

ПУЛЬКИНА

Анастасия Александровна

**ОПТИМИЗАЦИЯ ГРИППОЗНОГО ВЕКТОРА С
МОДИФИЦИРОВАННЫМ БЕЛКОМ NS1 ДЛЯ ЭФФЕКТИВНОЙ
ПРЕЗЕНТАЦИИ АНТИГЕНОВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО
ВИРУСА**

1.5.10 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Санкт-Петербург

2023

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

Научный руководитель: доктор биологических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России
Егоров Андрей Юрьевич

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

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

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

Защита диссертации состоится _____ в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 21.1.01.017 при ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17)

Тел.: (812) 499 15 00

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17) и на сайте www.influenza.spb.ru.

Автореферат разослан « _____ » _____ г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета Д 21.1.01.017

Кандидат биологических наук

Амосова Ирина Викторовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ), наряду с вирусом гриппа и коронавирусом SARS-CoV-2, является одним из основных клинически значимых респираторных патогенов, поражающих преимущественно детей первых месяцев жизни (Nair et al., 2010; Scheltema et al., 2017) и пожилых людей (Falsey et al., 2005). Перенесенная в детском возрасте РСВ инфекция (РСВИ) ассоциирована с отдаленными последствиями, в том числе развитием бронхиальной астмы (Huvärinen et al., 2007; Кривицкая и др., 2013; Feldman et al., 2015; Давыдова и др., 2018). Наиболее эффективным средством специфической профилактики вирусных инфекций является вакцинация, которая традиционно направлена на формирование вируснейтрализующих антител. Но в защите от повторной РСВИ и элиминации вируса также важно образование антиген-специфичных Т клеток, как системных, так и ассоциированных со слизистой оболочкой верхних дыхательных путей (Habibi et al., 2015; Morabito et al., 2017; Kinnear et al., 2018; Luangrath et al., 2021).

Интраназальное введение вакцин на основе рекомбинантных аттенуированных вирусных векторов, в отличие от инактивированных вакцин, позволяет выработать не только антительный, но и Т-клеточный иммунный ответ в дыхательных путях (Travieso et al., 2022). Однако, проблемой векторных вакцин часто является доминирование антигенных детерминант вектора над эпитопами вставки (Schirmbeck et al., 2008; Leon et al., 2013; Schöne et al., 2017). Феномен иммунодоминантности эпитопов, связанный с ограничением формирования иммунного ответа на субдоминантные эпитопы, не может корректироваться добавлением адъювантов в состав вакцинного препарата, поскольку определяется иерархией эпитопов вектора. Таким образом, для создания эффективной векторной вакцины требуются исследования по оптимизации дизайна генетических конструкций самих векторов.

Вакцинные векторы вируса гриппа имеют ряд преимуществ, таких как возможность интраназального введения, отсутствие стадии ДНК в репликативном цикле вируса, существование множества антигенных подтипов вируса гриппа, позволяющее проводить повторные иммунизации и достигать максимального профилактического эффекта, избегая негативного влияния предсуществующего иммунитета. Неструктурный белок NS1 вируса гриппа является перспективной мишенью для конструирования векторных вакцин, поскольку его укорочение ведет к аттенуации вируса и усилению его иммуногенности за счет стимуляции цитокинового ответа (Stasakova et al., 2005; Pica et al., 2012; Vasilyev et al., 2020). В тоже время, цитоплазматическая и особенно внутриядерная локализация белка NS1 и слитого с ним трансгена может ограничивать формирование к нему гуморального и Т-клеточного иммунного ответа. Следовательно, необходимо исследовать возможность оптимизации стратегии конструирования гриппозных векторов с модифицированным белком NS1, повышая эффективность презентации эпитопов трансгена лимфоцитам.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время описаны различные стратегии встраивания представляющих интерес генов в

последовательность гена NS вируса гриппа. Одной из используемых модификаций является слияние антигенов с полноразмерным белком NS1 (Perez et al., 2013). Альтернативным способом конструирования является замена последовательности, кодирующей белок NS1, последовательностью интересующего гена, с сохранением синтеза белка NEP. Подобная конструкция, описанная впервые Wolschek с соавторами (Wolschek et al., 2011), была использована при разработке вакцин против SARS-CoV-2 (Chen et al., 2022; Deng et al., 2023). Одна из них (dNS1-RBD, Pneucolin®) является первой в мире мукозальной вакциной против COVID-19, которая прошла три фазы клинических исследований и была разрешена для экстренного использования в Китае (Xia et al., 2023; Zhang et al., 2023). Еще одной популярной стратегией вставки антигена является его слияние с укороченным до 124-126 N-концевых аминокислотных остатков белком NS1. Такой способ использовали для экспрессии множества представляющих интерес генов или их частей, включая IL-2 (Kittel et al., 2005; Ferko et al., 2006), пептиды *Brucella abortus* (Tabynov et al., 2014; Tabynov et al., 2016), вируса гепатита С (Zhang et al., 2017), вируса иммунодефицита человека (Tan et al., 2016), аденовируса человека (Yang et al., 2015), PCB (Bian et al., 2014; Zhang et al., 2014; Kotomina et al., 2019), коронавируса (Isakova-Sivak et al., 2022) и микобактерии туберкулеза (Sereinig et al., 2006).

Тем не менее, изучение возможности повышения иммуногенности гриппозных векторов с модифицированным белком NS1 является актуальной задачей. Исследуются способы оптимизации химерного гена NS, направленные на увеличение антительной и Т-клеточной иммуногенности вакцинного антигена. Например, в одной из работ была описана возможность формирования стойкого антительного ответа к трансгену за счет добавления трансмембранного и цитоплазматического домена DAF к рецептор-связывающему домену белка Spike коронавируса (RBD), экспрессируемого с открытой рамки считывания белка NS1 (Lublin et al., 1989; Deng et al., 2023). Двукратная иммунизация мышей вектором со вставкой DAF приводила к формированию RBD-специфичных антител класса IgG в более высоком титре, чем при иммунизации животных вектором без DAF (Deng et al., 2023). Вопрос усиления Т-клеточной иммуногенности трансгена, экспрессируемого в составе химерного белка NS1, остается открытым. Существенной проблемой является доминирование эпитопов вектора над эпитопами вставки, которая может быть решена с помощью многократной иммунизации векторами, несущими один и тот же трансген, но отличающихся поверхностными антигенами (Fenko et al., 2004). Однако, для достижения защитного иммунного ответа в результате однократной иммунизации данная стратегия не подходит. В связи с этим, необходимо подобрать оптимальный дизайн конструкций гриппозных векторов с модифицированным белком NS1, влияющий на локализацию трансгена в инфицированных клетках и позволяющий сфокусировать иммунный ответ на Т- и В-клеточных эпитопах вставки. Одним из подходов к достижению этой цели может быть встраивание гидрофобных последовательностей в состав трансгена, например, сигнальных пептидов (Fonseca et al., 2018).

Цель работы. Оценка влияния дизайна гриппозных векторов, экспрессирующих антигены респираторно-синцитиального вируса, ассоциированные с укороченным до 124 аминокислотных остатков белком NS1, на их иммуногенность и защитную эффективность в отношении экспериментальной РСВ инфекции.

Задачи исследования:

1. Получить репортерный гриппозный вектор, экспрессирующий люциферазу NanoLuc с открытой рамки считывания (ОРС) укороченного до 124 аминокислотных остатков белка NS1 (NS1₁₂₄). Оценить эффективность внеклеточного транспорта трансгена NanoLuc при заражении культуры клеток и мышей.
2. Сконструировать набор гриппозных векторов с модифицированным белком NS1, экспрессирующих идентичный трансген участков белка F РСВ, но различающихся присутствием сигнального пептида IgGк и расположением трансгена относительно белка NS1₁₂₄. Оценить влияние использованных модификаций на локализацию трансгена в зараженных клетках.
3. Изучить репродуктивную активность, безопасность и иммуногенность сконструированных векторов при однократном интраназальном введении мышам.
4. Оценить защитную эффективность векторов после однократной интраназальной иммунизации на модели экспериментальной РСВ инфекции у мышей.
5. Охарактеризовать иммунный ответ в ходе РСВ инфекции у иммунизированных животных.

Научная новизна работы

1. Впервые было показано, что трансгены, слитые с укороченным до 124 аминокислотных остатков белком NS1 вируса гриппа А, детектируются во внеклеточном пространстве зараженных клеток.
2. В рамках работы был сконструирован оригинальный трансген, состоящий из кассеты участков белка F РСВ (248–290 и 409–451 ак), который был использован для конструирования рекомбинантных гриппозных векторов.
3. Впервые продемонстрирована возможность реконструкции геномного сегмента NS путем встраивания новой открытой рамки считывания для последовательности антигена РСВ, дополненного сигнальным пептидом IgGк.
4. Впервые показана возможность фокусирования Т-клеточного иммунного ответа на эпитопах вставки с помощью дополнения трансгена последовательностью сигнального пептида IgGк.
5. Продемонстрирована защитная эффективность сконструированных гриппозных векторов с модифицированным белком NS1 в отношении РСВ инфекции уже при однократной интраназальной иммунизации мышей. При этом иммунизация гриппозными векторами, содержащими последовательность сигнального пептида IgGк, приводила к более эффективному подавлению репликативной активности РСВ в легких зараженных животных без развития иммунопатологии.

- Показано, что защитный механизм интраназальной иммунизации мышей вектором NS-2AsF может быть связан с формированием РСВ-специфичных CD8⁺ Т клеток, в частности ко-продукторов IL-10 и IFN- γ , а также привлечением CD4⁺ регуляторных Т клеток в ткани легких.

Теоретическая и практическая значимость работы. Полученные результаты указывают на важность поиска оптимального дизайна конструкции гриппозных векторов с модифицированным геном NS с целью повышения иммуногенности трансгенов. В настоящей работе показано, что введение последовательности сигнального пептида IgGк в состав трансгена позволяет сфокусировать и существенно усилить Т-клеточный иммунный ответ к эпитопам вставки. При этом защита от экспериментальной РСВ инфекции может быть достигнута уже после однократной интраназальной иммунизации животных за счет формирования РСВ-специфического Т-клеточного иммунного ответа в отсутствие нейтрализующих антител. Полученные в рамках проведенного исследования результаты были использованы при создании вакцины RSV/Flu-01E, предназначенной для профилактики респираторно-синцитиальной вирусной инфекции у пожилых людей, находящейся на этапе клинических исследований I и II фазы. Полученные результаты могут быть экстраполированы при конструировании других векторов, кодирующих вставки протективных антигенов разнообразных патогенов, для которых показана важность индукции Т-клеточного иммунного ответа.

