

# КОНСЕРВАТИВНЫЕ ЛИНЕЙНЫЕ В-КЛЕТОЧНЫЕ ПЕПТИДЫ НЕЙРАМИНИДАЗЫ ВИРУСА ГРИППА А УСИЛИВАЮТ КРОСС-ПРОТЕКТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ЦЕЛЬНОВИРИОННОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНЫ



Т.С. Котомина, И.А. Сычев, А.Я. Рак, П.-Ф. Вон, А.В. Бажина, И.Н. Исакова-Сивак,  
Л.Г. Руденко

ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

**Резюме.** *Введение.* Грипп представляет собой заболевание, вызываемое широко распространенным вирусом, обладающим пандемическим потенциалом. Зачастую люди, прошедшие вакцинацию против сезонного вируса гриппа, все же подвержены заболеванию, что свидетельствует о необходимости повышения иммуногенного потенциала существующих вакцин. При оценке эффективности действия вакцин против вируса гриппа в основном принимают во внимание иммунный ответ к одному вирусному антигену — молекуле гемагглютинаина. Тем не менее по данным доклинических и клинических исследований, нейраминидаза (NA) стимулирует кросс-протективный иммунитет, эффективный в отношении не только гомологичных, но и дрейфовых вариантов вируса гриппа А. *Материалы и методы.* В настоящем исследовании изучалась способность отобранных нами ранее консервативных линейных В-клеточных эпитопов NA (SGYSGK, SWPDGK, EECSCYPK, VELIRGRK) усиливать иммуногенность инактивированной цельновиральной гриппозной вакциной на основе модельного штамма PR8 (iPR8). Мышам линии BALB/c вводили iPR8 в комбинации с одним из пептидов внутримышечно три раза с интервалом в две недели. Образцы крови забирали через 14 дней после последней иммунизации, после чего мышей подвергали челлендж-инфекции вирусами гриппа неродственных подтипов H1N1pdm09 и H3N2. *Результаты.* У всех иммунизированных мышей наблюдалась индукция H1N1 (PR8)-специфических IgG антител спустя две недели после третьей иммунизации. В группе мышей, иммунизированных вакцинным препаратом iPR8 в комбинации с пептидом VELIRGRK, была выявлена наиболее выраженная индукция IgG антител к реассортантному штамму H6N1, NA которого соответствует вирусу iPR8, что указывает на способность пептида NA стимулировать выработку NA-специфических антител. Тем не менее выработанные после иммунизации антитела не были способны ингибировать ферментативную активность NA. Несмотря на это, мыши, иммунизированные iPR8 в комбинации с анти-NA пептидами, продемонстрировали более высокий уровень выживаемости после заражения гетерологичными вирулентными

## Адрес для переписки:

Котомина Татьяна Сергеевна  
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. Академика Павлова, 12,  
ФГБНУ Институт экспериментальной медицины.  
Тел.: 8 (921) 979-28-99.  
E-mail: kotomina@iemspb.ru

## Contacts:

Tatiana S. Kotomina  
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Academician  
Pavlov str., 12, Institute of Experimental Medicine.  
Phone: +7 (921) 979-28-99.  
E-mail: kotomina@iemspb.ru

## Для цитирования:

Котомина Т.С., Сычев И.А., Рак А.Я., Вон П.-Ф., Бажина А.В., Исакова-Сивак И.Н., Руденко Л.Г. Консервативные линейные В-клеточные пептиды нейраминидазы вируса гриппа А усиливают кросс-протективный потенциал инактивированной цельновиральной гриппозной вакцины // Инфекция и иммунитет. 2024. Т. 14, № 3. С. 593–600. doi: 10.15789/2220-7619-CLB-16932

## Citation:

Kotomina T.S., Sychev I.A., Rak A.Ya., Wong P.-F., Bazhina A.V., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G. Conserved linear B-cell peptides among the influenza A viral neuraminidases enhance the cross-protective potential of inactivated whole-virion influenza vaccine // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2024, vol. 14, no. 3, pp. 593–600. doi: 10.15789/2220-7619-CLB-16932

Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ по проекту FGWG-2022-0001.  
The study was financially supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation under the project FGWG-2022-0001.

© Котомина Т.С. и соавт., 2024

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-CLB-16932>

вирусами гриппа: A/California/07/09 (H1N1pdm09) и A/Philippines/2/82 (H3N2) по сравнению с группами PBS и iPR8. *Заключение.* Таким образом, в исследовании было продемонстрировано иммунопотенцирующее действие индивидуальных пептидов, соответствующих консервативным линейным эпитопам молекулы NA, при их добавлении к стандартной инактивированной гриппозной вакцине, что позволило расширить спектр защитного действия вакцины в отношении гетеросубтипических вирусов гриппа.

*Ключевые слова:* вирус гриппа, иммунный ответ, универсальная гриппозная вакцина, антинейраминидазные антитела, линейные B-клеточные эпитопы.

