

Иммуногенность экспериментальных ДНК-вакцин, кодирующих гемагглютинин и стебель гемагглютинина вируса гриппа А (H5N8)

В.Р. Литвинова, Н.Б. Рудомётова, Л.А. Кисакова, Д.Н. Кисаков, В.А. Яковлев, Е.В. Тигеева, М.Б. Боргоякова, К.И. Иванова, В.Ю. Марченко, Т.Н. Ильичева, Л.И. Карпенко, А.П. Рудомётов, А.А. Ильичёв

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Новосибирская обл., р.п. Кольцово

Резюме

Вирус гриппа птиц А субтипа Н5 широко распространен в популяции птиц, и существует риск его передачи человеку, поэтому для предотвращения распространения вируса необходимо создание эффективной вакцины. Целью данного исследования являлась разработка прототипов ДНК-вакцин, кодирующих модифицированные варианты тримера гемагглютинина и стебля гемагглютинина высокопатогенного вируса гриппа птиц А (H5N8), и изучение их иммуногенных свойств. **Материал и методы.** Спроектированы, наработаны и очищены ДНК-конструкции, проведен анализ их экспрессии в эукариотических клетках с помощью ПЦР с обратной транскрипцией и вестерн-блот-анализа. Выполнена иммунизация лабораторных животных (сирийских хомяков) экспериментальными ДНК-вакцинами методом струйной инъекции, в сыворотке их крови с помощью ИФА определен титр антител. Сыворотки также исследованы в реакции вируснейтрализации в культуре клеток MDCK. **Результаты и их обсуждение.** Подтверждена экспрессия целевых генов в составе экспериментальных ДНК-вакцин на уровне транскрипции и трансляции. Анализ иммуногенности показал, что иммунизация сирийских хомяков конструкциями рVAX-H5 и рVAX-H5 delT4, кодирующими варианты эктодомена гемагглютинина с тримеризующим доменом фибритина бактериофага Т4 и без него, с помощью струйной инъекции приводит к формированию специфических антител (средние титры $1:3 \times 10^4$ и $1:5 \times 10^3$ соответственно), обладающих вируснейтрализующей активностью (средний 50%-й нейтрализующий титр 1:40). При этом в группе животных, иммунизированных ДНК-вакциной, кодирующей стебель гемагглютинина, специфические антитела не выявлены. **Заключение.** В ходе работы спроектированы и получены ДНК-вакцины, кодирующие варианты тримера гемагглютинина вируса гриппа подтипа А (H5N8) и его фрагмент (стебель). Проведено сравнение иммуногенности экспериментальных ДНК-вакцин и установлен наиболее перспективный вариант конструкции – рVAX-H5, кодирующий модифицированный тример гемагглютинина вируса гриппа с тримеризующим доменом фибритина бактериофага Т4.

Ключевые слова: ДНК-вакцины, вирус гриппа А (H5N8), струйная инъекция, иммуногенность, ИФА, вируснейтрализация.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания ФБУН Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Автор для переписки. Литвинова В.Р., e-mail: viktoriya_litvinova_1999@mail.ru

Для цитирования. Литвинова В.Р., Рудомётова Н.Б., Кисакова Л.А., Кисаков Д.Н., Яковлев В.А., Тигеева Е.В., Боргоякова М.Б., Иванова К.И., Марченко В.Ю., Ильичева Т.Н., Карпенко Л.И., Рудомётов А.П., Ильичёв А.А. Иммуногенность экспериментальных ДНК-вакцин, кодирующих гемагглютинин и стебель гемагглютинина вируса гриппа А (H5N8). *Сиб. науч. мед. ж.* 2025;45(1):100–108. doi: 10.18699/SSMJ20250111

Immunogenicity of experimental DNA vaccines encoding hemagglutinin and hemagglutinin stalk of influenza A (H5N8) virus

V.R. Litvinova, N.B. Rudometova, L.A. Kisakova, D.N. Kisakov, V.A. Yakovlev, E.V. Tigeeva, M.B. Borgoyakova, K.I. Ivanova, V.Yu. Marchenko, T.N. Ilyicheva, L.I. Karpenko, A.P. Rudometov, A.A. Ilyichev

Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology "Vector" of Rospotrebnadzor
630559, Novosibirsk Region, Koltsovo