Методология и методы исследования. В работе были использованы стандартные молекулярно-биологические, молекулярно-генетические, вирусологические, серологические, иммунологические и статистические методы. Исследования проводили на базе лаборатории векторных вакцин ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Трансген NanoLuc, слитый с укороченным белком NS1₁₂₄ вируса гриппа, детектируется в супернатантах клеток и плазме крови мышей на ранних сроках инфекции. При этом, во внеклеточном пространстве клеточных культур, зараженных репортерным вирусом, обнаруживается в 100-1000 раз меньше трансгена NanoLuc, чем в цитоплазме.
- Сконструированы генетически стабильные гриппозные векторы, экспрессирующие вставку консервативных участков белка F РСВ. Показано, что векторы обладают сходной репродуктивной активностью, но различаются по паттерну накопления антигена РСВ в зараженных клетках, зависящему от встраивания последовательности сигнального пептида IgGк в состав трансгена.
- Сконструированные векторы были в одинаковой степени аттенуированы для мышей при однократном интраназальном введении. Однако, интенсивность индукции CD8⁺ Т-клеточного ответа к эпитопу РСВ усиливалась при дополнении трансгена последовательностью сигнального пептида IgGк. Независимо от

дизайна вектора, иммунизация не приводила к формированию детектируемого антительного ответа к антигену РСВ.

4. Однократная интраназальная иммунизация мышей полученными векторами приводила к подавлению репродукции РСВ в легких независимо от дизайна конструкции. При этом в группах мышей, иммунизированных IgGк-содержащими векторами, были выявлены минимальные иммунопатологические изменения без признаков воспалительного процесса.
5. Профилактическая эффективность вектора NS-2AsF была обусловлена повышенной индукцией популяции РСВ-специфичных CD8⁺ Т клеток, продуцирующих IL-10 и IFN- γ , а также накоплением в легких CD4⁺ регуляторных Т клеток на фоне РСВ инфекции.

Личный вклад автора состоит в самостоятельном проведении обзора литературы, планировании и проведении лабораторных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов. Методическая помощь при выполнении работы была оказана сотрудниками лабораторий векторных вакцин, внутриклеточного сигналинга и транспорта, и лаборатории молекулярной вирусологии ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России.

Степень достоверности и апробация результатов. Материалы диссертационного исследования были представлены: на XX Зимней молодежной школе по биофизике и молекулярной биологии (Гатчина, 2019), на международном форуме «Молодежные дни вирусологии 2020» (Санкт-Петербург, 2020), на I Международная научно-практическая конференция «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий» (Томск, 2020), на IV Всероссийской конференции молодых учёных «Вирусные инфекции – от диагностики к клинике» (Санкт-Петербург, 2023), на международной конференции «Individual and population immunity to respiratory viruses» (г. Гонконг, Китай, 2023).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 печатных работ: 3 научные статьи в журналах, входящих в Перечень рецензируемых изданий, рекомендованных ВАК РФ, и 7 тезисов докладов, 1 патент на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 132 страницах машинописного текста, включая 6 таблиц и 31 рисунок. Работа состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, 6 глав собственных исследований и обсуждения полученных результатов, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 277 источников на русском и английском языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа с нуклеотидными последовательностями. Конструирование плазмид, кодирующих модифицированный ген NS вируса гриппа, и обработку результатов секвенирования проводили в программе Vector NTI (Invitrogen).

Клеточные культуры. В работе использовали культуры клеток MDCK (IRR #FR-58), Vero (ATCC #CCL-81) и Hep-2 (ATCC #CCL-23), перевиваемые в условиях стандартного культивирования.

Лабораторные животные. В работе использовались самки мышей линий Balb/c массой 16-20 грамм, в возрасте 6-8 недель, полученных из питомников лабораторных животных «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России или «Пушино» РАН Филиал института Биоорганической Химии имени М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова с соответствующими ветеринарными свидетельствами. Все исследования были выполнены в соответствии с приказом № 199н «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики» министерства здравоохранения РФ от 01.04.2016 г.

Вирусы гриппа. Использованные в работе гриппозные векторы с модифицированным белком NS1 были получены при помощи электропорации клеток Vero набором из 8 двунаправленных плазмид (Hoffmann и др., 2000). Накопление вирусов проводили в системе 10-дневных развивающихся куриных эмбрионов (РКЭ). Контроль генетической стабильности штаммов проводили с использованием методов ОТ-ПЦР и секвенирования со специально подобранными праймерами. Репродуктивную активность штаммов вируса гриппа оценивали методом предельных разведений в РКЭ или культурах клеток. Реакцию гемагглютинации (РГА) применяли для считывания результатов титрования, расчет 50%-ной эмбриональной и тканевой инфекционной дозы (ЭИД₅₀/ТИД₅₀) проводили методом Reed-Muench (Reed, Muench, 1938). Контрольный вирус A/PR8-NS124 с укороченным до 124 аминокислотных остатков (ак) белком NS1 (NS1₁₂₄), был получен из коллекции НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева.

Люциферазную активность репортерного штамма определяли с помощью набора реагентов Nano-Glo Luciferase Assay System (Promega) и мультифотометра CLARIOstar (BMG LABTECH).

Оценка экспрессии белков в зараженных клетках Vero проводилась методом иммунофлуоресцентного окрашивания мышьиной сывороткой к участкам белка F РСВ, кроличьей сывороткой к белку NS1 вируса гриппа и соответствующими флуоресцентно мечеными конъюгатами Goat Anti-Mouse IgG (Alexa Fluor® 568, Abcam) и Goat Anti-Rabbit IgG H&L (Alexa Fluor® 488, Abcam). Фотографии получали с помощью конфокального микроскопа Leica TCS SP8 (Leica Microsystems).

Респираторно-синцитиальный вирус штамм A2 серотипа А (РСВ A2, IRR, #FR-294) накапливали в клетках Hep-2. Инфекционную активность РСВ определяли методом образования бляшек под полужидким агарозным покрытием. Окрашивание проводили моноклональными мышьиными антителами 4F2, специфичными к РСВ (Krivitskaya et al., 2016), и мечеными пероксидазой хрена конъюгатами.

Для получения инактивированного формалином РСВ (ИФ-РСВ), накопленный вирус инкубировали 72 часов при 37°C в присутствии формалина (1:4000), согласно ранее описанному протоколу (Kim et al., 2015). Для получения прототипа вакцины ИФ-РСВ к очищенному вирусу за 1 час до иммунизации добавляли гидроксид алюминия (Sigma).

Иммунизация и заражение мышей. Интраназальную иммунизацию проводили под легким эфирным наркозом в дозе $6,0 \log_{10}$ ГИД₅₀, вводя по 30 мкл вируса. Группе контроля заражения вводили DPBS в эквивалентном объеме. Животных группы ИФ-РСВ иммунизировали внутримышечно по 100 мкл препарата, содержащего 5 мкг ИФ-РСВ и 20 мкг гидроксида алюминия. Заражение мышей РСВ А2 проводили через 28 дней после иммунизации, вводя интраназально $5,0 \log_{10}$ БОЕ/мышь в объеме 30 мкл.

Выделение и стимуляция лимфоцитов. Легкие животных подвергали ферментативному расщеплению раствором коллагеназы (Sigma) и ДНКазы (Sigma). Лизис эритроцитов проводили реагентами RBC Lysis Buffer (Biolegend). Для стимуляции продукции цитокинов использовали пептид TYMLTNSSELL (5 мкг/мл), соответствующий эпитопу F₂₄₉₋₂₅₈ и гриппозный штамм A/Guangdong-Maonan/SWL1536/2019 (H1N1)pdm09 (5 мкг/мл). Рестимуляцию проводили в присутствии брефельдина А (Biolegend, США). После стимуляции клетки окрашивали флуорохром-конъюгированными антителами CD8-PE/Cy7, CD4-PerCP-Cy5.5, CD44-BV510, CD62L-APC/Cy7, CD103 – BV605, CD69 – BV785, IFN γ -FITC, TNF α -BV421, IL10-PE/Dazzle594 и IL2-PE. Для окраски использовали коммерческий набор реагентов Cytofix/Cytoperm (BD). Для анализа Т-регуляторных лимфоцитов использовали CD45-BV421(Biolegend), CD4- PerCPCy5.5(BD Biosciences), CD8-PECy7 (Biolegend), HeliosPE/Dazzle и FoxP3-Alexa 488 (Biolegend). Окрашивание по FoxP3 проводили с использованием набора реагентов True-Nuclear™ Transcription Factor Buffer Set (Biolegend). Сбор и анализ данных проводили с использованием проточного цитометра CytoFlex и программного обеспечения Kaluza Analysis v2.

Гистологический анализ. Легкие инфицированных мышей фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине и обезжировали в 70% этаноле и помещали в парафиновые блоки. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином.

Статистический анализ данных. Данные обрабатывали с использованием программы Microsoft Office Excel 2016 и RStudio Desktop 1.0.153. Для сравнения показателей использовали дисперсионный анализ ANOVA с последующим сравнением групп при помощи критерия Тьюки.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение и характеристика репортерного вектора

Конструирование репортерного гриппозного вектора. Для оценки эффективности внеклеточного транспорта трансгена, слитого с укороченным белком NS1₁₂₄ вируса гриппа, был получен репортерный вектор A/PR8-NS-Luc, экспрессирующий белок NanoLuc (рис. 1А). Нанолуцифераза NanoLuc обладает устойчивой биолюминесцентной активностью с низким уровнем фона, что делает ее

высококчувствительным репортером (Hall et al., 2012). Нуклеотидная последовательность, кодирующая люциферазу NanoLuc, была оптимизирована по GC-составу для экспрессии в составе гриппозного вектора A/PR/8/1934 (H1N1). Полученный путем трансфекции клеток Vero (Hoffmann et al., 2000) репортерный вектор A/PR8-NS-Luc был генетически стабилен и демонстрировал высокую инфекционную активность в биологических системах: $8,28 \pm 0,29 \log_{10}$ ЭИД₅₀/мл в системе РКЭ, и $7,75 \pm 0,43 \log_{10}$ ТИД₅₀/мл в культуре клеток MDCK. Так как биолуминесцентные методы детекции являются специфичными и высококчувствительными способами обнаружения белка, сконструированный репортерный гриппозный вектор является подходящим инструментом для изучения экспрессии трансгена, сшитого с укороченным белком NS1₁₂₄.