## CONSERVED LINEAR B-CELL PEPTIDES AMONG THE INFLUENZA A VIRAL NEURAMINIDASES ENHANCE THE CROSS-PROTECTIVE POTENTIAL OF INACTIVATED WHOLE-VIRION INFLUENZA VACCINE

Kotomina T.S., Sychev I.A., Rak A.Ya., Wong P.-F., Bazhina A.V., Isakova-Sivak I.N., Rudenko L.G.

*Institute of Experimental Medicine, St Petersburg, Russian Federation*

**Abstract.** *Introduction.* Influenza is a disease caused by a widespread virus with pandemic potential. Frequently, individuals vaccinated against seasonal influenza virus are still susceptible to the disease, indicating the need to improve the immunogenic potential of existing vaccines. To assess the efficacy of influenza virus vaccines, immune response only to a single viral antigen — hemagglutinin molecule, is taken into consideration. However, according to preclinical and clinical studies, neuraminidase (NA) stimulates cross-protective immunity, which is effective against not only homologous but also drifted variants of influenza A virus. *Materials and methods.* In the present study, we investigated the ability of previously selected conserved linear B-cell NA epitopes (SGYSGK, SWPDGK, EECSCYPK, VELIRGRK) to enhance the immunogenicity of an inactivated whole-virion influenza vaccine based on the model strain PR8 (iPR8). BALB/c mice were injected with iPR8 in combination with one of the peptides intramuscularly three times at two-week intervals. Blood samples were collected 14 days after the last immunization, after which the mice were challenged with heterosubtypic influenza viruses H1N1pdm09 and H3N2. *Results.* All immunized mice showed induction of H1N1 (PR8)-specific IgG antibodies two weeks after the third immunization. The group of mice immunized with the iPR8 vaccine preparation in combination with VELIRGRK peptide showed the most pronounced induction of IgG antibodies to the H6N1 reassortant strain, the NA of which corresponds to the iPR8 virus, indicating the ability of the NA peptide to stimulate the production of NA-specific antibodies. However, the antibodies produced after immunization were not capable to inhibit the NA enzymatic activity. Despite this, mice immunized with iPR8 in combination with anti-NA peptides showed a higher survival rate after infection with heterologous virulent influenza viruses: A/California/07/09 (H1N1pdm09) and A/Philippines/2/82 (H3N2) compared to the PBS and iPR8 groups. *Conclusion.* Thus, the study demonstrated the immune-potentiating effect of individual peptides corresponding to conservative linear epitopes of the NA molecule in combination with a standard inactivated influenza vaccine, which made it possible to improve the protective effect of the vaccine against heterosubtypic influenza viruses.

*Key words:* influenza A virus, immune response, universal influenza vaccine, heterosubtypic immune response, antineuraminidase antibodies, linear B-cell epitopes.

## Введение

Противогриппозные вакцины остаются главным инструментом систем общественного здравоохранения для снижения бремени сезонной заболеваемости гриппозными инфекциями у населения. Большинство существующих инактивированных и живых аттенуированных вакцин направлено на индукцию штамм-специфических нейтрализующих антител против главного поверхностного антигена вируса гриппа — молекулы гемагглютинина (HA), при этом такие антитела не являются долгоживущими [3, 17]. Для преодоления проблемы узкой специфичности гриппозных вакцин во всем мире проводятся исследования по разработке универсальной вакцины, способной обеспечивать защиту против широкого круга эволюционно удаленных вирусов гриппа. Настоящее

исследование направлено на поиск новых подходов для усиления кросс-протективных свойств традиционных противогриппозных вакцин за счет направленной индукции антител к консервативным эпитопам вируса гриппа. Ранее в результате проведения комплексного биоинформатического анализа нами были отобраны линейные эпитопы нейраминидазы (NA), высококонсервативные среди всех вирусов гриппа типа А. Иммунизация мышей индивидуальными пептидами, соответствующими найденным эпитопам, конъюгированными с белковыми носителями (овальбумин или гемоцианин лимфы улитки), приводила к индукции NA-специфических антител, однако эти уровни не позволяли достичь желаемого эффекта защиты при заражении иммунизированных мышей летальными челлендж-вирусами [2]. В литературных источниках описана стратегия

усиления кросс-протективных свойств гриппозных вакцин за счет добавления к живой или инактивированной вакцине пептидов, соответствующих консервативным эпитопам вируса гриппа [10, 12, 15, 16, 19]. Соответственно, основной целью настоящего исследования явилась оценка иммунопотенцирующего действия отобранных нами ранее консервативных линейных эпитопов вируса гриппа А при их добавлении к стандартной цельновирионной инактивированной гриппозной вакцине.

## Материалы и методы

**Консервативные пептиды NA.** В работе использовали пептиды NA, соответствующие описанным ранее последовательностям консервативных линейных В-клеточных эпитопов [1]:

1. SGYSGK (Vir-4);
2. SWPDGK (Vir-5);
3. EECSCYPK (Vir-6);
4. VELIRGRK (Vir-7).

Пептиды были химически синтезированы твердофазным методом (SPPS) [9] по методике, описанной ранее [1]. Концентрацию пептидов определяли с помощью спектрофотометрического анализа при длинах волн 280 нм или 214 нм, в зависимости от наличия в составе молекулы пептида остатков тирозина или триптофана. Коэффициенты молярной экстинкции использовались для определения концентрации пептидов.