Abstract

Avian influenza A virus subtype H5 is widespread in the bird population, and there is a risk of its transmission to humans, therefore, it is necessary to develop an effective vaccine to prevent virus spread. The aim of the work was to develop prototypes of DNA vaccines encoding modified variants of the hemagglutinin trimer of highly pathogenic avian influenza A virus (H5N8) and its fragment (stem) and to study their immunogenic properties. **Material and methods.** DNA constructs were designed, produced and purified, their expression was analyzed in eukaryotic cells using reverse transcription PCR and Western blot analysis. Laboratory animals (Syrian hamsters) were immunized with experimental DNA vaccines using the jet injection method, the antibody titer in their sera was determined using ELISA. The sera were also tested in the virus neutralization reaction in MDCK cell culture. **Results and discussion.** Expression of target genes in experimental DNA vaccines was confirmed at the transcription and translation levels. Immunogenicity analysis showed that immunization of Syrian hamsters with pVAX-H5 and pVAX-H5 delT4 constructs encoding hemagglutinin ectodomain variants with and without the fibrin trimerizing domain of bacteriophage T4 using jet injection resulted in the formation of specific antibodies (average titer 1.3×10^4 and 1.5×10^3 , respectively) with virus-neutralizing activity (average 50 % neutralizing titer 1:40). At the same time, specific antibodies were not detected in the group of animals immunized with the DNA vaccine encoding the hemagglutinin stalk. **Conclusions.** In the course of the work, DNA vaccines encoding variants of the hemagglutinin trimer of the influenza virus subtype A (H5N8) and its fragment (stem) were designed and obtained. A comparison of the immunogenicity of experimental DNA vaccines was conducted and the most promising variant of the design – pVAX-H5, encoding a modified trimer of the hemagglutinin of the influenza virus with a trimerizing domain of the fibrin of the bacteriophage T4 – was established.

Key words: DNA vaccines, influenza A virus (H5N8), jet injection, immunogenicity, ELISA, virus neutralization.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Financing. The study was conducted under the state assignment of FBRI SRC VB "Vector" of Rospotrebnadzor.

Correspondence author. Litvinova V.R., e-mail: viktoriya_litvinova_1999@mail.ru

Citation. Litvinova V.R., Rudometova N.B., Kisakova L.A., Kisakov D.N., Yakovlev V.A., Tigeeva E.V., Borgoyakova M.B., Ivanova K.I., Marchenko V.Yu., Ilyicheva T.N., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Ilyichev A.A. Immunogenicity of experimental DNA vaccines encoding hemagglutinin and hemagglutinin stalk of influenza A (H5N8) virus. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2025;45(1):100–108. [In Russian]. doi: 10.18699/SSMJ20250111

Введение

Вирусы гриппа А относятся к семейству Orthomyxoviridae и характеризуются одноцепочечным РНК-геномом негативной полярности, состоящим из восьми сегментов [1]. До 1997 г. считалось, что вирусы птичьего гриппа А подтипа Н5 не передаются непосредственно человеку, поскольку не связываются с рецептором сиаловой кислоты- $\alpha 2,6$ -галактозы человека с высокой аффинностью. Однако в 1997 г. в Гонконге впервые зарегистрировано 18 случаев респираторных

заболеваний у людей (из них шесть – со смертельным исходом), которые были вызваны высокопатогенными вирусами птичьего гриппа подтипа А (H5N1). С тех пор ВОЗ подтвердила более 900 случаев инфицирования человека и более 400 смертей (летальность ~ 49 %) [2]. В частности, с 2020 по 2022 г. зарегистрировано шесть случаев заражения людей вирусом гриппа H5 2.3.4.4b, в том числе один смертельный исход [3]. В марте 2024 г. в США зафиксированы случаи инфицирования крупного рогатого скота вирусом гриппа А

(H5N1) [4]. Некоторые реассортантные вирусы H5 с разными подтипами NA (например, H5N2, H5N8 и H5N6), которые произошли от одного и того же вируса H5N1, недавно появились в Китае и распространились в другие страны Евразии и Северной Америки. Так, в начале декабря 2020 г. в России впервые выявлены случаи заражения людей вирусом А (H5N8) [5]. Хотя сообщений об устойчивой передаче вируса от человека к человеку не поступало, показано, что лишь нескольких аминокислотных замен (например, замены Gln на Leu в позиции 226 в гемагглютанине [6]) достаточно для того, чтобы вирусы линии А/Н5 стали передаваться воздушно-капельным путем между млекопитающими [7].

Постоянно появляющиеся новые штаммы вируса гриппа усиливают потребность в усовершенствовании вакцинных технологий, которые будут обеспечивать эффективный иммунный ответ и иметь возможность организации быстрого и масштабируемого производства. В настоящее время одобренные Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (Food and Drug Administration, FDA) и лицензированные цельновирусные и живые аттенуированные вакцины против вирусов гриппа А человека в основном производятся на куриных эмбрионах, и процесс может длиться до девяти месяцев [8]. Один из новых подходов – создание вакцин на основе нуклеиновых кислот. Они обладают такими характеристиками, как неинфекционность, отсутствие антивекторного иммунного ответа, способность индуцировать гуморальный и клеточный иммунные ответы. Производство таких вакцин является однотипным, быстрым и масштабируемым [9]. Эти преимущества делают их перспективными для разработки вакцин против гриппа. Для повышения иммуногенности ДНК-вакцин используют различные методы доставки, например физические (электропорация, генная пушка, микроиглы, струйная инъекция) и химические (липосомы, дендримеры и др.). К перспективным относится метод транспортировки с помощью струйной инъекции с использованием индивидуальных насадок. ДНК-вакцины, доставленные таким способом, обладают высокой иммуногенностью и вызывают минимальные побочные эффекты [10].

Гемагглютинин является одним из основных компонентов вакцин против гриппа, поскольку именно он индуцирует образование нейтрализующих антител, которые обеспечивают формирование защитного иммунного ответа. Разработка универсальной вакцины, способной вызывать иммунный ответ против широкого спектра штаммов вируса гриппа, также очень актуальна. Фраг-

мент гемагглютинина вируса гриппа – стебель – представляет собой перспективную мишень для разработки такой вакцины, поскольку содержит консервативные эпитопы, способные индуцировать антитела и цитотоксические Т-лимфоциты к широкому спектру подтипов вируса гриппа [11–13].