Оценка экспрессии трансгена NanoLuc. Для оценки экспрессии трансгена NanoLuc, вставленного в ОРС белка NS1, культуру клеток Vero заражали штаммом A/PR8-NS-Luc в дозе 0,005 ТИД₅₀/клетку. Люциферазную активность оценивали в супернатанте и лизате клеток в течение 24 часов после заражения (рис. 1Б, 1В).

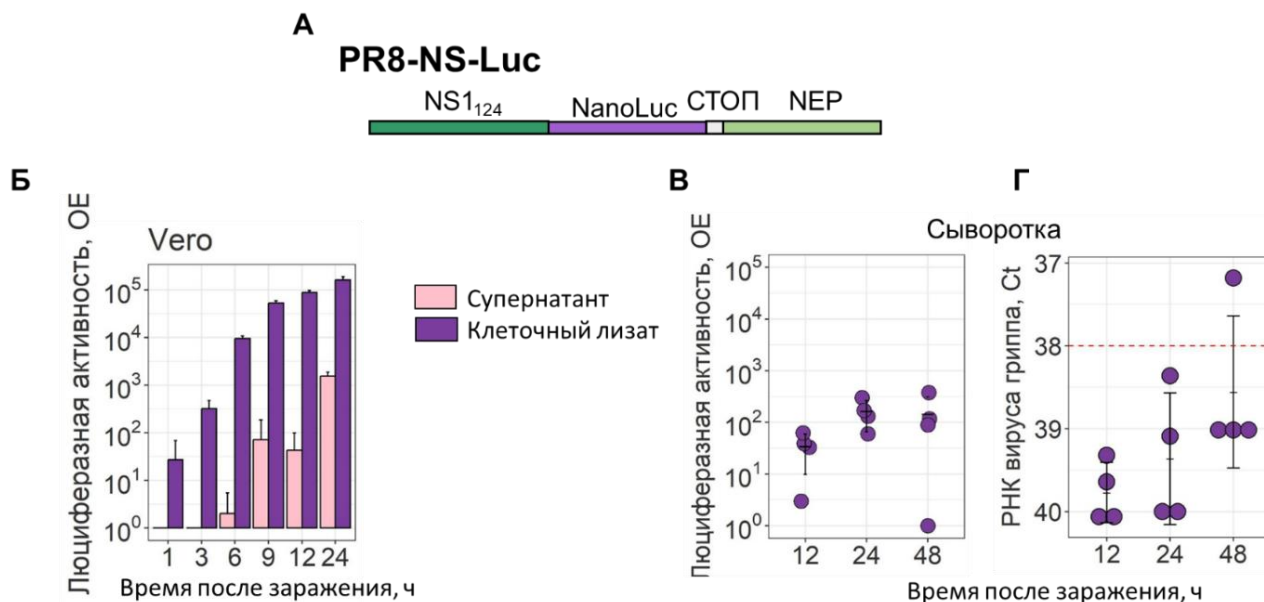


Рисунок 1 – (А) Схематическое изображение модифицированного геномного сегмента NS рекомбинантного вируса гриппа A/PR8-NS-Luc. (Б) Люциферазная активность штамма A/PR8-NS-Luc в зараженной культуре клеток Vero. Люциферазный сигнал измеряли в супернатанте и лизате клеток, инфицированных в дозе 0,005 ТИД₅₀/клетку, в течение 24 часов (среднее значение \pm СО). (В) Люциферазная активность вируса A/PR8-NS-Luc в сыворотке зараженных животных в течение первых 48 часов после инфекции. (Г) Наличие РНК вируса гриппа в сыворотке животных, зараженных репортерным вирусом A/PR8-NS-Luc. Все образцы, значение Ct которых выше красной пунктирной линии (Ct=38), являются положительными на грипп А.

В клеточном лизате экспрессия белка NanoLuc наблюдалась уже через час после заражения культуры клеток Vero. Во внеклеточном пространстве биолуминесцентный сигнал был обнаружен через 6 часов после инфекции и нарастал в течение 24 часов. Было отмечено, что во всех временных точках люциферазный сигнал во

внутриклеточном пространстве был в 100-1000 раз выше, чем во внеклеточном пространстве.

Биолюминесцентную активность штамма также оценивали в сыворотке крови мышей через 12, 24 и 48 часов после инфицирования репортерным штаммом в дозе $6,0 \log_{10}$ ТИД₅₀/мышь (рис. 1В). Дополнительно изучали виремию, исследуя сыворотку на присутствие вирусной РНК с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени (рис. 1Г). Через 12 часов после введения вируса в сыворотке крови животных, зараженных репортерным вектором А/PR8-NS-Luc, был детектирован биолюминесцентный сигнал (до 60 ОЕ), нарастающий к 24 часам (до 300 ОЕ) (рис. 1В). Однако вирусная РНК в сыворотке крови мышей, зараженных репортерным штаммом, была обнаружена лишь у одной мыши через 48 после инфекции (рис. 1Г). Следовательно сигнал, детектируемый в сыворотке крови, обусловлен попаданием люциферазы NanoLuc, слитой с укороченным белком NS1₁₂₄, а не вирусной частицы.

Полученные данные свидетельствуют о том, что люцифераза NanoLuc, экспрессируемая в составе OPC модифицированного белка NS1 вируса гриппа А/PR/8/34, детектируется в питательной среде клеточных культур, однако в количестве в 100-1000 раз меньшем, чем в цитоплазме зараженных клеток. Уровень детектируемого люциферазного сигнала в сыворотке животных, зараженных репортерным вектором, также был невысоким (до 300 ОЕ). Обнаруживаемого количества внеклеточного трансгена может быть недостаточно для индукции антительного ответа к белку NS1 и слитому с ним протективному антигену. Следовательно, для формирования антител, специфичных к трансгену, слитому с химерным белком NS1, необходимо модифицировать стратегию вставки чужеродной последовательности, стимулируя транспорт трансгена во внеклеточное пространство.

Получение и характеристика гриппозных векторов с модифицированным белком NS1, экспрессирующих РСВ антиген

Как известно, транспорт белков в клетке в соответствующую органеллу опосредуют короткие аминокислотные последовательности, называемые сигнальными пептидами (Martoglio et al., 1998). Белки, секретируемые из клетки, на N-конце содержат сигнальную последовательность, нацеленную на эндоплазматический ретикулум. В настоящее время сигнальные пептиды широко используются как при производстве рекомбинантных белков, так и при разработке вакцин (Owji et al., 2018). В опубликованных работах сообщается, что вставка сигнального пептида перед трансгеном индуцирует формирование гуморального и Т-клеточного иммунного ответа на целевой белок у иммунизированных животных (Quinan et al., 2014; Fonseca et al., 2018; Vatakis et al., 2011). В связи с этим при конструировании плазмид, кодирующих ген NS со вставкой антигенов белка F РСВ, в качестве одного из подходов модификации была использована вставка сигнального пептида IgGк перед чужеродной последовательностью.

Конструирование плазмид, кодирующих ген NS со вставкой антигенов белка F РСВ. Для конструирования трансгена РСВ были выбраны участки белка F. Белок F

является одной из основных мишеней вирус-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов (Pemberton et al., 1987) и нейтрализующих антител (Olmsted et al., 1986). Два высоко консервативных участка белка F (248–290 и 409–451 ак), содержащих антигенные сайты II и IV (Ruckwardt et al., 2019), были объединены в кассету трансгена F РСВ (рис. 2). Помимо В-клеточных эпитопов, выбранный фрагмент содержал Т-клеточные эпитопы (рис. 2), в том числе иммунодоминантный эпитоп F₂₄₉₋₂₅₈ (epitope ID 67390), презентруемый на МНС класса I через ТАР-независимые пути (Johnstone et al., 2008). Нуклеотидная последовательность, кодирующая трансген, была оптимизирована по GC-составу для экспрессии в составе вируса гриппа А/PR/8/34. С использованием данного трансгена были сконструированы четыре варианта плазмид, кодирующих химерный ген NS вируса гриппа А/PR/8/34.

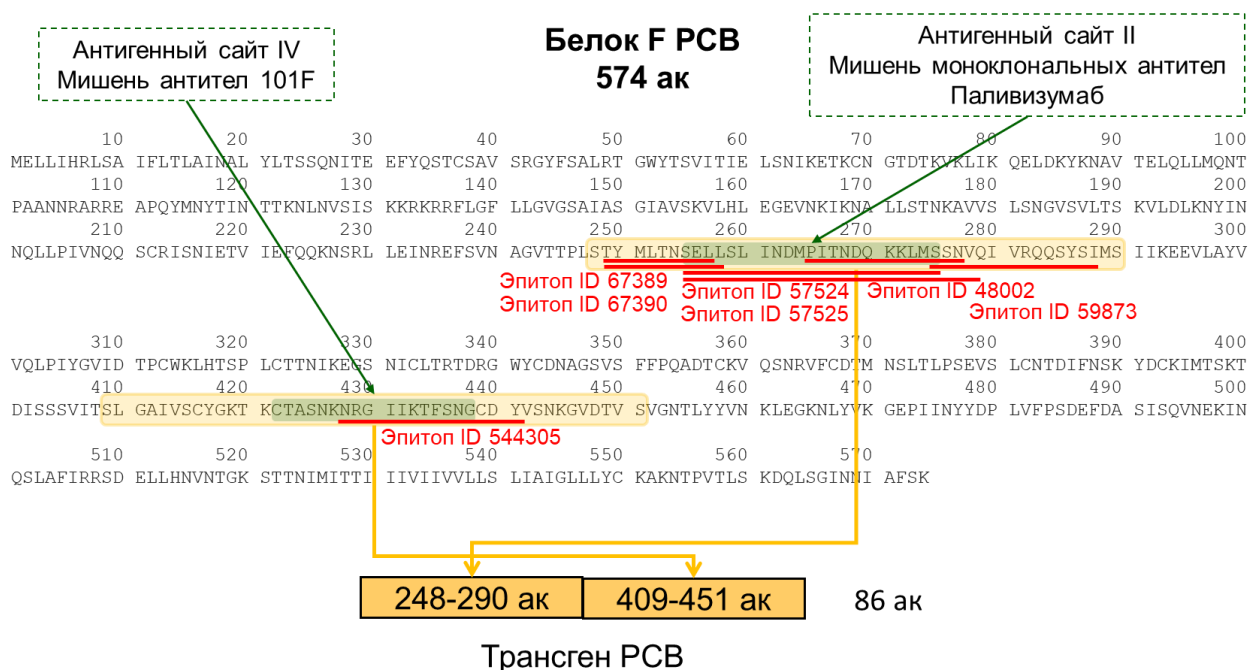


Рисунок 2 – Аминокислотная последовательность белка F РСВ. Оранжевым выделены участки белка, включенные в антигенную кассету – трансген F. Расположение эпитопов отмечено на основании базы данных Immune Epitope Database (IEDB, <https://www.iedb.org/>).