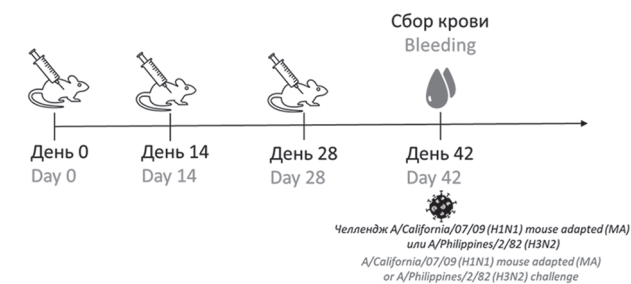
**Подготовка препарата инактивированной гриппозной вакцины.** Для подготовки препарата инактивированной гриппозной вакцины (ИГВ) модельный вирус гриппа штамма A/Puerto Rico/8/1934 (A/PR/8/34, H1N1) накапливали в 10–12 дневных развивающихся куриных эмбрионах (РКЭ) и концентрировали путем ультрацентрифугирования в ступенчатом градиенте плотности сахарозы 30–60% по стандартной методике [18]. Далее вируссодержащую жидкость инактивировали с помощью добавления 0,02% формалина и инкубации при +4°C в течение 48 часов. Эффективность инактивации вируса гриппа оценивали на основании заражения РКЭ, а также двух дополнительных слепых пассажей, в результате которых не было выявлено жизнеспособного вируса. Препарат инактивированной вакцины обозначали как iPR8, концентрацию белка в препарате измеряли при помощи набора Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) по инструкции производителя.

**Эксперименты на животных.** Для эксперимента по оценке кросс-протективного действия iPR8 с добавлением пептидов NA использовали самок мышей линии BALB/c в возрасте 4–6 недель, поставляемых из питомника

Филиал Столбовая ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Иммунизацию животных осуществляли по схеме, описанной в работе Oh и соавт. [16]. Одна вакцинная доза состояла из препарата iPR8 в концентрации 5 мкг в комбинации с 20 мкг одного из пепетидов NA, разведенных в стерильном фосфатно-солевом буфере (PBS). В исследование были включены две контрольные группы, одной вводили iPR8 в концентрации 5 мкг, вторая получала раствор PBS. Иммунизация производилась внутримышечно в объеме 100 мкл, трехкратно с интервалом в 14 дней, без адъюванта. Состав экспериментальных групп и схема проведения эксперимента представлены на рис. 1.

Через 2 недели после третьей иммунизации по 5–6 мышей из каждой группы подвергали экспериментальному заражению гетерологичными вирулентными вирусами гриппа: A/California/07/09 (H1N1pdm09) mouse adapted (Ca09 MA) или A/Philippines/2/82 (H3N2). Мышей заражали интраназально вирусами в дозе 10 ЛД<sub>50</sub> (50%-ная мышьяная летальная доза) в объеме 50 мкл под легким эфирным наркозом. Оценку выживаемости и измерение массы тела производили ежедневно в течение 14 дней после заражения.

**Оценка гуморального иммунного ответа методом иммуноферментного анализа (ИФА).** ИФА проводили общепринятым методом. Планшеты с высокой сорбционной способностью (SPL Lifesciences, Южная Корея) покрывали виру-



№ Группы № Group	Иммунизация (n=6) Immunization (n=6)
1	PBS (nonimmunized)
2	iPR8
3	iPR8+Vir4
4	iPR8+Vir5
5	iPR8+Vir6
6	iPR8+Vir7

**Рисунок 1. Схема проведения эксперимента на мышах линии BALB/c по изучению иммуногенности вакцинных препаратов iPr8+Vir и выживаемости мышей после заражения вирулентными вирусами гриппа**

Figure 1. Study designs and timelines for experiment in BALB/c mice

сом А/PR/8/34 (H1N1) в концентрации 16 геммагглютинирующих единиц (ГАЕ) в объеме 50 мкл/лунку. Сорбцию проводили в карбонат-бикарбонатный буфере (КББ, рН 9,6) в течение 16 часов при 4°C. Затем лунки планшетов промывали три раза промывочным буфером PBS с 0.05% Твин-20 (PBST) и подвергали обработке раствором 5% бычьего сывороточного альбумина в течение одного часа при 37°C. Нативные сыворотки мышей, собранные спустя две недели после третьей иммунизации, разводили в соотношении 1:50 в PBS и прогревали при 56°C в течение часа для снижения негативного влияния факторов системы комплимента на результаты анализа. Планшеты промывали три раза PBST и добавляли по 50 мкл двукратно разведенных в PBS сывороток крови, начиная с разведения 1:100, и инкубировали 1 час при 37°C. Использовали конъюгат козьих поликлональных антимышиных IgG антител (BioRad, США) в разведении 1:3000 и инкубировали 45 минут при 37°C. После четырех отмывок планшета PBST буфером детекцию связывания антител с антигеном проводили с использованием субстрата 1-Step Ultra TBM-Elisa Solution (Thermo Fisher, США). Реакцию останавливали путем добавления 25 мкл 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> и измеряли оптическую плотность образцов при длине волны 450 нм (ОП<sub>450</sub>) на спектрофотометре xMark (BioRad, США). За титр антител принимали наибольшее разведение сыворотки, при котором значение ОП<sub>450</sub> выше, чем усредненное двукратное значение ОП<sub>450</sub> в контрольных лунках без добавления сыворотки (2 × ОП<sub>450</sub>). Также экспериментальные группы сравнивали по численным показателям площади под кривой зависимости оптической плотности ОП<sub>450</sub> от разведений сывороток. В данном случае уровень IgG представляли в виде параметра AUC (area under curve) и выражали в условных единицах.