В настоящей работе представлены данные о разработке прототипов ДНК-вакцин, кодирующих модифицированный гемагглютинин высокопатогенного гриппа птиц А (H5N8) и его фрагмент (стебель) и результаты исследования их иммуногенных свойств.

Материал и методы

Штаммы бактерий, культуры клеток, плазмиды

Для наработки плазмидной ДНК использовали штамм *E. coli* Stbl3 (F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ) M15 zcf::Tn10 (TetR) Δ(ara-leu) 7697 araD139 fhuA ΔlacX74 galK16 galE15 e14- Φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC)), полученный из коллекции ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии (ГНЦ ВБ) «Вектор» Роспотребнадзора. В реакции вируснейтрализации использовали штамм вируса гриппа А/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (EPI_ISL_1114749), выделенный в отделе зоонозных инфекций и гриппа ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, и культуру клеток MDCK (Коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). Для анализа экспрессии генов использовали культуру клеток HEK293 (коллекция культур клеток ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора).

Получение плазмид pVAX-H5, pVAX-H5 delT4 и pVAX-H5 steb1

Дизайн нуклеотидной последовательности, кодирующей гемагглютинин вируса гриппа А (H5N8), осуществляли на основе природного гена гемагглютинина (A/turkey/Stavropol/320-01/2020 EPI_ISL_1114749). Последовательность, кодирующая стабилизированный белок гемагглютинина, синтезирована в коммерческой компании «ДНК-Синтез» (Россия). На ее основе получали следующие варианты генов, кодирующие модифицированные тримеры гемагглютинина А (H5N8) с тримеризующим доменом фибритина бактериофага Т4 и без него и стебель гемагглютинина А (H5N8) с тримеризующим доменом фибритина бактериофага Т4. Полученные гены клонировали в составе вектора pVAX1 (Thermo Fisher Scientific, США) с помощью эндонуклеаз рестрикции AsuNI, BglII и CciNI (SibEnzyme,

Россия), структуры рекомбинантных плазмид подтверждены секвенированием по методу Сэнгера и рестрикционным анализом. Препараты ДНК-вакцин наработаны и очищены с помощью набора EndoFree Plasmid Giga Kit (Qiagen, ФРГ) в соответствии с рекомендациями производителя и растворены в 0,9%-м растворе NaCl.

Трансфекция клеточной линии HEK293 и обратная транскрипция, совмещенная с ПЦР (ОТ-ПЦР)

Клетки линии HEK293 трансфицировали рекомбинантными плазмидами pVAX-H5, pVAX-H5 stebl, pVAX-H5 delT4 с использованием липофектамина (Lipofectamin 3000, Thermo Fisher Scientific, США), через 48 ч центрифугирования культуральную среду отбирали и замораживали. Клеточный осадок суспендировали в PBS и выделяли общий пул РНК с использованием реагента «ЛИРА» (Биолабмикс, Россия). Выделенные образцы РНК обрабатывали ДНКазой (Thermo Fisher Scientific) и хранили при -80°C . Реакцию ОТ проводили с использованием синтезированных фирмой «Биоссет» (Россия) праймеров (таблица) для получения кДНК генов, кодирующих гемагглютинин вируса гриппа А (H5N8) и стебель гемагглютинина вируса гриппа, с помощью набора БиоМастер ОТ-ПЦР-Экстра (2×) (Биолабмикс). Продукты амплификации анализировали с помощью электрофореза в 1%-м агарозном геле.

Вестерн-блот-анализ культуральной среды после трансфекции клеточной линии HEK293 рекомбинантными плазмидами pVAX-H5, pVAX-H5 stebl, pVAX-H5 delT4

Вестерн-блот-анализ проводили с использованием системы SNAP i.d. 2.0 (Millipore, США). В качестве первичных антител использовали сыворотку хорька, иммунизированного инактивированным вирусом гриппа А (H5N8) (разведение 1:200), в качестве вторичных антител – мышиные анти-хорьковые иммуноглобулины (разведение 1:3000) (ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора). После вторичных антител добавляли козы анти-мышинные IgG, конъюгированные со щелочной фосфатазой (1:5000) (Sigma-Aldrich, США). Визуализацию иммунного комплекса осуществляли субстратом 1-Step™ NBT/BCIP (Thermo Fisher Scientific).

Иммунизация сирийских хомяков прототипами ДНК-вакцин с помощью струйной инъекции

Работа с животными проводилась в соответствии с «Руководством по уходу и использованию

Праймеры, использованные для проведения ОТ-ПЦР

Primers used for RT-PCR

Название праймера	Нуклеотидная последовательность (5'-3')
F-pVAX Uni	TCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAG
R-pVAX Uni	CTGGCAACTAGAAGGCACAG

лабораторных животных», с соблюдением принципов гуманности в соответствии с протоколами, утвержденными Биоэтическим комитетом ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» (номер разрешения: НЦ ВБ «Вектор» 1/ 21.03.2023).

