фрейнда или адъювантной системой Sigma на 80% защищает мышей от заражения 10ЛД₅₀ вируса гриппа А/Anhui/01/13 (H7N9) и предотвращает повреждение тканей легких [55]. Так же, как было описано в предыдущей главе, иммуногенностью и протективностью против различных подтипов вируса гриппа А, обладает кандидатная рекомбинантная вакцина на основе бактерии *Lactobacillus casei*, экспрессирующей на поверхности белок M2, лишенный трансмембранного домена (sM2), фрагмент стволовой части HA и субъединицу холерного токсина A1 (pgsA-STA1sM2HA2/L. casei) [55]. Имеются данные о том, что введение мышам 15 мкг рекомбинантного белка M2, лишенного трансмембранного домена, в сочетании с адъювантом

цитозаном обеспечивает 100%-ную защиту от гомологичного штамма, 90%-ную защиту от гетерологичного штамма H1N1 и 30%-ную защиту от гетерологичного штамма H5N1 [85]. Tompkins et al. продемонстрировали, что праймирование ДНК-вакциной и бустирование рекомбинантным аденовирусом, несущим ген полноразмерного белка M2, индуцирует перекрестный гуморальный и клеточный иммунный ответ, а также защищает против летальной дозы вируса гриппа H5N1 [90].

На сегодняшний день направление с использованием эктодомена белка M2 для создания универсальной вакцины против гриппа показывает хорошие результаты. Однако использование M2e ограничено необходимостью использования высокоиммуногенных носителей, что делает целесообразным разработку различных способов повышения его иммуногенности, а также использования M2e в сочетании с компонентом, стимулирующим клеточный иммунный ответ. Okuda K. и коллеги показали, что внутримышечная и интраназальная иммунизация мышей препаратом плазмиды, экспрессирующей гены M1 и M2 вируса гриппа штамма А/PR/8/34 (H1N1), вызывает образование специфических антител и защищает от заражения штаммами вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1) и А/WSN/33 (H1N1) [68]. Zhou D. и соавт. продемонстрировали иммуногенность и протективность рекомбинантных аденовирусов шимпанзе, экспрессирующих гены M2e от 3 различных штаммов вируса гриппа, соединенные с геном NP вируса гриппа [104]. Авторами было создано 2 препарата на основе рекомбинантных аденовирусов шимпанзе серотипа С68 и С6, экспрессирующих гены M2e от штаммов вируса гриппа А подтипов H1N1, H5N1 и H7N2 и ген NP от вируса гриппа А H1N1 (AdC68M2e(3)-NP и AdC6-M2e(3)-NP). В экспериментах *in vivo* было показано, что праймирование AdC68M2e(3)-NP и бустирование AdC6-M2e(3)-NP индуцирует выработку значимых титров антител к белку M2 вируса гриппа подтипов H1N1, H5N1 и H7N2, а также значимое количество NP-специфичных CD8⁺ Т-клеток [104]. Эксперименты по протекции, в свою очередь показали, что полученные конструкции способны защищать мышей от летальной дозы вирусов гриппа А/PR/8/34 и А/Fort Monmouth/1/47.

Наши собственные исследования также продемонстрировали иммуногенные свойства рекомбинантного аденовируса человека пятого серотипа, экспрессирующего гены полноразмерных белков M2 и NP вируса гриппа А [1]. Нами был получен рекомбинантный аденови-

рус Ad5-tet-M2NP, несущий гены полноразмерных антигенов M2 и NP, консенсусных для различных штаммов вируса гриппа А, под контролем системы экспрессии tet-off. Однократная интраназальная иммунизация мышей Ad5-tet-M2NP в дозах 10^7 и 10^8 БОЕ на животное индуцирует выработку значимого уровня антител к антигенам M2 и NP [1], что также говорит о перспективе использования данных антигенов для создания универсальной противогриппозной вакцины.

Подходы к созданию вакцин, стимулирующих выработку специфических цитотоксических Т-лимфоцитов, и вакцин на основе внутренних антигенов вируса гриппа

Было показано, что у животных, зараженных вирусом гриппа, в последующем развивается протективный иммунный ответ против вирусов гриппа других подтипов, выражающийся в подавлении репликации вируса. Во многих случаях данная защита коррелирует с присутствием кросс-реактивных цитотоксических Т-лимфоцитов и наблюдается в отсутствие кросс-реактивных антител. Цитотоксические Т-лимфоциты циркулируют по организму, локализуются в селезенке и регионарных лимфатических узлах и легких. Было показано, что перенос активированных цитотоксических Т-лимфоцитов от мыши, зараженной вирусом гриппа, интактной мыши защищает последнюю от заражения. Аналогичные данные об индукции гетеросубтипического иммунного ответа были получены в экспериментах на хорьках и свиньях [95, 96]. Кроме того, существуют данные о наличии гетеросубтипического иммунного ответа у людей в отсутствие специфических антител [63]. В экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что цитотоксические Т-лимфоциты человека, выработанные в ответ на инфекцию сезонным вирусом гриппа, способны распознавать и реагировать с высокопатогенными штаммами вируса гриппа птиц, а также с новыми штаммами подтипа H1N1 человека [45, 53, 75].

Специфической мишенью для цитотоксических Т-лимфоцитов являются внутренние антигены вируса гриппа, обладающие высокой степенью консервативности, следовательно, вакцины, направленные на стимулирование их выработки, могут обладать протективными свойствами. Функции цитотоксических Т-лимфоцитов заключаются в распознавании и уничтожении клеток зараженных вирусом гриппа. Инфицированные клетки презентуют внутренние анти-