Сконструированные плазмиды можно разделить на две группы. Первая группа генетических конструкций (NS-F и NS-2AF) была смоделирована для сборки вирусов, при заражении клеток которыми происходит внутриклеточное накопление трансгена. В плазмиде, кодирующей химерный ген NS-F, последовательность антигена F была сшита с последовательностью N-концевого фрагмента, укороченного белка NS₁₂₄ (рис. 3). Конструкция NS-2AF отличалась от NS-F присутствием сайта «автопротеолиза» 2A между последовательностями белка NS₁₂₄ и трансгена F (рис. 3).

Вторая группа (NS-2AsF и sF-NS) была разработана для получения вирусов, при заражении клеток которыми трансген секретируется из клетки. Для этого плазмиды NS-2AsF, сконструированная идентично описанному выше, помимо сайта 2A была дополнена последовательностью сигнального пептида легкой цепи мышиноного IgGκ

(рис. 3), вставленной с N конца трансгена F. С целью увеличения эффективности транспорта трансгена из клетки была сконструирована плаزمид, кодирующая генный сегмент sF-NS. В этой конструкции ОРС химерного полипептида начиналась последовательностью сигнального пептида IgGк, за которой следовали последовательности трансгена F, NS1₁₂₄ и NS2/NEP, разделенные сайтами 2A (рис. 3). В конструкции sF-NS последовательность трансгена и белка NS1₁₂₄ располагались в обратном порядке в сравнении с конструкциями NS-F, NS-2AF и NS-2AsF, при этом синтез белка NEP происходил без сплайсинга.

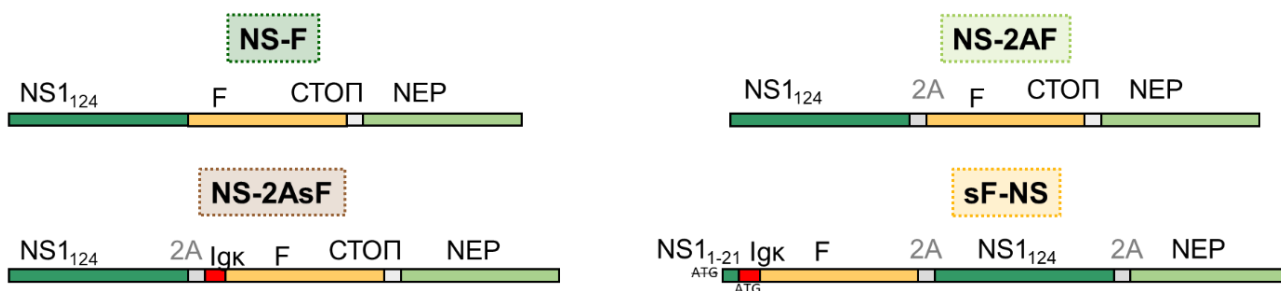


Рисунок 3 – Схематическое изображение химерных генов NS. NS1₁₂₄ – последовательность, кодирующий неструктурный белок вируса гриппа A/PR/8/34, укороченный до 124 аминокислотных остатков; F – кассета из участков F_{248–290} и F_{409–451} белка F РСВ; СТОП – стоп-кодон; NEP – последовательность, кодирующая белок ядерного экспорта вируса гриппа A/PR/8/34; NS1_{1–21} – модифицированная нуклеотидная последовательность белка NS1, кодирующая первые 21 ак без старт-кодонов; Igк – последовательность, кодирующая сигнальный пептид IgGк; 2A – последовательность, кодирующая сайт «автопротеолиза» 2A. Дизайн генных сегментов проводили в программе Vector NTI.

Получено четыре варианта плазмид, кодирующих химерный ген NS со вставкой антигенов белка F РСВ. Нуклеотидные последовательности химерных генных сегментов NS были синтезированы и клонированы в аналог вектора pHW2000 в компании «Евроген» (Россия). Последовательности плазмид были подтверждены секвенированием. Полученные плазмиды были трансформированы в клетки *E.coli* DH5 α , накоплены, очищены с использованием набора реагентов EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen) и использованы для сборки вирусов.

Получение и характеристика векторов вируса гриппа, экспрессирующих трансген F РСВ. Для получения набора гриппозных векторов, экспрессирующих фрагменты белка F РСВ, проводили трансфекцию клеток Vero набором плазмид, кодирующих геномные сегменты PB2, PB1, PA, NP, M, HA и NA лабораторного штамма вируса гриппа A/PR/8/1934 (H1N1) и одну из четырех описанных выше химерных конструкций гена NS.

В результате электропорации клеток были успешно собраны четыре гриппозных вектора, которые были названы в соответствии с плазмидными конструкциями. Полученные гриппозные векторы были генетически стабильны при последовательном клонировании в системе РКЭ в течение семи последовательных пассажей. Контроль

наличия вставки в химерном гене NS осуществлялся методом ОТ-ПЦР и секвенированием по Сенджеру. Химерные гены NS-F, NS-2AF и NS-2AsF были идентичны исходным последовательностям, конструкция sF-NS содержала некодирующие замены.

При оценке репродуктивной активности векторы демонстрировали способность реплицироваться до высоких титров в 10-дневных РКЭ ($8,0 - 9,0 \log_{10}$ ЭИД₅₀/мл) и клеточных линиях Vero и MDCK ($7,5 - 8,0 \log_{10}$ ТИД₅₀/мл).

Для подтверждения экспрессии белка NS1 и трансгена F использовали метод иммунофлуоресцентного окрашивания зараженных клеток Vero (рис. 4). В качестве контроля был использован вирус A/PR8-NS124 (NS124) без вставки трансгена.

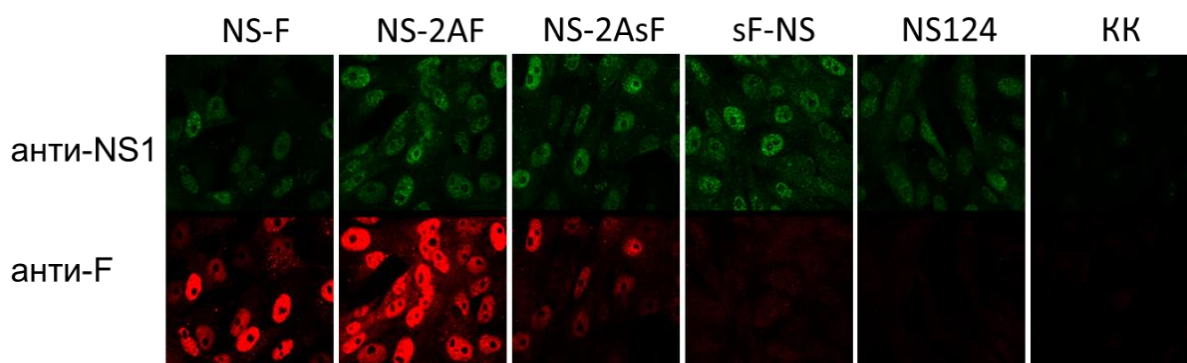


Рисунок 4 – Экспрессия белка NS1 и трансгена F векторами вируса гриппа A *in vitro*. Иммунофлуоресцентное окрашивание проводили через 12 часов после инфицирования клеток Vero рекомбинантными вирусными векторами, контрольным вирусом A/PR8-NS124 (NS124) и в неинфицированных клетках (КК). Для визуализации белка NS1 (зеленая окраска) и трансгена F РСВ (красная окраска) использовали поликлональную кроличью и мышиную сыворотки с последующим нанесением вторичных антител, меченных красителями Alexa Fluor 488 и Alexa Fluor 568 соответственно. Изображение получено на конфокальном микроскопе Leica TCS SP8 с увеличением $\times 60$.

При заражении клеток Vero в дозе 1 ТИД₅₀/клетку полученными штаммами наблюдали цитоплазматическое накопление белка NS1₁₂₄ со схожей интенсивностью окрашивания для всех векторов. При оценке экспрессии трансгена F более высокую интенсивность окрашивания наблюдали в клетках, зараженных векторами NS-F и NS-2AF. Векторы NS-2AsF и sF-NS, содержащие сигнальный пептид IgGк, демонстрировали более слабый РСВ-специфический сигнал. Сниженная интенсивность сигнала могла быть связана с внеклеточной секрецией трансгена или его быстрой деградацией в цитоплазме.

Полученные результаты показывают, что использованные в работе способы конструирования генного сегмента NS не оказывают влияния на эффективность сборки вируса, его генетическую стабильность и репликативную активность *in vitro*. Иммунофлуоресцентный анализ зараженных векторами клеток показал, что векторы, содержащие сигнальный пептид IgGк, демонстрируют более слабый РСВ-

специфический сигнал, тогда как NS1-специфический сигнал не зависит от присутствия IgGк.

Оценка безопасности и иммуногенности сконструированных векторов вируса гриппа на мышях линии Balb/c

Изучение безопасности вирусных векторов. Для оценки безопасности сконструированных векторов вируса гриппа А с модифицированным белком NS1 мышам линии Balb/c интраназально под легким эфирным наркозом вводили по 30 мкл рекомбинантных векторов в дозе $6,0 \log_{10}$ ТИД₅₀/животное. Репликацию вирусов в легких оценивали на 3-й и 5-й день после иммунизации, динамику массы тела отслеживали в течение 14 суток. Иммунизация мышей сконструированными векторами приводила к схожей вирусной нагрузке в легких на 3-й день, достигая $4 - 5 \log_{10}$ ТИД₅₀/мышь. На пятый день был отмечен широкий разброс данных. Статистически значимых различий в вирусовыделении между группами отмечено не было. Динамика массы тела также была схожей для всех экспериментальных групп и снижение не превышало 5% от исходного уровня. Таким образом, полученные гриппозные векторы демонстрировали схожую репликативную активность в легких мышей, необходимую для формирования мукозального иммунного ответа, но не увеличивали патогенность штаммов.