В работе использовали самцов сирийских хомяков массой 140 г в возрасте 4–6 недель. Препараты ДНК-вакцин pVAX-H5, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 delT4, а также плазмиду pHMGFP (использованную в качестве отрицательного контроля), растворенные в 50 мкл 0,9%-го раствора NaCl, вводили в заднюю бедренную мышцу методом струйной инъекции с помощью инжектора Comfort-IN (Mika Medical Co., Австралия). Для обезболивания применяли ингаляционный наркоз (RWD) с 2,5%-м изофлураном. Животные были разделены на пять групп по 6 голов в каждой: 1-й группе вводили 100 мкг pVAX-H5 stebl, 2-й группе – 100 мкг pVAX-H5 delT4, 3-й группе – 100 мкг pVAX-H5, 4-й – 100 мкг pHMGFP, 5-я группа состояла из интактных животных. Иммунизацию проводили 3 раза с интервалом в 4–5 недель. Через 14 дней после третьей иммунизации забирали кровь из ретроорбитального синуса.

ИФА

ИФА проводили по методике, описанной в работе М.Б. Боргояковой и соавт. [14]. В качестве антигена использовали рекомбинантный гемагглютинин вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) [15], в качестве первичных антител – сыворотки иммунных животных (разведение от 1:10), в качестве вторичных антител – козы антитела против IgG хомяка, конъюгированные с пероксидазой хрена (Invitrogen, США). В качестве хромогенного субстрата использовали раствор тетраметилбензидина (ИМТЭК, Россия). Реакцию останавливали 1N раствором соляной кислоты. Оптическую плотность измеряли на анализаторе Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific) при длине волны 450 нм. Конечный титр определяли по последнему разведенному образцу, давшему положительные результаты на ИФА.

Анализ вируснейтрализующей активности иммунных сывороток

Перед анализом сыворотку животных обрабатывали ферментом, разрушающим рецепторы (RDE, Denka Seiken, Япония), и инактивировали нагреванием перед анализом. Стандартизированный вирус содержал 200 TCID₅₀/200 мкл поддерживающей среды (культуральная среда DMEM с GlutaMAX™-I; 0,2 % альбумина бычьего; 80 мкг/мл реагента «антибиотик-антимикотик» (Gibco, Thermo Fisher Scientific); трипсин TPCK (Sigma-Aldrich) 2 мкг/мл). Готовили двойные разведения сыворотки крови в 200 мкл поддерживающей среды, затем в каждую пробирку добавляли по 200 мкл стандартизированных вирусов и инкубировали в течение 1 ч при 37 °C, 5 % CO₂; в качестве контроля использовали сыворотку неиммунных хомяков. После этого 200 мкл суспензии переносили в лунки 96-луночного планшета с культурой клеток MDCK-SIAT1, инкубировали в течение 48 ч при 37 °C, 5 % CO₂, окрашивали раствором кристаллического фиолетового и анализировали с помощью многорежимного считывателя клеток Agilent BioTek Cytation 5 (Thermo Fisher Scientific). Титр сыворотки в тесте на нейтрализацию вируса равен разведению сыворотки, при котором остается 50 % живых клеток. В контроле оставалось не более 5 % живых клеток.

Непрерывные переменные представлены в виде среднего арифметического и ошибки стандартного отклонения ($M \pm SD$). Различия между группами оценивали с помощью критерия Стьюдента, статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Получение экспериментальных ДНК-вакцин, кодирующих гемагглютинин вируса гриппа и его фрагмент (стебель)

Гемагглютинин вируса гриппа является основным компонентом современных противогриппозных вакцин [16, 17]. В данной работе за основу был взят вирус гриппа птиц А (H5N8), циркулировавший в Ставропольском крае в 2020 г., в его последовательность были внесены замены для стабилизации конформации. Для более эффективного формирования гомотримеров гемагглютинина и повышения иммуногенности антигена к последовательности был добавлен тримеризующий домен фибритина бактериофага Т4. Более подробно дизайн иммуногена, названного H5, описан в нашей работе [18]. На его основе также были получены последовательности, несущие модифицированный тример гемагглютинина вируса гриппа А (H5N8) без тримеризующего доме-

на (H5 delT4) и стебель гемагглютинина вируса гриппа А (H5N8) с тримеризующим доменом (H5 stebl). Далее последовательности H5, H5 stebl и H5 delT4 клонировали в составе вектора pVAX1. Так были получены плазмиды pVAX-H5 (кодирует модифицированный тример гемагглютинина А (H5N8) с тримеризующим доменом фибритина бактериофага Т4), pVAX-H5 delT4 (кодирует модифицированный тример гемагглютинина А (H5N8)) и pVAX-H5 stebl (кодирует модифицированный стебель гемагглютинина А (H5N8) с тримеризующим доменом фибритина бактериофага Т4).