гены вируса в комплексе с молекулами МНС I класса, благодаря чему происходит их распознавание и последующее уничтожение цитотоксическими Т-лимфоцитами [10, 11]. Как и анти-M2 антитела, специфические цитотоксические лимфоциты не могут предотвратить первичного инфицирования клеток вирусом, но они могут ограничить репродукцию вируса и ускорить процесс его элиминирования из организма. У невакцинированных взрослых людей цитотоксические лимфоциты играют решающую роль в освобождении организма от гриппозной инфекции [63] и функционируют посредством выделения перфорина и стимулирования апоптоза зараженной гриппом клетки [92]. Кроме того, при клеточном иммунном ответе важную роль играют Т-хелперные клетки, обеспечивающие индукцию иммунологической памяти [80]. Использование вакцин, стимулирующих клеточный иммунный ответ, может быть использовано для создания первой линии защиты против различных, в том числе пандемических, штаммов вируса. Согласно литературным данным, в белках M1, NP, и PB1 присутствуют эпитопы для цитотоксических и хелперных Т-лимфоцитов, консервативные у более чем 17 штаммов, относящихся к 6 различным подтипам [53]. Важным фактором при получении вакцин, стимулирующих клеточный иммунный ответ, является принцип иммунодоминантности, заключающийся в том, что иммунная система выбирает один или несколько основных эпитопов для распознавания [101]. Вакцины, направленные на выработку цитотоксических Т-лимфоцитов, специфичных к иммунодоминантному эпитопу, могут существенно сузить спектр перекреста иммунного ответа к различным штаммам вируса. Также при разработке таких вакцин, необходимо учитывать роль способа доставки антигена и его презентации. Для стимуляции сильного цитотоксического иммунного ответа необходимо, чтобы антиген был процессирован и презентируван дендритными клетками в комплексе с молекулами МНС I класса. Данные события могут происходить при непосредственном инфицировании или трансдуцировании дендритных клеток, а также при поглощении дендритными клетками апоптотических тел от других инфицированных клеток. Поэтому уровень индукции цитотоксического иммунного ответа среди вакцин варьирует от сильного — в случае живых аттенуированных, до более слабого и низкого — в случае инактивированных цельновирионных и субъединичных вакцин [71].

На сегодняшний день основными средствами доставки антигенов при разработке СТЛ-вакцин являются вирусные векторы [8, 9], липосомы, виросомы [49]), а также твердые частицы липидно-адьювантно-иммуностимулирующего комплекса (ISCOM) [73]. Ключевыми мишенями цитотоксического иммунного ответа на СТЛ-вакцины на сегодняшний день являются консервативные эпитопы белка NP вируса гриппа. Нуклеопротеин NP вируса гриппа является одним из мажорных белков вириона, связывает вирусную РНК, защищает ее от воздействия РНКаз, обеспечивает транспорт вирусного рибонуклеопротеидного комплекса в ядро клетки и играет важную роль при ее репликации. На поздней стадии инфекции белок NP связывается с белком экспортином 1 (XPO1) и играет активную роль в экспорте рибонуклеопротеина из клеточного ядра.

Согласно литературным данным антигенные изменения в последовательности NP являются очень редкими среди различных штаммов вируса гриппа А [76, 81]. Клеточный иммунный ответ против белка NP является весьма значимым, так как он направлен против нескольких вариантов клеточных эпитопов [32].

Altstein et al. продемонстрировали, что двукратная иммунизация мышей вектором вируса осповакцины, экспрессирующим ген NP вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1), защищает от последующего заражения вирусом гриппа А/Aichi2/68 (H3N2) и А/Mallard/Pennsylvania/10218/84 (H5N2) в дозе 1–5ЛД₅₀ на животное [5]. Векторная вакцина на основе *Lactococcus lactis*, экспрессирующего ген NP вируса гриппа А/California/04/2009(H1N1) в сочетании с адьювантом — холерным токсином В (СТВ) — способна индуцировать гуморальный (в том числе мукозальный) и клеточный иммунный ответ, а также обеспечивать 100% защиту против гомологичного штамма California/04/2009 (H1N1) и 80% защиту против гетерологичных штаммов А/Guangdong/08/95 (H3N2) и А/chicken/Henan/12/2004 (H5N1) соответственно при пероральном введении [54]. Протективностью и иммуногенностью против различных подтипов вируса гриппа А обладает ДНК-вакцина, экспрессирующая ген NP вируса гриппа А/PR8/34 (H1N1) с удаленным сигналом ядерной локализации [67]. Трехкратное внутримышечное введение данного препарата с интервалом 14 дней защищает мышей против 5ЛД₅₀ вирусов гриппа А гомологичного штамма H1N1 и гетерологичного H3N2, причем в 1,5–2 раза выше чем аналогичный препарат без удаления сигнала ядерной лока-

лизации у белка NP [67]. Существуют данные показывающие, что рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий ген NP вируса гриппа штамма А/PR/8/34 (H1N1), способен индуцировать выработку специфических антител IgA на слизистых дыхательных путей у мышей при интраназальном введении [50]. Кроме того, сублингвальное введение данного препарата обеспечивает выработку сильного цитотоксического иммунного ответа к иммунодоминантному эпитопу NP147-155. Следует также отметить, что именно интраназальное введение, в отличие от сублингвального, обеспечивало защиту мышей от летальной дозы вируса гриппа гетерологичного штамма [50]. Epstein et al. продемонстрировали, что праймирование ДНК-вакциной и бустирование рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим ген NP, индуцирует формирование гуморального и клеточного иммунного ответа, а также защищает против вируса гриппа H5N1 [21]. Индукцию гетеросубтипического иммунного ответа обеспечивает иммунизация рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим ген НА птичьего гриппа и ген NP [36].

Перспективным подходом к созданию СТЛ-вакцин является использование адьювантов способных регулировать иммунный ответ, в частности молекулы CD40L. Молекула CD40 и ее лиганд (CD40L) имеют очень важное значение при иммунном ответе, регулируя функции АПК. Hashem A.M. и соавт. продемонстрировали возможность индукции длительного иммунного ответа против вируса гриппа при помощи однократной иммунизации рекомбинантным аденовирусом, экспрессирующим ген химерного белка, состоящего из антигена NP и молекулы CD40L (NP-CD40L) [34]. Авторами было получено 4 аденовирусные конструкции, экспрессирующие ген NP вируса гриппа А/duck/Yokohama/aq10/03 (H5N1):

- rAd-SNP40L — рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий секретлируемую форму химерного белка NP-CD40L;
- rAd-NP40L — рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий несекретлируемую форму химерного белка NP-CD40L;
- rAd-SNP — рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий секретлируемую форму белка NP без молекулы CD40L;
- rAd-NP — рекомбинантный аденовирус, экспрессирующий несекретлируемую форму белка NP без молекулы CD40L. Далее в экспериментах на мышях линий BALB/c и C57BL/6J была продемонстрирована возможность индукции гетеросубтипического иммунного ответа против вирусов гриппа А

(H1N1) и А (H3N2) при помощи иммунизации мышей препаратом rAd-SNP40L, но не rAd-NP40L, rAd-SNP, rAd-NP. Кроме того было показано, что молекула CD40L достоверно усиливает иммунный ответ к антигену NP и направляет его по Th1-пути [34].

Разработка CTL-вакцин также является перспективным подходом к созданию универсальных противогриппозных вакцин. Их сочетание с компонентами, стимулирующими выработку антител, могло бы существенно расширить спектр их противогриппозной активности.