Анализ антительного иммунного ответа после однократной иммунизации векторами. Уровень гуморального иммунного ответа оценивали в сыворотке крови мышей, иммунизированных однократно гриппозными векторами NS-F, NS-2AF, NS-2AsF и sF-NS. Забор сыворотки крови проводили на 21 день после введения векторов. Реакция торможения гемагглютинации показала, что иммунизация сконструированными векторами приводила к формированию схожего уровня антигемагглютинирующих антител к вирусу гриппа A/PR/8/34 (значения среднегеометрического титра было порядка 64–128). Наличие специфических антител против РСВ в сыворотке крови мышей определяли методом иммуноферментного анализа, используя очищенный РСВ или химерный белок F РСВ, состоящий из фрагментов 248-290 ак и 409-451 ак. РСВ-специфичных антител класса IgG в группах мышей, иммунизированных векторами, после однократной интраназальной иммунизации обнаружить не удалось. Таким образом, модификация гриппозного вектора путем вставки сигнального пептида IgGк не позволяла сформировать детектируемый уровень гуморального ответа на антиген РСВ у мышей и не оказывала влияния на уровень сывороточных грипп-специфичных IgG.

Изучение Т-клеточного иммунного ответа после однократной иммунизации векторами. Анализ Т-клеточного иммунного ответа в легких иммунизированных мышей проводили на 9-й и 21-й день после иммунизации. Уровень эффекторных и тканерезидентных CD8⁺ Т клеток оценивали при рестимуляции вирусом гриппа (H1N1)pdm09 (рис. 5А) или пептидом F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ (рис. 5Б, 5В, 6).

На 9-й день после иммунизации в легких животных из группы NS-2AF был выявлен статистически значимо более высокий уровень CD8⁺ эффекторных Т

лимфоцитов, продуцирующих цитокины в ответ на стимуляцию вирусом гриппа, по сравнению с животными из интактной, NS-F, NS-2AsF и sF-NS групп (рис. 5). Интраназальная иммунизация мышей штаммом NS-2AF приводила к статистически значимому увеличению популяций как монофункциональных ($IFN\gamma+IL10-IL2-TNF\alpha-$), так и полифункциональных $CD8+$ Т лимфоцитов ($IFN\gamma+IL10-IL2+TNF\alpha-$, $IFN\gamma+IL10-IL2-TNF\alpha+$, $IFN\gamma+IL10+IL2-TNF\alpha+$). Иммунизация векторами NS-F, NS-2AsF и sF-NS индуцировала накопление сходного уровня грипп-специфичных Т клеток.

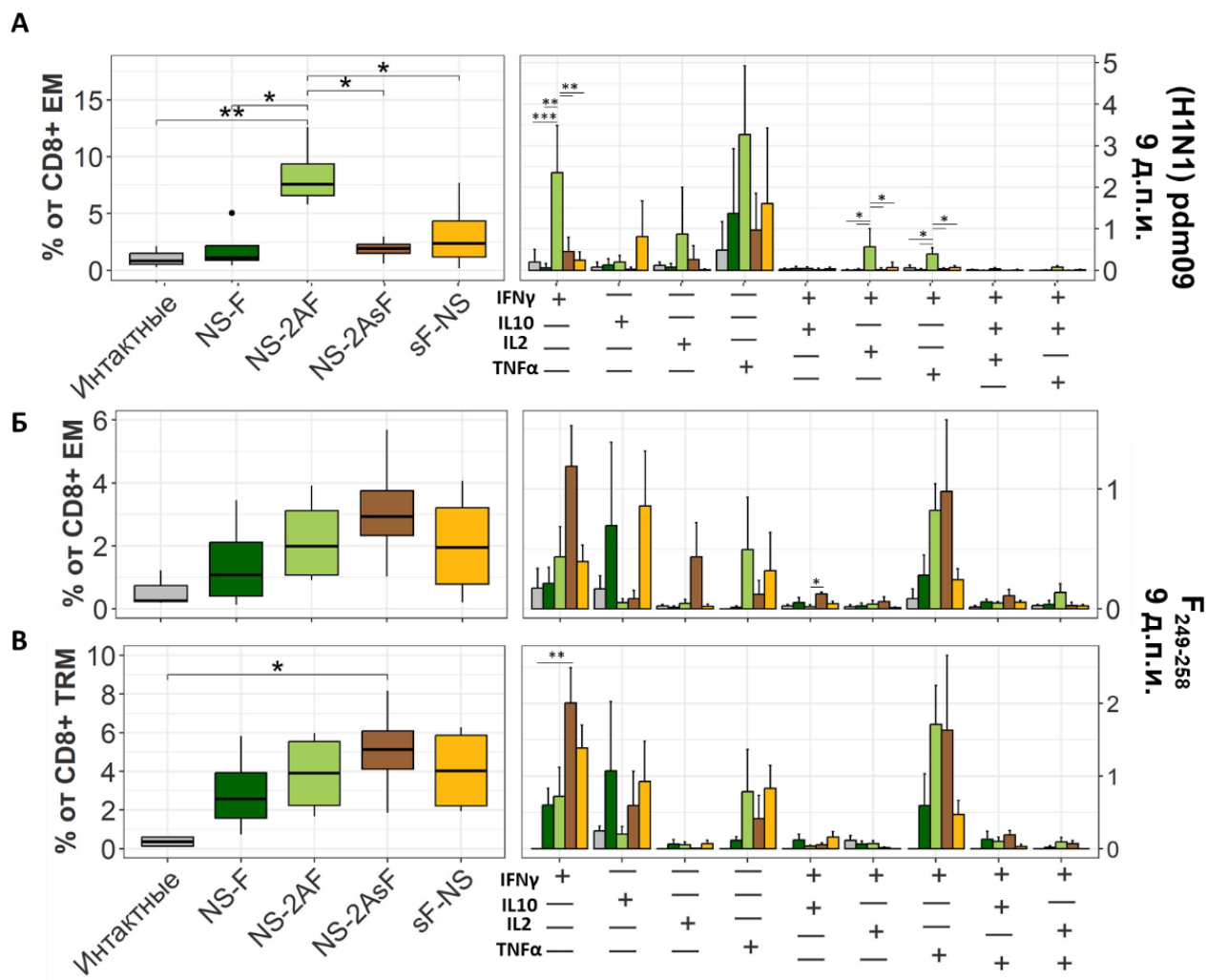


Рисунок 5 –Продукция цитокинов $CD8+$ Т лимфоцитами в легких мышей, иммунизированных векторами, экспрессирующими участки белка F РСВ. Забор легких осуществляли на 9-й день после интраназальной иммунизации (9 д.п.и.). На графике слева представлен процент $IFN\gamma/IL10/IL2/TNF\alpha$ цитокин-продуцирующих $CD8+$ эффекторных (EM) (А, Б) и тканерезидентных (TRM) (В) Т клеток в ответ на *in vitro* стимуляцию штаммом вируса гриппа (H1N1)pdm09 (А) или пептидом F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ (Б, В). Столбчатые диаграммы представляют процент различных субпопуляций Т клеток, продуцирующих цитокины (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки; *: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$; $n = 4$; среднее \pm СО).

Оценку относительного содержания РСВ-специфичных цитокин-продуцирующих Т лимфоцитов проводили на 9-й и 21-й день. Число F-специфичных

эффекторных Т клеток, сформировавшихся к 9-му дню после иммунизации, во всех группах было схожим. Однако наблюдалась тенденция более эффективного формирования РСВ-специфичных эффекторных Т клеток в группе NS-2AsF (рис. 5Б) и статистически значимые различия в уровне F-специфичных цитокин-продуцирующих тканерезидентных Т клеток между группами NS-2AsF и интактных мышей (рис. 5В). Основными участниками цитокинового ответа были субпопуляции монофункциональных ($IFN\gamma+IL10-IL2-TNF\alpha-$, $IFN\gamma-IL10+IL2-TNF\alpha-$) и полифункциональных ($IFN\gamma+IL10-IL2-TNF\alpha+$) Т лимфоцитов.

Различия между группами мышей, иммунизированных векторами со вставкой IgGк или без нее, носили более выраженный характер через 21 день после иммунизации (рис. 6). В серии независимых экспериментов было проведено попарное сравнение групп NS-2AF с NS-2AsF и NS-F с sF-NS. Было обнаружено статистически значимое увеличения монофункциональных ($IFN\gamma+IL2-TNF\alpha-$) и полифункциональных ($IFN\gamma+IL2-TNF\alpha+$ и $IFN\gamma+IL2+TNF\alpha+$) Т клеток в группах NS-2AsF и sF-NS.