Исследование экспрессии целевых генов в составе ДНК-вакцин с помощью ОТ-ПЦР и вестерн-блот-анализа

Экспрессию целевых генов в составе плазмид pVAX-H5, pVAX-H5 stebl, pVAX-H5 delT4 анализировали с помощью ОТ-ПЦР и вестерн-блот-анализа. Результаты ОТ-ПЦР, представленные на электрофореграмме (рис. 1, а) показывают, что размеры амплифицированных фрагментов соответствуют размерам спроектированных генов. Для анализа экспрессии генов на уровне продукции целевого белка проводили вестерн-блоттинг культуральной среды с использованием сыворотки хорька, иммунизированного вирусом гриппа А (H5N8), который показал наличие целевого белкового продукта в культуральной среде для конструкций pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 (рис. 1, б) и его отсутствие для конструкции pVAX-H5 stebl, что может быть связано с низкой эффективностью выхода белка из клетки. Таким образом, установлено, что конструкции pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 обеспечивают синтез целевых мРНК и белков в эукариотических клетках.

Анализ иммуногенности экспериментальных ДНК-вакцин и вируснейтрализующей активности иммунных сывороток

В настоящее время основными модельными животными для оценки эффективности вакцин против гриппа служат мыши и хорьки [19]. Однако сирийские хомяки являются хорошей дополнительной моделью ввиду восприимчивости к естественным изолятам вируса гриппа и большего удобства в работе и содержании по сравнению с хорьками [20, 21]. Поэтому в данном исследовании было решено использовать их как один из вариантов модельных животных перед тем как тестировать иммуногенность конструкций на более крупных моделях, таких как хорьки. Для сравнения иммуногенности полученных экспериментальных ДНК-вакцин выполнена трехкратная иммунизация сирийских хомяков полученными

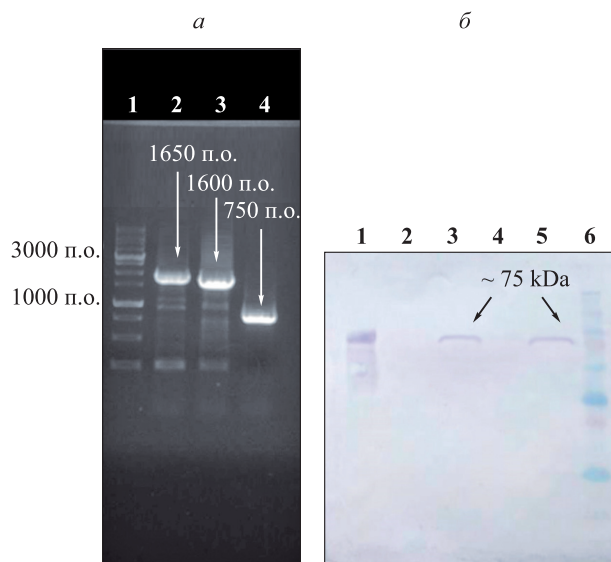


Рис. 1. Результаты ОТ-ПЦР (а): 1 – маркер M12 (SibEnzyme), 2, 3, 4 – использование в качестве матрицы тотальной РНК pVAX-H5, pVAX-H5 delT4 и pVAX-H5 stebl соответственно; анализ продукции целевых белков с помощью вестерн-блоттинга (б): 1 – рекомбинантный гемагглютинин HA/H5 вируса гриппа А (H5N8) (K+) [15], 2 – культуральная среда, собранная с нетрансфицированных клеток HEK293, 3, 4, 5 – культуральная среда, собранная с клеток HEK293, трансфицированных плазмидой pVAX-H5 delT4, pVAX-H5 stebl и pVAX-H5 соответственно, 6 – маркер молекулярных масс Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, США)

Fig. 1. RT PCR results (a): 1 – M12 marker (SibEnzyme), 2, 3, 4 – using of pVAX-H5, pVAX-H5 delT4 and pVAX-H5 stebl total RNA as a template, respectively; analysis of target protein production in HEK293 cells using Western blotting (b): 1 – recombinant hemagglutinin HA/H5 of influenza A virus (H5N8) (K+) [15], 2 – culture medium collected from untransfected HEK293 cells, 3 – culture medium collected from HEK293 cells transfected with pVAX-H5 delT4, pVAX-H5 stebl and pVAX-H5 plasmid, respectively, 6 – molecular weight marker Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad, USA)

ДНК-конструкциями с помощью струйной инъекции. Титры специфических антител выявлены в группах животных, иммунизированных pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 (1.3×10^4 и 1.5×10^3 соответственно) (рис. 2, а), наиболее иммуногенной оказалась конструкция pVAX-H5, несущая гемагглютинин вируса гриппа А (H5N8) с тримеризующим доменом. Таким образом, показано, что экспериментальные ДНК-вакцины pVAX-H5