*Реакция ингибирования нейраминидазной активности (РИНА).* С помощью данной процедуры выявляли антитела, присутствующие в сыворотках крови мышей через две недели после третьей иммунизации, которые были способны ингибировать нейраминидазную активность вирусов гриппа. Образцы сывороток предварительно обрабатывали реагентом RDE (Denka Seiken, Япония) по инструкции производителя для нивелирования эффекта неспецифического ингибирования. Процедуру РИНА делали по методике, описанной в статье Desheva и соавт. [7].

*Статистическая обработка результатов.* Анализ данных проводили при помощи программы GraphPad Prism Version 8.0 (GraphPad Software, США). Сравнения показателей выживаемости проводили попарно в группах

PBS, iPR8 и iPR8+Vir с помощью лог-ранг-теста Мантела–Кокса. Значения считались статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Сравнения показателей AUC проводились помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с тестом множественных сравнений Тьюки.

## Результаты

*Защитная эффективность ИГВ при добавлении пептидов NA.* Было показано, что добавление к препарату iPR8 пептидов SWPDGK (Vir-5), EECSCYPK (Vir-6), VELIRGRK (Vir-7) приводило к существенному повышению уровня выживаемости мышей после заражения вирусом Cal09 MA, в сравнении с группой животных, иммунизированных только вакциной iPR8 (рис. 2А). При заражении гетерологичным вирусом H3N2 в контрольных группах PBS и iPR8 выживаемость составила 17–20%, тогда как в группах iPR8+Vir-5, iPR8+Vir-6 и iPR8+Vir-7 выжило около 50–60% зараженных мышей (рис. 2Б). Следует заметить, что добавление к инактивированной вакцине аналогичного количества пептида SGYSGK (Vir-4) не приводило к существенному усилению защитных свойств iPR8 (рис. 2). Таким образом, сочетанная иммунизация мышей препаратом ИГВ и пептидами, соответствующими консервативным эпитопам нейраминидазы SWPDGK, EECSCYPK, VELIRGRK, позволила расширить кросс-протективный потенциал ИГВ. Далее были проведены эксперименты по выявлению факторов иммунитета, которые способствовали расширению спектра защитного действия стандартной инактивированной гриппозной вакцины.

*Иммуногенность исследуемых вакцинных препаратов.* В экспериментальных группах iPR8+Vir иммунизированные мыши вырабатывали специфические IgG антитела к вирусу гриппа PR8 на одном уровне с группой сравнения iPR8 (рис. 3А). Эти данные указывают на отсутствие существенного влияния добавленных пептидов NA на суммарную выработку вирусспецифических IgG антител, связывающихся со всеми антигенами вируса гриппа, поскольку в качестве подложки использовался гомологичный цельный вирус гриппа PR8. С целью выявления различий в индукции NA-специфических антител между экспериментальными группами сыворотки иммунизированных мышей также изучались в ИФА к вирусу гриппа H6N1, у которого NA была заимствована от штамма PR8, а иммунодоминантный антиген (молекула NA) принадлежал неродственному вирусу птичьего гриппа А/Н6N1, что снизит вероятность связывания NA-специфических антител в ИФА. Как следует из приведенных результатов на рис. 3Б, включение в состав вак-