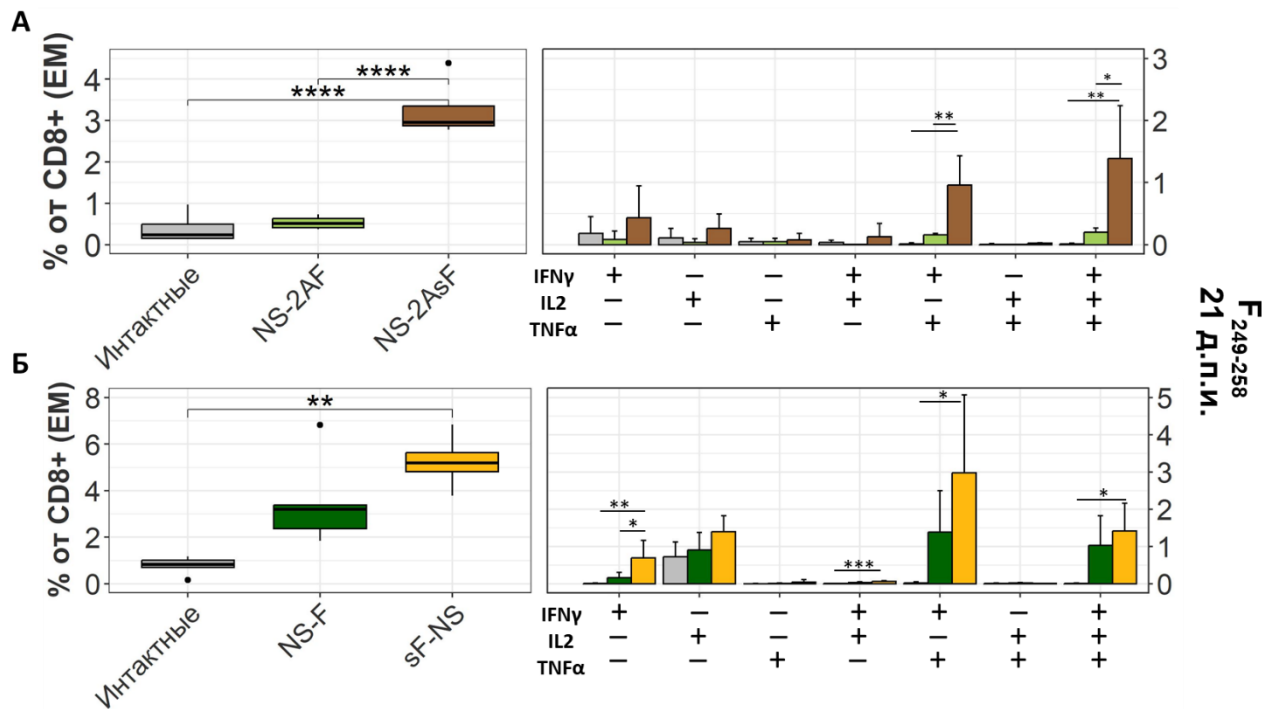


Рисунок 6 – Продукция цитокинов эффекторными CD8⁺ Т лимфоцитами в легких мышей, иммунизированных вирусными векторами NS-F и sF-NS (А); NS-2AF и NS-2AsF (Б). Забор легких осуществляли на 21-й день после интраназальной иммунизации (д.п.и.). На графике слева представлен процент $IFN\gamma/IL2/TNF\alpha$ цитокин-продуцирующих CD8⁺ Т-лимфоцитов в ответ на рестимуляцию пептидом F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ. Столбчатые диаграммы представляют процент различных субпопуляций Т клеток, продуцирующих цитокины (ANOVA с апостериорным критерием Тьюки; *: p<0,05; **: p<0,01; ***: p<0,001; ****: p<0,0001; n = 4; среднее \pm CO).

Полученные результаты показывают, что вставка сигнального пептида IgGк с N-конца трансгена, особенно в группе NS-2AsF, более эффективно стимулирует

формирование Т-клеточного РСВ-специфичного ответа, не увеличивая ответ Т клеток на вирус гриппа.

Оценка защитной эффективности векторов при однократной интраназальной иммунизации на модели РСВ инфекции у мышей

Защитную эффективность однократной иммунизации векторами оценивали на модели РСВ инфекции у мышей линии Balb/c. Иммунизацию мышей проводили интраназально под легким эфирным наркозом в дозе $6,0 \log_{10}$ ТИД₅₀/животное. В качестве контрольного препарата вводили DPBS в объеме 30 мкл/животное (контроль заражения). Для моделирования усиленного респираторного заболевания, обусловленного вакцинацией, был использован прототип инактивированной формалином вакцины против РСВ (ИФ-РСВ) (Kim et al., 1969; Kim et al., 2015). Иммунизацию животных проводили внутримышечно по 100 мкл препарата, содержащего 5 мкг ИФ-РСВ и 20 мкг гидроксида алюминия. Для моделирования РСВИ использовали РСВ штамм А2. Заражение проводили на 28-й день после иммунизации в дозе $5,0 \log_{10}$ БОЕ/мышь. Протективную эффективность сконструированных векторов оценивали по их способности снижать вирусную нагрузку в легких на 5-й день после заражения и защите от гистопатологических изменений в легких, связанных с вакцинацией и последующей РСВИ.

Иммунизация животных как сконструированными векторами, так и ИФ-РСВ, приводила к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в легких инфицированных мышей в сравнении с контрольной группой заражения. Иммунизация мышей векторами со вставкой сигнального пептида более эффективно подавляла вирусную репликацию, чем иммунизация векторами NS-F и NS-2AF (рис. 7А).

При оценке гистологических изменений в группе непривитых животных (контроль заражения) были отмечены поражения, типичные для модели РСВИ у мышей (Taylor et al., 1984), представленные преимущественно выраженной воспалительной инфильтрацией альвеолярной ткани, с вовлечением в воспалительный процесс гранулярных лейкоцитов и накоплением в просвете альвеол альвеолярных макрофагов и лимфоцитов. Отмечалась умеренная мононуклеарная инфильтрация интерстициальной ткани, выявлялись периваскулярные инфильтраты. В воздухоносном отделе легких наблюдалась незначительная гипертрофия и гиперплазия эпителия бронхов и бронхиол. Как и ожидалось, иммунизация прототипом ИФ-РСВ провоцировала наиболее тяжелые поражения и была сходна с описанной ранее патологией (Kim et al., 2015). Основным отличием от контрольной группы непривитых зараженных мышей было вовлечение в воспалительный процесс эозинофилов. Отмечалась выраженная смешанноклеточная воспалительная инфильтрация, представленная как мононуклеарными клетками, так и гранулярными лейкоцитами. В бронхах и бронхиолах наблюдалась выраженная гипертрофия и гиперплазия эпителия. Отмечались очаговые воспалительные повреждения стенок кровеносных сосудов.

Степень защиты легких от формирования патологических изменений в группах мышей, иммунизированных сконструированными векторами, различалась. Иммунизация вектором NS-F приводила к уменьшению количества гранулярных лейкоцитов, вовлеченных в воспалительный процесс, но в целом не предотвращала формирования патологических изменений. Поражение легких в группе NS-2AF характеризовалось повреждением эпителия с накоплением клеточного дебриса в просвете бронхиол, скоплением альвеолярных макрофагов в альвеолах. Наиболее эффективной, с точки зрения предотвращения иммунопатологических изменений, оказалась иммунизация мышей IgGк-содержащими векторами. У мышей из этих групп NS-2AsF и sF-NS наблюдались минимальные гистологические изменения без признаков воспалительного поражения (рис. 7Б, 7В).

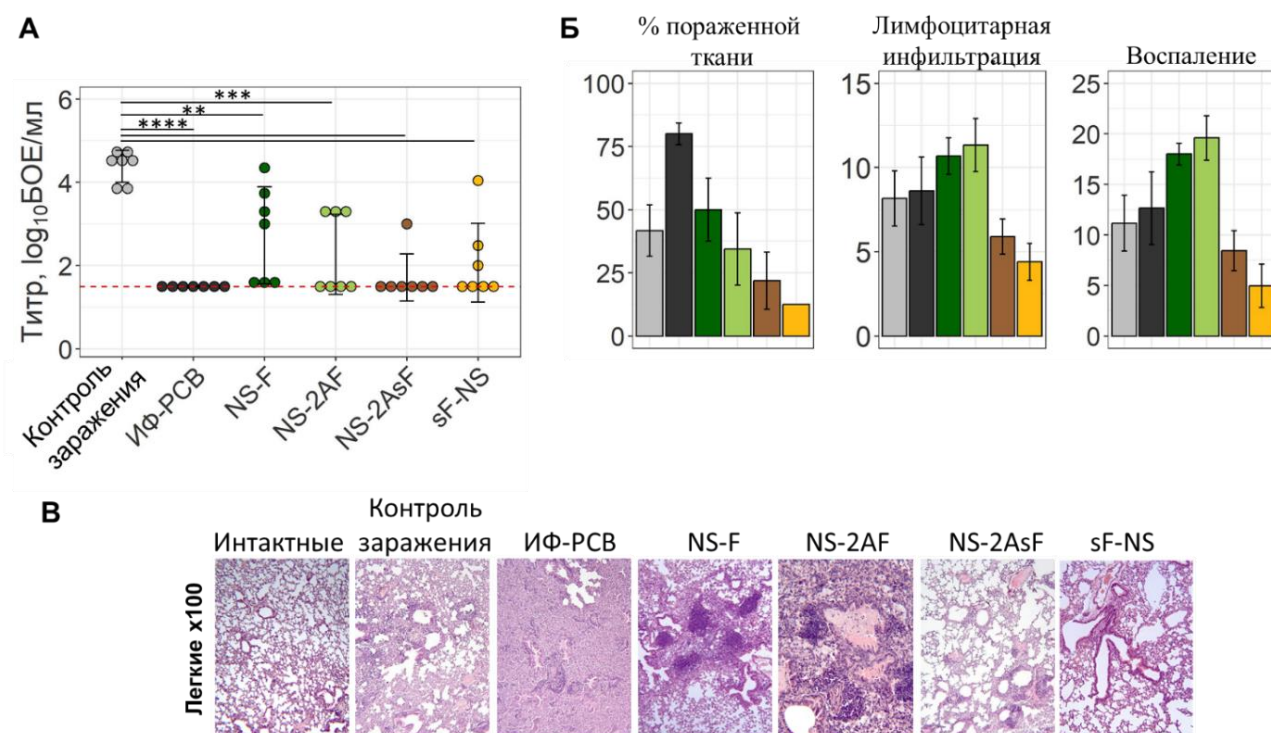


Рисунок 7 – Оценка протективной эффективности векторов вируса гриппа А с модифицированным белком NS1. **(А)** Вирусная нагрузка в легких иммунизированных и контрольных мышей через 5 суток после заражения PCB штаммом А2. Результаты представлены в виде индивидуальных значений для каждого животного (ANOVA, апостериорный тест Тьюки; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$; $n = 7$). Красной пунктирной линией отмечена граница чувствительности метода. **(Б)** Процент пораженной ткани, оценка лимфоцитарной инфильтрации и воспаления через 6 дней после заражения. Показатели патологии и процентное содержание пораженной ткани нормализовали по отношению к контрольной группе заражения. Результаты представлены в виде гистограмм ($n = 4$; среднее значение \pm СО). **(В)** Микрофотографии гистологических срезов легких (100х увеличение), окрашенных гематоксилином и эозином, отражают патологические изменения у вакцинированных и контрольных мышей.