Заключение

Разработка универсальной вакцины против вируса гриппа на сегодняшний день является вполне реальной и весьма перспективной задачей для ученых. Такие универсальные вакцины должны будут сочетать в себе как компоненты, стимулирующие выработку кросс-реактивных антител, так и компоненты, индуцирующие Т-клеточный иммунный ответ. Также важную роль играют адьюванты, функции которых могут быть направлены как на повышение уровня иммунного ответа к ан-

тигену, так и на его регуляцию. Немаловажной задачей является подбор оптимальных средств доставки антигенов в организм, в качестве которых могут выступать рекомбинантные вирусные векторы, рекомбинантные вирусные частицы, бактериальные дисплеи и т.д. Кроме того, при создании универсальных противогриппозных вакцин необходимо уделять внимание способу их введения, так как для предотвращения заболевания гриппом важен не только системный, но и мукозальный иммунный ответ. Таким образом, создание универсальной вакцины против гриппа является непростой задачей, требующей комплексного подхода и учета множества факторов и нюансов. Скорее всего, такие вакцины не смогут обеспечивать выработку стерильного иммунитета, но смогут эффективно ограничивать размножение вируса в организме и таким образом предотвращать заболевания. В будущем такие вакцины могут быть использованы не только для предотвращения сезонных вспышек заболеваний гриппом, но и в качестве средства первого эшелона защиты при возникновении пандемии, связанной с появлением совершенно новых в антигенном отношении вариантов вируса гриппа.

Список литературы/References

1. Есмагамбетов И.Б., Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Гарас М.Н., Шмаров М.М., Логунов Д.Ю. Конструирование рекомбинантного аденовируса человека, экспрессирующего гены консервативных антигенов вируса гриппа А ионного канала М2 и нуклеопротеина // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2014. № 2. С. 22–28. [Esmagambetov I.B., Sedova E.S., Shcherbinin D.N., Lysenko A.A., Garas M.N., Shmarov M.M., Logunov D.Yu. Construction of recombinant adenoviral vector expressing genes of the conservative influenza proteins M2 and nucleoprotein. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya = Molecular Genetics, Microbiology and Virology*, 2014, no. 2, pp. 22–28. doi: 10.3103/S0891416814020050 (In Russ.)]
2. Патент 2358981 Российская Федерация, МПК⁸ C07K14/00, C12N7/01, A61K39/145, C12N15/70. Универсальная вакцина против вируса гриппа птиц / Равин Н.В., Киселев О.И., Скрябин К.Г.; заявитель и патентообладатель Центр «Биоинженерия» РАН (RU), ГУ НИИ гриппа РАМН (RU). № 2358981 С 2; заявл. 07.08.2007; опубл. 20.06.2009, Бюл. № 17 [Patent 2358981 Russian Federation, IPC 8 C07K14/00, C12N7/01, A61K39/145, C12N15/70. Universal'naya vaksina protiv virusa grippa ptits [A universal vaccine against avian influenza] / Ravin N.V., Kiselev O.I., Skryabin K.G.; appl. and patent holder Center «Bioengineering» RAS (RU), State Research Institute of Influenza RAMS (RU). № 2358981 С 2; stat. 07.08.2007; publ. 20.06.2009, Bul. No. 17]
3. Седова Е.С., Шмаров М.М., Тутыхина И.Л., Барыков Ю.А., Верховская Л.В., Логунов Д.Ю., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Протективные свойства кандидатных генно-инженерных вакцин против вируса гриппа птиц, созданных на основе рекомбинантных аденовирусных векторов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2010. № 3. С. 44–48. [Sedova E.S., Shmarov M.M., Tutykhina I.L., Barykov Yu.A., Verkhovskaia L.V., Logunov D.Yu., Naroditskiy B.S., Ginzburg A.L. Protective properties of candidate genetically engineered vaccines against avian influenza viruses constructed on the basis of recombinant adenoviral vectors. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2010, vol. 3, pp. 44–48. (In Russ.)]
4. Шмаров М.М., Седова Е.С., Верховская Л.В., Руднева И.А., Богачева Е.А., Барыкова Ю.А., Щербинин Д.Н., Лысенко А.А., Тутыхина И.Л., Логунов Д.Ю., Смирнов Ю.А., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. Индукция протективного гетеросубтипического иммунного ответа против вируса гриппа при иммунизации рекомбинантными аденовирусными векторами, экспрессирующими гемагглютинин вируса гриппа H5 // Acta Naturae. 2010. Т. 2, № 1. С. 119–126. [Shmarov M.M., Sedova E.S., Verkhovskaya L.V., Rudneva I.A., Bogacheva E.A., Barykova Y.A., Shcherbinin D.N., Lysenko A.A., Tutykhina I.L., Logunov D.Y., Smirnov Y.A., Naroditskiy B.S., Gintsburg A.L. Induction of a protective hetero-subtypic immune response against the influenza virus by using recombinant adenoviral vectors expressing hemagglutinin of the influenza H5 virus. *Acta Naturae*, 2010, vol. 2, no. 1, pp. 119–126. (In Russ.)]

5. Altstein A.D., Gitelman A.K., Smirnov Y.A., Piskareva L.M., Zakharova L.G., Pashvykina G.V., Shmarov M.M., Zhirnov O.P., Varich N.P., Ilyinskii P.O., Shneider A.M. Immunization with influenza A NP-expressing vaccinia virus recombinant protects mice against experimental infection with human and avian influenza viruses. *Arch. Virol.*, 2006, vol. 151, no. 5, pp. 921–931.
6. Acosta-Rodriguez E.V., Napolitani G., Lanzavecchia A., Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat. Immunol.*, 2007, vol. 8, pp. 942–949. doi: 10.1038/ni1496
7. Assarsson E., Bui H.H., Sidney J., Zhang Q., Glenn J., Oseroff C., Mbawuike I.N., Alexander J., Newman M.J., Grey H., Sette A. Immunomic analysis of the repertoire of T-cell specificities for influenza A virus in humans. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 24, pp. 12241–12251. doi: 10.1128/JVI.01563-08
8. Bennink J.R., Yewdell J.W., Smith G.L., Moller C., Moss B. Recombinant vaccinia virus primes and stimulates influenza haemagglutinin specific cytotoxic T cells. *Nature*, 1984, vol. 311, no. 5986, pp. 578–579.
9. Berkhoff E.G., Geelhoed-Mieras M.M., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan G.F. Assessment of the extent of variation in influenza A virus cytotoxic T-lymphocyte epitopes by using virus-specific CD8+ T-cell clones. *J. Gen. Virol.*, 2007, vol. 88, pp. 530–535. doi: 10.1099/vir.0.82120-0
10. Braciale T.J. Immunologic recognition of influenza virus-infected cells. I. Generation of a virus-strain specific and a cross-reactive subpopulation of cytotoxic T cells in the response to type A influenza viruses of different subtypes. *Cell. Immunol.*, 1977, vol. 33, no. 2, pp. 423–436.
11. Braciale T.J. Immunologic recognition of influenza virus-infected cells. II. Expression of influenza A matrix protein on the infected cell surface and its role in recognition by cross-reactive cytotoxic T cells. *J. Exp. Med.*, 1977, vol. 146, pp. 673–689.
12. Carragher D.M., Kaminski D.A., Moquin A., Hartson L., Randall T.D. A novel role for non-neutralizing antibodies against nucleoprotein in facilitating resistance to influenza virus. *J. Immunol.*, 2008, vol. 181, no. 6, pp. 4168–4176.
13. Conenello G.M., Tisoncik J.R., Rosenzweig E., Varga Z.T., Palese P., Katze M.G. A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 2, pp. 652–662. doi: 10.1128/JVI.01987-10
14. Corti D., Suguitan A.L.Jr., Pinna D., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B.M., Vanzetta F., Santos C., Luke C.J., Torres-Velez F.J., Temperton N.J., Weiss R.A., Sallusto F., Subbarao K., Lanzavecchia A. Heterosubtypic neutralizing antibodies are produced by individuals immunized with a seasonal influenza vaccine. *J. Clin. Invest.*, 2010, vol. 120, no. 5, pp. 1663–1673. doi: 10.1172/JCI1902
15. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B.M., Agatic G., Bianchi S., Giacchetto-Sasselli I., Calder L., Sallusto F., Collins P., Haire L.F., Temperton N., Langedijk J.P., Skehel J.J., Lanzavecchia A. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science*, 2011, vol. 333, no. 6044, pp. 850–856. doi: 10.1126/science.1205669
16. Ekiert D.C., Friesen R.H., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H.J., Brandenburg B., Vogels R., Brakenhoff J.P., Kompier R., Koldijk M.H., Cornelissen L.A., Poon L.L., Peiris M., Koudstaal W., Wilson I.A., Goudsmit J. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science*, 2011, vol. 333, no. 6044, pp. 843–850. doi: 10.1126/science.1204839
17. Ekiert D.C., Bhabha G., Elsliger M.A., Friesen R.H., Jongeneelen M., Throsby M., Goudsmit J., Wilson I.A. Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. *Science*, 2009, vol. 324, no. 5924, pp. 246–251. doi: 10.1126/science.1171491
18. Ekiert D.C., Kashyap A.K., Steel J., Rubrum A., Bhabha G., Khayat R., Lee J.H., Dillon M.A., O’Neil R.E., Faynboym A.M., Horowitz M., Horowitz L., Ward A.B., Palese P., Webby R., Lerner R.A., Bhatt R.R., Wilson I.A. Cross-neutralization of influenza A viruses mediated by a single antibody loop. *Nature*, 2012, vol. 489, no. 7417, pp. 526–532. doi: 10.1038/nature11414
19. El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A., Van Rooijen N., Verbeek S., Fiers W., Saelens X. Universal vaccine based on ectodomain of matrix protein 2 of influenza A: Fc receptors and alveolar macrophages mediate protection. *J. Immunol.*, 2011, vol. 186, no. 2, pp. 1022–1031. doi: 10.4049/jimmunol.0902147
20. Elaish M., Kang K.I., Xia M., Ali A., Shany S.A., Wang L., Jiang X., Lee C.W. Immunogenicity and protective efficacy of the norovirus P particle-M2e chimeric vaccine in chickens. *Vaccine*, 2015, vol. 33, no. 38, pp. 4901–4909. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.07.049
21. Epstein S.L., Kong W.P., Mispion J.A., Lo C.Y., Tumpey T.M., Xu L., Nabel G.J. Protection against multiple influenza A subtypes by vaccination with highly conserved nucleoprotein. *Vaccine*, 2005, vol. 23, no. 46–47, pp. 5404–5410. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.04.047
22. Fan J., Liang X., Horton M.S., Perry H.C., Citron M.P., Heidecker G.J., Fu T.M., Joyce J., Przysiecki C.T., Keller P.M., Garsky V.M., Ionescu R., Rippeon Y., Shi L., Chastain M.A., Condra J.H., Davies M.E., Liao J., Emini E.A., Shiver J.W. Preclinical study of influenza virus A M2 peptide conjugate vaccines in mice, ferrets, and rhesus monkeys. *Vaccine*, 2004, vol. 22, no. 23–24, pp. 2993–3003. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.02.021
23. Fernandez Gonzalez S., Jayasekera J.P., Carroll M.C. Complement and natural antibody are required in the long-term memory response to influenza virus. *Vaccine*, 2008, vol. 26, no. 8, pp. 186–193.
24. Friesen R.H., Koudstaal W., Koldijk M.H., Weverling G.J., Brakenhoff J.P., Lenting P.J., Stittelaar K.J., Osterhaus A.D., Kompier R., Goudsmit J. New class of monoclonal antibodies against severe influenza: prophylactic and therapeutic efficacy in ferrets. *PLoS ONE*, 2010, vol. 5, no. 2, e9106. doi: 10.1371/journal.pone.0009106
25. Garcia-Sastre A. Identification and characterization of viral antagonists of type I interferon in negative-strand RNA viruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2004, vol. 283, pp. 249–280.
26. GeurtsvanKessel C.H., Lambrecht B.N. Division of labor between dendritic cell subsets of the lung. *Mucosal Immunol.*, 2008, vol. 1, pp. 442–450. doi: 10.1038/mi.2008.39
27. Gorman O.T., Bean W.J., Webster R.G. Evolutionary processes in influenza viruses: divergence, rapid evolution, and stasis. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 1992, vol. 176, pp. 75–97.

28. Graef K.M., Vreede F.T., Lau Y.F., McCall A.W., Carr S.M., Subbarao K., Fodor E. The PB2 subunit of the influenza virus RNA polymerase affects virulence by interacting with the mitochondrial antiviral signaling protein and inhibiting expression of beta interferon. *J. Virol.*, 2010, vol. 84, no. 17, pp. 8433–8445. doi: 10.1128/JVI.00879-10
29. Grant E., Wu C., Chan K.F., Eckle S., Bharadwaj M., Zou Q.M. Nucleoprotein of influenza A virus is a major target of immune dominant CD8⁺ T-cell responses. *Immunol. Cell Biol.*, 2013, vol. 91, pp. 184–194. doi: 10.1038/icc.2012.78
30. Guan Z., Liu D., Mi S., Zhang J., Ye Q., Wang M., Gao G.F., Yan J. Interaction of Hsp40 with influenza virus M2 protein: implications for PKR signaling pathway. *Protein Cell*, 2010, vol. 1, no. 10, pp. 944–955. doi: 10.1007/s13238-010-0115-x.
31. Guo Z., Chen L.M., Zeng H., Gomez J.A., Plowden J., Fujita T., Katz J.M., Donis R.O., Sambhara S. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2007, vol. 36, no. 3, pp. 263–269. doi: 10.1165/rcmb.2006-0283RC
32. Haanen J.B., Wolkers M.C., Kruisbeek A.M., Schumacher T.N. Selective expansion of cross-reactive CD8⁺ memory T cells by viral variants. *J. Exp. Med.*, 1999, vol. 190, no. 9, pp. 1319–1328.
33. Haller O., Kochs G. Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. *Traffic*, 2002, vol. 3, no. 10, pp. 710–717. doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.31003.x
34. Hashem A.M., Gravel C., Chen Z., Yi Y., Tocchi M., Jaentschke B., Fan X., Li C., Rosu-Myles M., Pereboev A., He R., Wang J., Li X. CD40 ligand preferentially modulates immune response and enhances protection against influenza virus. *J. Immunol.*, 2014, vol. 193, no. 2, pp. 722–734. doi: 10.4049/jimmunol.1300093
35. Heil F., Hemmi H., Hochrein H., Ampenberger F., Kirschning C., Akira S., Lipford G., Wagner H., Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 2004, vol. 303, no. 5663, pp. 1526–1529. doi: 10.1126/science.1093620
36. Hoelscher M.A., Garg S., Bangari D.S., Belsler J.A., Lu X., Stephenson I., Bright R.A., Katz J.M., Mittal S.K., Sambhara S. Development of adenoviral-vector-based pandemic influenza vaccine against antigenically distinct human H5N1 strains in mice. *Lancet*, 2006, vol. 367, no. 9509, pp. 475–481. doi: 10.1016/S0140-6736(06)68076-8
37. Holsinger L., Nichani D., Pinto L., Lamb R. Influenza A virus M2 ion channel protein: a structure-function analysis. *J. Virol.*, 1994, vol. 68, no. 3, pp. 1551–1563.
38. Holsinger L., Lamb R. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. *Virology*, 1991, vol. 183, no. 1, pp. 32–43.
39. Holzinger D., Jorns C., Stertz S., Boisson-Dupuis S., Thimme R., Weidmann M., Casanova J.L., Haller O., Kochs G. Induction of MxA gene expression by influenza A virus requires type I or type III interferon signaling. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 14, pp. 7776–7785. doi: 10.1128/JVI.00546-06
40. Hwang S.D., Shin J.S., Ku K.B., Kim H.S., Cho S.W., Seo S.H. Protection of pregnant mice, fetuses and neonates from lethality of H5N1 influenza viruses by maternal vaccination. *Vaccine*, 2010, vol. 28, no. 17, pp. 2957–2964. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.016
41. Ichinohe T., Pang I.K., Iwasaki A. Influenza virus activates inflammasomes via its intracellular M2 ion channel. *Nat. Immunol.*, 2010, vol. 11, no. 5, pp. 404–410. doi: 10.1038/ni.1861
42. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., Zhong G., Hanson A., Katsura H., Watanabe S., Li C., Kawakami E., Yamada S., Kiso M., Suzuki Y., Maher E.A., Neumann G., Kawaoka Y. Experimental adaptation of an influenza H5 HA confers respiratory droplet transmission to a reassortant H5 HA/H1N1 virus in ferrets. *Nature*, 2012, vol. 486, no. 7403, pp. 420–428. doi: 10.1038/nature10831
43. Impagliazzo A., Milder F., Kuipers H., Wagner M.V., Zhu X., Hoffman R.M., Van Meersbergen R., Huizingh J., Wanningen P., Verspuij J., De Man M., Ding Z., Apetri A., Kükler B., Sneekes-Vriese E., Tomkiewicz D., Laursen N.S., Lee P.S., Zakrzewska A., Dekking L., Tolboom J., Tettero L., Van Meerten S., Yu W., Koudstaal W., Goudsmit J., Ward A.B., Meijberg W., Wilson I.A., Radošević K. A stable trimeric influenza hemagglutinin stem as a broadly protective immunogen. *Science*, 2015, vol. 349, no. 6254, pp. 1301–1306. doi: 10.1126/science.aac7263
44. Ito T., Gorman O., Kawaoka Y., Bean W., Webster R. Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J. Virol.*, 1991, vol. 65, no. 10, pp. 5491–5498.
45. Jameson J., Cruz J., Terajima M., Ennis F.A. Human CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte memory to influenza A viruses of swine and avian species. *J. Immunol.*, 1999, vol. 162, no. 12, pp. 7578–7583.
46. Jayasekera J.P., Moseman E.A., Carroll M.C. Natural antibody and complement mediate neutralization of influenza virus in the absence of prior immunity. *J. Virol.*, 2007, vol. 81, no. 7, pp. 3487–3494. doi: 10.1128/JVI.02128-06
47. Jegaskanda S., Job E.R., Kramski M., Laurie K., Isitman G., De Rose R. Cross-reactive influenza-specific antibody-dependent cellular cytotoxicity antibodies in the absence of neutralizing antibodies. *J. Immunol.*, 2013, vol. 190, no. 4, pp. 1837–1848. doi: 10.4049/jimmunol.1201574
48. Jegerlehner A., Schmitz N., Storni T., Bachmann M.F. Influenza A vaccine based on the extracellular domain of M2: weak protection mediated via antibody-dependent NK cell activity. *J. Immunol.*, 2004, vol. 172, no. 9, pp. 5598–5605.
49. Kammer A.R., Amacker M., Rasi S., Westerfeld N., Gremion C., Neuhaus D., Zurbriggen R. A new and versatile virosomal antigen delivery system to induce cellular and humoral immune responses. *Vaccine*, 2007, vol. 25, no. 41, pp. 7065–7074. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.07.052
50. Kim H.M., Lee Y.W., Lee K.J., Kim H.S., Cho S.W., Van Rooijen N., Guan Y., Seo S.H. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. *J. Virol.*, 2008, vol. 82, no. 9, pp. 4265–4274. doi: 10.1128/JVI.02602-07
51. Kuiken T., Riteau B., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F. Pathogenesis of influenza virus infections: the good, the bad and the ugly. *Curr. Opin. Virol.*, 2012, vol. 2, no. 3, pp. 276–286. doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.013
52. Lamere M.W., Moquin A., Lee F.E., Misra R.S., Blair P.J., Haynes L., Randall T.D., Lund F.E., Kaminski D.A. Regulation of antinucleoprotein IgG by systemic vaccination and its effect on influenza virus clearance. *J. Virol.*, 2011, vol. 85, no. 10, pp. 5027–5035. doi: 10.1128/JVI.00150-11

53. Lee L.Y., Ha D.L., Simmons C., De Jong M.D., Chau N.V., Schumacher R., Peng Y.C., McMichael A.J., Farrar J.J., Smith G.L., Townsend A.R., Askonas B.A., Rowland-Jones S., Dong T. Memory T cells established by seasonal human influenza A infection cross-react with avian influenza A (H5N1) in healthy individuals. *J. Clin. Invest.*, 2008, vol. 118, no. 10, pp. 3478–3490. doi: 10.1172/JCI32460
54. Lei H., Peng X., Jiao H., Zhao D., Ouyang J. Broadly protective immunity against divergent influenza viruses by oral co-administration of *Lactococcus lactis* expressing nucleoprotein adjuvanted with cholera toxin B subunit in mice. *Microb Cell Fact.*, 2015, vol. 14, e111. doi: 10.1186/s12934-015-0287-4
55. Leung H.C., Chan C.C., Poon V.K., Zhao H.J., Cheung C.Y., Ng F., Huang J.D., Zheng B.J. An H5N1-based matrix protein 2 ectodomain tetrameric peptide vaccine provides cross-protection against lethal infection with H7N9 influenza virus. *Emerg. Microbes Infect.*, 2015, vol. 4, no. 4, e22. doi: 10.1038/emi.2015.22
56. Li R., Chowdhury M.Y., Kim J.H., Kim T.H., Pathinayake P., Koo W.S., Park M.E., Yoon J.E., Roh J.B., Hong S.P., Sung M.H., Lee J.S., Kim C.J. Mucosally administered *Lactobacillus* surface-displayed influenza antigens (sM2 and HA2) with cholera toxin subunit A1 (CTA1) Induce broadly protective immune responses against divergent influenza subtypes. *Vet. Microbiol.*, 2015, vol. 179, no. 3–4, pp. 250–263. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.07.020
57. Lin K.L., Suzuki Y., Nakano H., Ramsburg E., Gunn M.D. CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality. *J. Immunol.*, 2008, vol. 180, no. 4, pp. 2562–2572.
58. Liu W., Zou P., Ding J., Lu Y., Chen Y.H. Sequence comparison between the extracellular domain of M2 protein human and avian influenza A virus provides new information for bivalent influenza vaccine design. *Microbes Infect.*, 2005, vol. 7, no. 2, pp. 171–177. doi: 10.1016/j.micinf.2004.10.006
59. Lund J.M., Alexopoulou L., Sato A., Karow M., Adams N.C., Gale N.W., Iwasaki A., Flavell R.A. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2004, vol. 101, no. 15, pp. 5598–5603. doi: 10.1073/pnas.0400937101
60. Mardanov E.S., Kotlyarov R.Y., Kuprianov V.V., Stepanova L.A., Tsybalova L.M., Lomonosoff G.P., Ravin N.V. Rapid high-yield expression of a candidate influenza vaccine based on the ectodomain of M2 protein linked to flagellin in plants using viral vectors. *BMC Biotechnol.*, 2015, vol. 15, e42. doi: 10.1186/s12896-015-0164-6
61. Mazanec M.B., Coudret C.L., Fletcher D.R. Intracellular neutralization of influenza virus by immunoglobulin A anti-hemagglutinin monoclonal antibodies. *J. Virol.*, 1995, vol. 69, no. 2, pp. 1339–1343.
62. Mbawuikwe I.N., Six H.R., Cate T.R., Couch R.B. Vaccination with inactivated influenza A virus during pregnancy protects neonatal mice against lethal challenge by influenza A viruses representing three subtypes. *J. Virol.*, 1990, vol. 64, pp. 1370–1374.
63. McMichael A.J., Gotch F.M., Noble G.R., Beare P.A. Cytotoxic T-cell immunity to influenza. *N. Engl. J. Med.*, 1983, vol. 309, no. 1, pp. 13–17. doi: 10.1056/NEJM198307073090103
64. Meurs E., Chong K., Galabru J., Thomas N.S., Kerr I.M., Williams B.R., Hovanessian A.G. Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell*, 1990, vol. 62, no. 2, pp. 379–390. doi: 10.1016/0092-8674(90)90374-N
65. Murphy B.R., Nelson D.L., Wright P.F., Tierney E.L., Phelan M.A., Chanock R.M. Secretory and systemic immunological response in children infected with live attenuated influenza A virus vaccines. *Infect. Immun.*, 1982, vol. 36, no. 3, pp. 1102–1108.
66. Neirynek S., Deroo T., Saelens X., Vanlandschoot P., Jou W.M., Fiers W. A universal influenza A vaccine based on the extracellular domain of the M2 protein. *Nat. Med.*, 1999, vol. 5, no. 10, pp. 1157–1163. doi: 10.1038/13484
67. Ohba K., Yoshida S., Zahidunnabi Dewan M., Shimura H., Sakamaki N., Takeshita F., Yamamoto N., Okuda K. Mutant influenza A virus nucleoprotein is preferentially localized in the cytoplasm and its immunization in mice shows higher immunogenicity and cross-reactivity. *Vaccine*, 2007, vol. 25, no. 21, pp. 4291–4300. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.02.074
68. Okuda K., Ihata A., Watabe S., Okada E., Yamakawa T., Hamajima K., Yang J., Ishii N., Nakazawa M., Okuda K., Ohnari K., Nakajima K., Xin K.Q. Protective immunity against influenza A virus induced by immunization with DNA plasmid containing influenza M gene. *Vaccine*, 2001, vol. 19, no. 27, pp. 3681–3691. doi: 10.1016/S0264-410X(01)00078-0
69. Onodera T., Takahashi Y., Yokoi Y., Ato M., Kodama Y., Hachimura S., Kurosaki T., Kobayashi K. Memory B cells in the lung participate in protective humoral immune responses to pulmonary influenza virus reinfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 7, pp. 2485–2490. doi: 10.1073/pnas.1115369109
70. Ozawa T., Jin A., Tajiri K., Takemoto M., Okuda T., Shiraki K., Kishi H., Muraguchi A. Characterization of a fully human monoclonal antibody against extracellular domain of matrix protein 2 of influenza A virus. *Antiviral Res.*, 2011, vol. 91, no. 3, pp. 283–287. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.06.012
71. Paget C., Ivanov S., Fontaine J., Blanc F., Pichavant M., Renneson J., Bialecki E., Pothlichet J., Vendeville C., Barba-Speath G., Huerre M.R., Faveeuw C., Si-Tahar M., Trottein F. Potential role of invariant NKT cells in the control of pulmonary inflammation and CD8+ T cell response during acute influenza A virus H3N2 pneumonia. *J. Immunol.*, 2011, vol. 186, no. 10, pp. 5590–5602. doi: 10.4049/jimmunol.1002348
72. Rothbarth P.H., Groen J., Bohnen A.M., De Groot R., Osterhaus A.D. Influenza virus serology – a comparative study. *J. Virol. Methods*, 1999, vol. 78, no. 1–2, pp. 163–169.
73. Sambhara S., Kurichh A., Miranda R., Tumpey T., Rowe T., Renshaw M., Arpino R., Tamane A., Kandil A., James O., Underdown B., Klein M., Katz J., Burt D. Heterosubtypic immunity against human influenza A viruses, including recently emerged avian H5 and H9 viruses, induced by FLU-ISCOP vaccine in mice requires both cytotoxic T-lymphocyte and macrophage function. *Cell. Immunol.*, 2001, vol. 211, no. 2, pp. 143–153. doi: 10.1006/cimm.2001.1835
74. Sandbulte M.R., Jimenez G.S., Boon A.C., Smith L.R., Treanor J.J., Webby R.J. Cross-reactive neuraminidase antibodies afford partial protection against H5N1 in mice and are present in unexposed humans. *PLoS Med.*, 2007, vol. 4, no. 2, e59. doi: 10.1371/journal.pmed.0040059
75. Scheible K., Zhang G., Baer J., Azadniv M., Lambert K., Pryhuber G., Treanor J.J., Topham D.J. CD8+ T cell immunity to 2009 pandemic and seasonal H1N1 influenza viruses. *Vaccine*, 2011, vol. 29, no. 11, pp. 2159–2168. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.12.073

76. Scholtissek C., Ludwig S., Fitch W.M. Analysis of influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanisms leading to new phylogenetic virus lineages. *Arch. Virol.*, 1993, vol. 13, no. 3–4, pp. 237–250.
77. Schotsaert M., De Filette M., Fiers W., Saelens X. Universal M2 ectodomainbased influenza A vaccines: preclinical and clinical developments. *Expert Rev. Vaccines*, 2009, vol. 8, no. 4, pp. 499–508. doi: 10.1586/erv.09.6
78. Schwartzman L.M., Cathcart A.L., Pujanauski L.M., Li Q., Kash J.C., Taubenberger J.K. An intranasal virus-like particle vaccine broadly protects mice from multiple subtypes of influenza A virus. *mBio*, 2015, vol. 6, no. 4, e01044–15. doi: 10.1128/mBio.01044-15
79. Sharma K., Tripathi S., Ranjan P., Kumar P., Garten R., Deyde V., Katz J.M., Cox N.J., Lal R.B., Sambhara S., Lal S.K. Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation. *PLoS ONE*, 2011, vol. 6, no. 6, e20215. doi: 10.1371/journal.pone.0020215
80. Shedlock D.J., Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*, 2003, vol. 300, no. 5617, pp. 337–339. doi: 10.1126/science.1082305
81. Shu L.L., Bean W.J., Webster R.G. Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. *J. Virol.*, 1993, vol. 67, no. 5, pp. 2723–2729.
82. Slepshkin V.A., Katz J.M., Black R.A., Gamble W.C., Rota P.A., Cox N.J. Protection of mice against influenza A virus challenge by vaccination with baculovirus-expressed M2 protein. *Vaccine*, 1995, vol. 13, no. 15, pp. 1399–1402. doi: 10.1016/0264-410X(95)92777-Y
83. Smith D.J., Lapedes A.S., De Jong J.C., Bestebroer T.M., Rimmelzwaan G.F., Osterhaus A.D., Fouchier R.A. Mapping the antigenic and genetic evolution of influenza virus. *Science*, 2004, vol. 305, no. 5682, pp. 371–376. doi: 10.1126/science.1097211
84. Soghoian D.Z., Streeck H. Cytolytic CD4(+) T cells in viral immunity. *Expert Rev. Vaccines*, 2010, vol. 9, no. 12, pp. 1453–1463. doi: 10.1586/erv.10.132
85. Sui Z., Chen Q., Wu R., Zhang H., Zheng M., Wang H., Chen Z. Cross-protection against influenza virus infection by intranasal administration of M2-based vaccine with chitosan as an adjuvant. *Arch. Virol.*, 2010, vol. 155, no. 4, pp. 535–544.
86. Takeda M., Pekosz A., Shuck K., Pinto L., Lamb R. Influenza A virus M2 ion channel activity is essential for efficient replication in tissue culture. *J. Virol.*, 2002, vol. 76, no. 3, pp. 1391–1399. doi: 10.1128/JVI.76.3.1391-1399.2002
87. Tan S.L., Katze M.G. Biochemical and genetic evidence for complex formation between the influenza A virus NS1 protein and the interferon-induced PKR protein kinase. *J. Interferon Cytokine Res.*, 1998, vol. 18, no. 9, pp. 757–766.
88. Thompson W.W., Shay D.K., Weintraub E., Brammer L., Bridges C.B., Cox N.J., Fukuda K. Influenza-associated hospitalizations in the United States. *JAMA*, 2004, vol. 292, no. 11, pp. 1333–1340. doi: 10.1001/jama.292.11.1333
89. Throsby M., Van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., Van Deventer E., Guan Y., Cinatl J., Ter Meulen J., Lasters I., Carsetti R., Peiris M., De Kruijff J., Goudsmit J. Heterosubtypic neutralizing monoclonal antibodies cross-protective against H5N1 and H1N1 recovered from human IgM+ memory B cells. *PLoS One*, 2008, vol. 3, no. 12, e3942. doi: 10.1371/journal.pone.0003942
90. Tompkins S.M., Zhao Z.S., Lo C.Y., Mispion J.A., Liu T., Ye Z., Hogan R.J., Wu Z., Benton K.A., Tumpey T.M., Epstein S.L. Matrix protein 2 vaccination and protection against influenza viruses, including subtype H5N1. *Emerg. Infect. Dis.*, 2007, vol. 13, no. 3, pp. 426–435. doi: 10.3201/eid1303.061125
91. Tong S., Li Y., Rivaller P., Conrardy C., Castillo D.A., Chen L.M., Recuenco S., Ellison J.A., Davis C.T., York I.A., Turmelle A.S., Moran D., Rogers S., Shi M., Tao Y., Weil M.R., Tang K., Rowe L.A., Sammons S., Xu X., Frace M., Lindblade K.A., Cox N.J., Anderson L.J., Rupprecht C.E., Donis R.O. A distinct lineage of influenza A virus from bats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 11, pp. 4269–4274. doi: 10.1073/pnas.1116200109
92. Topham D.J., Tripp R.A., Doherty P.C. CD8 T cells clear influenza virus by perforin or Fas-dependent processes. *J. Immunol.*, 1997, vol. 159, no. 11, pp. 5197–5200.
93. Treanor J.J., Tierney E.L., Zebedee S.L., Lamb R.A., Murphy B.R. Passively transferred monoclonal antibody to the M2 protein inhibits influenza A virus replication in mice. *J. Virol.*, 1990, vol. 64, no. 3, pp. 1375–1377.
94. Ungchusak K., Auewarakul P., Dowell S.F., Kitphati R., Auwanit W., Puthavathana P., Uiprasertkul M., Boonnak K., Pittayawonganon C., Cox N.J., Zaki S.R., Thawatsupha P., Chittaganpitch M., Khontong R., Simmerman J.M., Chunsuttiwat S. Probable person-to-person transmission of avian influenza A (H5N1). *N. Engl. J. Med.*, 2005, vol. 352, pp. 333–340. doi: 10.1056/NEJMoa044021
95. Van Reeth K., Braeckmans D., Cox E., Van Borm S., Van den Berg T., Goddeeris B., De Vleeschauwer A. Prior infection with an H1N1 swine influenza virus partially protects pigs against a low pathogenic H5N1 avian influenza virus. *Vaccine*, 2009, vol. 27, no. 45, pp. 6330–6339.
96. Van Reeth K., Gregory V., Hay A., Pensaert M. Protection against a European H1N2 swine influenza virus in pigs previously infected with H1N1 and/or H3N2 subtypes. *Vaccine*, 2003, vol. 21, no. 13–14, pp. 1375–1381. doi: 10.1016/S0264-410X(02)00688-6
97. Whittle J.R., Zhang R., Khurana S., King L.R., Manischewitz J., Golding H., Dormitzer P.R., Haynes B.F., Walter E.B., Moody M.A., Kepler T.B., Liao H.X., Harrison S.C. Broadly neutralizing human antibody that recognizes the receptor-binding pocket of influenza virus hemagglutinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 34, pp. 14216–14221. doi: 10.1073/pnas.1111497108
98. Wu C., Zanker D., Valkenburg S., Tan B., Kedzierska K., Zou Q.M. Systematic identification of immune dominant CD8+ T-cell responses to influenza A virus in HLA-A2 individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, vol. 108, no. 22, pp. 9178–9183. doi: 10.1073/pnas.1105624108
99. Wu Y., Wu Y., Tefsen B., Shi Y., Gao G.F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends Microbiol.*, 2014, vol. 22, no. 4, pp. 183–91. doi: 10.1016/j.tim.2014.01.010
100. Yassine H.M., Boyington J.C., McTamney P.M., Wei C.J., Kanekiyo M., Kong W.P., Gallagher J.R., Wang L., Zhang Y., Joyce M.G., Lingwood D., Moin S.M., Andersen H., Okuno Y., Rao S.S., Harris A.K., Kwong P.D., Mascola J.R., Nabel G.J., Graham B.S. Hemagglutinin-stem nanoparticles generate heterosubtypic influenza protection. *Nat. Med.*, 2015, vol. 21, no. 9, pp. 1065–1070. doi: 10.1038/nm.3927