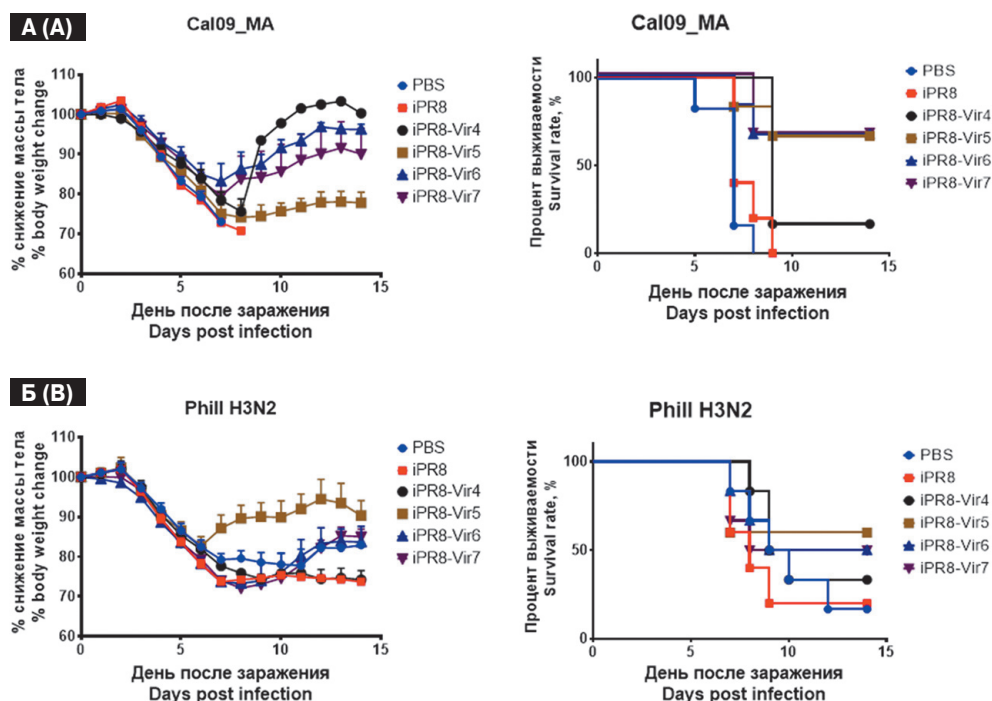
цинного препарата iPR8 пептида Vir7 привело к индукции статистически значимо более высоких значений IgG антител по сравнению с группой iPR8. Иммунизация мышей вакцинным препаратом iPR8+Vir4 приводило к менее выраженной выработке специфических IgG антител к вирусу H6N1 по сравнению с остальными группами iPR8+Vir. Из представленных данных следует, что добавление пептида VELIRGRK к препарату ИГВ существенно повышало выработку NA-связывающих антител у мышей, возможно, за счет индукции антител к целевому консервативному эпитопу NA.

Для проверки гипотезы о том, что выработанные в организме иммунизированных мышей анти-NA антитела способны ингибировать нейраминидазную активность вируса гриппа, был проведен специфический лектин-ферментативный анализ, используя реассортантный штамм H6N1, несущий NA от вируса PR8. В настоящем исследовании не было выявлено достоверных данных о способности сывороток крови иммунизированных мышей ингибировать NA активность вируса H6N1, как в группах iPR8, так и экспериментальных группах iPR8+Vir

(данные не представлены). Эти результаты указывают на неспособность инактивированной вакцины вырабатывать высокие уровни NA-ингибирующих антител, и защитный эффект NA-связывающих антител может быть обусловлен стерическими эффектами, препятствуя вирусу проникать в клетку на этапе инфицирования, а не на этапе отпочковывания созревших вирионов.

## Обсуждение

К наиболее иммуногенным антигенам вируса гриппа относят оболочечные гликопротеины — гемагглютинин (HA) и нейраминидазу (NA). На поверхности вирусной частицы содержится большее количество HA, а количество NA составляет лишь 10–20% от количества HA. Оба белка жизненно необходимы вирусу гриппа, так HA обеспечивает проникновение вируса в клетки путем связывания с сиаловыми молекулами, расположенными на поверхности клеток. NA ферментативно расщепляет остатки сиаловых кислот, что позволяет вирусу проникнуть в клетку-мишень и эффективно высво-



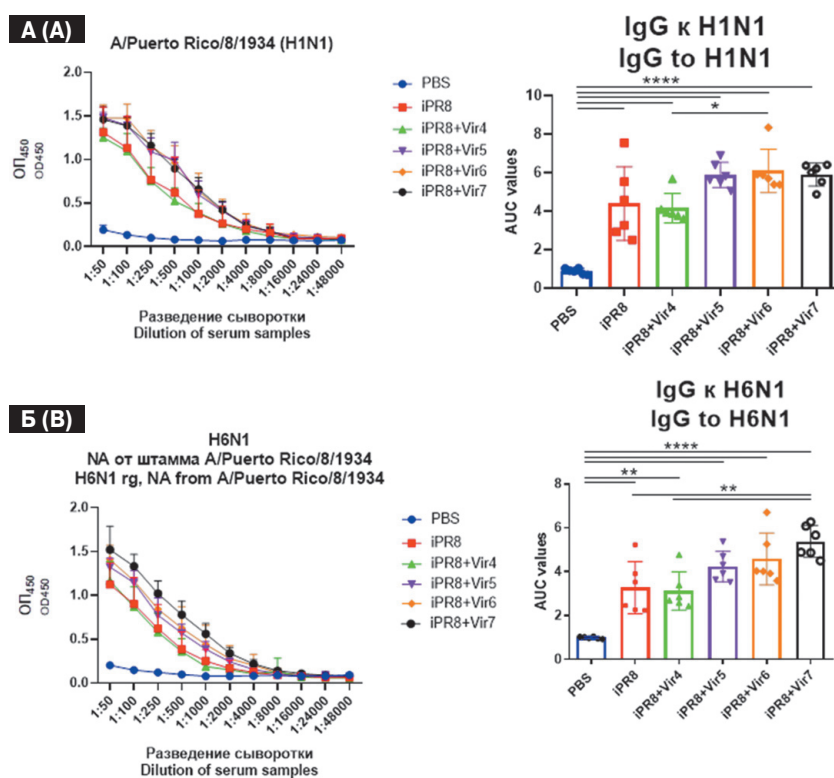
**Рисунок 2.** Динамика снижения массы тела и выживаемость интактных мышей (PBS) и мышей, иммунизированных инактивированной вакциной iPR8 либо индивидуально, либо в комбинации с одним из указанных пептидов NA: SGYSGK (Vir-4), SWPDGK (Vir-5), EECSCYPK (Vir-6) и VELIRGRK (Vir-7), после челленджа вирулентным вирусом гриппа A/California/7/09 mouse-adapted (H1N1pdm09) (А) и A/Philippines/2/82 X-79 (H3N2) (Б)