На основании полученных данных можно заключить, что иммунизация всеми четырьмя сконструированными векторами приводила к статистически значимому снижению вирусной нагрузки в легких. При этом векторы, содержащие последовательность сигнального пептида IgGк, демонстрировали более выраженное подавление репродукции РСВ в легких, сопровождавшееся защитой от развития гистологических изменений ткани легкого.

Изучение параметров иммунного ответа в ходе РСВ инфекции у иммунизированных животных

Для оценки влияния дизайна вектора на уровень эффекторных Т клеток памяти после заражения РСВ, были измерены различные популяции Т клеток в легких на 6-й день после заражения. Иммунизацию и контрольное заражение животных проводили по схеме, описанной выше. Рисунок 8А иллюстрирует процент Т клеток, продуцирующих цитокины в ответ на рестимуляцию *in vitro* эпитопом РСВ F₂₄₉₋₂₅₈. Все группы мышей, иммунизированных сконструированными векторами вируса гриппа, продемонстрировали высокий уровень CD8⁺ Т клеток, специфичных к РСВ. В группе NS-2AsF было выявлено достоверное увеличение относительного содержания цитокин-продуцирующих CD8⁺ эффекторных и тканерезидентных Т лимфоцитов в легких после заражения (рис. 10А, 10Б), что совпало с тенденцией, наблюдаемой на 9-й и 21-й дни после иммунизации. Цитокин-продуцирующие популяции Т лимфоцитов были представлены полифункциональными IFN γ +IL2–IL10⁺ и монофункциональными IFN γ +IL2–IL10–CD8⁺ EM и TRM Т клетками. Статистически значимое повышение уровня РСВ-специфичных CD8⁺ эффекторных Т лимфоцитов, продуцирующих одновременно IFN- γ и IL-10 было также выявлено в группе NS-2AsF (рис. 8В). Эта субпопуляция играет важную роль в предотвращении иммунопатологических изменений легких, вызванных чрезмерной пролиферацией CD8⁺ Т клеток (Schmidt et al., 2008; Sun et al., 2011; Loebbermann et al 2012).

Поскольку в контроле развития РСВ-патологии важную роль также играют регуляторные Т клетки (Treg), было проанализировано относительное содержание Treg клеток в легких мышей. Было показано существенное увеличение доли FOXP3⁺Helios⁺Т-регуляторных клеток у животных из группы NS-2AsF по сравнению с группой контроля заражения (рис. 8Г). Группа sF-NS также продемонстрировала тенденцию к увеличению относительного количества Treg клеток.

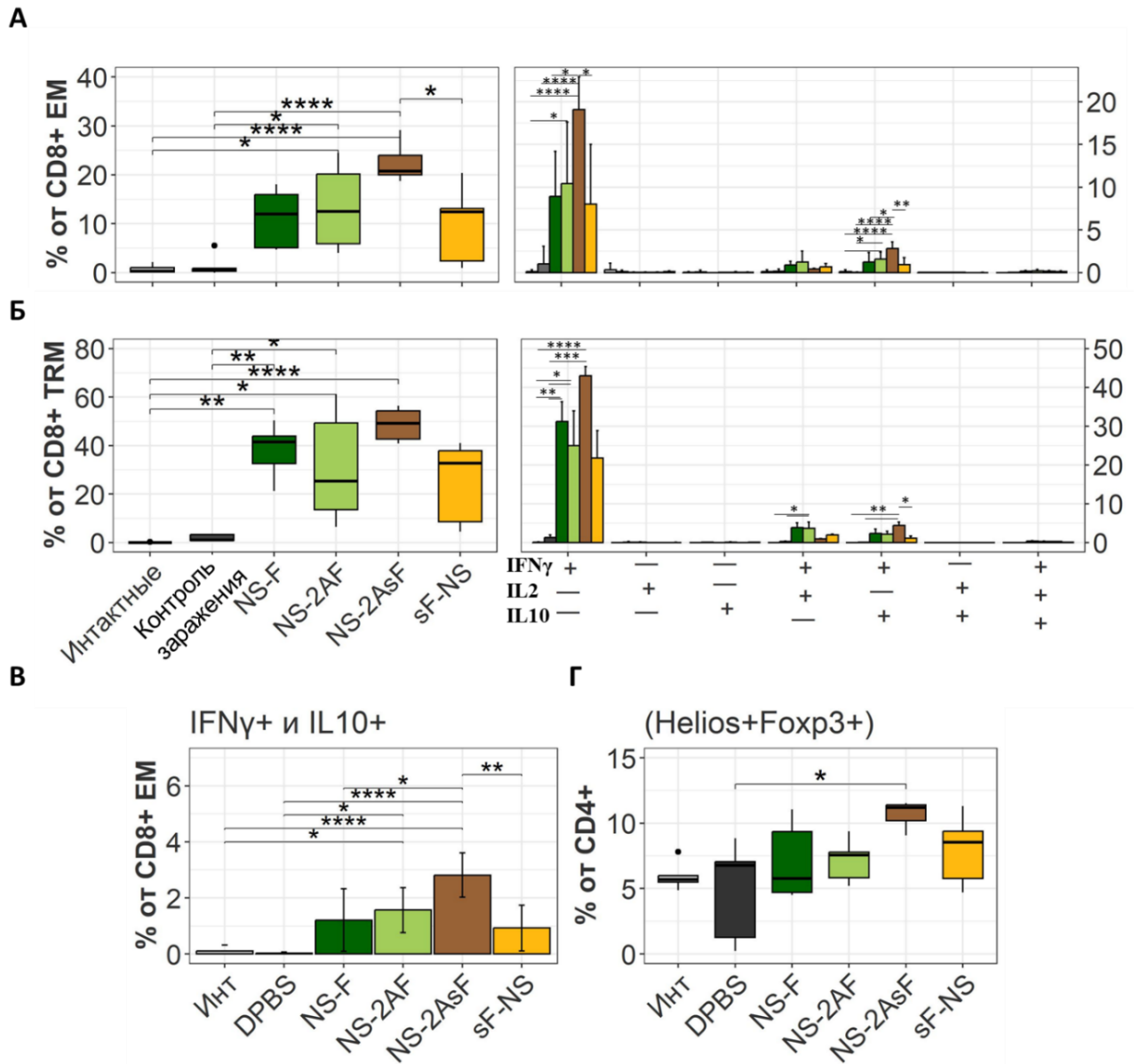


Рисунок 8 – Адаптивный Т-клеточный иммунный ответ в легких мышей через 6 дней после РСВИ. Продукция цитокинов CD8⁺ эффекторными (EM) (А) и тканерезидентными (TRM) (Б) Т лимфоцитами в легких мышей. На графике слева представлен процент IFN γ /IL2/IL10 цитокин-продуцирующих CD8⁺ Т лимфоцитов в ответ на *in vitro* стимуляцию эпитопом РСВ F₂₄₉₋₂₅₈. Столбчатые диаграммы представляют процент различных субпопуляций Т клеток, продуцирующих цитокины. (В) Столбчатая диаграмма представляет собой процент субпопуляций IFN γ /IL2-/IL10+ цитокин-продуцирующих CD8⁺ Т клеток. (Г) Уровень регуляторных Т клеток в легких мышей, иммунизированных векторами вируса гриппа, после заражения РСВ штаммом А2. (ANOVA с последующим апостериорным тестом Тьюки; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$; $n = 5$; среднее значение \pm СО).

Наиболее эффективную защиту от РСВИ обеспечивала иммунизация мышей вектором NS-2AsF, которая достигалась за счет эффекторных и регуляторных компонентов иммунной системы. Инфекция РСВ в группе мышей, иммунизированных

NS-2AsF, вызывала увеличение относительного содержания цитокин-продуцирующих CD8⁺ Т лимфоцитов, специфичных к пептиду F₂₄₉₋₂₅₈ РСВ, в том числе ко-продуцентов IFN- γ и IL-10, и сопровождалась накоплением регуляторных Т клеток. Данные, полученные в иммунологических исследованиях, полностью соотносятся с результатами выделения РСВ и гистологического анализа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование вируса гриппа с модифицированным белком NS1 в качестве вектора является многообещающим подходом к разработке вакцин против респираторных инфекций. Однако внутриклеточная локализация трансгена, связанного с белком NS1, обуславливает ограниченную В-клеточную иммуногенность. Настоящая работа посвящена оптимизации встраивания антигенов РСВ в ген NS вируса гриппа с целью усиления иммуногенности вставки.

В рамках работы было получено четыре варианта гриппозных векторов, экспрессирующих один и тот же оригинальный трансген, состоящий из консервативных участков белка F РСВ. При конструировании векторов были использованы модификации, направленные на секрецию трансгена из клетки. Сконструированные векторы демонстрировали способностью к активной репликации в РКЭ и культурах клеток Vero и MDCK. Оценка экспрессии трансгена в зараженной культуре клеток показала, что включение последовательности IgGк в состав трансгена снижало эффективность его детекции во внутриклеточном пространстве. Обнаружить трансген F во внеклеточном пространстве также не удалось.

Сконструированные штаммы имели аттенуированный фенотип при однократном интраназальном введении мышам, демонстрируя сходный уровень репродукции в легких на 3 и 5 сутки после иммунизации, и не вызывая снижения массы тела в течение 14 дней более чем на 5%.

Однократная интраназальная иммунизация мышей приводила к формированию высокого уровня антительного ответа к вирусу гриппа у всех гриппозных векторов. Тем не менее, детектируемого гуморального ответа на антиген РСВ после однократного интраназального введения обнаружить не удалось ни в одной из групп. Отсутствие РСВ-специфичных антител может свидетельствовать о том, что трансген либо не транспортируется во внеклеточное пространство, либо подвергается быстрой протеасомной деградации внутри клеток, либо В-клеточные эпитопы недостаточно иммуногенны, чтобы сформировать антительный ответ в отсутствии адъювантов. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

Сопоставимый уровень РСВ-специфичного Т-клеточного иммунного ответа с тенденцией к увеличению в группе NS-2AsF был обнаружен на 9-й день после введения векторов. В то же время, CD8⁺ Т-клеточный ответ на антигены вируса гриппа у мышей, иммунизированных вектором NS-2AsF с сигнальным пептидом, был слабее, чем в группе мышей, иммунизированных вектором NS-2AF без последовательности IgGк. На 21-й день после иммунизации векторы дифференцировались по уровню РСВ-специфичного ответа CD8⁺ Т клеток. Наибольший процент РСВ-специфичных

цитокин-продуцирующих CD8⁺ Т лимфоцитов был отмечен у мышей, иммунизированных IgGк-содержащими векторами. Таким образом, присоединение сигнального пептида к трансгену позволило сфокусировать ответ CD8⁺ Т клеток на РСВ, не усиливая ответ на вирус гриппа.