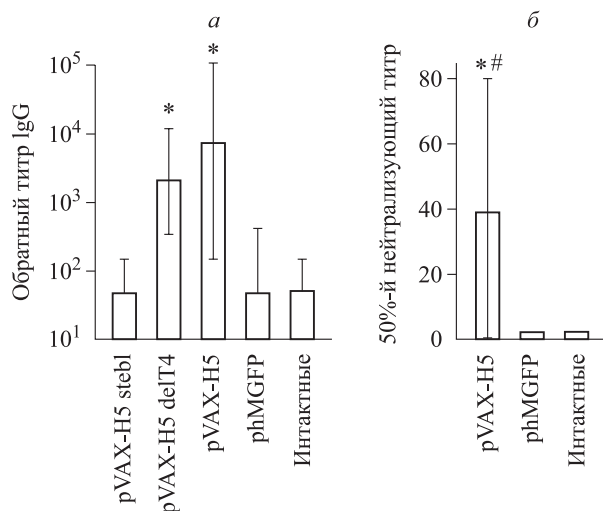


Рис. 2. Результаты ИФА по оценке иммуногенности ДНК-конструкций, кодирующих гемагглютинин вируса гриппа и его фрагменты (а), и вирус-нейтрализующая активность иммунных сывороток в отношении вируса гриппа A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (б); обозначены статистически значимые ($p < 0,05$) отличия от величин соответствующих показателей: * – intactных животных, # – животных, иммунизированных ДНК-конструкцией pHMGFP

Fig. 2. Results of ELISA for assessing the immunogenicity of DNA constructs encoding influenza virus hemagglutinin and its fragments (a), and virus-neutralizing activity of immune sera against the influenza virus A/turkey/Stavropol/320-01/2020 (H5N8) (b); * $p < 0,05$ compared to intact animals, # $p < 0,05$ compared to animals immunized with DNA construct pHMGFP

и pVAX-H5 delT4 индуцируют формирование вирус-специфического гуморального ответа у иммунизированных животных.

В группе животных, иммунизированных конструкцией pVAX-H5 stebl, специфические антитела не выявлены. Согласно результатам вестерн-блоттинга (см. рис. 1, б), целевой белковый продукт для конструкции pVAX-H5 stebl выходит из клетки с низкой эффективностью, что могло препятствовать формированию гуморального иммунного ответа на данную конструкцию. Также есть данные, показывающие, что удаление домена HA1 из последовательности гемагглютинина может приводить к неправильной конформации целевого иммуногена и требовать дополнительной оптимизации нуклеотидной последовательности [22]. Таким образом, дальнейшие исследования будут направлены на оптимизацию последова-

тельности стебля гемагглютинаина для стабилизации конформации иммуногена и для более эффективной презентации иммунной системы.

Для конструкции pVAX-H5, обладающей, по результатам ИФА, наибольшей иммуногенностью (см. рис. 2, а), далее было решено провести анализ вируснейтрализующей активности. Сыворотки хомяков, иммунизированных конструкцией pVAX-H5, исследовали в реакции вируснейтрализации на культуре клеток MDCK. В качестве контроля анализ также проводили с сыворотками крови животных, иммунизированных pHMGFP. Установлено, что только сыворотки животных, иммунизированных ДНК-вакциной pVAX-H5, способны нейтрализовать живой вирус гриппа штамм A/turkey/Stavropol/320-01/2020, средний 50%-й нейтрализующий титр составил 1:40 (рис. 2, б). Иммуногенные и протективные свойства конструкции pVAX-H5 были также изучены на модели мышей линии BALB/c в работе [18].

Заключение

В ходе работы спроектировано и получено несколько вариантов ДНК-вакцин, кодирующих модифицированные варианты тримера гемагглютинаина вируса гриппа подтипа А (H5N8) и его фрагмент (стебель). Показано, что полученные конструкции pVAX-H5 и pVAX-H5 delT4 обеспечивают синтез целевых мРНК и белков в эукариотических клетках. Установлено, что разработанные ДНК-вакцины (pVAX-H5, pVAX-H5 delT4) индуцируют формирование вирус-специфического гуморального ответа у животных, иммунизированных с помощью струйной инъекции (средние титры в ИФА составили $1:3 \times 10^4$ и $1:5 \times 10^3$ соответственно), наиболее иммуногенна конструкция pVAX-H5, несущая модифицированный тример гемагглютинаина вируса гриппа А (H5N8) с тримеризующим доменом. Показано, что специфические к гемагглютинуину антитела в сыворотках животных, иммунизированных экспериментальной ДНК-вакциной pVAX-H5, обладают вируснейтрализующей активностью (средний 50%-й нейтрализующий титр составил 1:40). Данный вариант ДНК-вакцины является перспективным для дальнейших исследований.