Figure 2. Dynamics of body weight loss and survival rate of nonimmunized BALB/c mice (PBS) and BALB/c mice immunized with inactivated iPR8 vaccine individually or in combination with one of the B-cell neuraminidase peptides: SGYSGK (Vir-4), SWPDGK (Vir-5), EECSCYPK (Vir-6) and VELIRGRK (Vir-7). Animals were monitored for 14 days after challenge with mouse-adapted virulent influenza virus strain A/California/7/09 mouse-adapted (H1N1pdm09) (A) and A/Philippines/2/82 X-79 (H3N2) (B)

бождать вновь синтезированные вирионы [5, 8]. В естественных условиях гриппозная инфекция приводит к выработке специфических анти-НА и анти-НА антител [11]. Тем не менее главной мишенью при создании вакцин является именно гемагглютинин. Однако не только высокая корреляция нейтрализующих антител к НА свидетельствует о защитном эффекте вакцинации. В литературных источниках указывается на то, что анти-НА антитела, ингибирующие активность НА, являются независимыми коррелятами иммунной защиты [6, 13, 14]. Таким образом, разработка вакцин, направленных на индукцию антител к НА, заслуживает внимания. В рамках исследования были синтезированы пептиды, последовательность которых соответствовала коротким консервативным линейным В-клеточным эпитопам НА. Поскольку короткие пептиды, самостоятельно

используемые для иммунизации, являются слабоиммуногенными, для повышения иммуногенности и выработки В-клеточного иммунного ответа предложено было использовать сочетанное введение отобранных пептидов вместе с цельновирионной инактивированной гриппозной вакциной на основе модельного штамма PR8. Цельновирионная инактивированная вакцина использовалась в данном исследовании из-за показанной в некоторых исследованиях адъювантной способности в виде одноцепочечной молекулы РНК связывать молекулы TLR7, одного из индукторов кросс-протективного эффекта [4].

Трехкратная иммунизация мышей линии BALB/c пептидами Vir в комбинации с iPR8 повышала выживаемость мышей после заражения вирулентными вирусами гомологичного и гетерологичного подтипа по сравнению с груп-



**Рисунок 3. Анализ иммуногенности вакцинных препаратов iPR8, iPR8+Vir после иммунизации мышей BALB/c**

Figure 3. Analysis of serum IgG antibody levels of BALB/c mice after triple immunization

**Примечание.** А. Иммуногенность в отношении гомологичного штамма A/Puerto Rico/8/1934. Зависимость оптической плотности ОП<sub>450</sub> в разведенных образцах сыворотки крови для каждой экспериментальной группы. Показатель AUC используется для проведения статистической обработки уровней IgG антител в разных группах Б. Иммуногенность в отношении гетерологичного штамма вируса гриппа H6N1, полученным методами обратной генетики на основе донора аттенуации штамм А/Ленинград/134/17/57, в котором НА идентичен штамму А/серебристая чайка/Сарма/51с/2006 (H6N1), а NA — штамму А/Puerto Rico/8/1934. Данные проанализированы с помощью однофакторного дисперсионного анализа (one-way ANOVA) с тестом множественных сравнений Тьюки. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Note. A. Immunogenicity against the homologous strain A/Puerto Rico/8/1934. AUC is used to perform statistical treatment of IgG antibody levels in different experimental groups B. Immunogenicity against a heterologous H6N1 influenza virus strain obtained by reverse genetics based on master donor strain A/Leningrad/134/17/57, in which HA is identical to strain A/Silver Gull/Sarma/51c/2006 (H6N1) and NA to strain A/Puerto Rico/8/1934. Data were analyzed using one-factor analysis of variance (one-way ANOVA) with Tukey's multiple comparisons test \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

пами iPR8 и PBS. При изучении иммуногенности было показано, что иммунизация мышей приводила к выработке штамм-специфических IgG-антител во всех экспериментальных группах кроме PBS. При этом выработка H6N1-специфических IgG-антител в группе iPR8+Vir7 была статистически значимо выше по сравнению с группой iPR8. Выбор антигена H6N1 в данном случае позволяет нивелировать вклад в иммуногенность NA-специфических IgG антител. В дальнейшем целесообразно использовать в качестве подложки отдельные NA пептиды, которые относятся к разным подтипам вируса гриппа.