Для изучения профилактической эффективности векторов была использована модель РСВ инфекции у мышей линии Balb/c. Однократная интраназальная иммунизация векторами снижала вирусную нагрузку в легких. Однако, защита от гистопатологических изменений была обнаружена только в группах мышей, иммунизированных векторами со вставкой сигнального пептида IgGк. В группах мышей, иммунизированных векторами без сигнальной последовательности, наблюдались характерные для модели РСВИ гистопатологические изменения.

Для изучения иммунологических параметров, коррелирующих с различной степенью защиты от РСВИ, на 6-й день после контрольного заражения сравнивали уровень вторичного Т-клеточного иммунного ответа у иммунизированных животных. На фоне РСВИ наиболее выраженный трансген-специфический ответ CD8⁺ Т клеток был обнаружен у мышей, иммунизированных вектором NS-2AsF. При этом в этой группе наблюдалось увеличенное образование субпопуляции CD8⁺ эффекторных Т клеток, одновременно продуцирующих IFN- γ и IL-10. Ранее было показано, что именно эта субпопуляция лимфоцитов играет ведущую роль в контроле легочной патологии при РСВИ и гриппе. Также защиту от чрезмерной цитотоксичности CD8⁺ Т клеток могли обеспечивать Treg клетки, накапливающиеся в повышенном количестве в легких мышей, иммунизированных вектором NS-2AsF.

Таким образом, в рамках проведенного исследования вместо предполагаемого усиления антительного ответа за счет вставки сигнального пептида IgGк, было обнаружено усиление РСВ-специфичного CD8⁺ Т-клеточного ответа к трансгену. Наиболее эффективную защиту от репродукции РСВ и формирования гистопатологии обеспечивала иммунизация животных вектором NS-2AsF со вставкой сигнального пептида между последовательностью укороченного белка NS1₁₂₄ и трансгеном. Структура вектора NS-2AsF оказалась наиболее оптимальной и может быть использована для конструирования векторных вакцинных штаммов, направленных на стимуляцию выраженного Т-клеточного ответа на чужеродную последовательность в гене NS1 вируса гриппа.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы исследования. Полученные в рамках исследования результаты предлагают способ оптимизации структуры гриппозного вектора с модифицированным белком NS1 для увеличения иммуногенности используемого трансгена. Результаты диссертационного исследования подчеркивают важность изучения влияния дизайна конструкции гриппозных векторов на стимулируемый иммунный ответ, и демонстрируют возможность тонкой настройки формируемого в результате вакцинации иммунитета. В свете полученных данных представляется необходимым дальнейшее изучение

способов оптимизации дизайна гриппозного вектора, направленных на формирование антительного ответа уже после однократного интраназального введения.

ВЫВОДЫ

1. На примере репортерного вектора NanoLuc показано, что трансген, слитый с укороченным белком NS1₁₂₄, может транспортироваться во внеклеточное пространство зараженных клеток *in vitro* и *in vivo*.
2. Сконструированные векторы вируса гриппа А, экспрессирующие участки белка F РСВ в составе геномного фрагмента NS, различались по интенсивности накопления трансгена в цитоплазме зараженных клеток в зависимости от наличия и расположения последовательности сигнального пептида IgGк.
3. Все полученные вирусы имели сходный уровень аттенуации для мышей, но отличались по параметрам иммуногенности. В частности, вектор NS-2AsF, содержащий последовательность сигнального пептида IgGк после последовательности NS1, обладал повышенной способностью формирования CD8⁺ Т-клеточного ответа на эпитоп трансгена при однократной интраназальной иммунизации мышей.
4. Независимо от дизайна векторной конструкции, однократная интраназальная иммунизация мышей подавляла репродукцию РСВ в легких зараженных мышей, но только векторы с сигнальным пептидом IgGк значительно снижали выраженность патологических изменений в легких.
5. Вектор NS-2AsF демонстрировал наиболее выраженную способность формирования ответа антиген-специфических CD8⁺ Т клеток, в том числе субпопуляции CD8⁺ Т клеток, продуцирующих IL-10 и IFN- γ , и накопления CD4⁺ регуляторных Т клеток в легких мышей, инфицированных РСВ.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

(жирным шрифтом отмечены публикации в рецензируемых изданиях: рекомендованных ВАК РФ и входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования)

1. Патент RU 2 759 054 C2 на изобретение «Рекомбинантный штамм вируса гриппа А/PR8-NS124-Luc и способ оценки поствакцинальных нейтрализующих антител с использованием биолюминесцентной детекции» Стукова М.А., Сергеева М.В., Романовская-Романько Е.А., Пулькина А.А., Егоров А.Ю.
2. **Pulkina A.** Evidence for the extracellular delivery of influenza NS1 protein / **Pulkina A.**, **Sergeeva M.**, **Krokhin A.**, **Stukova M.**, **Egorov A.** // **MIR J.**- 2021.- Vol. 8.- № 1. P. 27–37.
3. Сергеева М.В. Быстрое выявление нейтрализующих антител с применением вирусов гриппа с люциферазным репортером / Сергеева М.В., Пулькина А.А., Романовская-Романько Е.А., Мустафаева А.С., Егоров А.Ю., Стукова М.А.// **Биотехнология** – 2021.- Т. 37.- № 2.- С. 81–91.
4. **Pulkina, A.** IgGк Signal Peptide Enhances the Efficacy of an Influenza Vector Vaccine against Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice / **Pulkina, A.**; **Vasilyev, K.**;

Muzhikyan, A.; Sergeeva, M.; Romanovskaya-Romanko, E.; Shurygina, A.-P.; Shuklina, M.; Vasin, A.; Stukova, M.; Egorov, A. // *Int. J. Mol. Sci.*- 2023. – Vol. 24.- 11445.

5. Сергеева М.В. Опыт применения хлопковых крыс для моделирования респираторно-синцитиальной вирусной инфекции и иммунопатологии / Сергеева М.В., Пулькина А.А., Штро А.А., Васильев К.А., Романовская-Романько Е.А., Гаршинина А.В., Галочкина А.В., Мужикян А.А., Бузицкая Ж.В., Стукова М.А. // *Лабораторные животные для научных исследований.*- 2022.- №4.

Тезисы:

1. Пулькина А. А. Конструирование и свойства гриппозного вектора, экспрессирующего химерный белок NS1 с люциферазной активностью / Пулькина А. А., Сергеева М. В., Романовская-Романько Е.А., Стукова М.А., Егоров А.Ю. // *Материалы XX Зимней молодежной школы ПИЯФ по биофизике и молекулярной биологии.* Гатчина, 2019 г.
2. Pulkina A. «Detection of hidden A/PR/8/34 specific antibodies in ferret sera by the luciferase neutralization assay» / Pulkina A., Romanovskaja-Romanko E., Vasilyev K., Stukova M., Egorov A. // *The 1st ISIRV International Influenza Vaccine Meeting - Immunological Assays and Correlates of Protection for Next Generation Influenza Vaccines.* Siena, Italy, 2019.
3. Устный доклад на тему «Применение гриппозных векторов, обладающих биолюминесцентной активностью» в рамках Международного форума «Молодежные дни вирусологии 2020», Санкт-Петербург, 2020.
4. Sergeeva M.V. Influenza viruses with luciferase reporter designed for vaccine-induced neutralization antibody assessment / Sergeeva M.V., Pulkina A.A., Romanovskaya-Romanko E.A., Mustafaeva A.S., Stukova M.A. // *Научная конференция OPENBIO в рамках площадки открытых коммуникаций OpenBio-2020.*
5. Мустафаева А.С. Конструирование вирусов гриппа со вставкой гена люциферазы и их применение для анализа нейтрализующих антител / Мустафаева А.С., Пулькина А.А., Сергеева М.В. // *I Международная научно-практическая конференция «Медико-биологические и нутрициологические аспекты здоровьесберегающих технологий». Секция 1. Медицинская биотехнология и биофармацевтика.* Кемерово, 2020.
6. Сергеева М.В. Быстрый тест люциферазной нейтрализации для оценки титра антител к вирусам гриппа / Сергеева М.В., Пулькина А.А., Романовская-Романько Е.А., Стукова М.А. // *Сборник Трудов X Юбилейной международной научно-практической конференции «Молекулярная диагностика 2020».* Москва, 2020.
7. Pulkina A.A. Modulation of the T-cell epitope hierarchy in influenza vectors expressing RSV antigens / Pulkina A.A., Sergeeva M.V., Romanovskaya-Romanko E.A., Shurygina A.-P.S., Shuklina M.A., Stukova M.A., Lioznov D.A., Egorov A.A. // *Individual and population immunity to respiratory viruses».* Китай, г. Гонконг, 2023.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает глубокую благодарность своему научному руководителю д.б.н. Егорову Андрею Юрьевичу за активное участие, консультирование при планировании и проведении экспериментов, доброжелательное и внимательное отношение на всех этапах работы. Также автор благодарит заведующую лабораторией векторных вакцин ФГБУ «НИИ Гриппа им. А.А. Смородинцева» к.м.н. Стукову Марину Анатольевну за предложенную интересную тему диссертационного исследования. Автор выражает признательность коллегам: к.б.н. Романовской-Романько Екатерине Андреевне, к.м.н. Шурыгиной Анне-Полине Сергеевне, к.б.н. Васильеву Кириллу Александровичу, к.б.н. Мужикяну Арману Артушовичу, к.б.н. Бузицкой Жанне Валерьевне, Шуклиной Марине Александровне, Высочинской Вере Валерьевне. Автор искренне благодарит к.б.н. Сергееву Марию Валерьевну за переданный бесценный опыт в проведении и планировании вирусологических экспериментов.

Автор благодарит рецензентов д.б.н. Цыбалову Людмилу Марковну, д.б.н. Кривицкую Веру Зорьевну и д.б.н. Варюшину Елену Анатольевну за внимательное прочтение работы и ценные комментарии.