Список литературы / References

1. Gao F., Liu X., Dang Y., Duan P., Xu W., Zhang X., Wang S., Luo J., Li X. AddaVax-adjuvanted H5N8 inactivated vaccine induces robust humoral immune response against different clades of H5 viruses. *Vaccines (Basel)*. 2022;10(10):1683. doi: 10.3390/vaccines10101683
2. WHO. Avian influenza weekly update number 977. Human infection with avian influenza A(H5) viruses. Available at: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai_20241213.pdf
3. WHO. Assessment of risk associated with recent influenza A(H5N1) clade 2.3.4.4b viruses 21 December 2022. Available at: https://cdn.who.int/media/docs/default-source/influenza/avian-and-other-zoonotic-influenza/h5-risk-assessment-dec-2022.pdf?sfvrsn=a496333a_1&download=true
4. Eisfeld A.J., Biswas A., Guan L., Gu C., Mae-mura T., Trifkovic S., Wang T., Babujee L., Dahn R., Halfmann P.J., ... Kawaoka Y. Pathogenicity and transmissibility of bovine H5N1 influenza virus. *Nature*. 2024;633(8029):426–432. doi: 10.1038/s41586-024-07766-6
5. Жирнов О.П., Львов Д.К. Птичий грипп: «По ком звонит колокол?». *Вопр. вирусол.* 2024;69(2):101–118. doi: 10.36233/10.36233/0507-4088-213
6. Zhirnov O.P., Lvov D.K. Avian flu: «For whom the bell tolls»? *Voprosy virusologii = Problems of Virology*. 2024;69(2):101–118. [In Russian]. doi: 10.36233/10.36233/0507-4088-213
7. Xiong X., Xiao H., Martin S.R., Coombs P.J., Liu J., Collins P.J., Vachieri S.G., Walker P.A., Lin Y.P., McCauley J.W., Gamblin S.J., Skehel J.J. Enhanced human receptor binding by H5 haemagglutinins. *Virology*. 2014;456-457(100):179–187. doi: 10.1016/j.virol.2014.03.008
8. Kok A., Fouchier R.A.M., Richard M. Cross-reactivity conferred by homologous and heterologous prime-boost A/H5 influenza vaccination strategies in humans: a literature review. *Vaccines*. 2021;9(12):1465. doi: 10.3390/vaccines9121465
9. Furuyama W., Reynolds P., Haddock E., Meade-White K., Quynh Le M., Kawaoka Y., Feldmann H., Marzi A. A single dose of a vesicular stomatitis virus-based influenza vaccine confers rapid protection against H5 viruses from different clades. *NPJ Vaccines*. 2020;5(1):4. doi: 10.1038/s41541-019-0155-z
10. Litvinova V.R., Rudometov A.P., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. mRNA vaccine platform: mRNA production and delivery. *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2023;49(2): 220–235. doi: 10.1134/S1068162023020152
11. Ledesma-Feliciano C., Chapman R., Hooper J.W., Elma K., Zehrung D., Brennan M.B., Spiegel E.K. Improved DNA vaccine delivery with needle-free injection systems. *Vaccines*. 2023;11(2):280. doi: 10.3390/vaccines11020280
12. Bazhan S., Antonets D., Starostina E., Ilyicheva T., Kaplina O., Marchenko V., Durymanov A., Oreshkova S., Karpenko L. Immunogenicity and protective efficacy of influenza a dna vaccines encoding artificial antigens based on conservative hemagglutinin stem region and M2 protein in mice. *Vaccines (Basel)*. 2020;8(3):448. doi: 10.3390/vaccines8030448

12. Fukuyama H., Shinnakasu R., Kurosaki T. Influenza vaccination strategies targeting the hemagglutinin stem region. *Immunol. Rev.* 2020;296(1):132–141. doi: 10.1111/immr.12887
13. Cui X., Vervaeke P., Gao Y., Opsomer L., Sun Q., Snoeck J., Devriendt B., Zhong Z., Sanders N.N. Immunogenicity and biodistribution of lipid nanoparticle formulated self-amplifying mRNA vaccines against H5 avian influenza. *NPJ Vaccines.* 2024;9(1):138. doi: 10.1038/s41541-024-00932-x
14. Borgoyakova M.B., Karpenko L.I., Rudometov A.P., Volosnikova E.A., Merkuleva I.A., Starostina E.V., Zadorozhny A.M., Isaeva A.A., Nesmeyanova V.S., Shanshin D.V., ... Ilyichev A.A. Self-assembled particles combining SARS-CoV-2 RBD protein and RBD DNA vaccine induce synergistic enhancement of the humoral response in mice. *Int. J. Mol. Sci.* 2022;23(4):2188. doi: 10.3390/ijms23042188
15. Rudometova N.B., Fando A.A., Kisakova L.A., Kisakov D.N., Borgoyakova M.B., Litvinova V.R., Yakovlev V.A., Tigeeva E.V., Vahitov D.I., Sharabrin S.V., ... Karpenko L.I. Immunogenic and protective properties of recombinant hemagglutinin of influenza A (H5N8) virus. *Vaccines.* 2024;12(2):143. doi: 10.3390/vaccines12020143
16. Milder F.J., Jongeneelen M., Ritschel T., Bouchier P., Bisschop I.J.M., de Man M., Veldman D., Le L., Kaufmann B., Bakkers M.J.G., ... Langedijk J.P.M. Universal stabilization of the influenza hemagglutinin by structure-based redesign of the pH switch regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2022;119(6):e2115379119. doi: 10.1073/pnas.2115379119
17. Catani J.P.P., Job E.R., Ysenbaert T., Smet A., Ray S., LaRue L., Stegalkina S., Barro M., Vogel T.U., Saelens X. Pre-existing antibodies directed against a tetramerizing domain enhance the immune response against artificially stabilized soluble tetrameric influenza neuraminidase. *NPJ Vaccines.* 2022;7(1):11. doi: 10.1038/s41541-022-00435-7
18. Litvinova V.R., Rudometov A.P., Rudometova N.B., Kisakov D.N., Borgoyakova M.B., Kisakova L.A., Starostina E.V., Fando A.A., Yakovlev V.A., Tigeeva E.V., ... Karpenko L.I. DNA vaccine encoding a modified hemagglutinin trimer of avian influenza A virus H5N8 protects mice from viral challenge. *Vaccines (Basel).* 2024;12(5):538. doi: 10.3390/vaccines12050538
19. Nguyen T.Q., Rollon R., Choi Y.K. Animal models for influenza research: strengths and weaknesses. *Viruses.* 2021;13(6):1011. doi: 10.3390/v13061011
20. Iwatsuki-Horimoto K., Nakajima N., Ichiko Y., Sakai-Tagawa Y., Noda T., Hasegawa H., Kawaoka Y. Syrian hamster as an animal model for the study of human influenza virus infection. *J. Virol.* 2018;92(4):e01693–17. doi: 10.1128/JVI.01693-17
21. Hoxie I., Vasilev K., Clark J.J., Bushfield K., Francis B., Loganathan M., Campbell J.D., Yu D., Guan L., Gu C. ... Krammer F. A recombinant N2 neuraminidase-based CpG 1018® adjuvanted vaccine provides protection against challenge with heterologous influenza viruses in mice and hamsters. *Vaccine.* 2024;42(24):126269. doi: 10.1016/j.vaccine.2024.126269
22. de Jong N.M.C., Aartse A., van Gils M.J., Eggink D. Development of broadly reactive influenza vaccines by targeting the conserved regions of the hemagglutinin stem and head domains. *Expert. Rev. Vaccines.* 2020;19(6):563–577. doi: 10.1080/14760584.2020.1777861