Следует отметить, что результаты анализа реакции ингибирования нейраминидазной активности с вирусным антигеном H6N1 показали отсутствие индукции антител, ингибирующих ферментативную активность NA. Вероятно, усиленный протективный эффект при добавлении пептида VELIRGRK к инактивированной вакцине iPR8 был обусловлен выработкой NA-связывающих IgG антител, препятствующих

развитию гриппозной инфекции по механизму, не связанному с ингибированием ферментативной активности NA. Тем не менее требуются дополнительные исследования по оценке NA-специфических антител как в стандартном иммуноферментном анализе, так и в реакции ингибирования NA активности при использовании либо рекомбинантных препаратов NA, либо индивидуальных пептидов NA, соответствующих консервативным В-клеточным эпитопам данного белка.

Таким образом, в настоящей работе мы продемонстрировали иммунопотенцирующее действие индивидуальных пептидов, соответствующих консервативным линейным эпитопам молекулы NA, при их добавлении к стандартной инактивированной гриппозной вакцине. Соответственно, в перспективе наиболее иммуногенные эпитопы NA могут быть использованы как мишень для разработки универсальной гриппозной вакцины, используя различные системы доставки, такие как вирусные векторы или молекулы мРНК.

## Список литературы/References

1. Сычев И.А., Копейкин П.М., Цветкова Е.В., Чередова К.В., Мильман Б.Л., Шамова О.В., Исакова-Сивак И.Н., Дешева Ю.А. Индукция перекрестно-реактивных антител у мышей, иммунизированных консервативными линейными В-клеточными эпитопами нейраминидазы вируса гриппа А // Инфекция и иммунитет. 2021. Т. 11, № 3. С. 463–472. [Sychev I.A., Kopeikin P.M., Tsvetkova E.V., Cheredova K.V., Milman B.L., Shamova O.V., Isakova-Sivak I.N., Desheva Y.A. Induction of crossreactive antibodies in mice immunized with conserved influenza A virus neuraminidase-derived linear B-cell epitopes. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2021, vol. 11, no. 3, pp. 463–472. (In Russ.)] doi: 10.15789/2220-7619-IOC-1343
2. Сычев И.А., Копейкин П.М., Цветкова Е.В., Шамова О.В., Дешева Ю.А., Исакова-Сивак И.Н. Перспективы использования консервативных линейных В-клеточных эпитопов нейраминидазы вируса гриппа А для индукции кросс-протективного иммунного ответа // Медицинский академический журнал. 2021. Т. 21, № 3. С. 147–151. [Sychev I.A., Kopeikin P.M., Tsvetkova E.V., Shamova O.V., Desheva Y.A., Isakova-Sivak I.N. Prospects of using conservative linear B-cell epitopes of influenza virus A neuraminidase for induction of cross-protective immune response. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2021, vol. 21, no. 3, pp. 147–151. (In Russ.)] doi: 10.17816/MAJ76614
3. Andrews S.F., Graham B.S., Mascola J.R., McDermott A.B. Is It Possible to Develop a “Universal” Influenza Virus Vaccine? Immunogenetic Considerations Underlying B-Cell Biology in the Development of a Pan-Subtype Influenza A Vaccine Targeting the Hemagglutinin Stem. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2018, vol. 10, no. 7: a029413. doi: 10.1101/cshperspect.a029413
4. Budimir N., de Haan A., Meijerhof T., Waijer S., Boon L., Gostick E., Price D.A., Wilschut J., Huckriede A. Critical role of TLR7 signaling in the priming of cross-protective cytotoxic T lymphocyte responses by a whole inactivated influenza virus vaccine. *PLoS One*, 2013, vol. 8, no. 5: e63163. doi: 10.1371/journal.pone.0063163
5. Byrd-Leotis L., Cummings R.D., Steinhauer D.A. The Interplay between the Host Receptor and Influenza Virus Hemagglutinin and Neuraminidase. *Int. J. Mol. Sci.*, 2017, vol. 18, no. 7: 1541. doi: 10.3390/ijms18071541
6. Couch R.B., Atmar R.L., Franco L.M., Quarles J.M., Wells J., Arden N., Niño D., Belmont J.W. Antibody correlates and predictors of immunity to naturally occurring influenza in humans and the importance of antibody to the neuraminidase. *J. Infect. Dis.*, 2013, vol. 207, no. 6, pp. 974–981. doi: 10.1093/infdis/jis935
7. Desheva Y., Smolonogina T., Donina S., Rudenko L. Study of Neuraminidase-Inhibiting Antibodies in Clinical Trials of Live Influenza Vaccines. *Antibodies (Basel)*, 2020, vol. 9, no. 2: 20. doi: 10.3390/antib9020020
8. Dou D., Revol R., Östbye H., Wang H., Daniels R. Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement. *Front. Immunol.*, 2018, no. 9: 1581. doi: 10.3389/fimmu.2018.01581
9. Fmoc solid phase peptide synthesis. A Practical Approach. Eds: W.C. Chan, P.D. White. Oxford: Oxford University Press, 2000. 346 p.
10. Kim M.C., Lee Y.N., Ko E.J., Lee J.S., Kwon Y.M., Hwang H.S., Song J.M., Song B.M., Lee Y.J., Choi J.G., Kang H.M., Quan F.S., Compans R.W., Kang S.M. Supplementation of influenza split vaccines with conserved M2 ectodomains overcomes strain specificity and provides long-term cross protection. *Mol. Ther.*, 2014, vol. 22, no. 7, pp. 1364–1374. doi: 10.1038/mt.2014.33
11. Krammer F. The human antibody response to influenza A virus infection and vaccination. *Nat. Rev. Immunol.*, 2019, vol. 19, no. 6, pp. 383–397. doi: 10.1038/s41577-019-0143-6
12. Lee Y.T., Kim K.H., Ko E.J., Kim M.C., Lee Y.N., Hwang H.S., Lee Y., Jung Y.J., Kim Y.J., Santos J., Perez D.R., Kang S.M. Enhancing the cross protective efficacy of live attenuated influenza virus vaccine by supplemented vaccination with M2 ectodomain virus-like particles. *Virology*, 2019, vol. 529, pp. 111–121. doi: 10.1016/j.virol.2019.01.017