101. Yewdell J.W., Bennink J.R. Immunodominance in major histocompatibility complex class I-restricted T lymphocyte responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999, vol. 17, pp. 51–88.
102. Yoshida R., Igarashi M., Ozaki H., Kishida N., Tomabechi D., Kida H., Ito K., Takada A. Cross-protective potential of a novel monoclonal antibody directed against antigenic site B of the hemagglutinin of influenza A viruses. *PLoS Pathog.*, 2009, vol. 5, no. 3, e1000350. doi: 10.1371/journal.ppat.1000350
103. Zaman M., Ashraf S., Dreyer N.A., Toovey S. Human infection with avian influenza virus, Pakistan, 2007. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, vol. 17, no. 6, pp. 1056–1059. doi: 10.3201/eid1706.091652
104. Zhou D., Wu T.L., Lasaro M.O., Latimer B.P., Parzych E.M., Bian A., Li Y., Li H., Erikson J., Xiang Z., Ertl H.C. A universal influenza A vaccine based on adenovirus expressing matrix-2 ectodomain and nucleoprotein protects mice from lethal challenge. *Mol. Ther.*, 2010, vol. 18, no. 12, pp. 2182–2189. doi: 10.1038/mt.2010.202
105. Zuccotti G., Pogliani L., Pariani E., Amendola A., Zanetti A. Transplacental antibody transfer following maternal immunization with a pandemic 2009 influenza A(H1N1) MF59-adjuvanted vaccine. *JAMA*, 2010, vol. 304, no. 21, pp. 2360–2361. doi: 10.1001/jama.2010.1729

Авторы:

Есмагамбетов И.Б., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;
Алексеева С.В., к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия;
Саядян Х.С., д.м.н., профессор, профессор кафедры фармацевтической технологии и фармакологии ПМГМУ им. Сеченова, Москва, Россия;
Шмаров М.М., д.б.н., зав. лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБУ ФНИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Гамалеи МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Esmagambetov I.B., PhD, MD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, Gamaleya Research Center of Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russian Federation;
Alekseeva S.V., PhD, MD (Biology), Researcher, Laboratory of Molecular Biotechnology, Gamaleya Research Center of Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russian Federation;
Sayadyan K.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of the Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Shmarov M.M., PhD, MD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Biotechnology, Gamaleya Research Center of Microbiology and Epidemiology, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 09.03.2016
Принята к печати 04.04.2016

Received 09.03.2016
Accepted 04.04.2016