Сведения об авторах:

Литвинова Виктория Руслановна, ORCID: 0009-0003-6524-3222, e-mail: viktoriya_litvinova_1999@mail.ru
 Рудомётова Надежда Борисовна, к.б.н., ORCID: 0000-0002-1684-9071, e-mail: andreeva_nb@vector.nsc.ru
 Кисакова Любовь Александровна, ORCID: 0000-0001-7214-1855, e-mail: orlova_la@vector.nsc.ru
 Кисаков Денис Николаевич, ORCID: 0000-0003-4889-6865, e-mail: def_2003@mail.ru
 Яковлев Владимир Андреевич, ORCID: 0009-0009-4563-2099, e-mail: yakovlev_va@vector.nsc.ru
 Тигеева Елена Витальевна, ORCID: 0009-0001-5203-2130, e-mail: tigeeva_ev@vector.nsc.ru
 Боргоякова Мария Борисовна, к.б.н., ORCID: 0000-0002-0768-1561, e-mail: borgoyakova_mb@vector.nsc.ru
 Иванова Ксения Ивановна, ORCID: 0009-0002-3191-1360, e-mail: ivanova_ki@vector.nsc.ru
 Марченко Василий Юрьевич, д.б.н., ORCID: 0000-0002-1339-6732, e-mail: marchenko_vyu@vector.nsc.ru
 Ильичева Татьяна Николаевна, д.б.н., ORCID: 0000-0002-2354-7688, e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru
 Карпенко Лариса Ивановна, д.б.н., ORCID: 0000-0003-4365-8809, e-mail: karpenko@vector.nsc.ru
 Рудомётов Андрей Павлович, к.б.н., ORCID: 0000-0003-2808-4309, e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru
 Ильичёв Александр Алексеевич, д.б.н., проф., ORCID: 0000-0001-5356-0843, e-mail: ilyichev@vector.nsc.ru

Information about the authors:

Victoria R. Litvinova, ORCID: 0009-0003-6524-3222, e-mail: viktoriya_litvinova_1999@mail.ru

Nadezhda B. Rudometova, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-1684-9071,
e-mail: andreeva_nb@vector.nsc.ru

Lyubov A. Kisakova, ORCID: 0000-0001-7214-1855, e-mail: orlova_la@vector.nsc.ru

Denis N. Kisakov, ORCID: 0000-0003-4889-6865, e-mail: def_2003@mail.ru

Vladimir A. Yakovlev, ORCID: 0009-0009-4563-2099, e-mail: yakovlev_va@vector.nsc.ru

Elena V. Tigeeva, ORCID: 0009-0001-5203-2130, e-mail: tigeeva_ev@vector.nsc.ru

Mariya B. Borgoyakova, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-0768-1561,
e-mail: borgoyakova_mb@vector.nsc.ru

Ksenia I. Ivanova, ORCID: 0009-0002-3191-1360, e-mail: ivanova_ki@vector.nsc.ru

Vasiliy Yu. Marchenko, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0002-1339-6732,
e-mail: marchenko_vyu@vector.nsc.ru

Tatyana N. Ilyicheva, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0002-2354-7688, e-mail: ilicheva_tn@vector.nsc.ru

Larisa I. Karpenko, doctor of biological sciences, ORCID: 0000-0003-4365-8809, e-mail: karpenko@vector.nsc.ru

Andrey P. Rudometov, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-2808-4309,
e-mail: rudometov_ap@vector.nsc.ru

Alexandr A. Ilyichev, doctor of biological sciences, professor, ORCID: 0000-0001-5356-0843,
e-mail: ilyichev@vector.nsc.ru

Поступила в редакцию 16.09.2024

После доработки 07.12.2024

Принята к публикации 13.01.2025

Received 16.09.2024

Revision received 07.12.2024

Accepted 13.01.2025