13. Memoli M.J., Shaw P.A., Han A., Czajkowski L., Reed S., Athota R., Bristol T., Fargis S., Riso K., Powers J.H., Davey R.T.Jr., Taubenberger J.K. Evaluation of anti-hemagglutinin and antineuraminidase antibodies as correlates of protection in an influenza A/H1N1 virus healthy human challenge model. *mBio*, 2016, vol. 7, no. 2: e00417-16. doi: 10.1128/mBio.00417-16
14. Monto A.S., Petrie J.G., Cross R.T., Johnson E., Liu M., Zhong W., Levine M., Katz J.M., Ohmit S.E. Antibody to Influenza Virus Neuraminidase: An Independent Correlate of Protection. *J. Infect. Dis.*, 2015, vol. 212, no. 8, pp. 1191–1199. doi: 10.1093/infdis/jiv195
15. Music N., Reber A.J., Kim M.C., York I.A., Kang S.M. Supplementation of H1N1pdm09 split vaccine with heterologous tandem repeat M2e5x virus-like particles confers improved cross-protection in ferrets. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 4, pp. 466–473. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.12.023
16. Oh J., Subbiah J., Kim K.H., Park B.R., Bhatnagar N., Garcia K.R., Liu R., Jung Y.J., Shin C.H., Seong B.L., Kang S.M. Impact of hemagglutination activity and M2e immunity on conferring protection against influenza viruses. *Virology*, 2022, vol. 574, pp. 37–46. doi: 10.1016/j.virol.2022.07.010
17. Ostrowsky J., Arpey M., Moore K., Osterholm M., Friede M., Gordon J., Higgins D., Molto-Lopez J., Seals J., Bresee J. Tracking progress in universal influenza vaccine development. *Curr. Opin. Virol.*, 2020, vol. 40, pp. 28–36. doi: 10.1016/j.coviro.2020.02.003
18. Rudenko L., Isakova-Sivak I., Naykhin A., Kiseleva I., Stukova M., Erofeeva M., Korenkov D., Matyushenko V., Sparrow E., Kieny M.P. H7N9 live attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2016, vol. 16, no. 3, pp. 303–310. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00378-3
19. Song B.M., Kang H.M., Lee E.K., Jung S.C., Kim M.C., Lee Y.N., Kang S.M., Lee Y.J. Supplemented vaccination with tandem repeat M2e virus-like particles enhances protection against homologous and heterologous HPAI H5 viruses in chickens. *Vaccine*, 2016, vol. 34, no. 5, pp. 678–686. doi: 10.1016/j.vaccine.2015.11.074

**Авторы:**

**Котомина Т.С.**, к.б.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Сычев И.А.**, младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Рак А.Я.**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Вон П.-Ф.**, аспирант отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Бажина А.В.**, лаборант лаборатории иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Исакова-Сивак И.Н.**, член-корреспондент РАН, д.б.н., зав. лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия;  
**Руденко Л.Г.**, д.м.н., профессор, зав. отделом вирусологии им. А.А. Смородинцева ФГБНУ Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия.

**Authors:**

**Kotomina T.S.**, PhD (Biology), Researcher, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Sychev I.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Rak A.Ya.**, PhD (Biology), Senior Researcher, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Wong P.-F.**, PhD Student, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Bazhina A.V.**, Laboratory Assistant, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Isakova-Sivak I.N.**, RAS Corresponding Member, DSc (Biology), Head of the Laboratory of Immunology and Prevention of Viral Infections, A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation;  
**Rudenko L.G.**, DSc (Medicine), Professor, Head of A.A. Smorodintsev Department of Virology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation.